

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

TESE DE DOUTORADO

Autora: **Isadora D'Ávila Tassinari**

Orientador: **Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga**

Coorientadora: **Profa. Dra. Ana Helena Paz**

**PAPEL NEUROPROTETOR DO LACTATO EM CONDIÇÕES
HIPÓXICO-ISQUÊMICAS**

Porto Alegre, maio de 2024

CIP - Catalogação na Publicação

Tassinari, Isadora Davila
PAPEL NEUROPROTETOR DO LACTATO EM CONDIÇÕES
HIPÓXICO-ISQUÊMICAS / Isadora Davila Tassinari. --
2024.

142 f.

Orientadora: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Ana Helena Paz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Neurociência. 2. Metabolismo. 3. Lactato. I. de
Fraga, Luciano Stürmer, orient. II. Paz, Ana Helena,
coorient. III. Título.

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

Isadora D'Ávila Tassinari

**PAPEL NEUROPROTETOR DO LACTATO EM CONDIÇÕES
HIPÓXICO-ISQUÊMICAS**

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

Orientador: **Prof. Dr. Luciano Stürmer de Fraga**

Coorientadora: **Profa. Dra. Ana Helena Paz**

Porto Alegre, maio de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilhian Leipnitz (*relator*)

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Carmem Juracy Silveira Gottfried

Departamento de Bioquímica

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Márcia Giovenardi

Departamento de Ciências Básicas da Saúde

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

SUPLENTE

Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dedico essa tese à minha mãe, Tatiana D'Ávila, que me ensinou o valor e a importância do conhecimento, da educação, da ciência; constantemente fomenta e estimula o quão alto eu posso voar.

AGRADECIMENTOS

Os últimos 4 anos deram origem a essa Tese de doutorado, cuja concretização, hoje, só é possível graças ao apoio imprescindível das pessoas que tenho ao meu redor.

Meu primeiro agradecimento é para a pessoa que incentiva e apoia, diariamente, todos os meus sonhos, quaisquer que sejam eles: minha mãe, Tatiana de Oliveira D'Ávila. Tu és meu exemplo de pessoa, de ser humano, de justiça, de força, de carinho, de profissionalismo, de vida. Se um dia eu for a metade de mulher que tu és, já me dou por satisfeita! Eu só aprendi a ter coragem nessa vida pela tua confiança em mim, sou eternamente grata por ter me colocado nesse mundo e por ter me ensinado os valores que hoje são por onde eu vivo minha vida. Obrigada por me estimular a lutar todos os dias para que todas as mulheres entendam que o lugar delas é onde elas quiserem; por ter me ensinado desde cedo a importância do feminismo e da necessidade de ocuparmos nosso espaço. Sei que herdaste isso da nossa Doutora, *in memoriam*, Cleonice de Oliveira D'Ávila, uma mulher que sempre foi a frente de seu tempo, sendo a primeira cirurgiã-plástica mulher do Rio Grande do Sul e que tive a honra de conviver e chamar de Vó até 2008.

Agradeço imensamente ao professor e orientador Luciano de Fraga; mirei em um orientador e ganhei um amigo para a vida toda. Tenho muito apreço pela relação que estabelecemos ao longo dos últimos 6 anos. Sem dúvidas tu acompanhou fases cruciais do crescimento não só profissional, mas pessoal. Além de escutar meus desabafos, investiu e confiou no meu potencial, sobretudo quando eu mesma não acreditei. Tua orientação, postura, confiança, clareza e disponibilidade foram centrais para a forma como contribuístes para minha formação. O que construímos tornou todo processo muito mais pleno e memorável. Que seja só o começo de uma parceria infinita. Estendo este agradecimento à tua família: Renata e Ceci. Professora e amiga Renata Padilha Guedes, obrigada por SEMPRE me escutar e aconselhar, por entender como eu lidava com minhas questões pessoais, por sempre me arrancar muitas e muitas risada. Obrigada pelas *poker nights*, *wine bottles*, e por sempre me incentivar e me colocar para cima! Tu és uma inspiração para mim.

Agradeço à Profa. Ana Helena Paz, minha coorientadora, que desde a graduação na PUCRS confiou em mim, me ajudou a entender que, com certeza, meu lugar é na pesquisa. Obrigada por todo incentivo e confiança!

À minha melhor amiga do Universo, Janaína Zang. Entrou como colega de laboratório e hoje é a minha irmã. Quando falam que amizades verdadeiras são aquelas que já tem 20-30 anos, mas na real isso é como eu vejo a gente no futuro. Tu apareceu há “apenas” 5 anos, mas viveu fases da minha vida comigo, acompanhou etapas que mesmo quem me conhece há 29 anos não vivenciou. Tu é a minha certeza nessa vida, tu é a certeza que quando tudo desmorona, vai estar ali comigo para juntar os cacos e construir de novo. Além de ser a minha pessoa, a pessoa que vive comigo, me conhece como ninguém. O Universo foi muito competente na hora que cruzou nosso caminho, que a nossa sintonia não mude jamais. Quero estar contigo em todas as etapas da tua vida, nas fases boas e nas ruins também, assim como te quero na minha. Nesse sentido, aproveito para agradecer por ter sido outra mãe do Boo no período que eu estive na Inglaterra. O Boo foi (e sempre será) o melhor cachorro do mundo. Ele foi tão perfeito até quando me esperou voltar para ir para o paraíso dos cachorrinhos tão logo completou seus 11 anos. Boo, obrigada por ter sido meu companheiro todo esse tempo; como já disse Mario Sergio Cortella: *“Morrer é ser esquecido, ou seja, enquanto você se fizer lembrar, não terá morrido. A única forma de ficar, é ficar nos outros”*. Sem dúvidas, tu estás eternizado em mim, em muitas pessoas ao nosso redor, no meu coração e tatuado na minha pele. Te amo, Bubuzi!

Agradeço ao meu melhor amigo e outra metade, Jeferson Jantsch, meu gêmeo, por ter transformado nosso elo em algo sem igual. Pela conexão absurda, por acreditar em mim e estar SEMPRE PRESENTE. À nossa parceria, ao nosso cotidiano juntos, além das riquíssimas discussões científicas e pela grande amizade que construímos. Espero que a gente continue sempre assim *por nós!*

Ao melhor amigo, Gabriel Schirmbeck, por todo companheirismo e toda ajuda ao longo desses 6 anos, por estar presente todo os dias, independente do nosso lugar no mundo. Tudo foi mais leve ao teu lado. Obrigada pela parceria, pelas risadas, pela grande amizade que temos, pelos inesquecíveis momentos que passamos juntos.

Um agradecimento especial ao Patrick Türck. Outra pessoa que me ensinou muito sobre mim mesma, me mostrou que amor genuíno é aquele que permanece e que pode ser ressignificado. Teu apoio constante, tua presença, carinho, preocupação e cuidado sempre fizeram parte da minha vida. Ainda, na reta final da Tese, não me deixou desacreditar do meu potencial.

Ao Nicolás Heller, que também iniciou com colaborador e hoje é meu melhor amigo, uma pessoa insubstituível, que me entende e me leva para os melhores *drinks*.

Além de sermos muito parecidos pessoal e profissionalmente, uma conexão marcante que eu não vivo sem.

Às irmãs que eu escolhi para a minha vida, mulheres excepcionais que têm toda a minha admiração: à Fernanda Rodrigues que realizou seu dourado sanduíche na mesma Universidade que eu na Inglaterra, pelo mesmo período. Já éramos amigas aqui, mas nos tornamos irmãs ao morarmos, estudarmos, fazermos experimentos e surtarmos juntas. Obrigada por tudo, minha Sis! Pelos “Engovs” surpresa na minha porta, pelos finais de semana de filme, pelas “*Cheeeewsdays Pints*”, por sempre me arrancar muita risada; à Milla Paim, que também conheci através da pesquisa e foi um “*match*” perfeito desde o começo. Parceira de treino, de risada, de choro, das mais elevadas reflexões e filosofadas; tu foi uma baita surpresa e que nossa sintonia se mantenha sempre crescendo; à Ana Spohr, melhor amiga de infância, por entender a minha ausência, por nossa amizade se manter forte e por sempre sermos alicerce uma da outra nos momentos mais difíceis; à minha primeira amiga quando cheguei em Porto Alegre em 2011, Stephanie Ilha, que é parceira, amiga, incentivadora e que me inspira com sua coragem há 13 anos; à “*sister*”, Marina Seady por, mesmo longe, não só cultivarmos, mas também fortalecermos nossa amizade. Obrigada por prontamente me atender (mesmo sendo pós-doc na *Mayo Clinic*) em qualquer hora do dia via *FaceTime* para desabafos rápidos.

À minha família: ao meu pai, Luciano Tassinari, pelo apoio e compreensão. Vamo, *Duracell!* Obrigada por ter me ensinado o valor do conhecimento e entender minhas ausências, que não foram poucas. Também, todo meu apreço à minha Madrasta, Judy, que cuidou e cuida tão bem do nosso Véio: por teu cuidado e tua presença, além do teu conforto para me deixar “tranquila” para conduzir os experimentos e o que eu precisava para produzir esta Tese; ao meu avô Sérgio D’Ávila e minha “Vó-drasta” Ana, que me incentivaram desde minha escolha de curso na Graduação, estiveram presentes quando eu mais precisei – amo vocês; à minha tia Kim e à minha prima Rosa que sempre torceram por mim; à minha vó, Solange, aos meus tios (Renata e Daniel), ao meu primo Enzo: obrigada por entenderem a minha ausência em alguns eventos importantes e pelo incentivo nessa caminhada.

Agradeço a todo grupo de pesquisa do professor Luciano, Laboratório de Neurobiologia e Metabolismo (NeuroMet Lab), vocês são a minha segunda casa; especialmente à aluna de Iniciação Científica (IC), Bianca Martins, por ter se envolvido prontamente nos nossos projetos tão logo assumiu a IC, ter “dado a cara a tapa” ao

explicar a “Lançadeira de Lactato” durante um seminário no primeiro mês no laboratório, sempre profissional e impecável, além de uma baita parceira; também, especialmente, ao aluno de IC, João Tauffer, por ter se tornado um grande amigo, por dividir comigo tantos momentos agradáveis e engraçados, ter me dado o ombro para eu chorar algumas consideráveis vezes, por ser uma pessoa leve e que traz alegria não só ao laboratório, mas à minha vida; ao doutorando Ricardo Nunes por todo apoio durante esses últimos 4 anos, pelo companheirismo nos experimentos, pelos jantares, por me deixar brincar na guitarra, pelos *drinks*, cantorias e por me ouvir sempre – especialmente os surtos.

À Profa. Dra. Nadja Schröder, que além de ser uma das pessoas mais sensíveis e bondosas que eu conheço, é uma grande inspiração como cientista, mãe, mulher, líder e amiga. No último ano também se tornou uma grande parceira de cafés, almoços, desabafos, reflexões. Aprendo demais contigo. Que também seja apenas o começo de uma parceria infinita!

Ao meu supervisor durante o doutorado sanduíche no exterior (*Lancaster University*), Dr. Victorio Bambini-Junior: não imaginávamos quão parecidos nós éramos em termos de entusiasmo e energia até convivermos. Obrigada por ter acreditado nas minhas ideias e por ter tornado um período crucial na minha vida -14 meses longe de casa - tão especial.

À pesquisadora Daniella Arêas Mendes-da-Cruz (IOC-Fiocruz), por ter sido uma mãezona mesmo antes de eu chegar na Inglaterra. És exemplo de mulher, mãe, amiga, pesquisadora – especialmente na bancada!

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto por sua disponibilidade e confiança desde o início deste projeto (2018) e por não medir esforços para que sigamos colaborando.

Aos membros da Banca Examinadora, os quais têm minha profunda admiração, por avaliarem a presente Tese. É uma honra que tenham aceitado participar desse momento tão importante e especial na minha trajetória acadêmica.

Aos colaboradores: Eduardo Sanches, por ter me ensinado a operar há 6 anos e por ter virado um grande amigo desde então; à Luz Elena, nossa aproximação nos últimos meses me fez muito bem, és um exemplo desde o começo pra mim; ao Cássio Loss (*Florida Atlantic University*) que, além de grande amigo, é também parceiro para reflexões científicas de horas pelo *FaceTime* mesmo com o fuso horário de outro planeta (Júpiter, Flórida, EUA); à Alessia Aguiar, UFMG, que passou uma semana no NeuroMet e já virou família.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, sempre muito solícitos e gentis. Ressalto agradecimento especial à enfermeira e chefe da Unidade, Marta Justina Giotti Cioato e às veterinárias Daniela Campagnol e Tuane Garcez: nada teria sido conduzido de forma tão leve sem a ajuda e o apoio de vocês!

À equipe do CREAL, pela ajuda com a entrega dos animais e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado-Sanduíche no exterior.

Às demais agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

ACKNOWLEDGMENTS

The following acknowledgments were written in English, referring to loved ones who are now in England or France.

To Vanessa Vulovic, thank you for being a great friend while I was in the UK the whole time and for storing my stuff when I spent two months in Brazil. To the undergraduate students Becky Everett and Will Newton, who helped me conduct my experiments at Lancaster University. They were great lab partners and always ready for a pint or a night out. You are really important to me, and it has been an honor to be a part of your academic path.

To Dr. Anne-Karine Bouzier-Sore, from the University of Bordeaux, who, besides being one of the greatest names in the brain metabolism field, received me so kindly for a week in her laboratory. You are an inspiration to me. I would like to extend my gratitude to your research group, whose members I kept in touch with and sure will be in my heart; also, I would like to thank Dr. Luc Pellerin for being a humble idol of mine, for your kindness ever since we first met in Bordeaux in 2023; Thanks for sharing, in person, last month here in Porto Alegre, the historical moments about how the *astrocyte-neuron lactate shuttle* was first hypothesized and the initial repercussions of its mechanisms back then; it was a remarkable moment to close my doctoral chapter.

I would like to thank the Federation of European Neuroscience Societies for the full stipend to attend the FENS-Hertie Winter School in January 2023 (which was held in Obergurgl, Austria), especially the hosts and organizing committee of the event, and for the friends I made there.

Concluindo, agradeço aos obstáculos e percalços no caminho que me fortaleceram; aos momentos em que tive que olhar para mim e lembrar das minhas metas e objetivos; aos erros que me fizeram aprender; agradeço a todas as pessoas que resistiram e resistem junto comigo, principalmente naqueles 4 anos de negacionismo (2018-2022), os quais não foram nada fáceis, dentro e fora da Universidade. Sigamos na luta!

APRESENTAÇÃO

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida no período compreendido entre junho de 2020 e maio de 2024 e é constituída por:

1. PARTE 1

- 1.1. Introdução: embasamento teórico necessário para a compreensão do plano de trabalho e objetivos.
- 1.2. Hipótese.
- 1.3. Objetivos: descrevem as intenções centrais do trabalho desenvolvidas ao longo dos capítulos I, II, III e IV.

2. PARTE 2

A “PARTE 2” encontra-se dividida em capítulos e contextualiza os produtos desenvolvidos durante o período, os quais serão discutidos ao longo da Tese.

2.1. Capítulo I

O Capítulo I é composto por um artigo de “*Perspective*” publicado no periódico *Neural Regeneration Research* (Fator de Impacto: 6.1).

Potential Use of Lactate for the Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy

Neural Regeneration Research 17(4), (2022), 788-790
(Fator de impacto: 6.1)

DOI: [10.4103/1673-5374.322459](https://doi.org/10.4103/1673-5374.322459)

2.2. Capítulo II

O capítulo II se refere aos resultados publicados obtidos em experimentos *in vitro* durante o período de “doutorado-sanduíche” realizado no exterior, na *Lancaster University*, Inglaterra. Os dados foram publicados no periódico *Neurochemical Research* (Fator de impacto: 4.4).

Lactate Protects Microglia and Neurons from Oxygen–Glucose Deprivation/Reoxygenation

Neurochemical Research (2024), epub ahead of print
(Fator de Impacto: 4.4)

DOI: [10.1007/s11064-024-04135-7](https://doi.org/10.1007/s11064-024-04135-7)

2.3. Capítulo III

O capítulo III engloba os resultados do artigo com experimentos *in vivo* que se encontra submetido ao periódico *Experimental Neurology* (Fator de impacto: 5.3).

Lactate Administration Causes Long-Term Neuroprotective Effects Following Neonatal Hypoxia-Ischemia

Artigo submetido ao periódico *Experimental Neurology*
(Fator de Impacto: 5.3)

2.4. Capítulo IV

O capítulo IV descreve os resultados preliminares dos últimos experimentos realizados no doutorado, os quais são dados de PCR, conduzidos de forma a compreender o papel metabólico e/ou sinalizador do lactato.

Lactato como molécula sinalizadora através do HCAR1/GPR81 em ratos submetidos à hipoxia-isquemia neonatal e avaliados na idade adulta (resultados preliminares; dados não publicados)

3. PARTE 3

3.1. Discussão: Discussão integrada dos resultados obtidos.

3.2. Conclusões

3.3. Perspectivas

3.4. Referências: listagem das referências bibliográficas mencionadas nas Partes 1 (Introdução) e 3 (Discussão) – excluem-se as referências dos artigos.

RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) neonatal é uma das principais causas de mortalidade em recém-nascidos, cuja única terapia clínica preconizada é a hipotermia terapêutica, a qual apresenta limitações. O lactato tem recebido atenção por demonstrar ação neuroprotetora como substrato energético preferencial do encéfalo neonatal, além de exercer papel sinalizador via ativação do seu receptor GPR81. Recentemente, demonstramos que o lactato melhora os desfechos comportamentais e morfológicos em ratos neonatos submetidos à hipóxia-isquemia (HI). Entretanto os mecanismos de ação neuroprotetora do lactato seguem pouco conhecidos. Essa Tese buscou responder se as ações do lactato após a HI neonatal melhoram desfechos histológicos e comportamentais na vida adulta; e se o lactato teria uma ação dual, atuando como substrato metabólico e como sinalizador anti-inflamatório via GPR81. Inicialmente, para o capítulo I, foi realizada uma revisão da literatura sobre o papel do lactato em condições hipóxico-isquêmicas em recém-nascidos. Referente aos estudos *in vitro* (capítulo II), linhagens de microglia (BV-2) ou neurônios (SH-SY5Y) foram submetidas à privação de glicose e oxigênio (OGD) por 6h na presença de lactato ou do agonista do receptor GPR81. Na sequência, foram expostas a um período de reoxigenação por 24h – sem tratamento com lactato ou agonista do GPR81. Abordando os estudos *in vivo* (capítulo III), ratos Wistar machos e fêmeas com 7 dias de vida (P7) foram submetidos à oclusão permanente da artéria carótida comum direita (isquemia) combinada com a exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 60 minutos (hipóxia). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo HI (animais submetidos ao procedimento de HI neonatal); grupo HI+LAC (animais submetidos ao procedimento de HI neonatal e que receberam injeções de lactato após a HI); grupo SHAM (animais submetidos a uma cirurgia fictícia e mantidos em normoxia); grupo SHAM+LAC (animais submetidos a uma cirurgia fictícia, mantidos em normoxia e que receberam injeções de lactato). O lactato foi administrado 30 min e 2h após a hipóxia no grupo HI+LAC e nos mesmos momentos no grupo SHAM+LAC. Os grupos HI e SHAM receberam apenas a injeção de veículo (PBS). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de geotaxia negativa e reflexo de endireitamento (P8); teste do cilindro (P24); escore neurológico (P25), campo aberto e reconhecimento de objetos (P54-59) e acompanhados até a idade adulta (P60) para avaliação de parâmetros morfológicos (pela coloração histológica com violeta de cresil) e moleculares (RT-qPCR). Inicialmente, a revisão abriu possibilidades para uma avaliação metabólica e sinalizadora do lactato em condições hipóxico-isquêmicas, conforme relatadas. Nossos achados *in vitro* demonstraram que o lactato impediu a morte celular causada pela OGD em microglia e neurônios, enquanto a ativação do receptor evitou a morte celular secundária associada ao período de reoxigenação. Em animais submetidos à HI, a administração de lactato reduziu o volume de lesão encefálica e levou a melhoras nas respostas na geotaxia negativa, teste do cilindro, escore neurológico e reconhecimento de objetos, tanto em machos quanto em fêmeas. Nossos dados sugerem que o lactato é um substrato metabólico prontamente utilizado por células neurais, além de exercer um

efeito de sinalização, o qual está associado a uma neuroproteção observada tardiamente. Ainda, parece que o lactato exerce um efeito neuroprotetor de longo prazo, reduzindo a lesão encefálica na idade adulta, o que pode ter sido importante para a melhora dos desfechos comportamentais observada nos períodos neonatal, juvenil e adulto. Estudos adicionais são necessários para permitir a compreensão dos mecanismos de ação do lactato e sua utilização no tratamento de recém-nascidos que passaram por eventos hipóxico-isquêmicos encefálicos.

Palavras-chave: lactato, hipóxia-isquemia neonatal, metabolismo, dimorfismo sexual

ABSTRACT

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is one of the main causes of mortality in newborns, to which the only recommended clinical therapy is therapeutic hypothermia, which has limitations. Lactate has received attention for demonstrating neuroprotective action as a preferential energy substrate of the neonatal brain, in addition to playing a signaling role via activation of its receptor GPR81. Recently, we demonstrated that lactate improves behavioral and morphological outcomes in neonatal rats subjected to hypoxia-ischemia (HI). However, the mechanisms of lactate's neuroprotective action remain poorly understood. This thesis sought to answer whether the actions of lactate after neonatal HI improve histological and behavioral outcomes in adult life; and whether lactate would have a dual role, acting as a metabolic substrate and as an anti-inflammatory signal via GPR81. Initially, a literature review (chapter I) was carried out on the role of lactate in HI conditions in newborns. Regarding the *in vitro* (chapter II) studies, cell lines of microglia (BV-2) or neurons (SH-SY5Y) were subjected to glucose and oxygen deprivation (OGD) for 6 hours in the presence of lactate or the GPR81 receptor agonist. They were then exposed to a period of reoxygenation for 24 hours – without lactate treatment or GPR81 agonist. Addressing the *in vivo* (chapter III) studies, 7-day-old male and female Wistar rats (P7) were subjected to permanent occlusion of the common right carotid artery (ischemia) combined with exposure to a hypoxic atmosphere (8% oxygen) for 60 minutes (hypoxia). The animals were divided into 4 experimental groups: HI group (animals submitted to the neonatal HI procedure); HI+LAC group (animals that underwent the neonatal HI procedure and received lactate injections after HI); SHAM group (animals that underwent sham surgery and were maintained in normoxia); SHAM+LAC group (animals that underwent sham surgery, were maintained in normoxia and received lactate injections). Lactate was administered 30 min and 2 h after hypoxia in the HI+LAC group and at the same timepoints in the SHAM+LAC group. The HI and SHAM groups received only the vehicle injection (PBS). Animals were subjected to negative geotaxis and righting reflex (P8) behavioral tests; cylinder test (P24); neurological score (P25), open field and object recognition (P54-59) and followed until adulthood (P60) to evaluate morphological (by histological staining with cresyl violet) and molecular (RT-qPCR) parameters. The literature review opened possibilities for a metabolic and signaling functions of lactate in hypoxic-ischemic conditions, as reported. Lactate prevented cell death caused by OGD in microglia and neurons, while receptor activation prevented secondary cell death associated with the reoxygenation period. In animals subjected to HI, lactate administration reduced the volume of brain injury and led to improvements of behavioral responses in negative geotaxis, cylinder test, neurological score and object recognition, both in males and females. Our data suggest that lactate is a metabolic substrate readily used by neural cells, in addition to exerting a signaling effect, which is associated with a late neuroprotection. Furthermore, it appears that lactate exerts a long-term neuroprotective effect, reducing brain injury in adulthood, which may have been important for the improvement of behavioral outcomes observed in the neonatal,

juvenile and adult periods. Additional studies are necessary to understand the mechanisms of action of lactate and allow its clinical use in the treatment of newborns who have undergone brain hypoxic-ischemic events.

Keywords: lactate, neonatal hypoxia-ischemia, metabolism, sexual dimorphism

SUMÁRIO

1. PARTE 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.2. Fisiopatologia da EHI	3
1.1.3. Dimorfismo sexual	6
1.1.4. Lactato como agente neuroprotetor	6
1.1.5. Lactato e metabolismo energético encefálico	7
1.1.6. Lactato como sinalizador celular	9
1.2. HIPÓTESE	11
1.3. OBJETIVO GERAL	11
1.3.1. Objetivos específicos.....	11
2. PARTE 2	13
2.1. CAPÍTULO I	14
2.2. CAPÍTULO II	18
2.3. CAPÍTULO III	43
2.4. CAPÍTULO IV	78
2.4.1. Introdução	79
2.4.2. Metodologia	79
2.4.3. Resultados preliminares	82
2.4.4. Discussão.....	84
2.4.5. Referências	85
3. PARTE 3	87
3.1. DISCUSSÃO	88
3.2. CONCLUSÕES	103
3.3. PERSPECTIVAS	104
3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

1.1. INTRODUÇÃO

Figura 1. Fisiopatologia da HI.....	4
Figura 2. Esquema representativo do modelo animal de HI.....	5
Figura 3. Representação esquemática da lançadeira de lactato.....	8

PARTE 2

2.1. CAPÍTULO I

Figure 1. Hypoxic-ischemic encephalopathy is one of the main causes of mortality and disabilities in newborns, and therapeutic hypothermia (TH) is the only standard clinical treatment used to date.....	17
---	----

2.2. CAPÍTULO II

Figure 1. Schematic diagram of the oxygen–glucose deprivation (OGD) and OGD/reoxygenation (OGD/R) experimental procedures and respective conditions.....	23
Figure 2. Effects of lactate and GPR81 activation on BV-2 viability.....	25
Figure 3. Effects of lactate and GPR81 activation on BV-2 viability and extracellular lactate levels after OGD and OGD/R in the presence of either a LDH inhibitor, oxamate or a MCT inhibitor, 4-CIN.....	26
Figure 4. Effects of lactate and GPR81 activation on BV-2 intracellular pH after OGD or OGD/R in the absence or in the presence of either a LDH inhibitor, oxamate or a MCT inhibitor, 4-CIN.....	28
Figure 5. Effects of lactate and GPR81 activation on the number of BV-2 cells and the level of TNF- α	30
Figure 6. Effects of lactate and GPR81 activation on differentiated SH-SY5Y cells viability.....	31

Figure 7. Effects of lactate and GPR81 activation on SH-SY5Y viability an extracellular lactate levels after OGD and OGD/R in the presence of either a LDH inhibitor, oxamate or a MCT inhibitor, 4-CIN.....	32
Figure 8. Effects of lactate and GPR81 activation on the number of SH-SY5Y cells and neurite elongation.....	34
Supplementary File 1.....	39
Supplementary File 2.....	40
Supplementary File 3.....	41

2.3. CAPÍTULO III

Figure 1. Timeline of the experimental procedures.....	57
Figure 2. Body weight of the animals along the experimental procedures and the area under the curve (AUC) of each experimental group in male and female rats.....	59
Figure 3. Latency in the tests of negative geotaxis and righting reflex at P8.....	60
Figure 4. Cylinder test and modified neurological severity score (mNSS) scale for male and female rats.....	62
Figure 5. Open field test. Distance traveled and number of entries in the center of the arena	63
Figure 6. Recognition index in the novel object recognition test in male and female adult rats.....	64
Figure 7. Brain volume of lesion.....	65

2.4. CAPÍTULO IV

Figura 1: Expressão gênica do inflamassoma NLRP3Caspase-1/IL-1 β	82
Figura 2: Expressão gênica dos transportadores (MCT2 e MCT4) e do receptor (HCAR1/GPR81) de lactato.....	83

LISTA DE TABELAS

PARTE 2

2.2. CAPÍTULO II

Supplementary Table 1.....	42
----------------------------	----

2.4. CAPÍTULO IV

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados	81
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

3,5-DHBA: ácido 3,5-dihidroxibenzoico

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

ANLS: lançadeira de lactato astrócito-neurônio

ASC: proteína associada a apoptose contendo um domínio CARD

ATP: trifosfato de adenosina

BHE: barreira hematoencefálica

Ca²⁺: íon cálcio

CARD: domínio de ativação e recrutamento das caspases (do inglês, “*caspase activation and recruitment domain*”)

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: desvio-padrão

EHI: encefalopatia hipóxico-isquêmica

EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GLUT: proteína transportadora de glicose

GPR81: receptor acoplado à proteína G 81

H⁺: íon hidrogênio

HCAR1: receptor 1 de ácido carboxílico

HI: hipóxia-isquemia

HIF-1 α : fator de transcrição induzido pela hipóxia-1 alfa

HT: hipotermia terapêutica

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

iNOS: óxido nítrico-sintase induzível

K⁺: íon potássio

LDH: lactato desidrogenase

LPS: lipopolissacarídeo

MCAO: oclusão da artéria cerebral média (do inglês, “*Middle cerebral artery occlusion*”)

MCT: transportador de monocarboxilato

mNSS: escore neurológico modificado (do inglês, *modified neurological severity score*, mNSS)

MTT: 3- (4,5-Dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio

Na⁺: íon sódio

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

NEFL: neurofilamento de cadeia leve

NF-κB: fator nuclear kappa B

NLRP3: receptor do tipo NOD de pirina 3

NMDA: N-metil-D-Aspartato

NOR: reconhecimento de objeto novo (do inglês, "*novel object recognition*")

OF: campo aberto (do inglês, "*open field*")

OGD: privação de glicose e oxigênio (do inglês, "*oxygen and glucose deprivation*")

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: tampão fosfato-salino

pH: potencial hidrogeniônico

PKA: proteína quinase A

qPCR: PCR quantitativo

RGC: células ganglionares da retina

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensageiro

RT: transcriptase reversa (do inglês, "*reverse transcriptase*")

SNC: sistema nervoso central

VEÍC: veículo

1. PARTE 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1. Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) neonatal é uma importante consequência da asfixia perinatal (LOCCI et al., 2020) e é uma das principais causas de comprometimento no neurodesenvolvimento de recém-nascidos e crianças (MILLAR et al., 2017; VANNUCCI; HAGBERG, 2004), além de configurar um dos principais fatores de risco de mortalidade aguda em recém nascidos (BRYCE et al., 2005; FERRIERO, 2004). Em termos de categorização, essa condição é geralmente referida como EHI, embora a importância de um consenso sobre a classificação e nomenclatura das encefalopatias neonatais venha sendo debatida (MOLLOY et al., 2023). Indiscutivelmente, definições mais precisas facilitarão a compreensão e *consenso* dos estudos cujo foco é o desenvolvimento de terapias para tratamento desses eventos hipóxico-isquêmicos. Os dados atuais indicam que a incidência da EHI varia de acordo com o grau de desenvolvimento socioeconômico de cada país (BENAVENTE-FERNÁNDEZ; SIDDIQI; MILLER, 2020). Atualmente, a ocorrência de EHI é de 1 a 3 a cada 1000 nascidos vivos em países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento pode variar de 2,3 a 30,6 a cada 1000 nascidos vivos (KURINCZUK; WHITE-KONING; BADAWI, 2010; LAWN et al., 2009; NAMUSOKE et al., 2018; PARK et al., 2023).

São poucas as opções para o tratamento da EHI (DIXON et al., 2015; FERRIERO, 2004; THORESEN, 2018) para recém-nascidos humanos, sendo a hipotermia terapêutica (HT) a única terapia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e utilizada na prática clínica (SHANKARAN et al., 2005). A hipotermia consiste no resfriamento corporal do recém-nascido, com uma redução de 2 a 5°C na temperatura encefálica (ROCHA-FERREIRA et al., 2018; SHANKARAN et al., 2005), sendo indicada em casos de eventos hipóxico-isquêmicos moderados e severos e, iniciada dentro de uma janela terapêutica de no máximo 6 horas (GUNN; GLUCKMAN, 2007). A HT ainda não é aplicada em casos leves de EHI, embora se tenha discutido a sua eficácia nesses cenários (EL-DIB et al., 2019). Até o momento, não existem terapias bem estabelecidas para esses casos, os quais afetam uma porcentagem relativamente alta dos recém-nascidos humanos, causando cerca de 1,15 milhão de mortes por ano.

1.1.2. Fisiopatologia da EHI

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é caracterizada pela redução do fluxo sanguíneo e consequente interrupção da disponibilização de oxigênio e substrato energético ao tecido nervoso, o que resulta na redução da concentração de ATP (DOUGLAS-ESCOBAR; WEISS, 2015; RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981). A lesão neural é causada por morte neuronal aguda (devido a essa falha energética inicial) e tardia (por exemplo, pela ativação de vias de apoptose e de um processo inflamatório de longo prazo). A manifestação dos danos neurais depende de diversos fatores, como a região encefálica afetada (SANCHES et al., 2019), o tempo após o evento hipóxico-isquêmico (NORTHINGTON et al., 2001) e o dimorfismo sexual (MIRZA et al., 2015; NETTO et al., 2017; SANCHES et al., 2015; SMITH; ROSENKRANTZ; FITCH, 2016).

A fisiopatologia da HI no sistema nervoso central (SNC) geralmente envolve uma sequência de eventos que inicia com uma falha energética seguida de um período de reperfusão e estresse oxidativo e está representada na Figura 1. A interrupção do fluxo sanguíneo e a subsequente redução da disponibilização de glicose e oxigênio ao encéfalo neonatal levam à queda da concentração de ATP (trifosfato de adenosina) intracelular e ao desequilíbrio dos gradientes eletroquímicos (NABETANI; SHINTAKU; HAMAZAKI, 2018; PERLMAN, 2006). Um dos principais eventos envolvidos na fisiopatologia de condições caracterizadas pela privação de substratos metabólicos e de oxigênio é a falência energética devido à redução da presença de compostos fosforilados como ATP e fosfocreatina, comprometendo a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase (DE LORES ARNAIZ; ORDIERES, 2014). Isso leva à falha na manutenção dos gradientes iônicos e à liberação excessiva de glutamato (neurotransmissor excitatório) na fenda sináptica, contribuindo para a ativação de receptores do tipo N-metil-D-Aspartato (NDMA) (JOHNSTON, 2001) e aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, ativando cascatas neurotóxicas e estabelecendo um gradiente osmótico que favorece o movimento de água para o interior da célula, acarretando em edema e subsequente rompimento celular (HASSELL et al., 2015).

Quando ocorre a redução da concentração de ATP intracelular, a atividade das enzimas glutamina sintetase e Na^+/K^+ -ATPase (ambas dependentes de ATP) também é reduzida, levando à diminuição da conversão de glutamato em glutamina pelos astrócitos, além da falta de manutenção do gradiente iônico utilizado pelos transportadores de glutamato. A captação e conversão de glutamato (que são

dependentes de energia) são prejudicadas e o glutamato permanece no meio extracelular (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006) estimulando seus receptores e levando ao fenômeno conhecido como “excitotoxicidade glutamatérgica” (JOHNSTON, 2001), devido aos níveis excessivos de Ca^{2+} intracelular que provocam dano mitocondrial e potencializam o dano causado pela pelo estresse oxidativo.

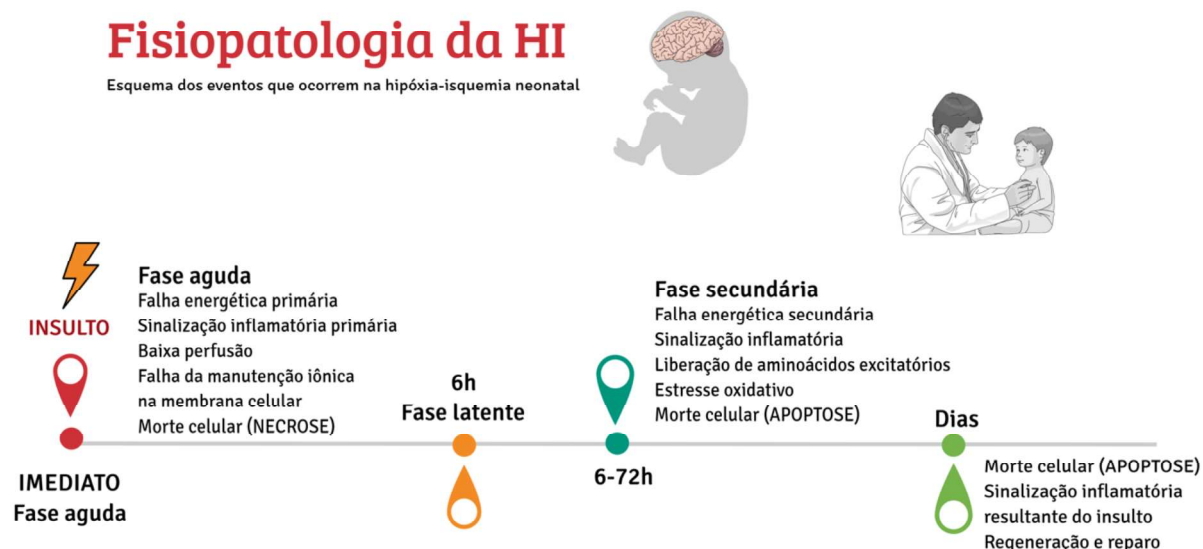


Figura 1. Diferentes etapas organizadas cronologicamente para representar a fisiopatologia da HI neonatal. A fase aguda do evento (o episódio hipóxico-isquêmico e as horas seguintes) é caracterizada pela falha na disponibilização de oxigênio e de substratos energéticos para o SNC, levando à morte celular. A fase latente se encontra entre a aguda e a secundária, sendo essa última considerada o momento em que mais se observam efeitos deletérios (Figura de autoria própria com base em Volpe et al., 2017 (TASSINARI, 2020)).

Dentre os eventos que culminam na EHI podemos destacar a privação energética, a presença de respostas neuroinflamatórias exacerbadas e o desequilíbrio do balanço redox, determinantes da fisiopatologia dessa condição. Portanto, a eficácia de agentes neuroprotetores que possam contornar esses eventos, de forma alternativa ou complementar à HT, tem sido testada em modelos animais e em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo (NUNES et al., 2023; TASSINARI et al., 2020; ZANG et al., 2023) e por outros (PEDROZA-GARCÍA; CALDERÓN-VALLEJO; QUINTANAR, 2022; YOU et al., 2023).

Na literatura, modelos animais têm sido utilizados com o objetivo de avaliar outras possibilidades de neuroproteção, sempre tendo como base a fisiopatologia da EHI. Entre estes, o modelo animal de Rice-Vanucci (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981) já está bem estabelecido como uma ferramenta experimental para o estudo da HI neonatal, mimetizando em ratos neonatos o dano cerebral observado em humanos

(CUAYCONG et al., 2011), tanto em relação às lesões nas estruturas cerebrais, quanto em relação aos déficits cognitivos e sensório-motores (NETTO et al., 2017), sendo o hipocampo uma das estruturas mais vulneráveis à lesão hipóxico-isquêmica nesse modelo em animais neonatais (FABRES et al., 2018; VANNUCCI et al., 1999). O modelo animal consiste na oclusão permanente unilateral da artéria carótida comum combinada com a exposição do animal a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio), resultando em dano encefálico unilateral. Uma representação do modelo animal de HI neonatal se encontra na Figura 2.

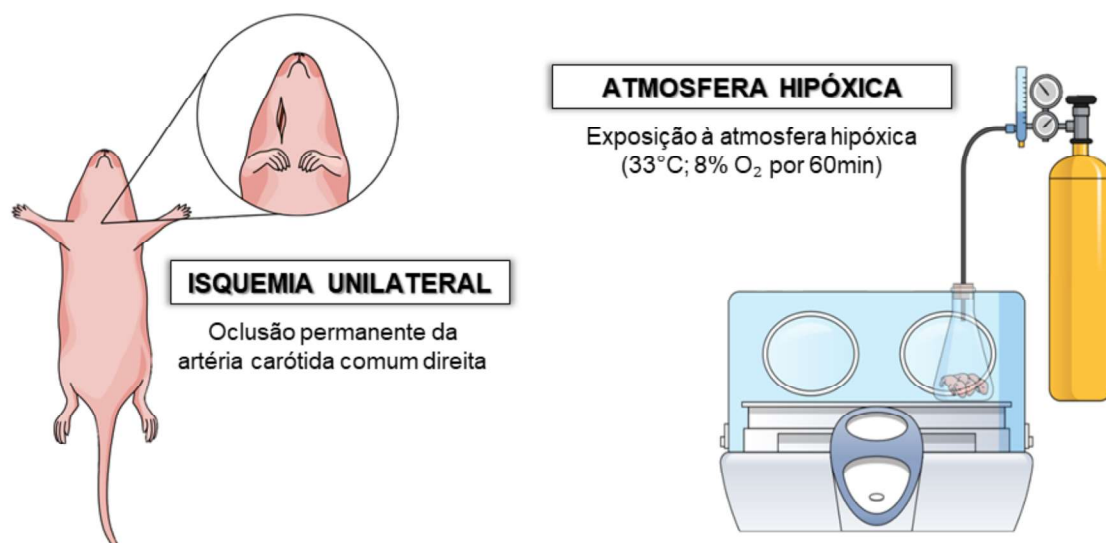


Figura 2. Esquema representativo do modelo animal de HI neonatal de Rice e Vannucci (Rice et al., 1981). Basicamente, o modelo consiste em duas etapas. Primeiro, uma incisão é feita no pescoço do animal para a localização da artéria carótida comum direita, que é ocluída permanentemente causando uma isquemia cerebral unilateral no encéfalo do animal. Os animais passam por um período de recuperação de cerca de 2h juntamente com as ratas-mães e, em seguida, são alocados em uma câmara com atmosfera hipóxica (8% O₂) por 60 minutos (Figura de autoria própria (TASSINARI, 2020))

Em ratos, esta abordagem é realizada 7 dias após o nascimento (P7), período em que o grau de maturação do SNC do rato se assemelha a um neonato humano nascido a termo (FERRIERO, 2004; NETTO et al., 2017; RAKHADE; JENSEN, 2009). Cabe salientar que alguns trabalhos sugerem que a idade de P7 se refere a um humano “prematureo tardio” (do inglês, *late preterm*), com idade gestacional de 34-36 semanas (DENIZ et al., 2018; SMITH; ROSENKRANTZ; FITCH, 2016). De qualquer forma, P7 é a idade mais utilizada na literatura com o modelo de HI neonatal (ALEXANDER et al., 2014; NETTO et al., 2017, 2018; XIONG et al., 2011).

1.1.3. Dimorfismo sexual

Embora poucos estudos com animais submetidos ao modelo de Rice-Vannucci tenham mostrado a existência de diferenças entre animais machos e fêmeas em relação à extensão da lesão induzida pela HI (NETTO et al., 2017; NIJBOER et al., 2007; SANCHES et al., 2015; SMITH; ROSENKRANTZ; FITCH, 2016), as respostas frente aos eventos fisiopatológicos da HI neonatal são diferentes entre os sexos, evidenciando uma forte influência do dimorfismo sexual (NETTO et al., 2017; SANCHES et al., 2013). Os achados ainda são controversos, reforçando a necessidade da continuidade da avaliação de ambos os sexos nos futuros estudos envolvendo este modelo experimental (CHARRIAUT-MARLANGUE; BESSON; BAUD, 2017; NETTO et al., 2017). Os machos parecem ser mais suscetíveis à perda tecidual específica de certas regiões como o córtex cerebral e o hipocampo, enquanto as fêmeas parecem sofrer redução do volume hemisférico total (NETTO et al., 2017). Quando se trata da sinalização inflamatória causada pelo episódio hipóxico-isquêmico, estudos recentes demonstram que animais machos têm uma maior ativação microglial e uma resposta inflamatória periférica mais intensa em comparação às fêmeas três dias após a HI (MIRZA et al., 2015). Ademais, em animais machos, a morte celular parece ocorrer com mais frequência por necrose, enquanto em fêmeas, por apoptose (WEIS et al., 2014). Dessa forma, estudar uma ação sexualmente dimórfica da administração exógena de lactato seria uma contribuição adicional para a literatura científica (além da descrição de um possível efeito neuroprotetor geral do lactato).

1.1.4. Lactato como agente neuroprotetor

Como a lesão hipóxico-isquêmica é progressiva, a busca por possíveis estratégias neuroprotetoras é contínua, mesmo que a intervenção seja aplicada apenas após a ocorrência do evento hipóxico-isquêmico. A eficácia de várias terapias tem sido testada em modelos animais de HI neonatal (DIXON et al., 2015; FABRES et al., 2018, 2020), incluindo trabalhos de nosso grupo de pesquisa (FABRES et al., 2018; TASSINARI et al., 2020). Uma possível estratégia neuroprotetora para o tratamento da HI neonatal é a utilização de substratos metabólicos: o tratamento com lactato tem mostrado efeitos promissores em situações de isquemia cerebral (BERTHET et al., 2009) e HI neonatal (ROUMES et al., 2021a; TASSINARI et al., 2020). Portanto, a administração de um substrato energético como o lactato para o tratamento da HI

neonatal parece ser uma estratégia interessante, uma vez que além de ser o substrato energético preferencial do sistema nervoso neonatal, e o mais importante substrato para a respiração mitocondrial, essa molécula também modula as respostas inflamatórias centrais e periféricas, atuando via seu receptor GPR81 (receptor acoplado à proteína G 81), também conhecido como HCAR1 (receptor 1 de ácido carboxílico). Apesar dos efeitos neuroprotetores do lactato em situações de isquemia cerebral neonatal terem sido demonstrados em apenas dois trabalhos na literatura até o momento (ROUMES et al., 2021a; TASSINARI et al., 2020), seus efeitos têm sido demonstrados de forma robusta em animais adultos (BERTHET et al., 2009; CASTILLO et al., 2015a, 2015b; ZHAI et al., 2020); ademais, um ensaio clínico randomizado (NCT04858139) encontra-se em andamento na Universidade de Lausanne, Suíça, avaliando os efeitos do tratamento com lactato em indivíduos adultos que sofreram isquemia cerebral ([NCT04858139](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04858139)).

1.1.5. Lactato e metabolismo energético encefálico

Apesar do encéfalo ser responsável por cerca de 25% da utilização diária de glicose do organismo (ALLE; ROTH; GEIGER, 2009; ATTWELL; LAUGHLIN, 2001), as diferentes células que compõem o SNC apresentam perfis metabólicos distintos: os astrócitos (com perfil glicolítico) são os principais responsáveis por captar a glicose circulante. Entretanto, a partir dela, produzem e exportam o lactato para os neurônios; já os neurônios (com perfil oxidativo) parecem utilizar este lactato como substrato energético preferencial (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018; PELLERIN; MAGISTRETTI, 1994). Esse mecanismo de transferência, conhecido como “lançadeira de lactato” (do inglês, “*astrocyte-neuron lactate shuttle*”, ANLS) – representado na Figura 3, propicia uma vantagem bioenergética para os neurônios que podem rapidamente reoxidar o lactato em piruvato, por meio da enzima lactato desidrogenase (LDH), e direcioná-lo para a fosforilação oxidativa, sem a necessidade do gasto de ATP da fase de investimento da glicólise (MÄCHLER et al., 2016; MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018; PELLERIN; MAGISTRETTI, 2012).

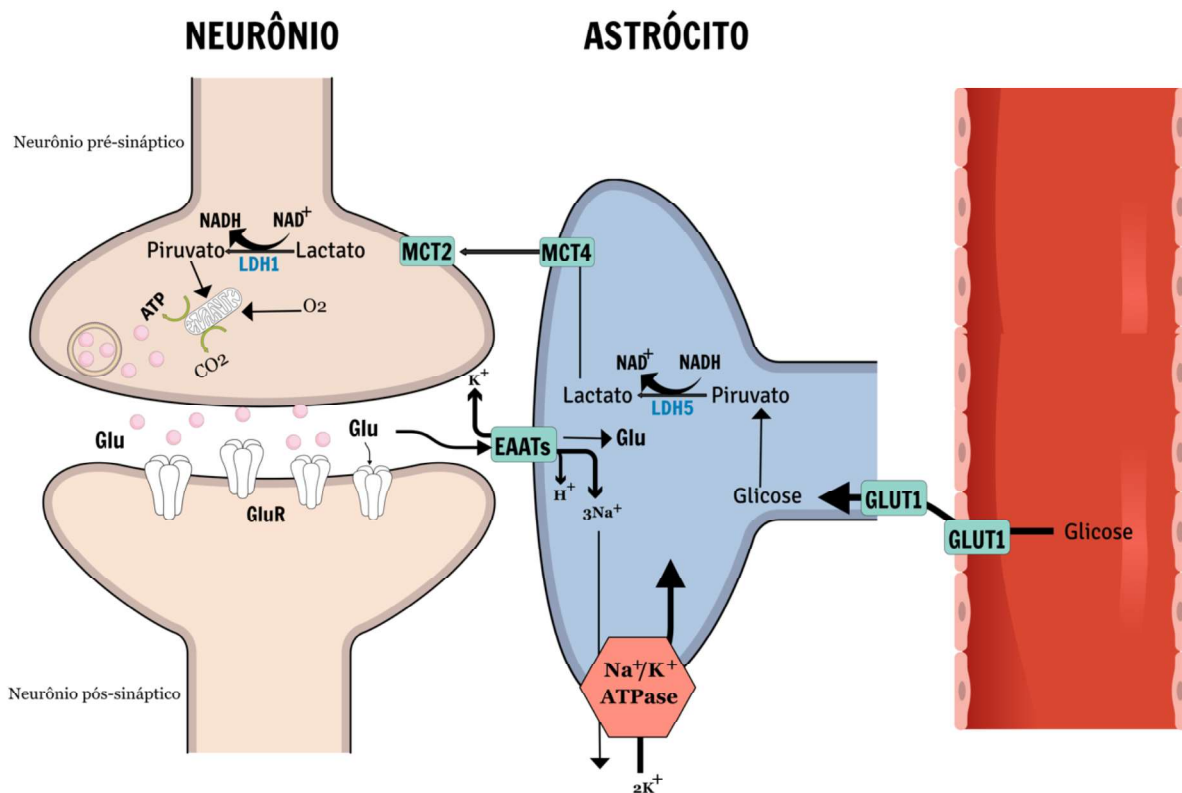


Figura 3. Representação esquemática da lançadeira de lactato entre astrócitos e neurônios (ANLS, do inglês *Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle*). O modelo da lançadeira sugere que a glicose captada pelos astrócitos é convertida em lactato, o qual é exportado para os neurônios para ser utilizado como um substrato energético. A glicose é captada da circulação pelo transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1, *glucose transporter 1*), presente nas células endoteliais e nos astrócitos. Nas sinapses glutamatérgicas, o glutamato (Glu) despolariza os neurônios agindo em seu receptor (GluR). A atividade excitatória é finalizada por um eficiente sistema de recaptção de glutamato pelos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs, *excitatory amino acid transporters*), localizados nos astrócitos: o glutamato é cotransportado com o Na^+ , levando ao aumento da concentração intracelular de Na^+ , ativando a bomba Na^+/K^+ -ATPase (dependente de ATP, sintetizado a partir da glicólise). Esse processo resulta, então, na utilização de glicose e produção de lactato, a partir da redução do piruvato pela lactato desidrogenase 5 (LDH5, *lactate dehydrogenase 5*) dos astrócitos. O lactato exportado pelo transportador de monocarboxilato 4 (MCT4, *monocarboxylate transporter 4*), de baixa afinidade dos astrócitos pode ser captado pelos neurônios através do transportador de monocarboxilato 2 (MCT2, *monocarboxylate transporter 2*), de alta afinidade. Nos neurônios, este lactato é oxidado a piruvato pela lactato desidrogenase 1 (LDH1, *lactate dehydrogenase 1*), servindo como substrato para a produção de energia pelas mitocôndrias. K^+ : íon potássio; Na^+ : íon sódio; H^+ : íon hidrogênio; LDH: lactato desidrogenase; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida; NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada; GLUT1: transportador de glicose 1; GluR: receptor de glutamato; ATP: trifosfato de adenosina; EAATs: transportadores de aminoácidos excitatórios; MCT: transportador de monocarboxilato; CO_2 : gás carbônico; O_2 : oxigênio (Figura de autoria própria com base em Pellerin e Magistretti, 1994 e adaptada de (TASSINARI, 2020)).

O transporte de lactato, sobretudo no sistema nervoso de ratos neonatos, ocorre via transportadores de monocarboxilatos (MCTs) (DOMBROWSKI; SWIATEK; CHAO, 1989; HALESTRAP; PRICE, 1999). O MCT1 é encontrado nos oligodendrócitos e na microglia (MOREIRA et al., 2009; RINHOLM et al., 2011), o

MCT2 nos neurônios (BERGERSEN, 2007; PIERRE et al., 2000) e o MCT4 nos astrócitos (RAFIKI et al., 2003). Portanto, fica claro que o lactato é o substrato energético preferencial de neurônios (SCHURR et al., 1997) e, em um ambiente de privação de glicose e oxigênio pode ser utilizado na prevenção da falha energética (JOURDAIN et al., 2016). A expressão diferencial das isoformas da LDH nas diferentes células do SNC parece estar diretamente envolvida nessa função: a LDH5, isoforma mais expressa em astrócitos, favorece a redução do piruvato e a formação e exportação de lactato; a LDH1, isoforma neuronal, favorece a oxidação do lactato e o direcionamento de piruvato para a fosforilação oxidativa (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011).

1.1.6. Lactato como sinalizador celular

Além de atuar no metabolismo energético, o lactato parece ter funções importantes na sinalização celular (MAGISTRETTI; ALLAMAN, 2018; MORLAND et al., 2015). O receptor GPR81 ou HCAR1, um receptor acoplado à proteína G, é um importante alvo de ligação do lactato já identificado nas células do SNC (COLUCCI et al., 2023; LAURITZEN et al., 2014). Este receptor responde às concentrações fisiológicas de lactato (MOSIENKO; TESCHEMACHER; KASPAROV, 2015) e pode explicar um possível efeito sinalizador do lactato independentemente do seu papel como substrato energético. Aparentemente, o lactato é capaz de modular as respostas inflamatórias através da ligação ao seu receptor GPR81 (HOQUE et al., 2014), demonstrando um efeito anti-inflamatório por reduzir a expressão de mediadores inflamatórios como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a IL-1 β (HOQUE et al., 2014). Essa resposta anti-inflamatória mediada pela ativação do GPR81 parece inibir a ativação do NLRP3 em modelo de pancreatite e hepatite, contudo, este mecanismo nunca foi descrito no SNC. Já foi descrito um ligante exógeno, agonista do GPR81 (o 3,5-DHBA, ácido 3,5-dihidroxibenzoico), cuja ação parece reduzir a morte celular e prevenir a degeneração das células da retina (VOHRA et al., 2022). O efeito do 3,5-DHBA e da ativação do receptor GPR81 em modelos de dano cerebral precisa ser aprofundado já que muitos dos desfechos são controversos: alguns trabalhos sugerem o receptor como um regulador da neurogênese, ativação microglial (KENNEDY et al., 2022) e angiogênese (CHAUDHARI et al., 2022) após a HI; já outros autores, atribuíram o efeito neuroprotetor do lactato a uma ação independente da ligação ao GPR81, em um modelo de traumatismo craniano (BUSCEMI et al., 2022).

Nesse sentido, o lactato parece modular respostas celulares que permanecem mesmo quando este não está mais presente no meio de cultura. A conservação dos efeitos neuroprotetores do lactato possivelmente está relacionada com a ativação do GPR81, o qual já foi ponderado como modulador de respostas inflamatórias na periferia (HOQUE et al., 2014).

De acordo com nossos trabalhos prévios (TASSINARI et al., 2020), o lactato reduziu o volume de lesão encefálica 48 horas após a HI neonatal, além de melhorar déficits comportamentais antes do desmame dos animais. Em linha com os nossos achados, outro grupo de pesquisa também avaliou recentemente, os efeitos da administração de lactato como tratamento após a HI neonatal, encontrando resultados semelhantes aos nossos (ROUMES et al., 2021a). Entretanto esses animais não foram acompanhados até a idade adulta (P60) para verificar se essa neuroproteção é observada a longo prazo.

Considerando que a EHI envolve um déficit energético inicial, seguido por um processo inflamatório, fica claro que o lactato pode ser uma alternativa para o tratamento dessa condição. Nesse sentido, é plausível considerar que o lactato atua como um substrato metabólico neuronal de modo a garantir o ATP necessário para proteger o encéfalo neonatal e minimizar os efeitos da excitotoxicidade glutamatérgica, além de atuar como uma molécula sinalizadora de longo prazo através da ligação ao seu receptor HCAR1/GPR81. Além de metabólito-chave em diversos processos do SNC, o lactato parece exercer efeitos anti-inflamatórios, portanto, é crucial que os mecanismos de ação neuroprotetora do lactato após a HI neonatal, que não estão completamente elucidados, sejam explorados tanto na resposta inflamatória neural, quanto nos desfechos comportamentais em longo prazo.

Além disso, devido à complexidade intrínseca dos estudos *in vivo*, é nítida a necessidade da complementariedade garantida por estudos *in vitro*. Estes, por sua vez, agregam de forma primordial, pois permitem a avaliação de respostas celulares individualmente, além da averiguação mais detalhada de mecanismos celulares e moleculares frente a diferentes condições experimentais.

A compreensão dos mecanismos de ação do lactato, que podem ser melhor descritos por meio de estudos *in vitro*, bem como estudos *in vivo* que acompanhem os animais tratados até a idade adulta, são essenciais para a realização de intervenções eficazes complementares ou alternativas à HT no contexto do tratamento da HI neonatal.

1.2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é de que o tratamento com lactato em cultivos celulares, usando um modelo de privação de glicose e oxigênio, ou em animais neonatos submetidos a condições hipóxico-isquêmicas, apresenta um efeito neuroprotetor de curto prazo (atuando como substrato energético) e outro de longo prazo (atuando como molécula sinalizadora via ligação ao receptor HCAR1/GPR81). Dessa forma, a administração de lactato será capaz de impedir a morte neuronal e a resposta inflamatória microglial causada pela privação de glicose e oxigênio. Assim, o lactato reduzirá a lesão encefálica e o processo neuroinflamatório associado, o que levará à atenuação dos déficits comportamentais produzidos pela HI.

1.3. OBJETIVO GERAL

Revisar os aspectos mais atuais sobre o papel do lactato em contextos hipóxico-isquêmicos e investigar os mecanismos neuroprotetores desencadeados pela administração de lactato após a privação de glicose e oxigênio *in vitro* e a hipóxia-isquemia neonatal *in vivo*.

1.3.1. Objetivos específicos

1.3.1.1. Em estudos de revisão da literatura:

-Analisar os mecanismos de ação do lactato na HI neonatal e propor perspectivas para a utilização dessa molécula em experimentos que envolvam investigações de possíveis tratamentos para a EHI.

1.3.1.2. Em estudos *in vitro*:

-Determinar a concentração de lactato no meio após a OGD (do inglês, “*oxygen and glucose deprivation*”, OGD) na presença ou ausência de inibidores farmacológicos dos MCTs e da enzima LDH;

-Quantificar a viabilidade celular (através da redução do 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio, MTT) e o papel do tratamento com lactato ou ativação do GPR81 após a OGD e reoxigenação;

-Elucidar o papel do metabolismo do lactato na viabilidade celular após a OGD por meio da inibição dos transportadores de lactato e da enzima LDH;

-Determinar a influência da OGD e do lactato no potencial hidrogeniônico (pH) intracelular microglial;

-Determinar a concentração de lactato e de citocinas inflamatórias (TNF- α) no meio de cultura após a OGD e após a reoxigenação, na presença ou ausência dos inibidores de MCT e LDH.

1.3.1.3. Em estudos *in vivo*:

-Quantificar o volume de lesão cerebral por meio de técnicas histológicas em animais adultos que foram submetidos à HI neonatal e tratados com lactato;

-Avaliar o desempenho dos animais em testes comportamentais (sensório-motores e cognitivos) e monitorar a presença de possíveis efeitos colaterais (alteração de peso corporal, estado geral dos animais nos testes comportamentais) atribuídos à administração de lactato em animais submetidos à HI;

-Quantificar a expressão (por RT-qPCR) do receptor GPR81, das proteínas envolvidas na ativação do inflamassoma (NLRP3, IL-1 β , caspase-1) e dos transportadores MCT2 e MCT4, em animais adultos que foram submetidos à HI neonatal e tratados com lactato;

-Investigar a existência de dimorfismo sexual nos parâmetros avaliados em animais submetidos à HI neonatal e tratados com lactato.

3.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, P. B. et al. Expanding the phenotype associated with the NEFL mutation: neuromuscular disease in a family with overlapping myopathic and neurogenic findings. **JAMA neurology**, v. 71, n. 11, p. 1413–1420, Nov. 2014.
- AL MAMUN, A. et al. Microglial IRF5-IRF4 regulatory axis regulates neuroinflammation after cerebral ischemia and impacts stroke outcomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 3, p. 1742–1752, 21 Jan. 2020.
- AL-CHALABI, A.; MILLER, C. C. J. Neurofilaments and neurological disease. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 25, n. 4, p. 346–355, Apr. 2003.
- ALEXANDER, M. et al. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. **Behavioural brain research**, v. 259, p. 85–96, 1 Feb. 2014.
- ALLE, H.; ROTH, A.; GEIGER, J. R. P. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. **Science**, v. 325, n. 5946, p. 1405–1408, 2009.
- AN, Y. J. et al. Lactate as a major epigenetic carbon source for histone acetylation via nuclear LDH metabolism. **Experimental & molecular medicine**, 2 Oct. 2023.
- ATTWELL, D.; LAUGHLIN, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 10, p. 1133–1145, Oct. 2001.
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, Aug. 2006.
- BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, 7 Dec. 2011.
- BENAVENTE-FERNÁNDEZ, I.; SIDDIQI, A.; MILLER, S. P. Socioeconomic status and brain injury in children born preterm: modifying neurodevelopmental outcome. **Pediatric research**, v. 87, n. 2, p. 391–398, Jan. 2020.
- BERGERSEN, L. H. Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. **Neuroscience**, v. 145, n. 1, p. 11–19, 2 Mar. 2007.

- BERTHET, C. et al. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 11, p. 1780–1789, Nov. 2009.
- BROOKS, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. **Redox biology**, v. 35, p. 101454, Aug. 2020.
- BRYCE, J. et al. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1147–1152, 2005.
- BURGER, D. et al. F-actin dampens NLRP3 inflammasome activity via Flightless-I and LRRFIP2. **Scientific reports**, v. 6, p. 29834, 19 Jul. 2016.
- BUSCEMI, L. et al. Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 and Neuroprotection in a Mouse Model of Cerebral Ischemia-Reperfusion. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 689239, 21 May 2021.
- BUSCEMI, L. et al. Lactate Neuroprotection against Transient Ischemic Brain Injury in Mice Appears Independent of HCAR1 Activation. **Metabolites**, v. 12, n. 5, 21 May 2022.
- CASTILLO, X. et al. A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 10, p. 1561–1569, 2015a.
- CASTILLO, X. et al. A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 10, p. 1561–1569, Oct. 2015b.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; BESSON, V. C.; BAUD, O. Sexually Dimorphic Outcomes after Neonatal Stroke and Hypoxia-Ischemia. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 61, 26 Dec. 2017.
- CHAUDHARI, P. et al. Neuronal GPR81 regulates developmental brain angiogenesis and promotes brain recovery after a hypoxic ischemic insult. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 42, n. 7, p. 1294–1308, Jul. 2022.
- COLUCCI, A. C. M. et al. History and Function of the Lactate Receptor GPR81/HCAR1 in the Brain: A Putative Therapeutic Target for the Treatment of Cerebral Ischemia. **Neuroscience**, v. 526, p. 144–163, 29 Jun. 2023.

- CUAYCONG, M. et al. A novel approach to the study of hypoxia-ischemia-induced clinical and subclinical seizures in the neonatal rat. **Developmental neuroscience**, v. 33, n. 3–4, p. 241–250, 27 Sep. 2011.
- DE LORES ARNAIZ, G. R.; ORDIERES, M. G. L. Brain Na(+), K(+)-ATPase Activity In Aging and Disease. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 10, n. 2, p. 85–102, Jun. 2014.
- DE MOURA, A. C. et al. Global Histone H4 acetylation in the olfactory bulb of lactating rats with different patterns of maternal behavior. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 36, n. 7, p. 1209–1213, Oct. 2016.
- DENIZ, B. F. et al. Folic acid supplementation during pregnancy prevents cognitive impairments and BDNF imbalance in the hippocampus of the offspring after neonatal hypoxia-ischemia. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 60, p. 35–46, 1 Oct. 2018.
- DIAS, C. et al. Astrocytic aerobic glycolysis provides lactate to support neuronal oxidative metabolism in the hippocampus. **BioFactors**, 17 Apr. 2023.
- DIXON, B. J. et al. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 9, p. 22368–22401, 15 Sep. 2015.
- DOMBROWSKI, G. J., Jr; SWIATEK, K. R.; CHAO, K. L. Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. **Neurochemical research**, v. 14, n. 7, p. 667–675, Jul. 1989.
- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. **JAMA pediatrics**, v. 169, n. 4, p. 397–403, Apr. 2015.
- DRAVID, A. et al. Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 23935, 14 Dec. 2021.
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. **Neuroscience**, v. 340, p. 291–298, 2017.
- DURÁN-CARABALI, L. E. et al. Tissue Injury and Astrocytic Reaction, But Not Cognitive Deficits, Are Dependent on Hypoxia Duration in Very Immature Rats Undergoing Neonatal Hypoxia-Ischemia. **Neurochemical research**, v. 44, n. 11, p. 2631–2642, Nov. 2019.

- EL-DIB, M. et al. Should therapeutic hypothermia be offered to babies with mild neonatal encephalopathy in the first 6 h after birth? **Pediatric research**, v. 85, n. 4, p. 442–448, Mar. 2019.
- 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, Jun. 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, Nov. 2020.
- FERRIERO, D. M. Neonatal brain injury. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 19, p. 1985–1995, 4 Nov. 2004.
- FURUKAWA, S. et al. Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. **Reproductive sciences**, v. 18, n. 2, p. 172–179, Feb. 2011.
- GAO, F. et al. An appropriate ratio of unsaturated fatty acids is the constituent of hickory nut extract for neurite outgrowth in human SH-SY5Y cells. **Food science & nutrition**, v. 8, n. 12, p. 6346–6356, Dec. 2020.
- GEISELER, S. J. et al. L-Lactate Treatment at 24 h and 48 h after Acute Experimental Stroke Is Neuroprotective via Activation of the L-Lactate Receptor HCA1. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 2, 19 Jan. 2024.
- GHASEMI, A.; JEDDI, S.; KASHFI, K. The laboratory rat: Age and body weight matter. **EXCLI journal**, v. 20, p. 1431–1445, 23 Sep. 2021.
- GORGIJ, E. et al. Maternal treadmill exercise ameliorates impairment of neurological outcome, caspase-1 and NLRP3 gene expression alteration in neonatal hypoxia-ischemia rats. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 26, n. 2, p. 228–234, Feb. 2023.
- GUNN, A. J.; GLUCKMAN, P. D. Head cooling for neonatal encephalopathy: the state of the art. **Clinical obstetrics and gynecology**, v. 50, n. 3, p. 636–651, Sep. 2007.
- GUPTA, P. et al. Effect of lactate and pH on mouse pluripotent stem cells: Importance of media analysis. **Biochemical engineering journal**, v. 118, p. 25–33, 15 Feb. 2017.
- HALESTRAP, A. P.; PRICE, N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. **Biochemical Journal**, v. 343 Pt 2, n. Pt 2, p. 281–299, 15 Oct. 1999.

- HAN, H. et al. Exercise improves cognitive dysfunction and neuroinflammation in mice through Histone H3 lactylation in microglia. **Immunity & ageing: I & A**, v. 20, n. 1, p. 63, 17 Nov. 2023.
- HASSELL, K. J. et al. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 100, n. 6, p. F541-52, Nov. 2015.
- HIRAYAMA, Y. et al. Preconditioning-Induced Facilitation of Lactate Release from Astrocytes Is Essential for Brain Ischemic Tolerance. **eNeuro**, v. 11, n. 4, Apr. 2024.
- HONG, H. et al. A novel role of lactate: Promotion of Akt-dependent elongation of microglial process. **International immunopharmacology**, v. 119, p. 110136, 17 Apr. 2023.
- HOQUE, R. et al. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1763–1774, Jun. 2014.
- 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. **The International journal of neuroscience**, v. 126, n. 7, p. 647–657, 2016.
- JITHOO, A. et al. The Temporal Relationship between Blood–Brain Barrier Integrity and Microglial Response following Neonatal Hypoxia Ischemia. **Cells**, v. 13, n. 8, p. 660, 9 Apr. 2024.
- JOHNSTON, M. V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, v. 7, n. 4, p. 229–234, 2001.
- JOURDAIN, P. et al. L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: implication of an ATP-mediated signaling cascade. **Scientific reports**, v. 6, p. 21250, 19 Feb. 2016.
- KENNEDY, L. et al. Lactate receptor HCAR1 regulates neurogenesis and microglia activation after neonatal hypoxia-ischemia. **eLife**, v. 11, 9 Aug. 2022.
- KONG, L. et al. Monocarboxylate transporter 1 promotes classical microglial activation and pro-inflammatory effect via 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3. **Journal of neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 240, 28 Nov. 2019.

- KOVALEVICH, J.; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods in molecular biology** , v. 1078, p. 9–21, 2013.
- 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, Jun. 2010.
- LAURITZEN, K. H. et al. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. **Cerebral cortex** , v. 24, n. 10, p. 2784–2795, Oct. 2014.
- LAWN, J. E. et al. Two million intrapartum-related stillbirths and neonatal deaths: where, why, and what can be done? **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 107 Suppl 1, p. S5-18, S19, Oct. 2009.
- LI, H. et al. Baicalin and Geniposide Inhibit Polarization and Inflammatory Injury of OGD/R-Treated Microglia by Suppressing the 5-LOX/LTB4 Pathway. **Neurochemical research**, v. 46, n. 7, p. 1844–1858, Jul. 2021.
- LIVINGSTON, J. M. et al. Subacute metformin treatment reduces inflammation and improves functional outcome following neonatal hypoxia ischemia. **Brain, behavior, & immunity - health**, v. 7, p. 100119, Aug. 2020.
- LOCCI, E. et al. Exploring Perinatal Asphyxia by Metabolomics. **Metabolites**, v. 10, n. 4, 4 Apr. 2020.
- LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural brain research**, v. 157, n. 1, p. 157–165, 10 Feb. 2005.
- MÄCHLER, P. et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. **Cell metabolism**, v. 23, n. 1, p. 94–102, 12 Jan. 2016.
- MAGISTRETTI, P. J.; ALLAMAN, I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 235–249, Apr. 2018.
- MARTÍNEZ, M.-A. et al. Use of human neuroblastoma SH-SY5Y cells to evaluate glyphosate-induced effects on oxidative stress, neuronal development and cell death signaling pathways. **Environment international**, v. 135, p. 105414, 1 Feb. 2020.

- MCKENNA, M. C.; HOPKINS, I. B.; CAREY, A. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamate decreases both glucose and lactate metabolism in neurons and astrocytes: implications for lactate as an energy substrate for neurons. **Journal of neuroscience research**, v. 66, n. 5, p. 747–754, 1 Dec. 2001.
- 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.
- MIRZA, M. A. et al. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, p. 32, 20 Feb. 2015.
- MOLLOY, E. J. et al. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy: moving from controversy to consensus definitions and subclassification. **Pediatric research**, 12 Aug. 2023.
- MONSORNO, K. et al. Loss of microglial MCT4 leads to defective synaptic pruning and anxiety-like behavior in mice. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 16 Sep. 2023.
- MOREIRA, T. J. T. P. et al. Enhanced cerebral expression of MCT1 and MCT2 in a rat ischemia model occurs in activated microglial cells. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 29, n. 7, p. 1273–1283, Jul. 2009.
- MORLAND, C. et al. The lactate receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. **Journal of neuroscience research**, v. 93, n. 7, p. 1045–1055, Jul. 2015.
- MOSIENKO, V.; TESCHEMACHER, A. G.; KASPAROV, S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 7, p. 1069–1075, Jul. 2015.
- NABETANI, M.; SHINTAKU, H.; HAMAZAKI, T. Future perspectives of cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Pediatric research**, v. 83, n. 1–2, p. 356–363, Jan. 2018.
- NAEYE, R. L. et al. Neonatal mortality, the male disadvantage. **Pediatrics**, v. 48, n. 6, p. 902–906, Dec. 1971.
- NAMUSOKE, H. et al. Incidence and short term outcomes of neonates with hypoxic ischemic encephalopathy in a Peri Urban teaching hospital, Uganda: a prospective

- cohort study. **Maternal health, neonatology and perinatology**, v. 4, p. 6, 7 Mar. 2018.
- NETTO, C. A. et al. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. **Journal of neuroscience research**, v. 95, n. 1–2, p. 409–421, 2 Jan. 2017.
- NETTO, C. A. et al. Pregnancy as a valuable period for preventing hypoxia-ischemia brain damage. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 70, p. 12–24, Nov. 2018.
- NETZAHUALCOYOTZI, C.; PELLERIN, L. Neuronal and astroglial monocarboxylate transporters play key but distinct roles in hippocampus-dependent learning and memory formation. **Progress in neurobiology**, v. 194, p. 101888, Nov. 2020.
- NICOLA, R.; MADAR, R.; OKUN, E. HCAR1-Mediated L-Lactate Signaling Suppresses Microglial Phagocytosis. **Neuromolecular medicine**, v. 24, n. 4, p. 399–404, Dec. 2022.
- NIJBOER, C. H. A. et al. Gender-dependent pathways of hypoxia-ischemia-induced cell death and neuroprotection in the immature P3 rat. **Developmental neuroscience**, v. 29, n. 4–5, p. 385–392, 2007.
- NORTHINGTON, F. J. et al. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. **Neurobiology of disease**, v. 8, n. 2, p. 207–219, Apr. 2001.
- NUNES, R. R. et al. Therapeutic hypothermia is limited in preventing developmental impairments after neonatal hypoxia-ischemia. **Developmental neuroscience**, 31 Oct. 2023.
- OTA, A. et al. Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 177, n. 3, p. 519–526, 1997.
- PAOLICELLI, R. C. et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. **Neuron**, v. 110, n. 21, p. 3458–3483, 2 Nov. 2022.
- PARK, J. et al. Growth and developmental outcomes of infants with hypoxic ischemic encephalopathy. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 23100, 28 Dec. 2023.
- PEDROZA-GARCÍA, K. A.; CALDERÓN-VALLEJO, D.; QUINTANAR, J. L. Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: Perspectives of Neuroprotective and

- Neuroregenerative Treatments. **Neuropediatrics**, v. 53, n. 6, p. 402–417, Dec. 2022.
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 22, p. 10625–10629, 25 Oct. 1994.
- PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J. Sweet sixteen for ANLS. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 7, p. 1152–1166, Jul. 2012.
- PENNY, T. R. et al. Optimization of behavioral testing in a long-term rat model of hypoxic ischemic brain injury. **Behavioural brain research**, v. 409, p. 113322, 9 Jul. 2021.
- PERLMAN, J. M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. **Clinical therapeutics**, v. 28, n. 9, p. 1353–1365, Sep. 2006.
- PIERRE, K. et al. Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. **Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 617–627, 2000.
- QIN, X. et al. TLR4 signaling is involved in the protective effect of propofol in BV2 microglia against OGD/reoxygenation. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 69, n. 4, p. 707–718, Dec. 2013.
- QIU, J. et al. The neuroprotection of Sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling. **International immunopharmacology**, v. 40, p. 492–500, Nov. 2016.
- RAFIKI, A. et al. HIGHLY DIFFERENTIAL EXPRESSION OF THE MONOCARBOXYLATE TRANSPORTERS MCT2 AND MCT4 IN THE DEVELOPING RAT BRAIN. **Neuroscience**, v. 122, p. 677–688, 2003.
- RAGHUNATH, M. et al. A novel kinase, AATYK induces and promotes neuronal differentiation in a human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. **Brain research. Molecular brain research**, v. 77, n. 2, p. 151–162, 5 May 2000.
- RAKHADE, S. N.; JENSEN, F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. **Nature reviews. Neurology**, v. 5, n. 7, p. 380–391, Jul. 2009.
- RICE, J. E., 3rd; 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, Feb. 1981.

- RINHOLM, J. E. et al. Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 2, p. 538–548, 12 Jan. 2011.
- ROBERGS, R. A. et al. **Lactate, not Lactic Acid, is Produced by Cellular Cytosolic Energy Catabolism. Physiology**, 1 Jan. 2018.
- ROCHA-FERREIRA, E. et al. The duration of hypothermia affects short-term neuroprotection in a mouse model of neonatal hypoxic ischaemic injury. **PloS one**, v. 13, n. 7, p. e0199890, 3 Jul. 2018.
- ROS, J. et al. Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex. **Journal of neuroscience research**, v. 66, n. 5, p. 790–794, 1 Dec. 2001.
- ROSAFIO, K.; PELLERIN, L. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 α -mediated transcriptional regulation. **Glia**, v. 62, n. 3, p. 477–490, Mar. 2014.
- ROUMES, H. et al. Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 342–358, Feb. 2021a.
- ROUMES, H. et al. Lactate transporters in the rat barrel cortex sustain whisker-dependent BOLD fMRI signal and behavioral performance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 47, 23 Nov. 2021b.
- SANCHES, E. F. et al. Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? **Brain research**, v. 1507, p. 105–114, 24 Apr. 2013.
- SANCHES, E. F. et al. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. **Neuroscience**, v. 290, p. 581–593, 2 Apr. 2015.
- SANCHES, E. F. et al. Mild Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia in Very Immature Rats Causes Long-Term Behavioral and Cerebellar Abnormalities at Adulthood. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 634, 5 Jun. 2019.
- SANCHES, E. F. et al. Previous adaptation triggers distinct molecular pathways and modulates early and long-term neuroprotective effects of pregnancy swimming

- preventing neonatal hypoxia-ischemia damage in rats. **Brain research**, v. 1733, p. 146722, 15 Apr. 2020.
- SCHREGLMANN, M. et al. Systematic review: long-term cognitive and behavioural outcomes of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy in children without cerebral palsy. **Acta paediatrica**, v. 109, n. 1, p. 20–30, Jan. 2020.
- SCHURR, A. et al. Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. **Journal of neurochemistry**, v. 69, n. 1, p. 423–426, Jul. 1997.
- SERDAR, M. et al. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 237, 24 May 2019.
- SHANKARAN, S. et al. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. **The New England journal of medicine**, v. 353, p. 1574–1584, 2005.
- SIDORYK-WĘGRZYNOWICZ, M.; STRUŻYŃSKA, L. Astroglial and Microglial Purinergic P2X7 Receptor as a Major Contributor to Neuroinflammation during the Course of Multiple Sclerosis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, 5 Aug. 2021.
- SMITH, A. L.; ROSENKRANTZ, T. S.; FITCH, R. H. Effects of Sex and Mild Intrainsult Hypothermia on Neuropathology and Neural Reorganization following Neonatal Hypoxic Ischemic Brain Injury in Rats. **Neural plasticity**, v. 2016, p. 2585230, 3 Mar. 2016.
- SUZUKI, A. et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 810–823, 4 Mar. 2011.
- TASSINARI, I. D. Administração de lactato como agente neuroprotetor em ratos neonatos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia encefálica. 2020.
- TASSINARI, I. D. et al. Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia-Ischemia. **Neuroscience**, v. 448, p. 191–205, 10 Nov. 2020.
- TASSINARI, I. D. et al. Lactate Protects Microglia and Neurons from Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation. **Neurochemical research**, 29 Mar. 2024.
- TEPE, T. et al. Long-term effect of indomethacin on a rat model of neonatal hypoxia ischemic encephalopathy through behavioral tests. **International journal of**

- developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 84, n. 1, p. 22–34, Feb. 2024.
- TETOROU, K. et al. Current Therapies for Neonatal Hypoxic-Ischaemic and Infection-Sensitised Hypoxic-Ischaemic Brain Damage. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 13, p. 709301, 24 Aug. 2021.
- THORESEN, M. **Combining two good treatments makes it worse. Brain, behavior, and immunity**, Jul. 2018.
- ULLAH, M. S.; DAVIES, A. J.; HALESTRAP, A. P. The Plasma Membrane Lactate Transporter MCT4, but Not MCT1, Is Up-regulated by Hypoxia through a HIF-1 α -dependent Mechanism *. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9030–9037, 7 Apr. 2006.
- UNSICKER, C. et al. SHANK2 mutations impair apoptosis, proliferation and neurite outgrowth during early neuronal differentiation in SH-SY5Y cells. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 2128, 22 Jan. 2021.
- VANNUCCI, R. C. et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Journal of neuroscience research**, v. 55, n. 2, p. 158–163, 15 Jan. 1999.
- VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. **The Journal of experimental biology**, v. 207, n. Pt 18, p. 3149–3154, Aug. 2004.
- VARGO, J. M. et al. Hemispheric asymmetry in neglect produced by unilateral lesions of dorsomedial prefrontal cortex in rats. **Experimental neurology**, v. 102, n. 2, p. 199–209, Nov. 1988.
- VOHRA, R. et al. Dual Properties of Lactate in Müller Cells: The Effect of GPR81 Activation. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 60, n. 4, p. 999–1008, 1 Mar. 2019a.
- VOHRA, R. et al. Lactate-Mediated Protection of Retinal Ganglion Cells. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 9, p. 1878–1888, 19 Apr. 2019b.
- VOHRA, R. et al. Prevention of Cell Death by Activation of Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1 (GPR81) in Retinal Explants. **Cells**, v. 11, n. 13, 2 Jul. 2022.
- WEIS, S. N. et al. Autophagy in the brain of neonates following hypoxia-ischemia shows sex- and region-specific effects. **Neuroscience**, v. 256, p. 201–209, 3 Jan. 2014.
- WU, Y. et al. Hippocampal Lactate-Infusion Enhances Spatial Memory Correlated with Monocarboxylate Transporter 2 and Lactylation. **Brain Sciences**, v. 14, n. 4, p. 327, 28 Mar. 2024.

- XIE, J. et al. Rethinking the necessity of low glucose intervention for cerebral ischemia/reperfusion injury. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 7, p. 1397–1403, Jul. 2022a.
- XIE, Y. et al. The role and mechanism of histone lactylation in health and diseases. **Frontiers in genetics**, v. 13, p. 949252, 23 Aug. 2022b.
- XIONG, M. et al. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. **Neurochemistry international**, v. 58, n. 6, p. 625–633, May 2011.
- YANG, F. et al. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 4, p. 660–667, Apr. 2014.
- YANG, J. et al. Aerobic exercise regulates GPR81 signal pathway and mediates complement- microglia axis homeostasis on synaptic protection in the early stage of Alzheimer's disease. **Life sciences**, p. 122042, 25 Aug. 2023.
- YOU, Q. et al. Neuroprotective strategies for neonatal hypoxic-ischemic brain damage: Current status and challenges. **European journal of pharmacology**, v. 957, p. 176003, 15 Oct. 2023.
- YSTGAARD, M. B. et al. Early Upregulation of NLRP3 in the Brain of Neonatal Mice Exposed to Hypoxia-Ischemia: No Early Neuroprotective Effects of NLRP3 Deficiency. **Neonatology**, v. 108, n. 3, p. 211–219, 13 Aug. 2015.
- ZANG, J. et al. Short-term effects of therapeutic hypothermia following hypoxia-ischemia in neonatal male and female rats. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 165–177, Apr. 2023.
- ZHAI, X. et al. L-lactate preconditioning promotes plasticity-related proteins expression and reduces neurological deficits by potentiating GPR81 signaling in rat traumatic brain injury model. **Brain research**, v. 1746, p. 146945, 1 Nov. 2020.
- ZHANG, B.-J. et al. Splenectomy protects experimental rats from cerebral damage after stroke due to anti-inflammatory effects. **Chinese medical journal**, v. 126, n. 12, p. 2354–2360, Jun. 2013.
- ZHANG, J. et al. Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization. **Cell metabolism**, v. 31, n. 6, p. 1136-1153.e7, 2 Jun. 2020.

- ZHANG, Y. et al. Lactate modulates microglial inflammatory responses after oxygen-glucose deprivation through HIF-1 α -mediated inhibition of NF- κ B. **Brain research bulletin**, v. 195, p. 1–13, Apr. 2023.
- ZHU, C. et al. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **Journal of neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1016–1027, Feb. 2006.