

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

Ricardo Ribeiro Nunes

**EFEITO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA SOBRE PARÂMETROS DO
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTAIS E A IMUNIDADE PERIFÉRICA EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA
NEONATAL**

Porto Alegre

2021

Ricardo Ribeiro Nunes

**EFEITO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA SOBRE PARÂMETROS DO
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTAIS E A IMUNIDADE PERIFÉRICA EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA
NEONATAL**

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

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

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Ricardo Ribeiro
EFEITO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA SOBRE PARÂMETROS
DO DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTAIS E A IMUNIDADE
PERIFÉRICA EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA NEONATAL / Ricardo Ribeiro
Nunes. -- 2021.

103 f.

Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Hipóxia-isquemia neonatal. 2. Hipotermia
terapêutica. 3. Dimorfismo sexual. 4. Desenvolvimento
e comportamento. 5. Imunidade periférica. I. de Fraga,
Luciano Stürmer, orient. II. Paz, Ana Helena da Rosa,
coorient. III. Título.

Ricardo Ribeiro Nunes

**EFEITO DA HIPOTERMIA TERAPÊUTICA SOBRE PARÂMETROS DO
DESENVOLVIMENTO E COMPORTAMENTAIS E A IMUNIDADE PERIFÉRICA EM
RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA
NEONATAL**

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

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Giovenardi - UFCSPA

Profa. Dra. Sílvia Honda Takada - UFABC

Profa. Dra. Nadja Schröder - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de pesquisa, sob orientação do Prof. Luciano, agradeço imensamente por toda a ajuda. Sem vocês, nada disso seria possível, afinal, ninguém faz ciência sozinho. Todas vocês me ajudaram durante os experimentos e com vocês, o trabalho além de se tornar possível, se torna agradável. Além de colegas de laboratório, considero todas vocês amigas. Um agradecimento especial à amiga que nunca passa despercebida, Isadora Tassinari, que esteve sempre presente, trabalhando comigo na UEA e realizou os procedimentos cirúrgicos e escutou meus dramas, aguentou minhas teimosias e contribuiu com várias discussões científicas e até existenciais; à Janaína Zang, que auxiliou em vários experimentos e análise de resultados e me acompanhou durante várias noites de hipotermia na UEA (hipotermia dos animais e dos pesquisadores...) e que mandou mensagens para checar se eu ainda tinha sanidade mental durante a escrita; às alunas de iniciação científica Mirella Andrade e Anna Clara Colucci, sempre dispostas a participar, ajudar nos experimentos e na análise dos resultados.

Agradeço a minha coorientadora, Profa. Ana Helena da Rosa Paz, por aceitar essa parceria e por ter aberto as portas de seu grupo de pesquisa e do HCPA, possibilitando a execução do trabalho em condições excelentes. Gostaria de ter tido mais contato e de mais momentos para trocas de ideias, mas isso foi dificultado pelo momento de pandemia e também pela sua maternidade em dose dupla: com a chegada de gêmeos em casa tudo deve ficar mais agitado! Porém, agradeço pelas conversas que tivemos para a elaboração do projeto. Levei adiante uma ideia que surgiu nesse período: os esfregaços sanguíneos, que foram um dado importante para essa dissertação. Espero que possamos seguir parceiros no futuro!

Agradeço à Profa. Denise Zancan, que como primeira professora de fisiologia na graduação, me encantou e plantou a semente que me fez seguir nessas áreas incríveis que são a fisiologia e a neurociência. Ao Prof. Luiz Carlos Rios Kucharski e à Profa. Márcia Trapp, que regaram essa semente em outras disciplinas de fisiologia durante a graduação e que, juntamente com a Profa. Anapaula Sommer Vinagre e Profa. Roselis Silveira Martins da Silva, me auxiliaram e me acolheram no LaMEC.

Mas provavelmente o momento mais importante e decisivo para que eu definisse o meu caminho foi quando fiz a disciplina eletiva de Neurofisiologia Básica, com o Prof. Luciano Stürmer de Fraga. Devo dizer que suas aulas foram riquíssimas, e não tive dúvidas que me encontraria nas neurociências. Não tive que pensar muito para fazer também a outra disciplina que ministravas de Fisiologia Humana, que foi praticamente uma experiência de aula particular, visto que fui o único aluno presente ao final da disciplina. A partir dessa disciplina, considereei mais interessante a visão abrangente da fisiologia. Além disso, como sabes, sigo um grande entusiasta da fisiologia comparada! Espero que saibas o excelente professor que és: possuis uma visão e didática incrível para a explicação dos conceitos básicos que possibilitam o entendimento dos assuntos mais complexos. E não poupa brincadeiras durante a aula! É aquele professor que demonstra o interesse no assunto que está ensinando e o interesse no ato de dar aula. Não demorou muito para que eu batesse na porta do laboratório e iniciasse a iniciação científica sob sua orientação, e em seguida, o mestrado. Como orientador, não foste diferente: sempre muito atencioso,

compreensivo, didático, divertido e interessado em fazer pesquisa. Também espero que saiba como isso é importante para motivar os seus alunos. Além disso, és exigente, e claro que não faltaram puxões de orelha, mas isso também é necessário e demonstra como se envolve e se importa com a produção científica do grupo. Poderia continuar escrevendo, mas também tenho que agradecer outras pessoas. Continue sendo esse orientador incrível: és, com certeza, meu maior exemplo de pesquisador e professor e tentarei seguir seus passos.

Agradeço meus pais, Sandra Mara Ribeiro Nunes e Ricardo Piucco Nunes, por serem também grandes exemplos pessoais e por incentivarem meus estudos, acreditarem no meu potencial e me apoiarem nas minhas escolhas. Também por me escutarem falando de coisas científicas, biológicas e fisiológicas que talvez nem estivessem entendendo... Mãe, obrigado por sempre querer me ajudar em tudo, até quando não tinha o que fazer, por se preocupar com minha saúde e quando ficava acordado de madrugada, sempre buscar me fazer sentir melhor e também pelos puxões de orelha quando achava que eu fazia escolhas erradas (pelo menos me fez refletir, mas sabes que sou teimoso). Pai, obrigado por sempre me ouvir, por sempre estar do meu lado, pelas eventuais caronas e pela construção do “beam walk”. Sei que se preocupas tanto quanto a minha mãe, então, obrigado por isso.

Agradeço ao meu grande amor, e com quem pretendo passar o resto de minha vida, Bárbara de Mello Barbosa, por deixar tudo mais leve (e olha que, mesmo assim, quase não aguentei... o mestrado mexe com a gente). Me ajudaste e me atrapalhaste, assim como eu faço contigo. Você tira a monotonia da minha vida, e isso me faz seguir em frente. E quando não me sinto bem, quando não sei o que fazer ou quando não consigo escrever aquele parágrafo da dissertação, encontro a tranquilidade em um abraço, recarrego as energias para seguir em frente. Seja qual for o objetivo de uma vida, sem amor, nada se faz. É preciso amar para se fazer ciência.

Agradeço às minhas duas famílias (uma de sangue e outra não), que me apoiaram em vários momentos da minha vida e durante os 2 anos de mestrado. Agradeço especialmente aos meus avós, ao meu primo Thiago Nunes Antoniazzi (praticamente um irmão) e minha sogra Mariângela de Mello, minha cunhada Beatriz de Mello Barbosa e meu sogro Gerson Luis Pereira Barbosa, por sempre me acolherem, pelos momentos bem-humorados e pelos vários almoços, jantas e cafés, mas principalmente por me fazerem sentir parte dessas outras famílias.

Agradeço também ao mais novo membro da família, meu cachorro, Ozzy. Foi em uma noite, quando voltava do HCPA após um dia de experimentos, que nos encontramos: você simplesmente apareceu no pátio de casa, procurando um lugar para dormir e com uma pata machucada. Acho que caiu do céu.... Hoje estás saudável e sendo muito amado, e me fez companhia durante a escrita da dissertação.

Agradeço a todos meus amigos que me apoiaram e me tranquilizaram. Obrigado por entenderem os momentos em que tive que me ausentar e pelos “rolês”, jogatinas e viagens que não aconteceram porque eu precisava escrever a dissertação ou “estar com os ratos”.

Também agradeço aos professores e aos alunos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) pelas contribuições, auxílios e

divisão do espaço de trabalho. Um agradecimento especial à pós-doc Mariana Hoff, pelas grandes discussões científicas e auxílio nos experimentos e no transporte das amostras.

Agradeço ao técnico Maikel Rosa de Oliveira pelo auxílio na coloração dos esfregaços sanguíneos e dicas sobre como realizá-los.

Ao laboratório de Neurobiologia Comparada pelo auxílio e compartilhamento de espaço e materiais, e em especial à Profa. Wânia Aparecida Partata pelas contribuições quando apresentei meu seminário e pelas ótimas aulas de neurofisiologia no cadeirão.

Agradeço ao Prof. Carlos Alexandre Netto, pelos ensinamentos (em especial na disciplina de história da fisiologia) e por se disponibilizar para auxiliar no projeto. Também agradeço os alunos do Laboratório 35 do Departamento de Bioquímica pela ajuda e disponibilidade.

Agradeço também aos demais professores e colegas do PPG Fisiologia por todos os ensinamentos e contribuições para meu crescimento como cientista.

Agradeço a todos os funcionários da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA, sempre atenciosos e dispostos a ajudar. Agradeço especialmente à enfermeira Marta Justina Cioato, chefe da unidade, e às veterinárias Daniela Campagnol e Tuane Garcez, pela disposição e pela incrível capacidade e praticidade para coordenar as atividades no local. Obrigado também pelo esforço que possibilitou a execução desse projeto durante o período de pandemia da COVID-19.

Agradeço à equipe do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), pela disposição e esforço para manter a produção e a entregar os animais, sempre nos prazos, mesmo com as dificuldades impostas pela pandemia.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Márcia Giovenardi, Profa. Dra. Silvia Honda Takada e Profa. Dra. Nadja Schröder pela disponibilidade e aceite do convite.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado e ao HCPA pelo apoio financeiro através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

Enfim, agradeço a todos que estiveram comigo nesse período de 2019 à 2021: nada foi fácil, pois, se já é difícil desenvolver um projeto de pesquisa, ficar em casa e não poder desenvolvê-lo por quase 1 ano por conta da pandemia foi muito mais. Mesmo assim, graça a todos os esforços, conseguimos desenvolver o projeto e cumprir os prazos, resultando em um estudo com qualidade e que espero que possa contribuir com o desenvolvimento da área e de trabalhos futuros do nosso grupo de pesquisa.

RESUMO

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é um problema de saúde mundial, responsável por muitas das mortes e deficiências neuropsicológicas em recém-nascidos. O único tratamento existente atualmente é a hipotermia terapêutica (HT), que apesar dos resultados positivos, ainda possui limitações quanto ao seu uso. O entendimento de efeitos específicos da HT é importante para o aprimoramento do seu uso e para a busca de terapias complementares. Neste estudo, foi avaliado o efeito do tratamento com HT em parâmetros do desenvolvimento, desfechos comportamentais e imunidade periférica em ratos neonatos machos e fêmeas após a HI. No 7º dia pós-natal (P7), realizou-se a oclusão da carótida comum direita seguida de exposição a uma atmosfera hipóxica (8% oxigênio). Nos animais do grupo SHAM, realizou-se uma cirurgia fictícia e estes foram mantidos em normóxia. Posteriormente, realizou-se a HT pela redução da temperatura corporal para 32°C por 5 h no grupo HT. Animais dos grupos HI e SHAM foram mantidos em normotermia (37°C). Realizaram-se os testes comportamentais de geotaxia negativa, aversão à borda, reflexo de endireitamento e discriminação olfatória de P8 a P14; e o teste do cilindro e escore de severidade neurológica modificado (mNSS) em P20. Também foram avaliados marcadores do desenvolvimento como o peso corporal, o dia de abertura dos olhos e o índice anogenital (IAG). Os animais foram eutanasiados em P9 ou P21, para pesagem dos hemisférios cerebrais, fígado, baço, timo e tecido adiposo marrom. Também foi coletado sangue para realização de contagem de leucócitos em esfregaços sanguíneos. Em machos e fêmeas, observou-se uma redução do peso do hemisfério ipsilateral à lesão nos grupos HI e HT, mais pronunciada em P21. Em P9, observou-se a presença de edema cerebral. Em relação aos marcadores do desenvolvimento, observou-se menor ganho de peso nos grupos HI e HT e atraso na abertura do olho ipsilateral à lesão. O comportamento foi pouco afetado pela HI e HT, mostrando alterações pontuais nas idades de P12 e P14. O teste de discriminação olfatória foi o mais afetado, havendo um maior prejuízo quando estímulos olfatórios da caixa-moradia estavam posicionados ipsilateralmente à lesão, nos machos. Nas fêmeas, houve uma diminuição do peso do baço no grupo HI. Nos machos, observou-se uma diminuição na quantidade de leucócitos circulantes no grupo HI, sendo parcialmente recuperada no grupo HT, enquanto nas fêmeas houve o aumento no grupo HI e recuperação no grupo HT. A HT parece ter sido neuroprotetora, apesar de não ter prevenido a perda de peso encefálica. A HT não preveniu os prejuízos nos parâmetros do desenvolvimento, mas tendeu a normalizar a imunidade periférica e prevenir os prejuízos comportamentais.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia neonatal. Hipotermia terapêutica. Dimorfismo sexual. Desenvolvimento. Comportamento. Imunidade periférica.

ABSTRACT

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a worldwide health problem, responsible for many of the deaths and neuropsychological deficiencies in newborns. The only treatment currently is therapeutic hypothermia (TH), which despite the positive results, still show some limitations. Understanding the specific effects of TH is important for the improvement of its use and for the search for complementary therapies. In this study, the effects of TH treatment on developmental parameters, behavioral outcomes and peripheral immunity were evaluated in male and female neonatal rats after HI. In the 7th post-natal day (P7), the right common carotid was occluded followed by exposure of the animals to a hypoxic atmosphere (8% oxygen). In the animals of the SHAM group, a fictitious surgery was performed and they were kept in normoxia. Thereafter, HT was performed by reducing body temperature to 32°C for 5 h in the HT group. Animals from the HI and SHAM groups were kept in normothermia (37°C). The behavioral tests of negative geotaxis, cliff aversion, righting reflex and olfactory discrimination were performed from P8 to P14; and the cylinder test and modified neurological severity score (mNSS) were performed at P20. Developmental markers such as body weight, day of eye opening and anogenital index (IAG) were also evaluated. The animals were euthanized at P9 or P21, and the cerebral hemispheres, the liver, the spleen, the thymus and the brown adipose tissue were weighted. Blood was also collected to perform leukocyte counting in blood smears. In males and females, there was a reduction of the weight of the brain hemisphere ipsilateral to the lesion in the HI and HT groups (more pronounced in P21). In P9, the presence of cerebral edema was observed. Regarding the developmental markers, a reduction in the weight gain and a delay in the opening of the ipsilateral eye were also observed in the HI and HT groups. The behavioral outcomes were just slightly affected by HI and HT, showing punctual changes in the ages of P12 and P14. The olfactory discrimination test was the most affected, with a greater impairment in the response when olfactory stimulus from the home bedding was positioned ipsilateral to the lesion, in males. In females, there was a reduction in spleen weight in the HI group. In males, there was a reduction in the number of circulating leukocytes in the HI group, being partially recovered in the HT group; while in females the number of leukocytes was increased in the HI group and recovered in the HT group. HT appears to have been neuroprotective, although it did not prevent brain weight loss. HT did not prevent developmental impairment, but showed a trend to recover the peripheral immunity and prevent behavioral impairment.

Keywords: Neonatal hypoxia-ischemia. Therapeutic hypothermia. Sexual dimorphism. Development. Behavior. Peripheral immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho Experimental	29
Figura 2. Temperatura Corporal nos Experimentos Preliminares	44
Figura 3. Temperatura Corporal nos Experimentos Posteriores.....	44
Figura 4. Imagens Representativas dos Encéfalos.....	45
Figura 5. Diferença de Peso entre os Hemisférios Cerebrais	46
Figura 6. Percentual do Peso Total do Encéfalo	47
Figura 7. Peso Corporal	48
Figura 8. Dia de Abertura dos Olhos	49
Figura 9. Índice Anogenital	50
Figura 10. Geotaxia Negativa	52
Figura 11. Geotaxia Negativa (AUC).....	53
Figura 12. Aversão à Borda	55
Figura 13. Aversão à Borda (AUC).....	56
Figura 14. Reflexo de Endireitamento	58
Figura 15. Reflexo de Endireitamento (AUC).....	59
Figura 16. Teste de Discriminação Olfatória.....	61
Figura 17. Teste de Discriminação Olfatória (AUC).....	63
Figura 18. Teste do Cilindro	66
Figura 19. Contagem de Leucócitos	68
Figura 20. Percentual do Peso do Baço	69
Figura 21. Percentual do Peso do Timo	70
Figura 22. Percentual do Peso do Fígado	71
Figura 23. Percentual do Peso Tecido Adiposo Marrom.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do escore de severidade neurológica modificado (mNSS).	38
Tabela 2. Mortalidade ao longo do estudo	42
Tabela 3. Proporções de escolha da marvalha no teste de discriminação olfatória	65
Tabela 4. Pontuações no escore de severidade neurológica modificado (mNSS)	67
Tabela 5. Pesos absolutos dos órgãos periféricos.	74
Tabela 6. Resumo dos principais resultados do estudo	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC: área sob a curva

DAG: distância anogenital

DAMP: padrões moleculares associados ao dano

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

HI: hipóxia-isquemia

HIF-1 α : fator induzível pela hipóxia-1 alfa

HT: hipotermia terapêutica

IAG: índice anogenital

Iba1: molécula adaptadora ligadora de cálcio ionizado-1

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

IL-18: interleucina-18

mNSS: escore de severidade neurológica modificado

NF- κ B: fator nuclear-kappa B

NMDA: N-metil D-Aspartato

P7: 7^o dia pós-natal

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

SNA: sistema nervoso autônomo

SNC: sistema nervoso central

TAM: tecido adiposo marrom

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UCP-1: proteína desacopladora-1

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Justificativa	23
1.2. Hipótese	24
1.3. Objetivo Geral	24
1.3.1. Objetivos Específicos	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1. Animais	26
2.2. Aspectos Éticos	27
2.3. Desenho Experimental	27
2.4. Hipóxia-Isquemia Neonatal.....	30
2.5. Hipotermia Terapêutica	31
2.6. Parâmetros do Desenvolvimento	32
2.6.1. Peso Corporal.....	32
2.6.2. Dia de Abertura dos Olhos	33
2.6.3. Índice Anogenital.....	33
2.7. Testes Comportamentais	33
2.7.1. Geotaxia Negativa	34
2.7.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”).....	34
2.7.3. Reflexo de Endireitamento	34
2.7.4. Testes de Discriminação Olfatória	35
2.7.5. Teste do Cilindro	35
2.7.6. Escore de Severidade Neurológica Modificado (mNSS).....	36
2.8. Eutanásia e Pesagem dos Órgãos.....	38
2.9. Esfregaço Sanguíneo e Contagem de Leucócitos	39
2.10. Análise Estatística	40
3. RESULTADOS	42
3.1. Mortalidade.....	42
3.2. Padronização da Hipotermia Terapêutica.....	43
3.3. Peso do Encéfalo	44
3.4. Peso Corporal	48
3.5. Dia de Abertura dos Olhos	49
3.6. Índice Anogenital.....	49
3.7. Geotaxia Negativa.....	50

3.8. Aversão à Borda.....	54
3.9. Reflexo de Endireitamento	57
3.10. Teste de Discriminação Olfatória.....	60
3.11. Teste do Cilindro	66
3.12. Escore de Severidade Neurológica Modificado (mNSS)	66
3.13. Contagem de Leucócitos	67
3.14. Peso dos Órgãos Periféricos.....	68
4. DISCUSSÃO.....	75
5. CONCLUSÕES	89
6. PERSPECTIVAS.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. INTRODUÇÃO

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é uma condição que afeta recém-nascidos mundialmente. O termo hipóxia se refere à diminuição da disponibilidade de oxigênio nos tecidos, enquanto o termo isquemia se refere à diminuição da perfusão sanguínea (a qual também resulta na diminuição da entrega de oxigênio) (QUIRKE *et al.*, 2021). Asfixia perinatal é um outro termo comumente utilizado como sinônimo, se referindo ao prejuízo nas trocas gasosas e perfusão sanguínea, conseqüentemente causando hipóxia (ASLAM *et al.*, 2014; RAINALDI & PERLMAN, 2016). No caso da asfixia perinatal, há também a ocorrência de hipercapnia (aumento de gás carbônico no sangue), podendo levar a outros distúrbios metabólicos e à acidose (KURINCZUK *et al.*, 2010).

Vários fatores podem contribuir para a ocorrência da HI neonatal, como pré-eclâmpsia, descolamento da placenta, toxemia, complicações durante o parto e prematuridade, tendo como principal consequência um dano encefálico, denominado encefalopatia hipóxico-isquêmica (ASLAM *et al.*, 2014; DOUGLAS-ESCOBAR & WEISS, 2012). Entre esses fatores, a prematuridade se destaca (LEE *et al.*, 2008): bebês nascidos pré-termo frequentemente apresentam problemas pulmonares, como produção insuficiente de surfactante (síndrome do desconforto respiratório), problemas cardiovasculares e atraso no desenvolvimento do sistema nervoso, destacando-se a presença de pré-oligodendrócitos que são mais sensíveis à hipóxia-isquemia do que os oligodendrócitos (GOPAGONDANAHALLI *et al.*, 2016).

Muitos dos recém-nascidos que sofrem um evento hipóxico-isquêmico não sobrevivem aos primeiros dias de vida (KAWAKAMI *et al.*, 2021). Os sobreviventes muitas vezes apresentam deficiências neuropsicológicas, como problemas cognitivos, deficiências visuais e auditivas, epilepsia e paralisia cerebral (DOUGLAS-ESCOBAR & WEISS, 2012; YILDIZ *et al.*, 2017). Em um estudo realizado na China, foi verificada a presença de deficiências intelectuais e auditivas causadas por asfixia perinatal, com uma prevalência de 0,77‰ crianças com deficiência no país (AO *et al.*, 2021).

A encefalopatia hipóxico-isquêmica é um dos principais problemas na neonatologia atualmente, ocorrendo em torno de 1-8‰ nascidos (KURINCZUK *et al.*, 2010). Porém, estes valores representam melhor a realidade dos países desenvolvidos, sendo que países subdesenvolvidos possuem uma prevalência ainda maior no número de casos (QUIRKE *et al.*, 2021). Estudos realizados no continente

africano mostraram prevalência de 30,1% em uma unidade de saúde da Nigéria (ILAH *et al.*, 2015) e de 21,1% em um hospital da Tanzânia (SEPEKU & KOHI, 2011). Um estudo de meta-análise realizado na Etiópia mostrou uma prevalência de asfixia perinatal em 24,06% dos neonatos (SENDEKU *et al.*, 2020). A associação entre asfixia perinatal e condição socioeconômica precária também foi identificada no Nepal e na China, uma vez que os casos de asfixia são impactados pelo grau de instrução, nutrição, saneamento básico e acesso das mães ao sistema de saúde (AO *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2008).

No Brasil, houve uma redução na mortalidade de bebês nascidos a termo que sofreram asfixia perinatal de 0,81‰ em 2005 para 0,61‰ em 2010 (ALMEIDA *et al.*, 2017). Entretanto, esse número ainda pode ser considerado alto, além de existir a possibilidade de estar subestimado, uma vez que neste estudo não foram incluídos os bebês prematuros, o grupo mais vulnerável à asfixia perinatal. Além disso, esse mesmo estudo evidenciou uma desigualdade na taxa de mortalidade entre as regiões do país, sendo as menores taxas encontradas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste; enquanto taxas 2 vezes maiores foram verificadas nas regiões norte e nordeste. Outro estudo, realizado em hospitais de São Paulo, mostrou uma redução de 32% na mortalidade entre 2004 e 2013 de 1,38‰ para 0,95‰ nascidos (KAWAKAMI *et al.*, 2021). Porém, esta redução ocorreu majoritariamente em bebês nascidos a termo, destacando novamente a vulnerabilidade dos bebês pré-termo.

O modelo utilizado em ratos adultos por Levine (1960), adaptado para ratos neonatos por Rice, Vannucci e Brierley (1981), é uma ferramenta útil para o estudo da HI em animais experimentais, sendo capaz de reproduzir unilateralmente a lesão encefálica humana. O modelo consiste na oclusão de uma das artérias carótidas comuns e subsequente exposição do animal a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) (RICE *et al.*, 1981). As principais estruturas cerebrais afetadas por esse modelo são o córtex cerebral, a substância branca subcortical e periventricular, o corpo estriado e o hipocampo, ipsilaterais à oclusão carotídea (SUTHERLAND *et al.*, 2004; VANNUCCI *et al.*, 1999).

Atualmente, existe uma escassez de opções terapêuticas para o tratamento da HI, sendo a hipotermia terapêutica (HT) a única terapia clínica bem estabelecida e desde 2010 é o tratamento padrão utilizado para a HI em neonatos humanos nascidos a termo (DOUGLAS-ESCOBAR & WEISS, 2015; KARNATOVSKAIA *et al.*, 2014). O procedimento deve ser iniciado em até 6 horas após o evento hipóxico-isquêmico, e

consiste em diminuir a temperatura do bebê para 33,5-34,5°C durante 72 h, seguido de reaquecimento de 0,5°C por hora (ROEHR *et al.*, 2011). O procedimento pode ser realizado através do resfriamento de todo o corpo ou através do resfriamento seletivo da cabeça, ambos com eficácia semelhante (BELETEW *et al.*, 2021; DOUGLAS-ESCOBAR & WEISS, 2015). A HT é capaz de reduzir a mortalidade e diminuir os prejuízos neurológicos após a HI em recém-nascidos (AZZOPARDI *et al.*, 2009; SHANKARAN *et al.*, 2005; SIMBRUNER *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010), também demonstrando melhora no desfecho dos pacientes a longo prazo (GUILLET *et al.*, 2012; JACOBS *et al.*, 2013; SHANKARAN *et al.*, 2012). Um estudo de meta-análise mostrou que a hipotermia terapêutica reduz a mortalidade em casos de HI neonatal em 26% (BELETEW *et al.*, 2021).

A realização da HT pós-HI também é capaz de reduzir a lesão em modelos animais (CHAKKARAPANI *et al.*, 2010; HOBBS *et al.*, 2008). Protocolos que diminuem a temperatura corporal para 26°C ou menos não são neuroprotetores, podendo inclusive piorar a lesão encefálica, enquanto a redução da temperatura corporal para 33,5°C, 32°C ou 30°C confere proteção (WOOD *et al.*, 2016). A indução de hipertermia, aumentando-se a temperatura corporal dos animais para 39°C, também resulta em aumento da lesão (WOOD *et al.*, 2018). Em relação à duração da hipotermia, foi observado que a realização de HT por menos de 2 h não é neuroprotetora (ROCHA-FERREIRA *et al.*, 2018), e que um protocolo de 3 h confere menor proteção do que um de 5 h; já um aumento do tempo para 10 h não confere proteção adicional (SABIR *et al.*, 2012). Vale ressaltar que, nesse último estudo, não foi observada hipoglicemia nos filhotes, mesmo que os filhotes não estivessem se alimentando durante o período, devido ao afastamento da respectiva mãe. A partir desses e outros estudos, concluiu-se que protocolos de HT reduzindo a temperatura corporal dos animais para 32°C durante 5 h são mais eficazes em reduzir o volume de lesão encefálica no modelo de HI neonatal.

Apesar dos benefícios, a HT ainda demonstra limitações importantes na sua utilização em humanos (QUIRKE *et al.*, 2021). O procedimento parece ter uma baixa eficácia em casos de neonatos com lesão severa (GLUCKMAN *et al.*, 2005; SABIR *et al.*, 2012; WOOD *et al.*, 2016). Já para casos leves, os estudos ainda são escassos, de modo que não se tem certeza da eficácia e segurança da aplicação da HT, não sendo recomendada sua utilização nesses pacientes (SAW *et al.*, 2019). Dessa forma, a HT acaba tendo sua maior eficácia limitada aos casos de lesão moderada. Pelo

desconhecimento sobre a sua segurança, a HT também não é aconselhada para bebês nascidos pré-termo, que representam uma parcela significativa dos casos de HI (HERRERA *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2017). A HT também parece ser pouco eficaz para evitar danos na substância branca, refletindo-se em um grau de deficiência cognitiva e motora (SPENCER *et al.*, 2021). A eficácia do procedimento também está diretamente relacionada com o momento da intervenção, possuindo uma janela terapêutica curta (de cerca de 6 horas para ser iniciada, após o evento de HI), podendo aumentar a lesão se executada após esse período (SABIR *et al.*, 2012). Em muitos casos, a aplicação do tratamento se torna impossível pela dificuldade de transporte dos bebês de regiões periféricas até centros de atendimento especializado, ultrapassando o tempo limite para início do tratamento. Na Índia, foi observado um pior desfecho quanto maior o tempo de transporte dos bebês (MONDAL *et al.*, 2021). Tendo em vista essas limitações, é importante o melhor entendimento dos mecanismos de ação da HT e como esta afeta os processos que ocorrem após a HI, para que haja um melhor direcionamento de pesquisas voltadas para terapias complementares e um aprimoramento na aplicação da HT em recém-nascidos humanos.

Os processos que levam ao estabelecimento de um dano encefálico observado após a HI são diversos e variam temporalmente (DAVIDSON *et al.*, 2015). A HI provoca a liberação exacerbada de glutamato, levando a uma estimulação prolongada de seus receptores nos neurônios, em especial os receptores do tipo N-metil D-aspartato (NMDA), gerando um influxo de íons sódio e íons cálcio capaz de ativar os mecanismos de morte celular por apoptose, processo conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (JOHNSTON, 2001). O processo de estresse oxidativo, resultado da alta produção de espécies reativas de oxigênio após a reperfusão do tecido, juntamente com a sobrecarga do sistema antioxidante, também é um importante ativador dos processos de morte celular por apoptose (FERRIERO, 2001). O tratamento com HT se mostrou eficaz, de uma forma geral, por reduzir a taxa metabólica cerebral em 6 a 7% a cada 1°C de resfriamento (KARNATOVSKAIA *et al.*, 2014). Esse efeito diminui o consumo de oxigênio pelas células do sistema nervoso, de forma a diminuir a demanda energética e o estresse oxidativo. A HT também reduz a excitotoxicidade ao reduzir a liberação de neurotransmissores excitatórios e o influxo de cálcio, por exemplo (LIU & YENARI, 2007).

Estudos utilizando modelos animais de HI também têm demonstrado a

existência de diferenças entre animais machos e fêmeas no grau de severidade da lesão (ARTENI *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2019; MIRZA *et al.*, 2015; SANCHES *et al.*, 2015) e na eficácia de neuroprotetores (HAGBERG *et al.*, 2004; NIJBOER *et al.*, 2007). As vias de ativação da apoptose parecem ser dependentes de caspase-3 nas fêmeas, mas nos machos predomina a ativação por outras vias (DU *et al.*, 2004; SIEGEL *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2006). A efetividade da HT também apresenta esse tipo de variação, geralmente sendo mais eficaz nas fêmeas (WOOD *et al.*, 2020). Essas observações levam à necessidade de se pensar em estratégias terapêuticas diferenciais para o tratamento da HI entre machos e fêmeas para a obtenção de melhores resultados clínicos.

Outro ponto relevante que contribui para a formação e progressão da lesão encefálica é a neuroinflamação. A HI neonatal induz uma resposta inflamatória cerebral que inclui a expressão e a produção de citocinas pró- e/ou anti-inflamatórias (KIM & CHO, 2021; ZIEMKA-NALECZ *et al.*, 2017). Essa resposta inflamatória contribui para a morte celular e para o aumento no volume da lesão encefálica nas primeiras horas pós-HI (LUCAS *et al.*, 2006). Também há evidências de que esse processo inflamatório persiste, contribuindo para as fases tardias da lesão, um dos motivos da lesão encefálica estar aumentada diversos dias após o evento hipóxico-isquêmico (DAVIDSON *et al.*, 2015).

Um dos sinais que melhor se correlaciona com a lesão encefálica decorrente da HI é um aumento nos níveis de interleucina-1 beta (IL-1 β), um sinalizador pró-inflamatório, no tecido nervoso e no líquido cefalorraquidiano (ZIEMKA-NALECZ *et al.*, 2017). Outras moléculas pró-inflamatórias que tendem a aumentar no tecido nervoso e no líquido cefalorraquidiano são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-8 (IL-8) e a interleucina-18 (IL-18) (ALY *et al.*, 2006; HEDTJÄRN *et al.*, 2002; JIN *et al.*, 2010; MEYBOHM *et al.*, 2010). Estudos sobre a atuação da IL-6 na HI mostram uma ação dúbia, contribuindo para a inflamação na fase inicial e agindo de forma neuroprotetora nas fases tardias (SUZUKI *et al.*, 2009). O aumento de muitos desses sinais pró-inflamatórios parece ser desencadeado por aumento do fator de transcrição nuclear-kappa B (NF- κ B), cuja inibição já resultou em diminuição da lesão (RIDDER & SCHWANINGER, 2009; VAN DER KOOIJ *et al.*, 2010). Porém, alguns sinalizadores anti-inflamatórios, como a interleucina-10 (IL-10), também aumentam na fase inicial da lesão (MEYBOHM *et al.*, 2010). Alterações nos níveis de

citocinas e nos mecanismos que levam ao aumento da inflamação também mostraram variação de acordo com a idade de ocorrência da HI em ratos neonatos (BROCHU *et al.*, 2011). Os níveis dessas citocinas no sangue tendem a seguir, na maioria dos casos, um padrão semelhante aos observados no sistema nervoso (ROCHA-FERREIRA *et al.*, 2017), porém a resposta desses sinais se mostra muito dinâmica e variável conforme o momento da lesão em ambos os tecidos, de forma que mais estudos são necessários.

A resposta inflamatória depende da ação de células como a microglia e os astrócitos e da infiltração de leucócitos circulantes, cujos efeitos podem induzir ou aumentar a lesão neuronal secundária à lesão produzida pela HI (JIN *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2013). As células microgliais são macrófagos residentes no sistema nervoso, onde ficam em uma forma inativa ramificada desempenhando uma função de vigilância (FLEISS *et al.*, 2021). Padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), a patógenos (PAMPs) e sinais pró e anti-inflamatórios são capazes de ativar a microglia (GÜLKE *et al.*, 2018). A ativação microglial envolve uma mudança morfológica celular para um formato ameboide e móvel (FILOSA & MORRISON, 2013), que pode variar dentro de um espectro de possibilidades entre a forma pró-inflamatória (fenótipo M1) e a anti-inflamatória (fenótipo M2) (ELALI & LEBLANC, 2016; ESPINOSA-GARCIA *et al.*, 2017). A microglia ativada desempenha diversos papéis, como a fagocitose e a liberação de citocinas, e desta forma, pode contribuir tanto para o aumento da lesão quanto para a neuroproteção, variando sua ação espacial e temporalmente na HI (PATEL *et al.*, 2013).

Além da microglia, os astrócitos também estão envolvidos no processo de neuroinflamação, estimulados por determinados sinais, da mesma forma que a microglia (ESCARTIN *et al.*, 2021). Os astrócitos reativos participam da liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, podendo modular o processo inflamatório e a apoptose neuronal (ALY *et al.*, 2006). A reação astrocitária muitas vezes envolve modificações morfológicas, incluindo o aumento dos prolongamentos celulares, migração e proliferação celular, que levam à formação das cicatrizes gliais no tecido lesionado, as quais, em longo prazo, inibem o crescimento axonal e prejudicam a recuperação tecidual (PANICKAR & NOREMBERG, 2005). A HT protege os neurônios e reduz a proliferação de astrócitos em modelos experimentais de isquemia transitória e parada cardíaca (MEYBOHM *et al.*, 2010; XIONG *et al.*, 2009).

Esses processos envolvidos na neuroinflamação apresentam diferenças entre machos e fêmeas (BRUCE *et al.*, 2019). Foi mostrado que os animais machos têm uma maior ativação microglial e da resposta inflamatória periférica em comparação aos animais fêmeas após a HI (MIRZA *et al.*, 2015; VILLAPOL *et al.*, 2019). Também foi observada uma resposta anti-inflamatória mais eficaz em fêmeas, bem como maiores níveis séricos de IL-10, enquanto nos machos foram observados maiores níveis séricos de TNF- α (AL MAMUN *et al.*, 2018).

Além das células locais, a infiltração de células do sistema imune periférico através da barreira hematoencefálica com permeabilidade aumentada ou danificada também contribui significativamente para o aumento do processo inflamatório (BURDA & SOFRONIEW, 2014). Os neutrófilos têm um papel importante na lesão, aumentando em quantidade nas primeiras horas pós-HI e podendo infiltrar no tecido nervoso ou atuar no endotélio (MÜLLING *et al.*, 2021; MUNTEANU *et al.*, 2021). Foi demonstrado que a depleção de neutrófilos antes da HI é capaz de diminuir a lesão e o edema cerebral (MÜLLING *et al.*, 2021; PALMER *et al.*, 2004). Os monócitos também desempenham um papel importante, se infiltrando no tecido nervoso e se diferenciando em macrófagos (ELALI & LEBLANC, 2016). Essas células, e também neutrófilos e microglia, são capazes de secretar a enzima mieloperoxidase (MPO), que produz espécies reativas a partir do peróxido de hidrogênio e assim induzem o processo de apoptose. Foi demonstrado que há um pico de secreção de MPO no tecido nervoso 3 dias após à HI, sendo detectável até 21 dias pós-HI (BRECKWOLDT *et al.*, 2008). Também já foi observada uma maior infiltração de leucócitos em animais do sexo masculino (AL MAMUN *et al.*, 2018; VILLAPOL *et al.*, 2019).

O estudo dos tecidos linfoides também demonstra a participação das células periféricas na lesão. O baço é um dos principais locais de armazenamento e ativação de leucócitos e produção de citocinas sistêmicas (ODORCYK *et al.*, 2018). O encéfalo lesionado produz antígenos, substâncias quimiotáticas e envia sinais via sistema nervoso autônomo que estimulam o baço a liberar células imunes na circulação, as quais migram para os locais lesionados dentro do sistema nervoso (LIU *et al.*, 2015). A remoção cirúrgica do baço (esplenectomia) antes da HI resulta em uma diminuição da lesão encefálica em ratos adultos e neonatos (AJMO *et al.*, 2008; FATHALI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). A longo prazo, a HI acaba levando paradoxalmente à atrofia do baço e do timo e à consequente diminuição da atividade destes órgãos (ODORCYK *et al.*, 2018; OFFNER *et al.*, 2006). De fato, é observada

imunossupressão pós-HI, tendo como uma de suas consequências o estabelecimento de infecções (CHAMORRO *et al.*, 2012).

Outro órgão importante para a imunidade é o timo, um dos locais de produção e ativação de linfócitos T, especialmente em neonatos (TRUBIANI *et al.*, 2002), e que pode levar ao aumento dessas células na circulação nas primeiras horas após a HI (DINA & MURASKAS, 2018). Os linfócitos T podem ser encontrados no tecido nervoso tardiamente (3 dias após a HI), sendo que os diferentes subtipos de linfócitos T podem atuar aumentando a lesão ou tendo efeitos neuroprotetores, neste último caso se destacando os linfócitos T regulatórios (T_{reg}) (JIN *et al.*, 2010). Porém, a função dos linfócitos e do timo são pouco estudadas em modelos de HI, especialmente em neonatos.

A HI e as alterações no sistema imune periférico também afetam negativamente outros órgãos, como o fígado (KARLSSON *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2004). Em modelo de parada cardíaca em ratos adultos, observou-se aumento de mastócitos e estresse oxidativo no fígado, sendo que esta resposta foi prevenida pela utilização de hipotermia terapêutica (PARK *et al.*, 2020). Em modelo de HI, foi observada uma diminuição de moléculas pró-inflamatórias no fígado 3 h após a HI (BONESTROO *et al.*, 2013). Por outro lado, o fígado também pode ser considerado um órgão linfoide, contribuindo com a produção sistêmica de citocinas e com a ativação de linfócitos T (CRISPE, 2009). Em humanos e roedores neonatos, o fígado parece ser mais importante inicialmente como um órgão relacionado à imunidade do que como um órgão metabólico (NAKAGAKI *et al.*, 2018).

O tecido adiposo marrom (TAM) é um depósito de gordura destinado à produção de calor (termogênese sem tremor), podendo ser encontrado em humanos adultos (depósitos supraclaviculares e paravertebrais) e em roedores, sendo o TAM interescapular um importante depósito em neonatos, regredindo na idade adulta (CARPENTIER *et al.*, 2018). Estímulos como o frio e o estado alimentar são detectados pelo hipotálamo, que estimula a produção de calor pelo TAM via sistema nervoso simpático (CANNON & NEDERGAARD, 2004). Já foi demonstrada uma menor quantidade de gordura no TAM de crianças tratadas com HT após a HI, provavelmente pela utilização dessa gordura para a produção de calor (HU *et al.*, 2014). Já foram observadas também diferenças sexuais na ativação do tecido adiposo marrom em ratos (QUEVEDO *et al.*, 1998).

Visto que a HI afeta diversos órgãos e sistemas do animal, a avaliação de aspectos comportamentais é importante para uma observação da condição geral do animal, sendo também um marcador da integridade do sistema nervoso (SCHAAR *et al.*, 2010). Porém, em animais neonatos essa avaliação é limitada principalmente a testes sensório-motores e de reflexos (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). A HI causa uma pior performance em testes comportamentais sensório-motores nas idades iniciais (LUBICS *et al.*, 2005) e diversas modalidades de comportamentos na vida adulta. Diferenças sexuais podem ser observadas em outros tipos de testes realizados em animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal (ARTENI *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2015).

Os comportamentos de geotaxia negativa, de aversão à borda (do inglês, “cliff aversion”) e o reflexo de endireitamento são amplamente utilizados para avaliação de animais neonatos submetidos ao modelo de HI. Esses comportamentos avaliam a integridade motora e sensorial (proprioceptiva e vestibular) do animal (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Foi mostrado que a indução de HI leva ao aumento da latência para a realização destes testes comportamentais em ratos neonatos e jovens (AHN *et al.*, 2018; BORNAVARD *et al.*, 2020; FAN *et al.*, 2005; HOBBS *et al.*, 2008; TASSINARI *et al.*, 2020). Já foi demonstrado aumento da latência no teste de aversão à borda e no reflexo de endireitamento, em modelo de hidrocefalia em camundongos neonatos (MOROMOKE *et al.*, 2020; ROBINSON *et al.*, 2018). Em relação à geotaxia negativa e ao reflexo de endireitamento, também já foi observado um prejuízo maior nos machos (HUANG, H.-Z. *et al.*, 2016; WADDELL *et al.*, 2016).

Um teste interessante de ser utilizado em neonatos é o teste de discriminação olfatória, pois além da avaliação sensório-motora, o comportamento depende de um processo de aprendizagem para reconhecer e buscar o cheiro da maravalha da caixa-moradia (ALBERTS, 2007; GREGORY & PFAFF, 1971; SULLIVAN *et al.*, 1990). Alguns trabalhos utilizando esse teste após a HI em ratos neonatos observaram uma maior latência para encontrar a maravalha proveniente da caixa moradia (SANCHES *et al.*, 2012, 2017).

O teste do cilindro é amplamente utilizado em animais adultos para avaliar a assimetria no uso das patas durante o comportamento exploratório (SCHAAR *et al.*, 2010; SCHALLERT *et al.*, 2000). Esse teste também vem sendo utilizado em animais jovens após a HI (DURÁN-CARABALI *et al.*, 2017; OGAWA *et al.*, 2021; TASSINARI *et al.*, 2020). Já o escore de severidade neurológica modificado (mNSS, do inglês

“modified neurological severity score”) é um conjunto de testes que avaliam a função motora e sensorial, o equilíbrio e alguns reflexos com o objetivo de avaliar a integridade do sistema nervoso em roedores (CHEN, J. *et al.*, 2001). É amplamente utilizado em adultos, mas também vem sendo utilizado em estudos de HI para avaliar animais jovens (ROUMES *et al.*, 2021).

Diversos marcadores do neurodesenvolvimento podem ser afetados pela HI. O ganho de peso tende a ser lento em animais submetidos à HI, o que está associado aos prejuízos motores que dificultam a obtenção do leite materno (FABRES *et al.*, 2018; TASSINARI *et al.*, 2020). Foi observada uma melhora no ganho de peso apenas nas fêmeas tratadas com HT após a HI (DIAZ *et al.*, 2017). A abertura dos olhos em ratos neonatos acontece por volta do 14º dia de vida (FAVERO *et al.*, 2006; HEYSER, 2003), e já foi demonstrado que a HI é capaz de atrasar o dia de abertura (FAN *et al.*, 2005; LUBICS *et al.*, 2005). O índice anogenital (IAG) é uma medida obtida a partir da distância anogenital (DAG), sendo um indicador do desenvolvimento sexual. Um IAG baixo em animais machos é sinal de prejuízo no desenvolvimento (KAIMAL *et al.*, 2021). O desenvolvimento sexual é controlado principalmente por mediadores endócrinos, e alterações em diversos hormônios são observadas em humanos e ratos após a HI, incluindo um pico de testosterona aumentado nas primeiras horas pós-HI em ratos neonatos machos (BOKSA & ZHANG, 2008). Já foram observados efeitos prejudiciais da HI no desenvolvimento sexual, levando à diminuição na expressão de receptores de estrógeno, progesterona e μ -opioides no hipotálamo em ratos neonatos do sexo feminino (EZQUER *et al.*, 2008), e também no nível de estradiol circulante (AL MAMUN *et al.*, 2018). A avaliação de marcadores do desenvolvimento, assim como dos desfechos comportamentais, é um importante preditor da condição geral do animal.

1.1. Justificativa

Apesar da mortalidade de recém-nascidos por conta da HI estar diminuindo, em grande parte graças à implementação da HT na clínica, ainda existe uma mortalidade bastante alta. Isso se deve à falta de locais que ofereçam a HT e às consequentes limitações do atraso no atendimento. Além disso, a HT possui eficácia limitada, muitas vezes prevenindo a mortalidade, mas não as sequelas pós-HI. Por

isso, ainda são necessários estudos utilizando modelos animais para avaliar os mecanismos pelos quais a HT exerce seus efeitos, com intuito de refinar a abordagem clínica. O processo inflamatório associado à HI tem sido bem estudado, mas com o foco principal nas respostas que ocorrem dentro do sistema nervoso, como a ativação microglial, reatividade astrocitária e a infiltração de leucócitos. Por outro lado, apesar da hipóxia produzir efeitos sistêmicos, os processos inflamatórios periféricos são bem menos estudados, mas esse conhecimento seria relevante para um melhor entendimento da HI e da eficácia de possíveis tratamentos, como a própria HT. A avaliação comportamental também está presente em muitos estudos, porém seus resultados ainda possuem muita discrepância e normalmente são realizados de forma isolada e, quase que exclusivamente, em animais do sexo masculino. O estudo dos mecanismos de ação da HT pode auxiliar no direcionamento de pesquisas para terapias complementares. Além disso, ainda são poucos os estudos que avaliam a influência do dimorfismo sexual no desenvolvimento e na imunidade periférica utilizando a HT como tratamento em um modelo de HI neonatal. A compreensão destes mecanismos é crucial para o planejamento de intervenções clínicas adequadas associadas à HT para cada um dos sexos em recém-nascidos que sofreram um evento hipóxico-isquêmico.

1.2. Hipótese

O tratamento com HT em animais neonatos submetidos à HI reduzirá os danos encefálicos, os prejuízos no desenvolvimento e nos desfechos comportamentais e a ativação da imunidade periférica causados pela HI. Os benefícios do tratamento com HT após a HI serão mais eficazes em animais do sexo feminino.

1.3. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com HT sobre parâmetros do desenvolvimento, comportamento e imunidade periférica em ratos submetidos à HI cerebral neonatal e comparar esses efeitos entre animais machos e fêmeas.

1.3.1. Objetivos Específicos

- Padronizar o protocolo de hipotermia terapêutica para o tratamento de animais neonatos previamente submetidos à HI;
- Avaliar os parâmetros do desenvolvimento em animais neonatos submetidos à HI e tratados com HT 48 h (P9) e 14 dias (P21) após a indução da lesão encefálica;
- Avaliar o peso dos hemisférios cerebrais, do baço, do timo, do fígado e do tecido adiposo marrom em animais submetidos à HI e tratados com HT 48 h (P9) e 14 dias (P21) após a indução da lesão encefálica;
- Realizar a contagem de leucócitos no sangue dos animais neonatos submetidos à HI e tratados com HT 14 dias (P21) após à HI;
- Avaliar o desempenho dos animais neonatos submetidos à HI e tratados com HT em testes comportamentais entre 24 h (P8) e 13 dias (P20) após a HI;
- Avaliar os efeitos do dimorfismo sexual sobre os parâmetros analisados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados 168 ratos Wistar de ambos os sexos (84 machos e 84 fêmeas) com 7 dias de idade (P7) e 21 ratas mães, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As ninhadas foram padronizadas após o nascimento, sendo compostas de 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas), com realização de enxertos quando necessário (nenhuma das ninhadas teve mais de um animal enxertado e a ocorrência do procedimento sempre foi registrada). Os animais foram transportados com 2 dias de vida (P2), em veículo climatizado, para a Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde foram mantidos em período de aclimação por 5 dias, em caixas de polipropileno de 49 x 34 x 16 cm, juntamente com suas respectivas mães. O assoalho das caixas foi recoberto com maravalha e as mães receberam alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos sob períodos de 12 h claro/12 h escuro com temperatura média de 22°C e umidade relativa do ar controlada (40-60%). De acordo com a resolução normativa nº 33 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de 18 de novembro de 2016, é incentivado o enriquecimento ambiental das caixas dos ratos, e este é também o protocolo padrão utilizado na UEA/HCPA. Porém, como o enriquecimento ambiental é capaz de alterar a lesão produzida pelo modelo de HI neonatal (DURÁN-CARABALI *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2008), a caixa foi enriquecida de forma restrita, havendo apenas fornecimento de materiais como papel toalha e rolo de papelão que permitiam aos animais construir ninhos e se abrigarem da luz e de outros estímulos estressantes. Também foi mantida uma relação pesquisador-animal positiva, com a manipulação mínima dos animais durante os procedimentos e a cada 2 dias para a pesagem dos filhotes.

2.2. Aspectos Éticos

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (nº 2019-0420) e registrado no Sistema Pesquisa da UFRGS (nº 38998). Os experimentos foram realizados conforme o disposto na resolução normativa nº 30 do CONCEA, de 2 de fevereiro de 2016 (Diretrizes para o Cuidado e Utilização de Animais), na resolução nº 33 do CONCEA, de 18 de novembro de 2016 (Procedimentos em Roedores e Lagomorfos), na resolução normativa nº 37 do CONCEA, de 15 de fevereiro de 2018 (Diretrizes da Prática de Eutanásia) e na Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõem a respeito da utilização científica de animais.

As fêmeas adultas (21 ratas mães), que não foram utilizadas nos procedimentos experimentais, foram eutanasiadas após os períodos experimentais pelo método de sobredose anestésica em câmara contendo isoflurano. Durante os procedimentos experimentais nos filhotes, foram utilizados pontos finais humanitários nos casos de condições gerais prejudicadas e sofrimento não previsto dos animais. Os parâmetros observados foram: baixo peso, extremidades azuladas e cianose, ausência de leite no estômago e condição geral do animal. Se necessário, foi realizada a eutanásia do filhote pelo método de sobredose anestésica em câmara com isoflurano.

2.3. Desenho Experimental

Para avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores da HT, ratos Wistar com 7 dias de vida foram submetidos ao modelo de HI neonatal (oclusão carotídea unilateral + hipóxia ambiental), e posteriormente tratados com HT (redução da temperatura corporal para 32°C) com duração de 5 h. Para isso, foram definidos 3 grupos experimentais:

- **Grupo Hipotermia Terapêutica (HT):** os animais foram submetidos ao procedimento de HI neonatal e posteriormente submetidos à HT;
- **Grupo Hipóxia-Isquemia (HI):** os animais foram submetidos ao procedimento de HI neonatal e posteriormente mantidos em normotermia;

- **Grupo SHAM:** os animais foram submetidos a uma cirurgia fictícia e mantidos em condições normóxicas e normotérmicas;

Considerando que cada ninhada era composta por 8 animais (4 machos e 4 fêmeas), a distribuição destes nos grupos foi realizada de forma a resultar em pelo menos um animal de cada sexo atribuído a cada um dos 3 grupos experimentais (totalizando 6 animais), evitando assim o efeito-ninhada; os 2 animais restantes de cada ninhada foram atribuídos a um dos grupos de forma variada, alternando-se essa atribuição de uma ninhada para outra. A definição dos grupos foi realizada no dia de realização da HI. Os filhotes foram primeiramente pesados e identificados quanto ao sexo e receberam um número de identificação, sendo atribuídos os números de 1 a 4 para os machos e de 5 a 8 para as fêmeas (marcados com caneta permanente atóxica Texta® Fine Line 700 no dorso e na cauda). Após, um animal qualquer foi retirado da caixa-moradia pelo experimentador para a realização do procedimento cirúrgico, sendo o animal então atribuído a um dos grupos experimentais. Ao fim da cirurgia, outro animal foi retirado da caixa-moradia e atribuído a um grupo da mesma forma descrita, mas conforme o necessário para obter a distribuição descrita no início do parágrafo.

Para avaliar os efeitos da lesão provocada pela HI e se houve proteção devido ao procedimento de HT, os animais foram submetidos a testes comportamentais nas idades de P8, P10, P12, P14 e P20 e eutanasiados em P21 para a coleta de sangue e de diferentes órgãos (todos os órgãos foram rapidamente pesados logo após a coleta). Realizou-se também um esfregaço sanguíneo logo após a eutanásia para a contagem de leucócitos. Um outro grupo de animais foi eutanasiado em P9 para a coleta e pesagem dos mesmos órgãos descritos para avaliação dos possíveis efeitos da HI e/ou HT em um momento mais próximo da indução da lesão. O desenho experimental descrito está representado na Figura 1.

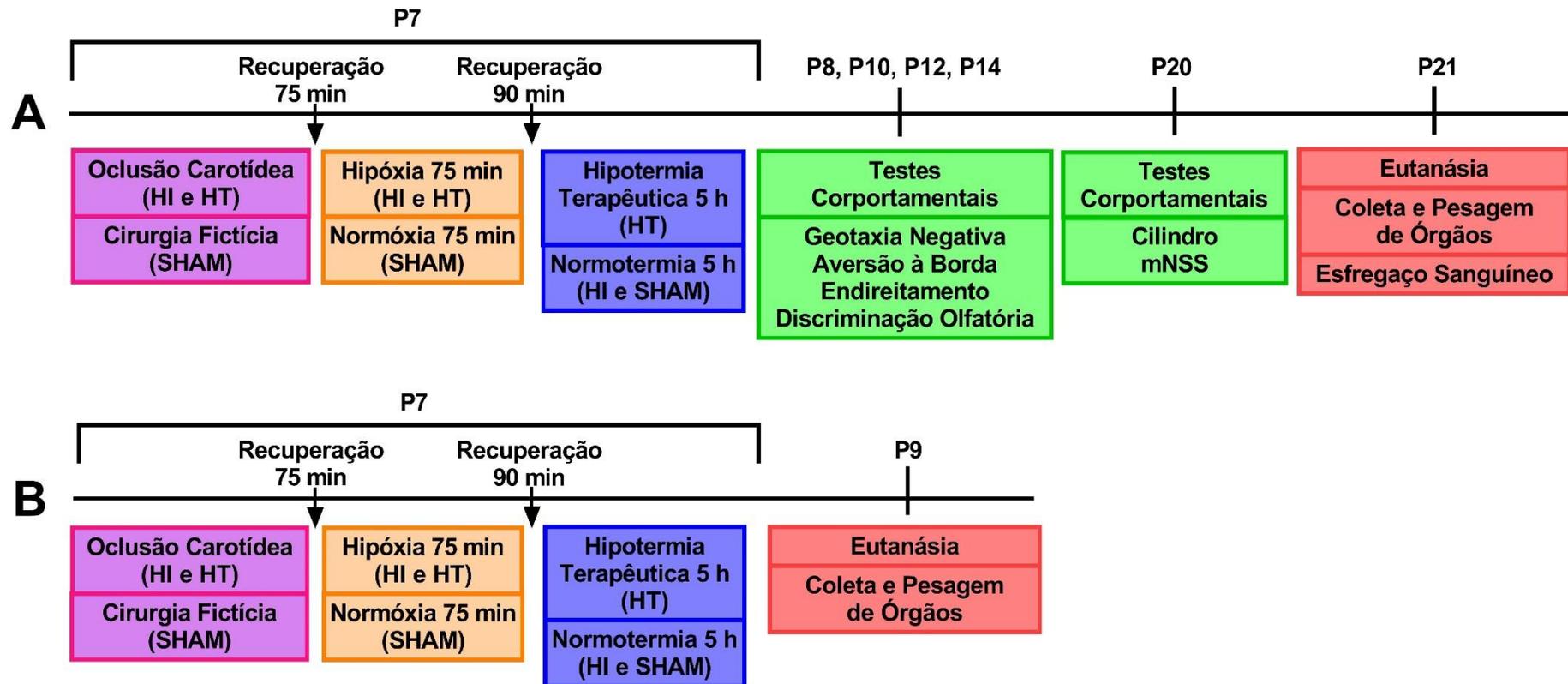


Figura 1. Desenho experimental. **(A)** No 7º dia pós-natal (P7), ratos Wistar de ambos os sexos foram submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal, que consistiu em uma cirurgia para a oclusão da carótida comum direita e posterior exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 75 min. Os animais do grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia fictícia e mantidos em normóxia. Após a indução da HI, os animais foram submetidos à hipotermia terapêutica (HT) (32°C) ou mantidos em normotermia (37°C) por 5 h. Um conjunto de testes comportamentais foi realizado em P8, P10, P12 e P14 e outro conjunto em P20. Em P21, os animais foram eutanasiados para a coleta e pesagem dos órgãos e realização do esfregaço sanguíneo. **(B)** Mesmo procedimento descrito em A, com exceção da realização da eutanásia em P9.

2.4. Hipóxia-Isquemia (HI) Neonatal

O procedimento de HI neonatal foi realizado, de acordo com o modelo de Rice-Vannucci (RICE *et al.*, 1981). O procedimento já está bem estabelecido e padronizado pelo grupo de pesquisa que já desenvolveu estudos prévios na UEA do HCPA utilizando o mesmo modelo (FABRES *et al.*, 2018; TASSINARI *et al.*, 2020). Aos 7 dias de vida (P7), os filhotes foram anestesiados com isoflurano (5% para a indução e 3% para a manutenção), com o oxigênio (300 mL/min) como gás de transporte (a anestesia foi controlada através de vaporizador específico para isoflurano acoplado a um carrinho anestésico). O anestésico foi administrado pela via inalatória, com o uso de um cone nasal acoplado ao focinho do filhote. O tempo máximo de cirurgia (descrita a seguir) foi de 5 min, observando-se sempre a ausência de cianose. Testou-se o reflexo nociceptivo da pata posterior, apertando-a com uma pinça, e, na ausência do reflexo, iniciou-se o procedimento cirúrgico para a oclusão da artéria carótida comum direita (isquemia).

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com material esterilizado e em bancada coberta com papel TNT limpo. A cirurgia consistiu em, com o animal posicionado em decúbito dorsal, realizar uma incisão longitudinal com bisturi (lâmina nº 15) na porção ventral do pescoço, levemente à direita da linha média e caudal em relação às orelhas, seguido do afastamento dos músculos do pescoço com duas pinças de ponta fina. Após a identificação da carótida comum direita, a artéria foi isolada dos tecidos circundantes e do nervo vago com o auxílio das pinças. Uma vez isolada, uma das pinças foi inserida por baixo da carótida, para que esta pudesse ser levemente elevada e a pinça foi levemente aberta para receber a ponta de um fio cirúrgico de seda 4.0. Com a pinça, o fio foi puxado cuidadosamente por baixo da carótida, foram realizados dois nós e as pontas excedentes foram cortadas. A incisão foi fechada com uma sutura simples realizada com agulha e fio cirúrgico de seda 4.0. Os animais do grupo SHAM (controle cirúrgico) foram submetidos a todas as etapas do procedimento cirúrgico mencionadas, não havendo, entretanto, a oclusão carotídea. Como a anestesia favorece a diminuição da temperatura corpórea, os animais foram mantidos sobre uma mesa cirúrgica aquecida durante todo o procedimento cirúrgico.

Após a cirurgia, os filhotes foram devolvidos às caixas-moradia juntamente com as respectivas mães e após 75 min de recuperação foram expostos a uma atmosfera

hipóxica (8% de oxigênio e 92% de nitrogênio) durante 75 minutos. Esse procedimento foi realizado colocando-se os animais dentro de um frasco Kitasato de vidro de 2 L. A abertura superior do frasco foi vedada com uma rolha de espuma perfurada para permitir apenas a colocação da tubulação para a entrada da mistura gasosa para a hipóxia (fluxo de 5 L/min) juntamente com a passagem do sensor de um termo-higrômetro (Incoterm® 7664.01.0.00) para controle da temperatura e umidade dentro da câmara (mantidos em torno de 33°C e 70% respectivamente). Antes de entrar na câmara de hipóxia, o gás passava por um umidificador com água, garantindo o aquecimento e umidificação do gás. Durante todo o procedimento, o Kitasato foi mantido no interior de uma incubadora para neonatos (Fanem®, CT186TS) ajustada para 33°C a fim de manter a temperatura corporal dos filhotes dentro dos limites fisiológicos (36-37 °C). Esse ajuste de temperatura na incubadora já foi padronizado e confirmado como adequado para a manutenção da temperatura corporal dos animais (FABRES *et al.*, 2018; TASSINARI *et al.*, 2020). Para fins de confirmação, a temperatura corporal dos ratos foi medida individualmente com termômetro infravermelho (Incoterm® TCI1000) logo após a hipóxia. Os animais do grupo SHAM não passaram pelo procedimento de hipóxia, sendo colocados durante os 75 min em outra incubadora mantida a 33°C em condições de normóxia. Ao final do procedimento de hipóxia, os animais retornaram às caixas-moradia com as respectivas mães por um período de 90 min.

2.5. Hipotermia Terapêutica (HT)

Um dos objetivos deste estudo foi padronizar o procedimento de HT em uma incubadora para neonatos (Fanem®, CT186TS). Para os experimentos preliminares de padronização, foram utilizados um total de 72 filhotes (9 ninhadas), divididos nos mesmos 3 grupos (SHAM, HI e HT), acondicionados da mesma forma descrita no item 2.1 e submetidos ao modelo de HI como descrito no item 2.4, com as únicas exceções de o tempo de recuperação entre a cirurgia e a hipóxia ter sido de 60 min (ao invés de 75 min) e o tempo de hipóxia ter sido de 90 min (ao invés de 75 min). Os resultados desses experimentos (apresentados no item 3.2) determinaram a padronização do procedimento de HT, conforme descrito a seguir.

Para o procedimento de HT, os filhotes foram resfriados sendo colocados sobre uma bolsa térmica de gel congelada, enrolada com uma compressa, até atingirem uma temperatura corporal de 32°C (levando entre 10-15 min). Esses animais foram então colocados em incubadoras para neonatos (Fanem®, CT186TS) durante 5 h, sendo que a incubadora foi mantida em uma temperatura entre 20-21°C, de modo que a temperatura corporal dos animais se mantivesse em 32°C (a temperatura foi medida na cabeça dos animais, a cada 15 min com o uso de um termômetro infravermelho Incoterm® TCI1000). Conforme a necessidade, foram colocadas bolsas térmicas de gel congeladas para resfriar a incubadora ou a mesma foi aquecida alterando-se o ajuste de temperatura do equipamento. Os ajustes e controle de temperatura foram realizados por um experimentador que acompanhou todo o período de HT. Durante todo o procedimento, os animais foram mantidos em uma estrutura de acrílico, colocada dentro da incubadora, que permitia a individualização dos animais e impedia o comportamento de agregação dos filhotes, o qual afetaria a temperatura corporal dos animais. Os animais dos grupos SHAM e HI foram mantidos em outra incubadora, mantida em 33°C, de modo que a temperatura corpórea dos animais fosse mantida em torno de 37°C (normotermia). Após o período de 5 h de hipotermia, os filhotes foram reaquecidos por 20-30 min (até atingirem uma temperatura de 35-36°C) em uma mesa aquecida coberta por uma compressa. Após esse período, os animais de todos os grupos experimentais retornaram às caixa-moradia com suas respectivas mães.

2.6. Parâmetros do Desenvolvimento

Foram avaliados 3 parâmetros do desenvolvimento, descritos a seguir.

2.6.1. Peso Corporal

Os animais foram pesados em P7, P8 e a cada 2 dias até o dia da eutanásia em P21, dia em que também foram pesados. Para isso, os animais foram colocados em um recipiente transparente e pesados em uma balança de precisão (Marte® Ad1000).

2.6.2. Dia de Abertura dos Olhos

Nos dias das pesagens, também foi observada a abertura dos olhos, registrando-se o dia em que o animal abriu pela primeira vez cada um dos olhos. O critério utilizado foi a separação total das pálpebras (FAVERO *et al.*, 2006).

2.6.3. Índice Anogenital (IAG)

Antes da eutanásia em P21, foi medida com paquímetro manual a distância anogenital (DAG) em milímetros, a qual consiste na distância entre a porção mais posterior do ânus e a porção mais anterior da papila genital. A medição foi realizada com o animal anestesiado e segurado em decúbito dorsal, aplicando-se uma leve tensão na região a ser medida para mantê-la esticada. A partir dessa medida, calculou-se o índice anogenital (IAG) dividindo-se a DAG pela raiz cúbica do peso corporal, pela fórmula: $DAG/\text{peso corporal}^{1/3}$ (GALLAVAN *et al.*, 1999).

2.7. Testes Comportamentais

Foram empregados quatro testes para a avaliação comportamental realizados em P8, P10, P12 e P14 e outros dois testes realizados em P20 (descritos a seguir). Todos os testes foram realizados no período da tarde, sendo filmados e analisados posteriormente. Os testes realizados de P8 à P14 foram conduzidos entre 15:00 p.m. e 19:00 p.m., na seguinte ordem: geotaxia negativa, aversão à borda, reflexo de endireitamento e teste de discriminação olfatória (foi realizado um teste por vez, sendo testados todos os animais antes de iniciar o próximo teste). Os testes realizados em P20 foram conduzidos entre 13:00 p.m. e 15:00 p.m., sendo realizados para cada rato o escore de severidade neurológica modificado seguido pelo teste do cilindro. Não foi possível a realização de todas as etapas por pesquisadores cegos aos grupos experimentais devido às restrições de acesso à UEA durante o período da pandemia de COVID-19, que restringiu o acesso dos pesquisadores às dependências do HCPA e exigiu que os experimentos fossem realizados por apenas 2 pesquisadores atuando simultaneamente.

Cada um dos testes comportamentais utilizados está descrito detalhadamente a seguir.

2.7.1. Geotaxia Negativa (P8, P10, P12 e P14)

O teste avalia a integridade proprioceptiva, vestibular e motora dos ratos. Os animais foram posicionados sobre um plano inclinado em um ângulo de 35°, com a cabeça voltada para a direção negativa (base do plano). A superfície do plano possuía uma rede, para que o animal conseguisse manter-se agarrado à superfície. Foi avaliado o tempo necessário para o animal realizar uma volta de 180° (tomando como referência a posição da cabeça), com tempo máximo de 60 s (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Os animais foram testados apenas 1 vez, exceto nos casos em que o animal caiu do plano, nos quais foi realizada uma segunda tentativa após a realização dos testes dos outros animais.

2.7.2. Aversão à Borda (“Cliff Aversion”) (P8, P10, P12 e P14)

O teste avalia a integridade proprioceptiva e a capacidade motora de se afastar de uma borda elevada. Foi colocada sobre a bancada uma caixa com o fundo virado para cima, resultando em uma superfície com 20 cm de elevação, sobre a qual se posicionou o animal com o focinho e os dígitos das patas dianteiras sobre a borda. A superfície da caixa continha uma rede para que o animal conseguisse se agarrar. Foi medida a latência para o animal se afastar da borda e girar a cabeça em 90°, com tempo máximo de 30 s (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016).

2.7.3. Reflexo de Endireitamento (P8, P10, P12 e P14)

O reflexo consiste em uma resposta motora que permite ao animal reorientar sua postura. O animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre uma compressa de gaze em uma superfície plana e foi medida a latência do animal para voltar à postura original, apoiado sobre as quatro patas, com um tempo máximo de 15 s (FEATHER-

SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Cada animal foi testado um total de três vezes de forma não-sequencial (as repetições eram realizadas após todos os animais terem realizado a tentativa) e foi calculada a média entre as três latências registradas.

2.7.4. Testes de Discriminação Olfatória (P8, P10, P12 e P14)

O teste avalia a capacidade do animal de detectar, reconhecer e se locomover até um local contendo maravalha proveniente da caixa-moradia. Em uma caixa de acrílico (40 x 20 x 20 cm), em um dos lados foi colocada maravalha proveniente da caixa de origem do filhote (“maravalha-moradia”), contendo o cheiro da mãe e do respectivo ambiente, e no outro lado da caixa foi colocada maravalha esterilizada (“maravalha limpa”). As maravalhas foram colocadas em áreas retangulares, partindo da extremidade da caixa até 12 cm para o centro da caixa, em comprimento, e de uma extremidade da caixa até a outra em largura (resultando em uma dimensão de 12 x 20 cm). O animal foi posicionado no centro da caixa e foi medida a latência para entrar com as quatro patas em uma das áreas de maravalha, com o tempo máximo de 120 segundos (SANCHES *et al.*, 2012). Também foi registrada qual maravalha o animal escolheu. Entre a tentativa de cada animal (e também antes da tentativa do primeiro animal), a caixa foi limpa com uma compressa de gaze umedecida com álcool 70%. Após a realização do teste de todos os animais, realizou-se uma segunda testagem na qual a posição direita/esquerda das maravalhas (relativa ao posicionamento do animal) foi invertida, girando-se a caixa.

2.7.5. Teste do Cilindro (P20)

O objetivo do teste do cilindro é verificar se existe uma preferência pelo uso de uma das patas dianteiras no comportamento do rato ao explorar um cilindro. O animal foi colocado dentro de um cilindro de vidro (13 cm de diâmetro e 19 cm de altura), posicionado sobre uma superfície transparente para possibilitar a filmagem por baixo do cilindro. Foi contado, quando o animal se apoiava apenas sobre as patas posteriores, o número de toques executados por cada uma das patas anteriores nas paredes do cilindro durante 5 min, a partir dos quais foi calculada a porcentagem de

uso da pata contralateral pela fórmula: (toques com a pata contralateral/total de toques)*100 (SCHAAR *et al.*, 2010; SCHALLERT *et al.*, 2000). O início de um toque foi considerado como o momento em que o animal posicionou a pata na parede do cilindro e o fim do toque quando a pata foi posicionada novamente na base do cilindro.

2.7.6. Escore de Severidade Neurológica Modificado (mNSS) (P20)

O escore de severidade neurológica modificado (do inglês “modified neurological severity score” – mNSS) consiste em uma série de testes comportamentais motores, sensoriais, reflexos e de equilíbrio, utilizados para avaliar a integridade do sistema nervoso. De acordo com o desempenho do animal, atribuiu-se uma pontuação para cada teste, de forma que quanto maior a pontuação, mais severo é o prejuízo do animal, podendo variar de 0 (animal sem prejuízo) até 18 (máximo prejuízo) (CHEN, J. *et al.*, 2001). As pontuações atribuídas para cada teste podem ser observadas na Tabela 1. Sempre que possível, observou-se e pontuou-se independentemente a resposta do lado direito e do lado esquerdo do animal, de modo que cada animal recebeu 2 pontuações finais.

O primeiro teste consistiu em levantar o animal pela cauda durante 30 s, e observar se ocorria a flexão dos membros anteriores ou posteriores ou a inclinação da cabeça em um ângulo maior do que 10° no eixo vertical do animal, sendo que a ocorrência de cada um desses comportamentos correspondia a 1 ponto. O segundo teste foi colocar o animal sobre uma superfície plana e observar o seu padrão de locomoção, podendo corresponder a uma pontuação de 0 a 3.

O teste seguinte, “placing test”, consistiu em segurar o animal pelo tronco, deixando os membros anteriores livres, e aproximar o animal lateralmente à borda de uma mesa, tocando-a com as vibrissas. A resposta esperada é que o animal coloque a pata anterior sobre a borda da mesa, a partir da estimulação tátil e visual. Após, realizou-se um teste proprioceptivo, no qual a pata posterior do animal foi pressionada contra a superfície da mesa, aplicada com a unha do pesquisador, sendo a resposta esperada a retirada da pata. Tanto o “placing test” quanto o teste proprioceptivo foram realizados 2 vezes, uma no lado direito e outra no lado esquerdo, atribuindo-se 1 ponto na ausência da resposta esperada.

A seguir, foi realizado um teste de equilíbrio (“beam walk”) em que o animal foi colocado sobre uma prancha de 1,4 cm de largura, 23,5 cm de comprimento e colocada a 17 cm de altura da superfície da mesa, por 60 s. Conforme o desempenho do animal, foi atribuída uma pontuação de 0 a 6.

Após, foi testado o “pinna reflex”, que consistiu na estimulação do meato acústico externo com um pequeno pincel, fazendo com que o animal sacudisse a cabeça. A seguir, foi testado o reflexo córneo, pela estimulação da córnea do animal, tocando-a gentilmente com um cotonete, estimulando o animal a piscar. Por fim, observou-se o reflexo de susto, através do som produzido após soltar a presilha de uma prancheta a 20 cm de distância do animal, que realizava uma resposta motora. Para todos esses reflexos, atribui-se 1 ponto caso não ocorresse a resposta esperada.

A última característica observada foi a presença de convulsão, mioclonia ou mioclonia durante todo o procedimento, atribuindo-se 1 ponto nesse caso.

Tabela 1. Escore de Severidade Neurológica modificado (mNSS) (adaptado de (CHEN, J. *et al.*, 2001)). Estão mostrados os testes que o compõem o escore e a pontuação atribuída para cada um deles.

	Pontos
Testes Motores	
Levantar o animal pela cauda por 30 s	
Flexão do membro anterior	1
Flexão do membro posterior	1
Movimento da cabeça >10° no eixo vertical	1
Colocar animal numa superfície plana	
Caminha normalmente	0
Incapaz de caminhar em linha reta	1
Movimento circular em direção ao lado paralisado	2
Cai em direção ao lado paralisado	3
Teste Sensoriais	
Ausência de resposta no “placing test”	1
Ausência de resposta no teste proprioceptivo	1
Teste de Equilíbrio	
Se equilibra com postura normal	0
Se equilibra agarrando as laterais da prancha	1
Abraça a prancha e um membro cai da prancha	2
Abraça a prancha e dois membros caem da prancha ou roda na prancha	3
Tenta se equilibrar, mas cai da prancha (depois de 40 s)	4
Tenta se equilibrar, mas cai da prancha (entre 40 e 20 s)	5
Cai sem tentar se equilibrar ou se agarra na prancha (antes de 20 s)	6
Reflexos	
Ausência do “pinna reflex”	1
Ausência do reflexo córneo	1
Ausência do reflexo de susto	1
Presença de convulsões, mioclonia ou mioclonia	1

2.8. Eutanásia e Pesagem dos Órgãos

Um conjunto de animais foi eutanasiado 48 h após a HI (em P9) e outro conjunto foi eutanasiado 14 dias após a HI (em P21). Após a pesagem e medida da distância anogenital (DAG), os animais foram decapitados sem anestesia com uma tesoura (procedimento permitido para animais neonatos de acordo com o anexo da resolução normativa nº37 do CONCEA, de 15 de fevereiro de 2018) e o sangue troncular foi coletado em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para evitar a coagulação. Deste sangue, uma pequena porção foi retirada para a realização de esfregaço sanguíneo. Logo após a eutanásia, o encéfalo foi dissecado,

o cerebelo foi removido e os hemisférios cerebrais foram separados em direito e esquerdo e pesados. Também foram dissecados e pesados o lobo lateral esquerdo do fígado, o baço, o timo e o tecido adiposo marrom interescapular.

2.9. Esfregaço Sanguíneo e Contagem de Leucócitos

Após a realização de todas as eutanásias, agitou-se suavemente o tubo contendo o sangue troncular previamente coletado e foi retirada uma pequena quantidade de sangue com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Pingou-se uma pequena gota deste sangue sobre uma lâmina histológica limpa (2 lâminas para cada animal). Foi utilizada outra lâmina como espalhador, aproximando sua extremidade pelo lado em que seria realizado o esfregaço, com inclinação de 30°, até que o sangue fosse espalhado por efeito capilar por toda a extensão do espalhador. Nesse momento, realizou-se o esfregaço sanguíneo deslocando-se o espalhador em velocidade constante em direção ao final da lâmina. Logo após a secagem, o sangue foi fixado mergulhando-se a lâmina por 30 s em metanol 100% (AJMO *et al.*, 2008). Posteriormente, as lâminas foram coradas com a utilização do corante hematológico Panótico Rápido (Laborclin®), segundo as orientações do fabricante (5 s em cada uma das 3 soluções). Após secarem, as lâminas foram montadas com meio de montagem (Permount®) e cobertas com lamínulas.

Os esfregaços foram analisados manualmente, por um pesquisador não-cego aos grupos experimentais, em microscópio óptico para a contagem de leucócitos (foram contadas todas as células nucleadas visíveis no campo). A contagem foi realizada na porção da cauda do esfregaço, onde os leucócitos estavam presentes em maior quantidade e em uma monocamada, na objetiva de 20x, definindo-se 10 campos para cada lâmina (sendo um campo toda a porção visível observada pelas lentes oculares) (CHUNG *et al.*, 2015; DURBIN *et al.*, 2009). A definição dos campos iniciou-se aleatoriamente na parte de cima ou de baixo da lâmina, com a procura de um campo no qual houvessem leucócitos. Após a contagem desse campo, o charriot foi movimentado 2 mm no sentido vertical (para cima ou para baixo, dependendo de onde foi iniciada a contagem), resultando no próximo campo. Caso não houvessem leucócitos nesse campo, o charriot foi movimentado horizontalmente 1 mm em direção à cauda do esfregaço, até que fosse encontrado um campo com leucócitos. O

procedimento foi repetido até que fossem contados 10 campos. Dessa forma, como foram preparadas 2 lâminas por animal, foram contados um total de 20 campos por animal. Nos casos em que uma das lâminas não atendia aos critérios para a contagem, foram avaliados 20 campos na lâmina restante, da mesma forma descrita anteriormente com exceção de que o charriot era movimentado 1 mm no sentido vertical. Para a análise estatística desses dados, cada campo foi considerado como uma observação independente.

2.10. Análise Estatística

Para a análise do peso corporal e dos comportamentos de geotaxia negativa, aversão à borda, reflexo de endireitamento e teste olfatório ao longo do tempo, foram construídas curvas para cada animal, das quais foram calculadas as respectivas áreas sob a curva, com o intuito de verificar a existência de diferenças entre os grupos ao longo de todo o período de análise. Para o peso corporal, foi definida como base da área o peso do animal em P7, e as porções da área que estivessem abaixo dessa base foram subtraídas do total. Para os comportamentos, a base foi definida como o valor zero, e foram incluídos somente animais que possuíam as medidas em P8, em P14 e pelo menos em uma das outras medidas.

Todos as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Prism® GraphPad 8.0.2, com exceção do teste exato de Fisher que foi realizado com o auxílio do programa SPSS® PASW Statistics 18. Os dados foram primeiramente analisados para a identificação e remoção de “outliers” pelo método de ROUT, com $Q=1\%$. Os dados resultantes foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para determinar sua normalidade e pelo teste de Brown-Forsythe para determinar sua homocedasticidade (ambas definidas por $p>0,05$). Caso os dados fossem normais e homocedásticos, conduziram-se os testes comparativos paramétricos. Caso os dados não cumprissem esses critérios, os “outliers” previamente identificados foram reinseridos e os dados foram transformados pela fórmula $Y=\text{Log}(Y)$ ou $Y=Y^{1/2}$, e os valores resultantes foram novamente analisados para identificação de “outliers” e em seguida testados quanto a sua normalidade e homocedasticidade. Caso os dados cumprissem os critérios, conduziram-se os testes comparativos paramétricos. De qualquer forma, os dados foram apresentados em seus valores originais (decimais).

Se mesmo após a transformação os dados não cumprissem os critérios para a realização de testes paramétricos, optou-se pela utilização de testes não-paramétricos, sem análise prévia para “outliers”. Os dados normais foram apresentados como média±erro padrão da média, enquanto os dados não-paramétricos foram apresentados como mediana e intervalos interquartis (25º e 75º percentil).

Utilizaram-se os seguintes testes paramétricos: ANOVA de uma via seguida de Tukey para a análise dos dados de peso percentual total do encéfalo, geotaxia negativa, aversão à borda, reflexo de endireitamento, teste do cilindro, peso percentual e absoluto do baço, peso absoluto do timo e peso percentual do fígado; e ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni para os resultados do teste de discriminação olfatória (fatores grupo experimental e lado) e do índice anogenital (fatores grupo experimental e sexo). Utilizaram-se os seguintes testes não-paramétricos: teste U de Mann-Whitney para os resultados do dia de abertura dos olhos (comparação do olho direito e esquerdo); teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn para os resultados de diferença de peso dos hemisférios cerebrais, peso corporal, dia de abertura dos olhos (comparações entre grupos), mNSS, contagem de leucócitos, peso percentual do timo, peso absoluto do fígado e peso percentual e absoluto do TAM; e teste exato de Fisher para análise dos percentuais de resposta no teste de discriminação olfatória. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Mortalidade

Dos 72 filhotes (9 ninhadas) destinados aos experimentos preliminares, 22 animais dos grupos HI e HT morreram (30,56%), muitos destes após a hipóxia de 90 min. A partir disso, optou-se por diminuir o tempo de hipóxia para 75 min nos experimentos posteriores.

Do total de 168 filhotes (21 ninhadas) utilizados nos experimentos posteriores, 9 animais dos grupos HI e HT morreram, correspondendo a uma mortalidade de 5,36%. As mortes ocorreram durante o procedimento cirúrgico, durante a hipóxia, dias após o procedimento ou por eutanásia por aplicação de ponto final humanitário. Estes animais foram excluídos das análises. Mais detalhes da mortalidade em ambos experimentos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Momentos da morte dos animais dos grupos HI (hipóxia-isquemia) e HT (hipotermia terapêutica) em machos e fêmeas, nos experimentos preliminares e posteriores.

	Machos		Fêmeas	
	HI	HT	HI	HT
Experimentos Preliminares	Mortalidade = 30,56%			
Cirurgia (P7)	2	0	3	0
Hipóxia (P7)	3	4	4	3
Pós-HI (P8-P21)	1	0	0	0
Eutanásia ("endpoint")	0	2	0	0
Total	6	6	7	3
Experimentos Posteriores	Mortalidade = 5,36%			
Cirurgia (P7)	2	0	1	1
Hipóxia (P7)	0	0	0	0
Pós-HI (P8-P21)	1	0	2	1
Eutanásia ("endpoint")	0	1	0	0
Total	3	1	3	2

3.2. Padronização da Hipotermia Terapêutica (HT)

Nos experimentos preliminares, buscou-se resfriar a incubadora colocando-se gelo em um compartimento do equipamento destinado a este fim, e observou-se que era possível resfriá-la até 17°C. Porém, essa temperatura resultava em uma temperatura corporal dos filhotes abaixo de 32°C. Já, aumentando-se a temperatura da incubadora para 20-21°C, era possível obter a temperatura corporal desejada. Observou-se também que não era necessário colocar gelo na incubadora para atingir essa temperatura. O gelo passou a ser utilizado apenas conforme a necessidade, e posteriormente foi substituído por bolsas térmicas de gel congeladas, colocadas no interior da incubadora. Outro fator observado nesses experimentos foi que os animais levavam em torno de 1 h para alcançarem uma temperatura de 32°C, um tempo muito prolongado (Figura 2). A partir desse resultado, os animais passaram a ser previamente resfriados sendo colocados sobre uma bolsa térmica de gel congelada, atingindo a temperatura desejada em 10-15 min e então sendo colocados na incubadora para a manutenção da temperatura.

Nos experimentos posteriores, após a padronização, foi possível manter os animais do grupo HT com uma temperatura corporal de 32°C durante as 5 h de hipotermia terapêutica, enquanto os animais dos grupos SHAM e HI foram mantidos com uma temperatura corporal de 37°C (Figura 3).

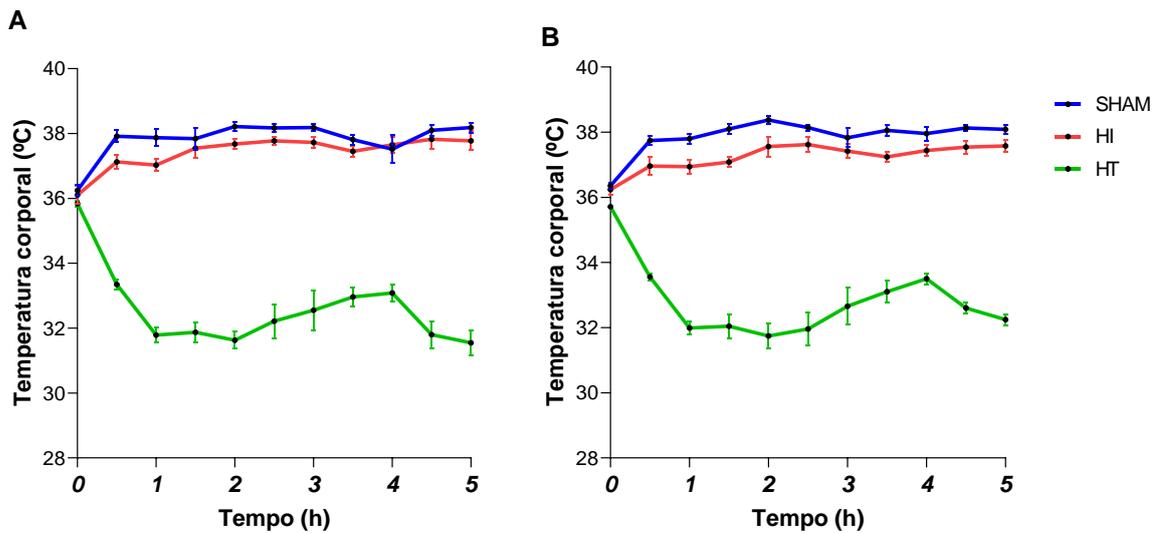


Figura 2. Temperatura corporal dos animais, medida a cada 30 min, nos machos (A) e nas fêmeas (B), no grupo HT ao longo do período de 5 h de hipotermia terapêutica (32°C) e nos grupos SHAM e HI durante as 5 h de normotermia (37°C). Dados referentes aos experimentos preliminares, em que se observou um tempo prolongado para os animais do grupo HT atingirem uma temperatura corporal de 32 °C. Resultados representados como média±erro padrão da média.

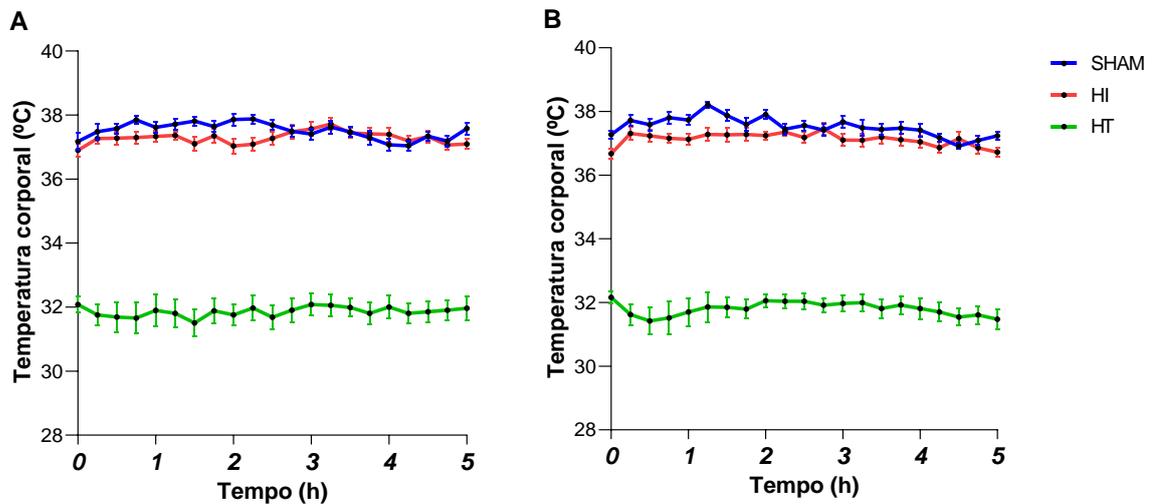


Figura 3. Temperatura corporal dos animais, medida a cada 15 min, nos machos (A) e fêmeas (B), no grupo HT ao longo do período de 5 h de hipotermia terapêutica (32°C) e nos grupos SHAM e HI durante as 5 h de normotermia (37°C). Dados referentes aos experimentos posteriores, após a padronização. Resultados representados como média±erro padrão da média.

3.3. Peso do Encéfalo

Imagens representativas dos encéfalos de machos e fêmeas, dissecados em P9 e em P21, são mostradas na Figura 4. Em P9, observou-se a presença de edema

no hemisfério direito (ipsilateral à oclusão carotídea) nos grupos HI e HT em ambos os sexos. Em P21, o edema não estava presente, mas pode ser claramente percebida a perda de tecido no hemisfério ipsilateral nos grupos HI e HT de ambos os sexos, parecendo haver uma maior perda nos animais do grupo HI (observação qualitativa).

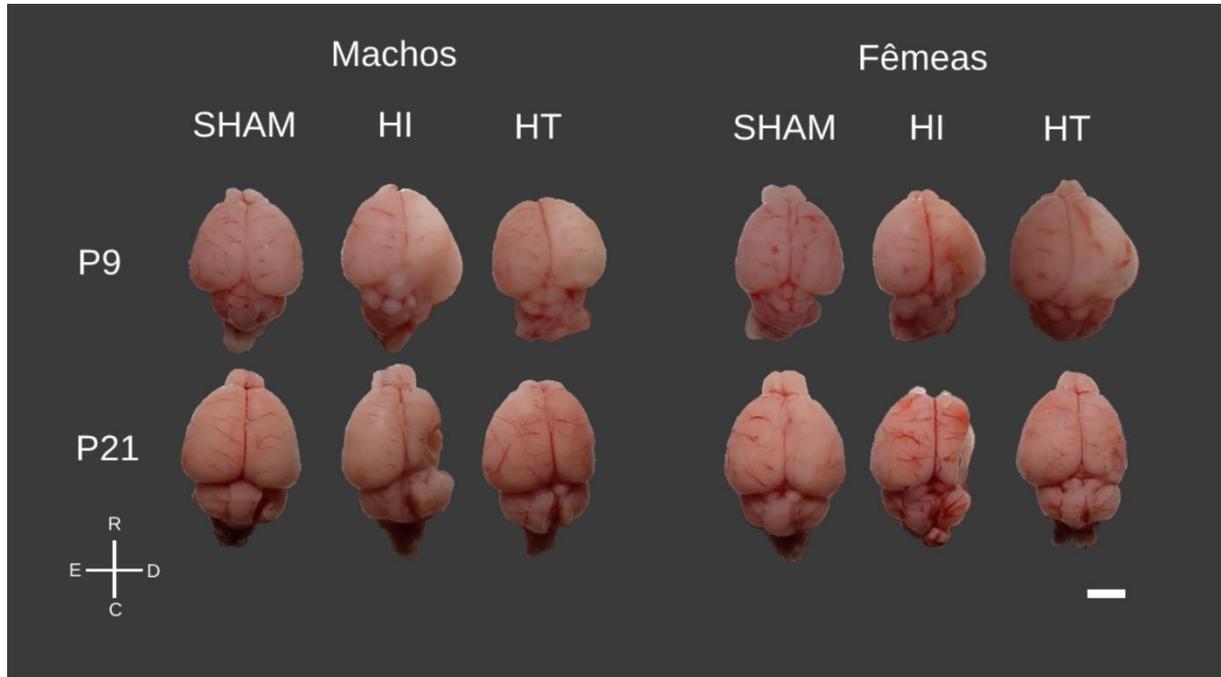


Figura 4. Imagens representativas dos encéfalos de animais neonatos machos e fêmeas, em vista dorsal, em P9 (linha superior) e P21 (linha inferior). Observou-se em P9 a presença de edema no hemisfério direito (ipsilateral à isquemia carotídea) nos grupos HI e HT, em ambos os sexos. Em P21, pode-se perceber claramente a perda tecidual no hemisfério ipsilateral nos grupos HI e HT de ambos os sexos, parecendo haver uma maior perda nos animais do grupo HI. Orientação: R: rostral; C: caudal; D: direito; E: esquerdo. Barra de escala = 0,5 cm.

Os valores da diferença de peso entre os hemisférios cerebrais ipsilateral e contralateral à isquemia carotídea (hemisfério ipsilateral - hemisfério contralateral), utilizados para avaliar a perda de tecido no hemisfério ipsilateral, são mostrados na Figura 5. Em P9, quando comparados ao grupo SHAM, foi observada uma diferença de peso entre os hemisférios significativamente maior nos grupos HI e HT nos animais machos ($H_{(2)}=10,38$; $p=0,006$), e apenas no grupo HT nas fêmeas ($H_{(2)}=10,42$; $p=0,005$). Em P21, a diferença de peso entre os hemisférios foi significativamente maior nos grupos HI e HT quando comparados ao grupo SHAM, em ambos os sexos (machos: $H_{(2)}=26,68$; $p<0,001$; fêmeas: $H_{(2)}=29,20$; $p<0,001$). Além disso, as diferenças de peso em P9 foram menores que as observadas em P21. Os animais do grupo SHAM, em qualquer idade e em ambos os sexos, apresentaram uma diferença

de peso entre os hemisférios cerebrais próxima de zero, indicando uma igualdade de peso entre os hemisférios pela ausência de lesão.

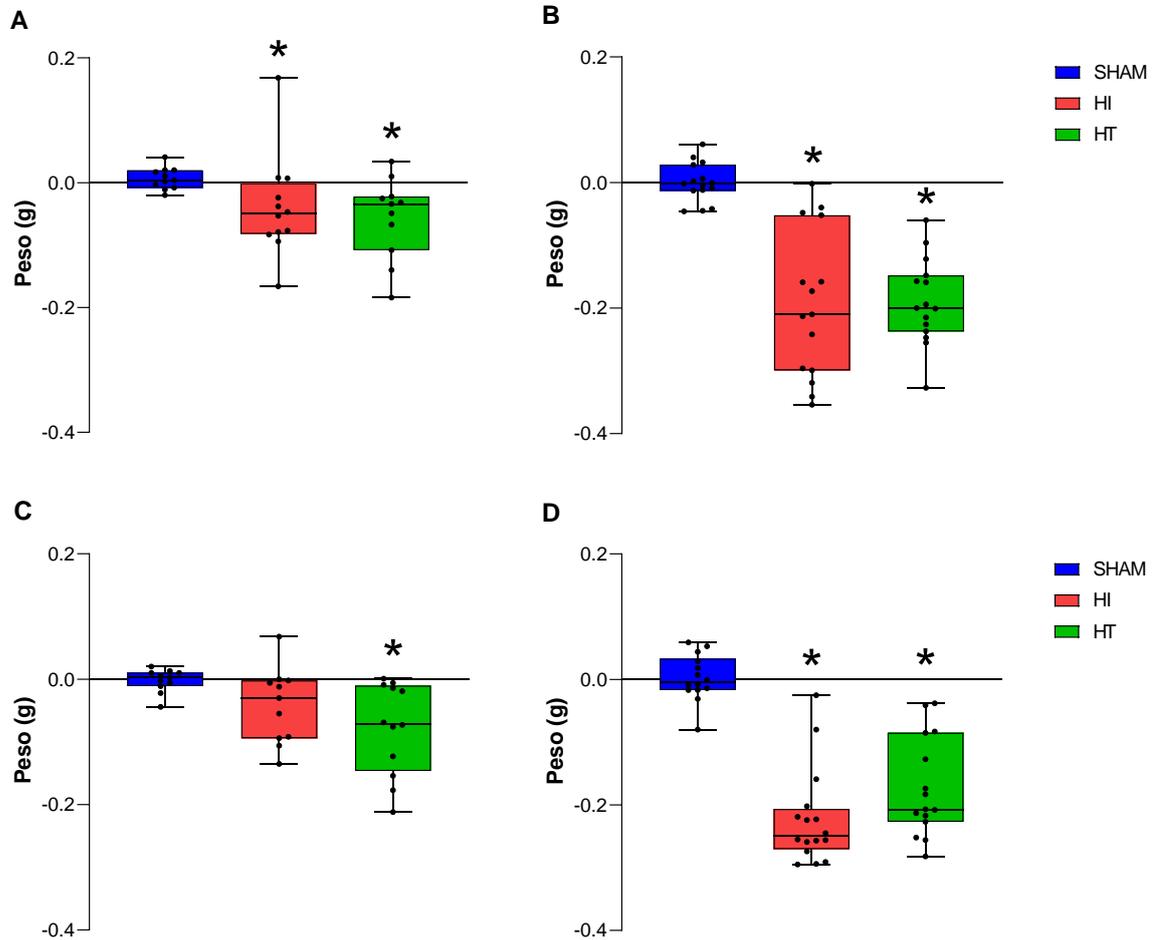


Figura 5. Diferença de peso entre os hemisférios cerebrais (ipsilateral - contralateral) dos animais machos em P9 (A) e em P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e em P21 (D). Em P9, os machos dos grupos HI e HT apresentaram diferença de peso entre os hemisférios significativamente maior em relação ao grupo SHAM, enquanto nas fêmeas, apenas o grupo HT apresentou uma diferença de peso entre os hemisférios significativamente maior em relação ao grupo SHAM. Em P21, em ambos os sexos, os grupos HI e HT apresentaram uma maior diferença em relação ao grupo SHAM. Observou-se que em P21 as diferenças de peso entre os hemisférios são maiores do que em P9. Resultados representados como mediana, intervalos interquartis (25^o e 75^o percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). *diferença em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

O peso percentual total do encéfalo é mostrado na Figura 6. Esse valor foi calculado como uma porcentagem do peso do encéfalo em relação ao peso corporal, utilizando a fórmula $[(\text{hemisfério ipsilateral} + \text{hemisfério contralateral})/\text{peso corporal}] \times 100$. Em P9, o grupo HT apresentou um maior peso percentual encefálico quando comparado ao grupo SHAM tanto em machos ($F_{(2,31)}=4,59$, $p=0,018$) quanto em fêmeas ($F_{(2,31)}=4,95$, $p=0,014$), enquanto que, em P21, observou-se um menor

peso percentual encefálico nos grupos HI e HT nos machos ($F_{(2,40)}=9,57$, $p<0,001$) e no grupo HT nas fêmeas ($F_{(2,42)}=3,76$, $p=0,031$), quando comparados ao grupo SHAM.

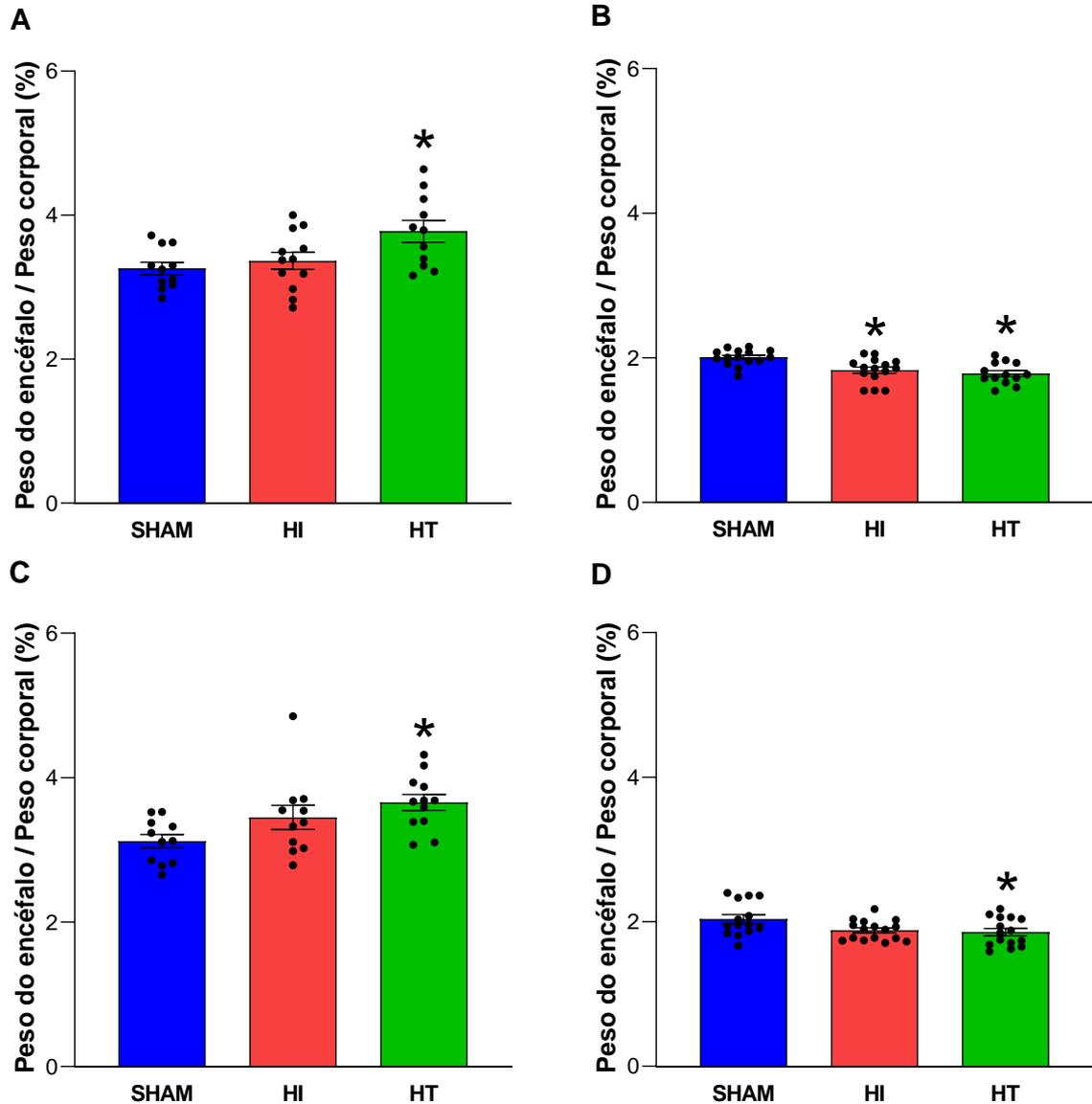


Figura 6. Percentual do peso total do encéfalo em relação ao peso corporal de animais machos em P9 (A) e em P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e em P21 (D). Em P9, o grupo HT apresentou um peso percentual do encéfalo significativamente maior em relação ao grupo SHAM tanto em machos quanto em fêmeas. Em P21, os machos dos grupos HI e HT apresentaram um menor peso percentual do encéfalo em relação ao grupo SHAM, enquanto nas fêmeas, apenas o grupo HT apresentou um menor valor em relação ao grupo SHAM. Resultados representados como média \pm erro padrão da média. *diferença em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey).

3.4. Peso Corporal

Os resultados do peso corporal medido ao longo do tempo (gráficos de linha) e a área sob a curva (AUC) calculada são mostrados na Figura 7. Foi observado ganho de peso ao longo do experimento para todos os grupos (linhas ascendentes). Entretanto, os animais dos grupos HI e HT ganharam peso em uma velocidade menor. A análise da AUC relativa ao peso corporal mostra uma menor área nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM tanto nos machos ($H_{(2)}=16,60$; $p<0,001$) quanto nas fêmeas ($H_{(2)}=19,33$; $p<0,001$).

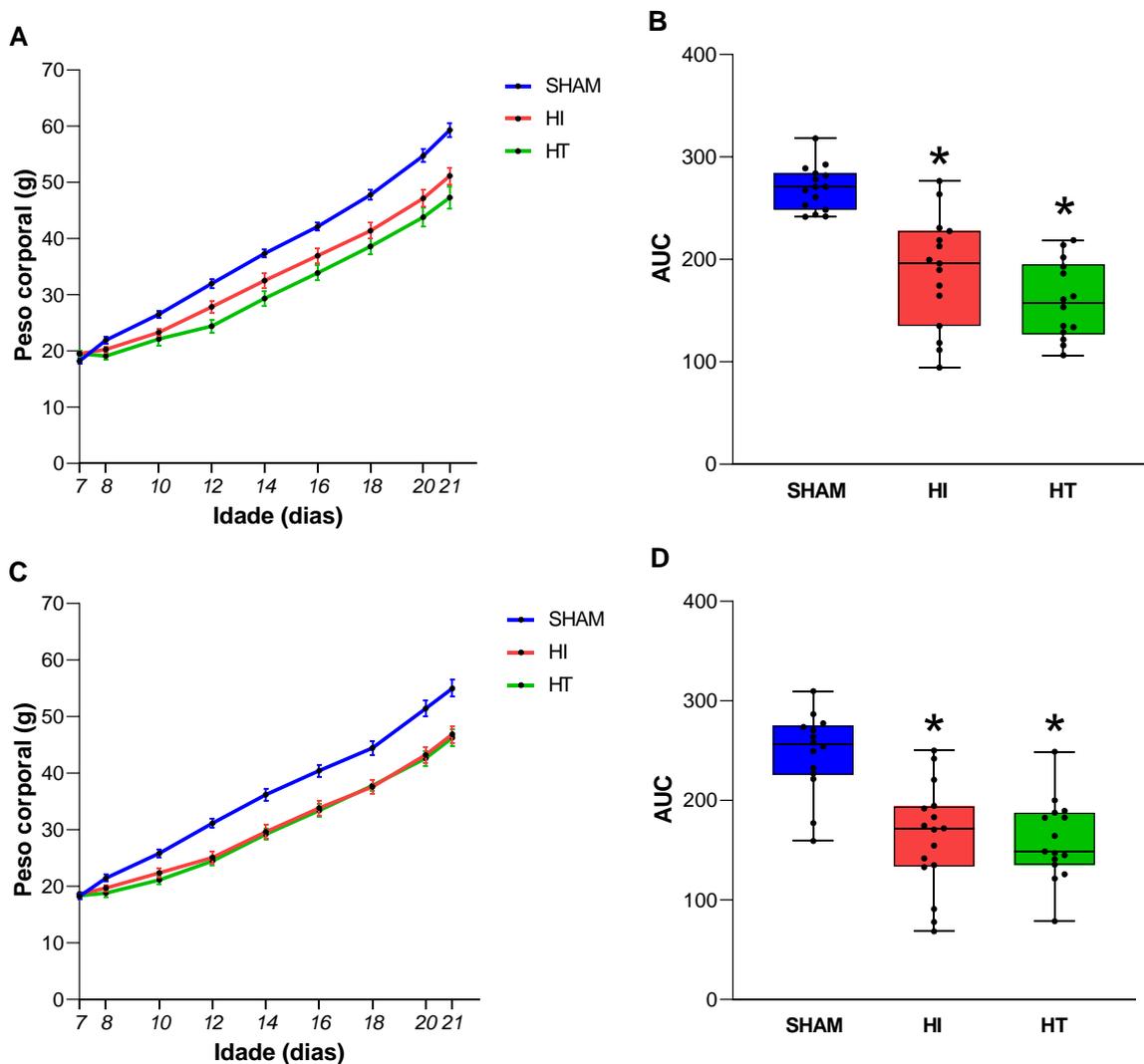


Figura 7. Peso corporal aferido entre as idades de P7 e P21 nos machos (A) e nas fêmeas (C) e área sob a curva (AUC) calculada para machos (B) e fêmeas (D). Observou-se uma AUC significativamente menor nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM em ambos os sexos. Peso corporal (A e C) representado como média±erro padrão da média; AUC representada como mediana, intervalos interquartis (25º e 75º percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). *diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn)

3.5. Dia de Abertura dos Olhos

Os resultados do dia de abertura dos olhos, observado ao longo do período experimental, são mostrados na Figura 8. Foi observado um atraso na abertura do olho direito em relação ao olho esquerdo no grupo HI (machos: $U=43,50$; $p<0,001$; fêmeas: $U=29,50$; $p<0,001$) e no grupo HT (machos: $U=25,50$; $p<0,001$; fêmeas: $U=24,00$; $p<0,001$). Comparando-se o dia de abertura do olho direito entre os grupos, foi observado um atraso na abertura dos olhos direitos nos animais dos grupos HI e HT em relação aos animais do grupo SHAM nos machos ($H_{(2)}=14,94$; $p<0,001$) e nas fêmeas ($H_{(2)}=18,40$; $p<0,001$). O dia de abertura do olho esquerdo não diferiu entre os grupos.

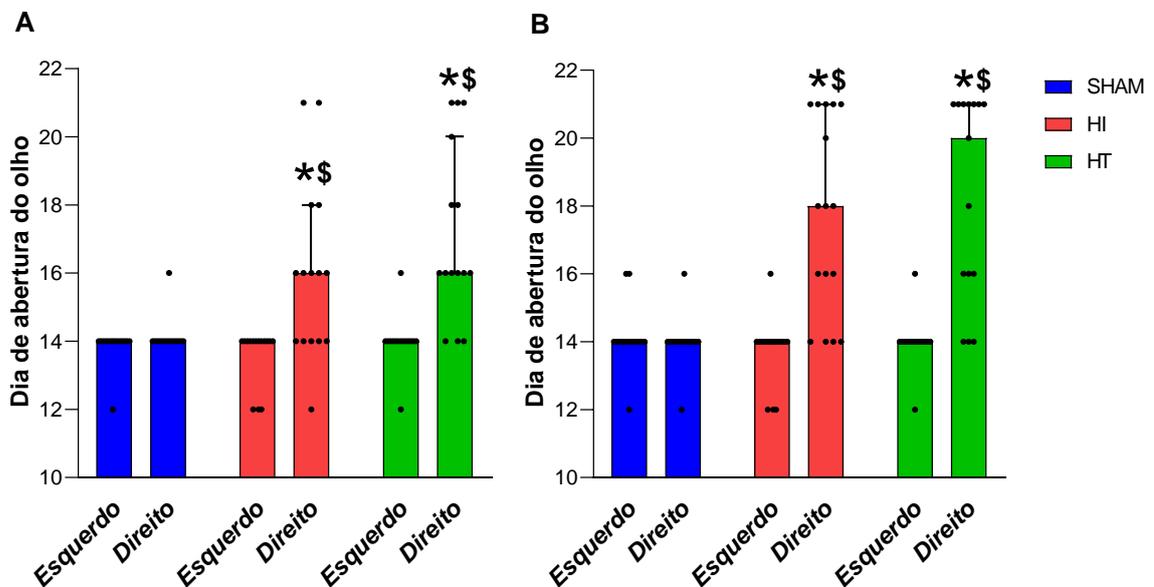


Figura 8. Dia de abertura dos olhos direito e esquerdo em machos (A) e fêmeas (B). Em ambos os sexos, o dia de abertura do olho direito foi atrasado nos animais dos grupos HI e HT em relação aos animais do grupo SHAM e em relação ao dia de abertura do olho esquerdo no mesmo grupo. Resultados representados como mediana e intervalos interquartis (25º e 75º percentis) *diferença significativa em relação ao mesmo olho do grupo SHAM ($p<0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn); \$diferença significativa em relação ao olho esquerdo do mesmo grupo ($p<0,05$, teste U de Mann-Whitney)

3.6. Índice Anogenital

Os resultados do IAG, em P21, são mostrados na Figura 9. Esses resultados foram analisados com utilização de ANOVA de duas vias, tendo como fatores o grupo

experimental e o sexo do animal. A análise do IAG mostrou um efeito do fator sexo ($F_{(1,80)}=331,0$; $p<0,001$), mas não mostrou nenhum efeito do fator grupo ($F_{(2,80)}=2,33$; $p=0,104$), nem interação entre os fatores ($F_{(2,80)}=2,32$; $p=0,105$). Nas comparações múltiplas, os animais do sexo masculino apresentaram maiores índices quando comparados aos animais do sexo feminino ($p<0,05$). Foi observado também um maior IAG nos machos do grupo HT, em comparação com o grupo HI do mesmo sexo ($p<0,05$).

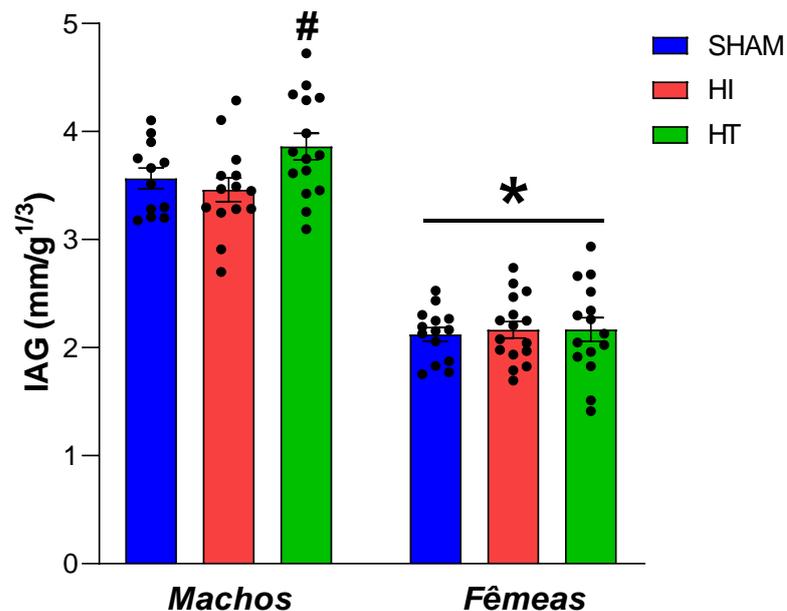


Figura 9. Índice anogenital (IAG) medido em P21 em animais machos e fêmeas. Foi observado que os animais machos apresentaram um índice anogenital maior em relação às fêmeas ($p<0,001$). Os machos do grupo HT apresentaram um maior índice anogenital em relação ao grupo HI. Resultados representados como média±erro padrão da média. *diferença em relação aos machos; #diferença em relação ao grupo HI do mesmo sexo ($p<0,05$, ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni)

3.7. Geotaxia Negativa

A latência dos animais no teste da geotaxia negativa, em cada idade, é mostrada na Figura 10. Não foram observadas diferenças significativas nas latências em nenhum dos sexos em P8 (machos: $F_{(2,43)}=0,29$, $p=0,749$; fêmeas: $F_{(2,43)}=0,74$, $p=0,484$) e em P10 (machos: $F_{(2,33)}=0,33$, $p=0,722$; fêmeas: $F_{(2,37)}=1,45$, $p=0,247$). Foi observada diferença significativa nos machos em P12, quando os animais do grupo HI tiveram uma latência maior em comparação ao grupo SHAM ($F_{2,41}=4,13$, $p=0,023$), mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas fêmeas

nesta idade ($F_{(2,43)}=1,99$, $p=0,150$). Em P14, também não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos sexos (machos: $F_{(2,42)}=0,69$, $p=0,507$; fêmeas: $F_{(2,43)}=2,30$, $p=0,112$).

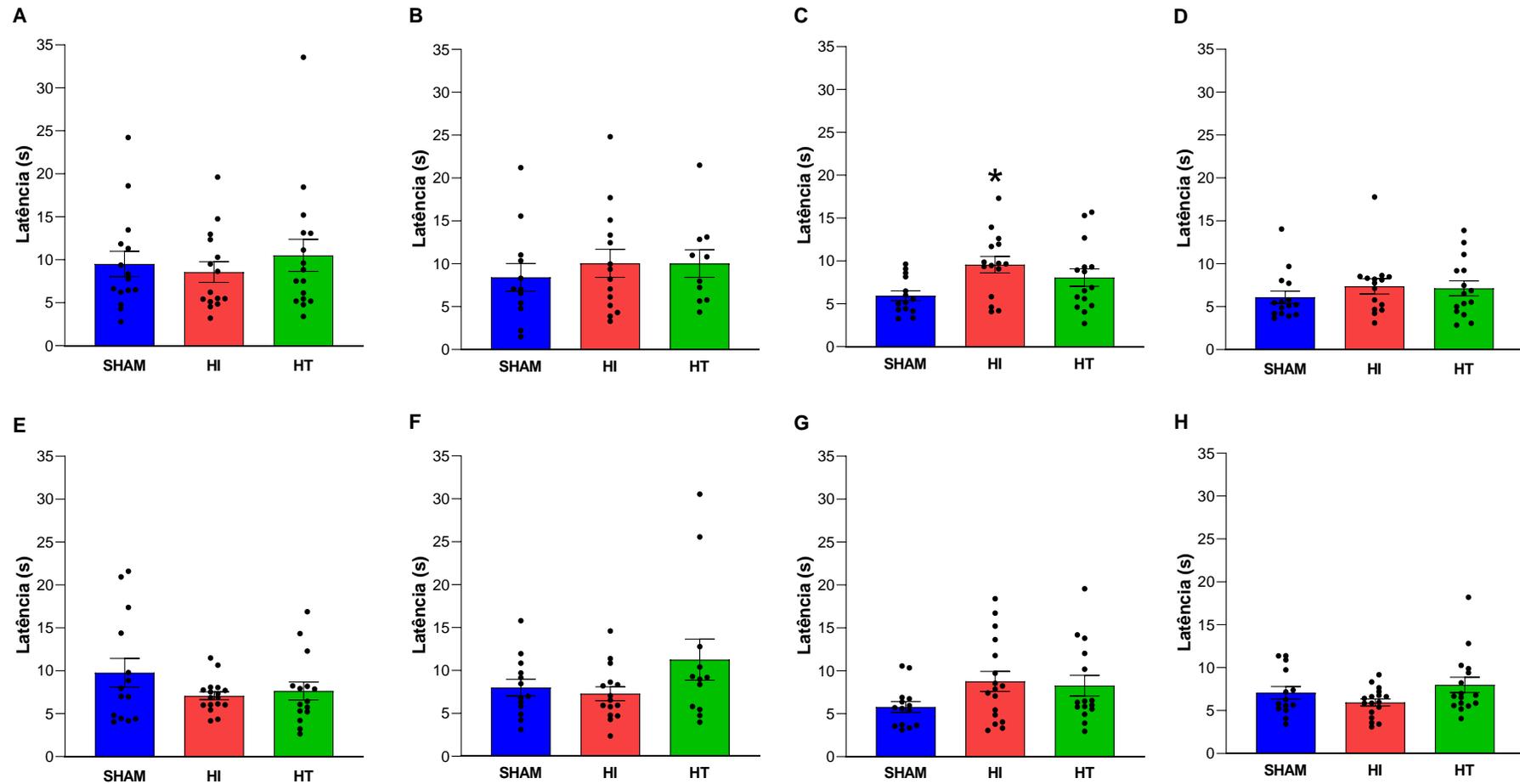


Figura 10. Latência para girar 180° no teste de geotaxia negativa em animais machos em P8 (A), P10 (B), P12 (C) e P14 (D) e em animais fêmeas em P8 (E), P10 (F), P12 (G) e P14 (H). Foi observada uma maior latência no grupo HI em relação ao grupo SHAM apenas nos machos em P12. As demais análises não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Resultados representados como média ± erro padrão da média. *diferença em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey).

Na Figura 11, são mostradas as mesmas latências representadas ao longo do tempo (gráficos de linha), a partir das quais foi avaliada a área sob a curva (AUC). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as AUCs dos diferentes grupos experimentais nem em machos ($F_{(2,41)}=1,85$, $p=0,170$), nem em fêmeas ($F_{(2,40)}=0,13$, $p=0,881$).

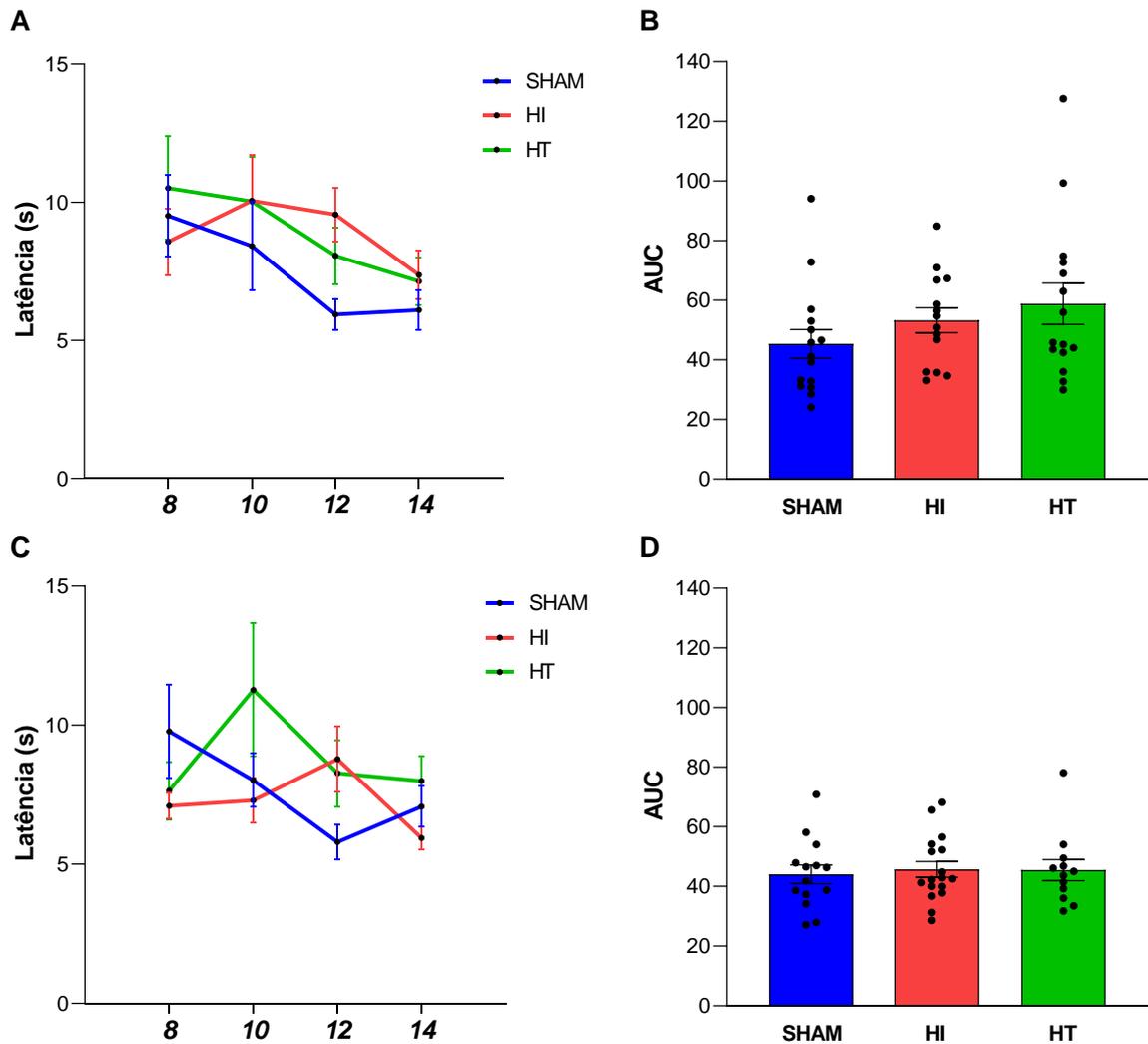


Figura 11. Latência para girar 180° no teste de geotaxia negativa, ao longo do tempo, em animais machos (A) e fêmeas (C) e área sob a curva (AUC) calculada para machos (B) e fêmeas (D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à AUC dos diferentes grupos experimentais em nenhum dos sexos ($p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média \pm erro padrão da média.

3.8. Aversão à Borda

A latência dos animais no teste de aversão à borda, em cada idade, é mostrada na Figura 12. Não foram observadas diferenças significativas nas latências em nenhum dos sexos em P8 (machos: $F_{(2,42)}=0,36$, $p=0,701$; fêmeas: $F_{(2,45)}=2,30$, $p=0,112$) ou em P10 (machos: $F_{(2,36)}=0,58$, $p=0,566$; fêmeas: $F_{(2,35)}=1,62$, $p=0,210$). Foi observada diferença significativa entre as fêmeas em P12, quando os animais do grupo HT tiveram uma latência menor em comparação ao grupo SHAM ($F_{2,43}=6,76$, $p=0,003$), mas nenhuma diferença significativa foi observada nessa idade nos machos ($F_{2,42}=0,03$, $p=0,970$). Em P14, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (machos: $F_{(2,42)}=0,70$, $p=0,501$; fêmeas: $F_{(2,42)}=2,83$, $p=0,071$).

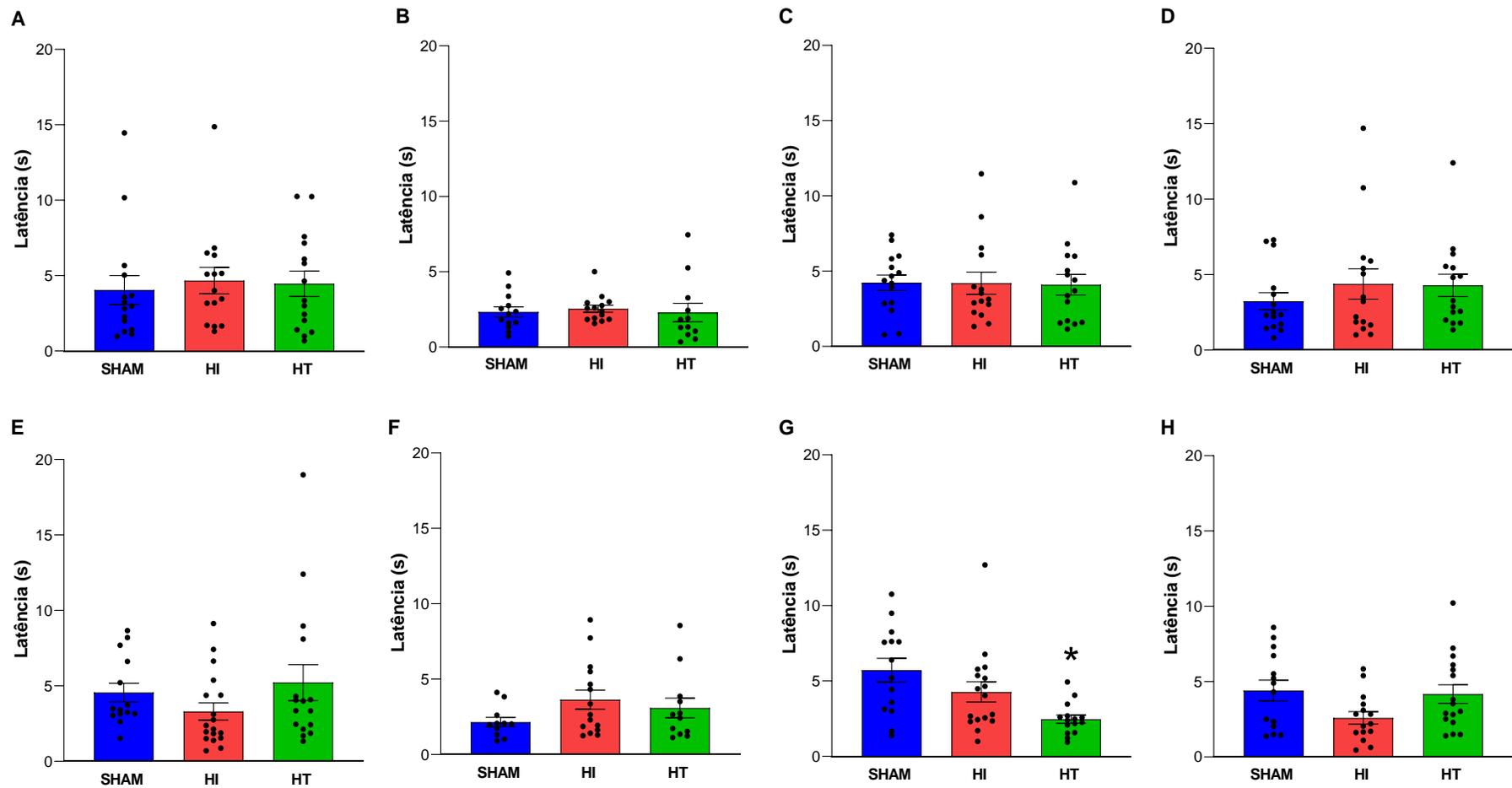


Figura 12. Latência para virar 90° no teste de aversão à borda em animais machos em P8 (A), P10 (B), P12 (C) e P14 (D) e em animais fêmeas em P8 (E), P10 (F), P12 (G) e P14 (H). Em P12, nas fêmeas, foi observada uma menor latência no grupo HT em relação ao grupo SHAM. As demais análises não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Resultados representados como média±erro padrão da média. *diferença em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey).

Na Figura 13, são mostradas as mesmas latências ao longo do tempo (gráficos de linha) no teste de aversão à borda e a respectiva área sob a curva (AUC) calculada para cada um dos grupos experimentais. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as AUCs dos diferentes grupos experimentais nem em machos ($F_{(2,40)}=0,20$, $p=0,818$), nem em fêmeas ($F_{(2,42)}=1,59$, $p=0,210$).

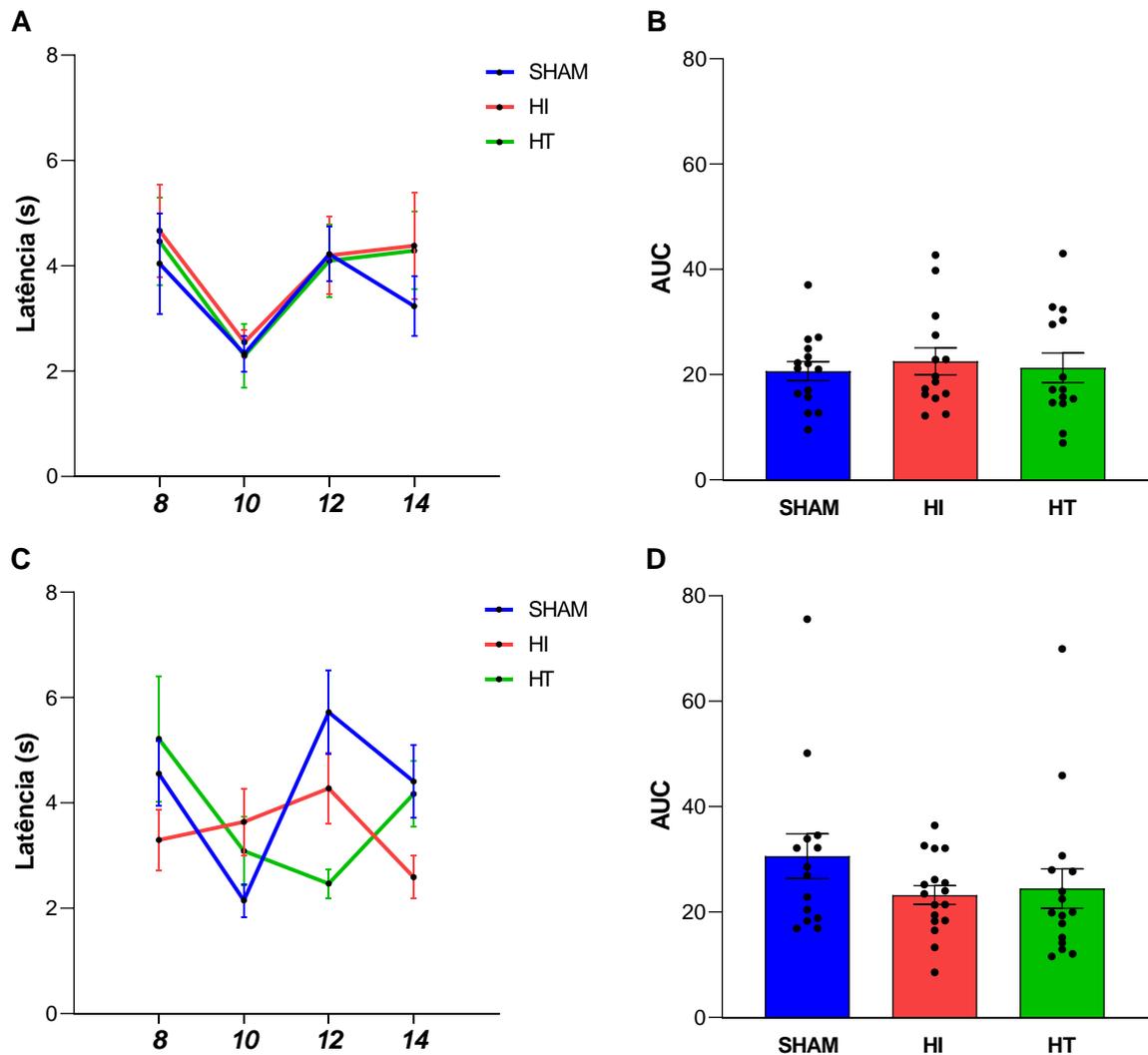


Figura 13. Latência para girar 90° no teste de aversão à borda, ao longo do tempo, em animais machos (A) e fêmeas (C) e área sob a curva (AUC) calculada para machos (B) e fêmeas (D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à AUC dos diferentes grupos experimentais em nenhum dos sexos ($p>0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média±erro padrão da média.

3.9. Reflexo de Endireitamento

A latência dos animais no teste do reflexo de endireitamento, em cada idade, é mostrada na Figura 14. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhuma das idades avaliadas, nem em machos e nem em fêmeas (machos P8: $F_{(2,43)}=0,75$, $p=0,480$; fêmeas P8: $F_{(2,43)}=0,50$, $p=0,609$; machos P10: $F_{(2,36)}=2,44$, $p=0,101$; fêmeas P10: $F_{(2,41)}=1,36$, $p=0,270$; machos P12: $F_{(2,42)}=0,64$, $p=0,530$; fêmeas P12: $F_{(2,43)}=0,38$, $p=0,685$; machos P14: $F_{(2,42)}=0,85$, $p=0,435$; fêmeas P14: $F_{(2,41)}=0,21$, $p=0,813$).

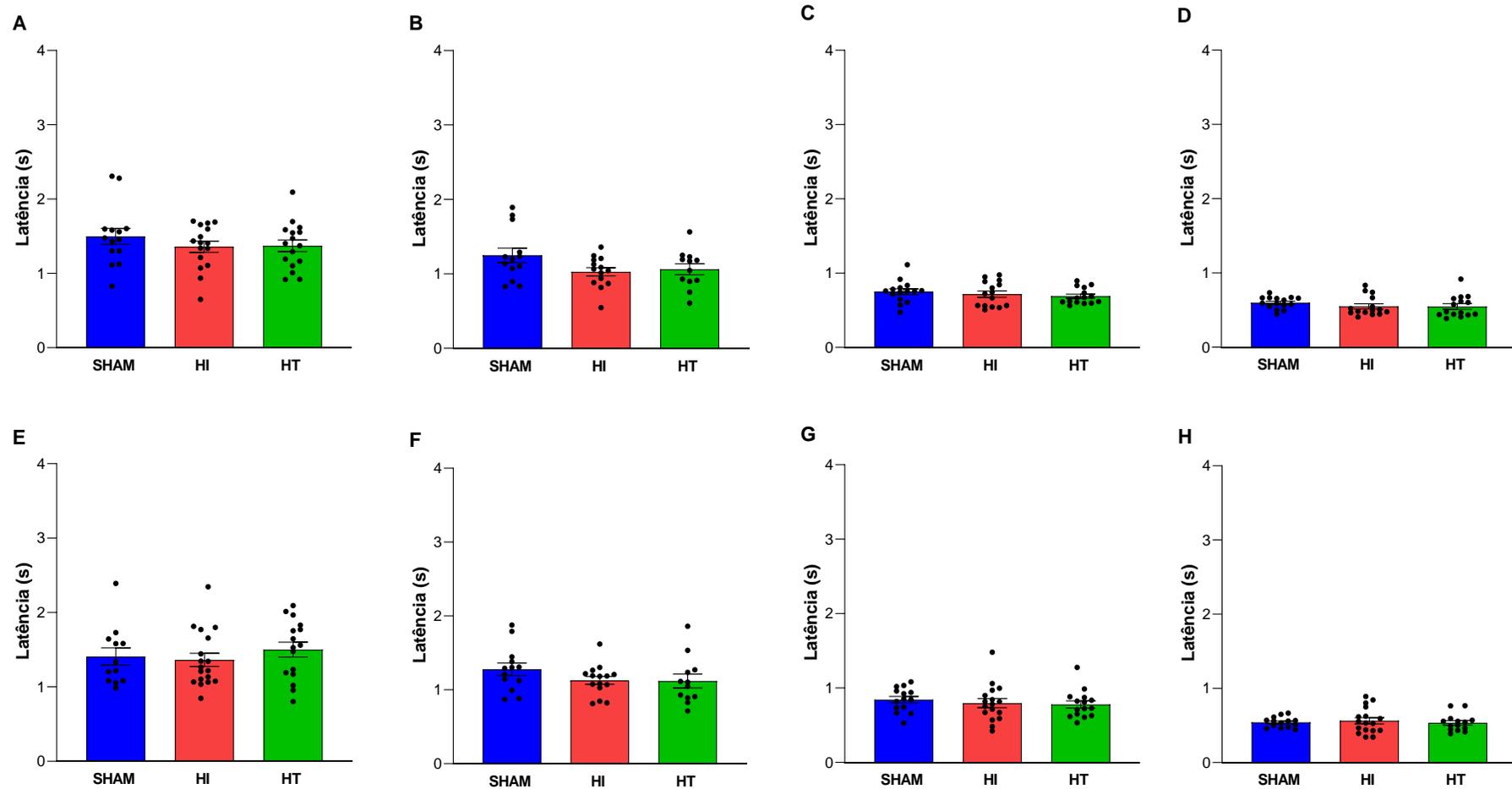


Figura 14. Latência para voltar à postura original no teste do reflexo de endireitamento em animais machos em P8 (A), P10 (B), P12 (C) e P14 (D), e em animais fêmeas em P8 (E), P10 (F), P12 (G) e P14 (H). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma idade e sexo ($p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média \pm erro padrão da média.

Na Figura 15, são mostradas as mesmas latências ao longo do tempo (gráficos de linha) e a área sob a curva (AUC) calculada para cada um dos grupos experimentais no teste do reflexo de endireitamento. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as AUCs dos diferentes grupos experimentais, nem em machos ($F_{(2,41)}=2,19, p=0,125$), nem em fêmeas ($F_{(2,42)}=1,45, p=0,245$).

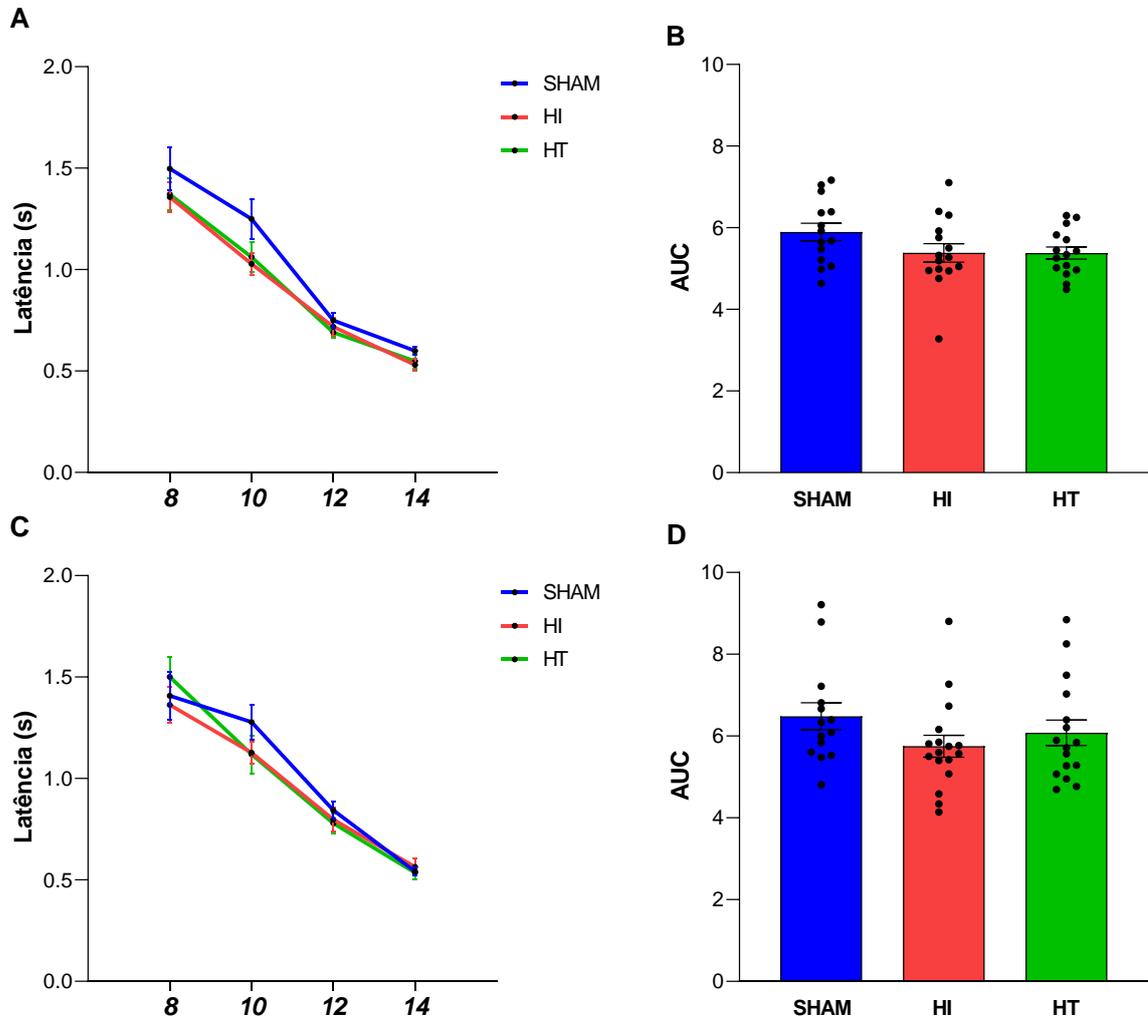


Figura 15. Latência para voltar à postura original no teste de reflexo de endireitamento, ao longo do tempo, em animais machos (A) e fêmeas (C) e área sob a curva (AUC) calculada para machos (B) e fêmeas (D). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à AUC dos diferentes grupos experimentais em nenhum dos sexos ($p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média \pm erro padrão da média.

3.10. Teste de Discriminação Olfatória

As latências no teste de discriminação olfatória, em cada idade e em cada lado de posicionamento da maravalha-moradia são mostradas na Figura 16. Para a análise, foi utilizada ANOVA de duas vias, tendo como fatores o grupo experimental e o lado em que foi posicionada a maravalha-moradia. Em P8, em ambos os sexos, não foi observado efeito do fator grupo (machos: $F_{(2,39)}=1,85$; $p=0,171$; fêmeas: $F_{(2,45)}=0,23$; $p=0,795$), nem efeito do fator lado (machos: $F_{(1,39)}=1,85$; $p=0,182$; fêmeas: $F_{(1,45)}=0,05$; $p=0,820$), também não havendo interação entre os fatores (machos: $F_{(2,39)}=0,44$; $p=0,646$; fêmeas: $F_{(2,45)}=0,80$; $p=0,457$). Em P10, em ambos os sexos, também não foi observado efeito do fator grupo (machos: $F_{(2,58)}=0,56$; $p=0,571$; fêmeas: $F_{(2,56)}=1,30$; $p=0,281$), nem efeito do fator lado (machos: $F_{(1,58)}=0,70$; $p=0,407$; fêmeas: $F_{(1,56)}=0,05$; $p=0,822$) e nem interação entre os fatores (machos: $F_{(2,58)}=0,02$; $p=0,977$; fêmeas: $F_{(2,56)}=0,06$; $p=0,944$). Em P12, não foi observado efeito do fator grupo nem em machos ($F_{(2,62)}=0,23$; $p=0,798$), nem em fêmeas ($F_{(2,64)}=1,71$; $p=0,189$), mas foi observado efeito do fator lado em ambos os sexos (machos: $F_{(1,62)}=10,26$; $p=0,002$; fêmeas: $F_{(1,64)}=8,88$; $p=0,004$), havendo, nessa idade, interação entre os fatores nos machos ($F_{(2,62)}=3,21$; $p=0,047$), mas não nas fêmeas ($F_{(2,62)}=0,05$; $p=0,955$). Nessa idade, as comparações múltiplas mostraram uma latência significativamente maior no grupo HT quando a maravalha-moradia estava posicionada à direita, em comparação com o mesmo grupo quando a maravalha-moradia estava posicionada à esquerda ($p<0,05$). Em P14, não foi observado efeito do fator grupo nem em machos ($F_{(2,62)}=2,01$; $p=0,143$) e nem em fêmeas ($F_{(2,63)}=1,19$; $p=0,310$). Foi observado efeito do fator lado nos machos ($F_{(1,62)}=8,24$; $p=0,006$), mas não nas fêmeas ($F_{(1,63)}=1,21$; $p=0,275$) e não foi observada interação entre os fatores em nenhum dos sexos (machos: $F_{(2,62)}=2,18$; $p=0,122$; fêmeas: $F_{(2,63)}=0,72$; $p=0,490$).

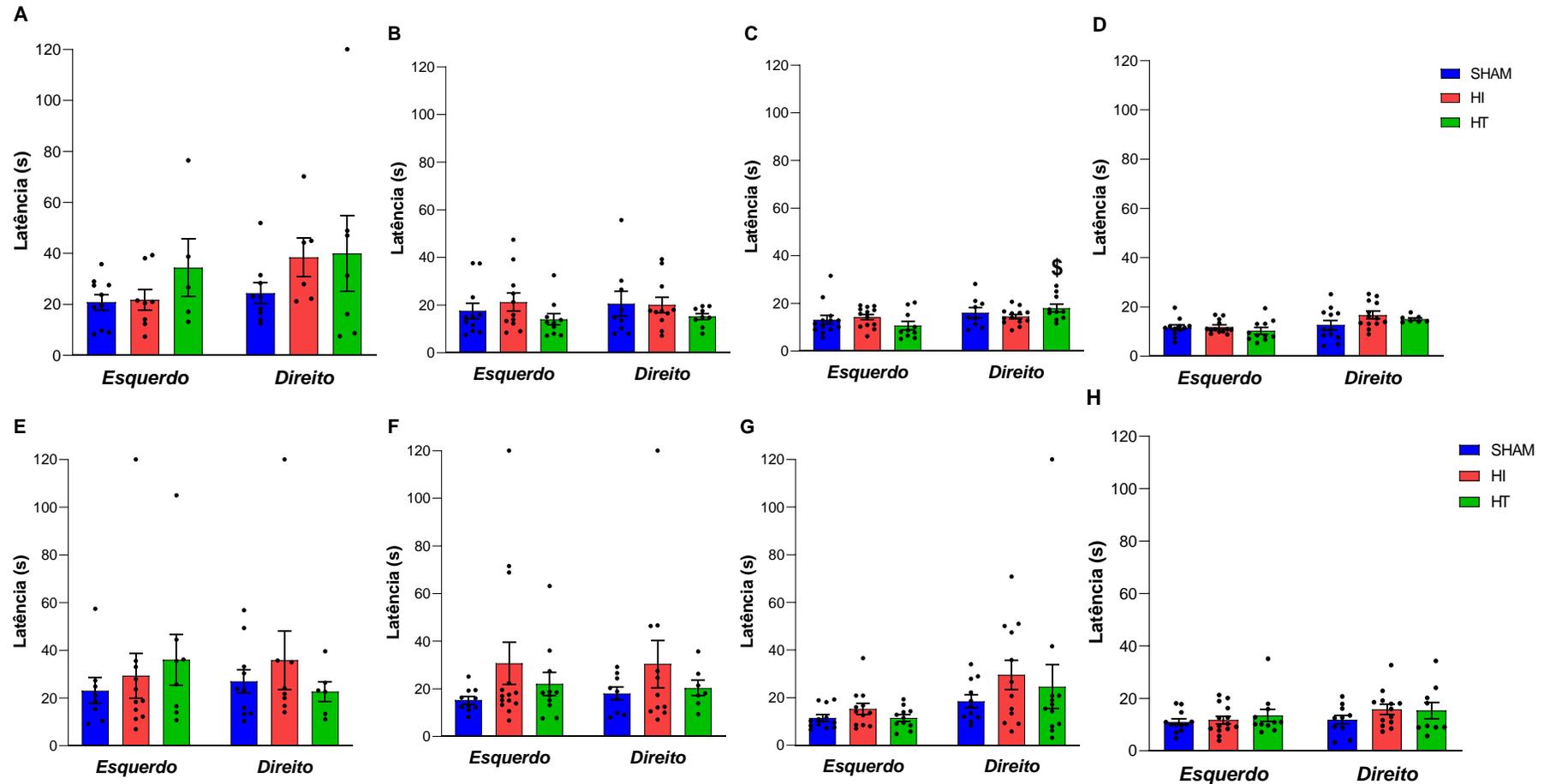


Figura 16. Latência para subir com as quatro patas na maravalha proveniente da caixa moradia em animais machos em P8 (A), P10 (B), P12 (C) e P14 (D) e em animais fêmeas em P8 (E), P10 (F), P12 (G) e P14 (H). Os resultados do teste são mostrados quando a maravalha proveniente da caixa moradia estava no lado esquerdo ou direito do animal. A análise com ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni mostrou um efeito do fator lado nas fêmeas em P12 e nos machos em P12 e P14. Foi observada interação entre os fatores nos machos em P12. Resultados representados como média±erro padrão da média. \$diferença em relação ao posicionamento esquerdo no mesmo grupo ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

Na Figura 17, são mostradas as mesmas latências ao longo do tempo (gráficos de linha) e a área sob a curva (AUC) calculadas para o teste de discriminação olfatória. Foi observado um efeito do grupo na AUC nos machos ($F_{(2,34)}=3,79$; $p=0,033$), sendo mostrada nas comparações múltiplas uma maior AUC no grupo HI em relação ao grupo SHAM ($p<0,05$).

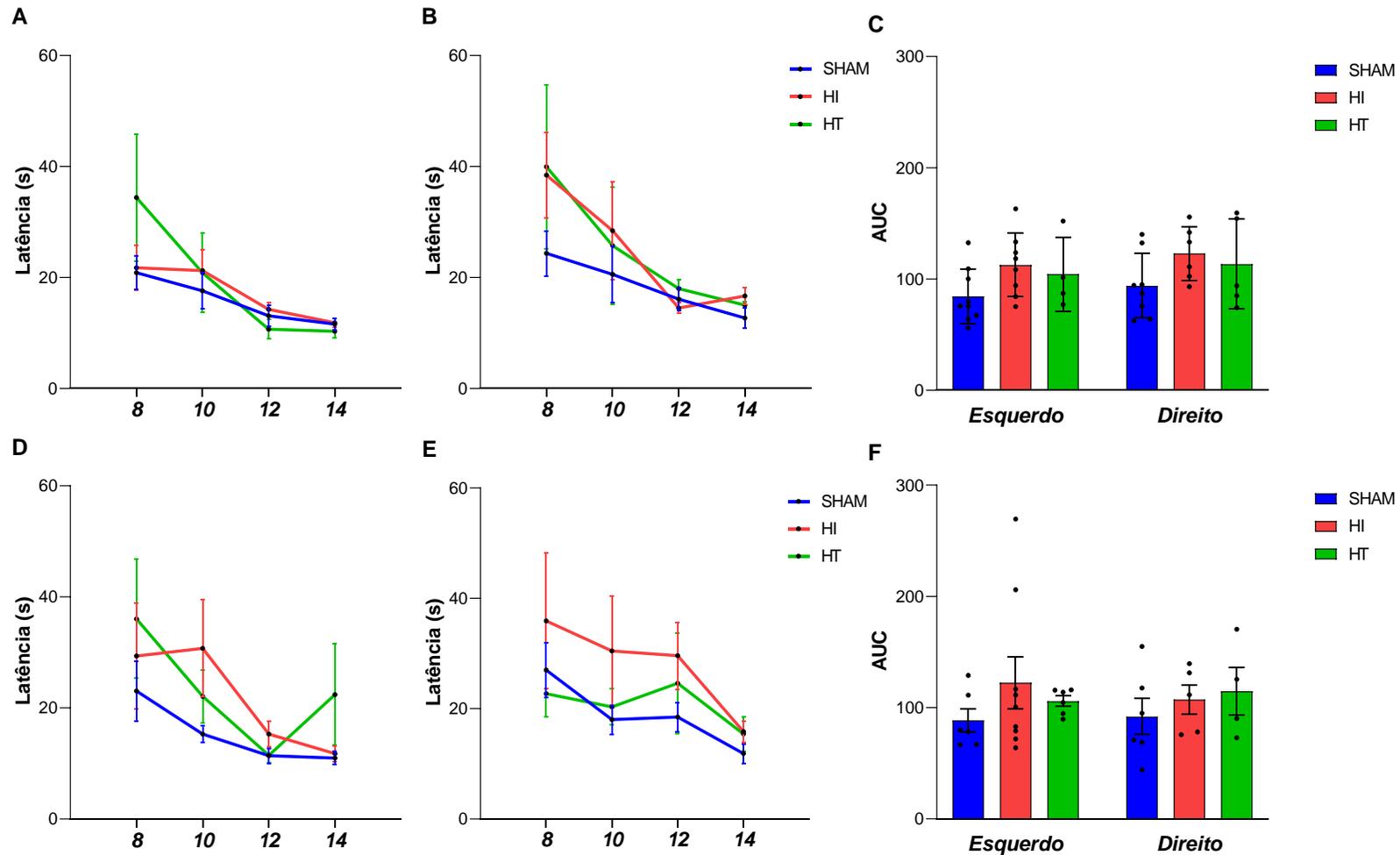


Figura 17. Latência para subir com as quatro patas na maravalha proveniente da caixa-moradia quando estava à esquerda nos machos (A) e fêmeas (D) e quando estava à direita em machos (B) e fêmeas (E). Mostra-se também a AUC em machos (C) e fêmeas (D). A análise com ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni mostrou, nos machos, um efeito do fator grupo, havendo uma maior AUC no grupo HI em relação ao grupo SHAM. Resultados mostrados como média±erro padrão da média.

Os resultados referentes à preferência entre a maravalha-moradia e a maravalha limpa são mostrados na Tabela 3. Quando a maravalha-moradia estava à direita, não foram observadas diferenças entre os grupos na preferência pela maravalha em nenhuma das idades, nem em machos (P8: $p=0,317$; P10: $p=0,575$; P12: $p=0,066$; P14: $p=0,278$) e nem em fêmeas (P8: $p=0,612$; P10: $p=1,00$; P12: $p=0,527$; P14: $p=0,447$). O mesmo ocorreu quando a maravalha-moradia estava à esquerda em machos (P8: $p=0,607$; P10: $p=0,855$; P12: $0,296$; P14: $p=1,00$) e fêmeas (P8: $p=0,178$; P10: $p=0,486$; P12: $p=1,00$; P14: $p=0,625$). Não foram observadas diferenças na proporção de escolha quando a maravalha-moradia estava à direita ou à esquerda, em nenhuma idade ou sexo, nem no grupo SHAM (machos P8: $p=1,00$; machos P10: $p=0,645$; machos P12: $p=0,096$; machos P14: $p=1,00$; fêmeas P8: $p=0,640$; fêmeas P10: $p=1,00$; fêmeas P12: $p=1,00$; fêmeas P14: $p=0,593$), nem nas proporções de escolha do grupo HI (machos P8: $p=0,659$; machos P10: $p=1,00$; machos P12: $p=1,00$; machos P14: $p=1,00$; fêmeas P8: $p=0,311$; fêmeas P10: $p=0,326$; fêmeas P12: $p=1,00$; fêmeas P14: $p=1,00$) e nem nas proporções de escolha do grupo HT (machos P8: $p=0,569$; machos P10: $p=1,00$; machos P12: $1,00$; machos P14: $p=0,476$; fêmeas P8: $p=0,467$; fêmeas P10: $p=0,155$; fêmeas P12: $p=1,00$; fêmeas P14: $p=0,217$).

Tabela 3. Maravalha na qual os animais subiram no teste de discriminação olfatória, de P8 a P14 em machos e fêmeas.

		Machos				Fêmeas			
		SHAM	HI	HT	Valor-p	SHAM	HI	HT	Valor-p
Direito		n=10-11	n=12	n=11-12		n=11	n=11	n=12	
P8	Limpa	2 (16,67%)	5 (45,45%)	1 (14,29%)	p=0,317	2(16,67%)	4 (36,36%)	2 (25%)	p=0,612
	Moradia	10 (83,33%)	6 (54,55%)	6 (85,71%)		10 (83,33%)	7 (63,64%)	6 (75%)	
P10	Limpa	4 (30,77%)	2 (15,38%)	1 (10%)	p=0,575	4 (30,77%)	4 (28,57%)	4 (36,36%)	p=1,000
	Moradia	9 (69,23%)	11 (84,62%)	9 (90%)		9 (69,23%)	10 (71,43%)	7 (63,64%)	
P12	Limpa	4 (30,77%)	0 (0%)	1 (9,09%)	p=0,066	2 (15,38%)	2 (14,29%)	0 (0%)	p=0,527
	Moradia	9 (69,23%)	13 (100%)	10 (90,91%)		11 (84,62%)	12 (85,71%)	11 (100%)	
P14	Limpa	1 (7,69%)	0 (0%)	2 (18,18%)	p=0,278	3 (23,08%)	1 (7,14%)	3 (25%)	p=0,447
	Moradia	12 (92,31%)	13 (100%)	9 (81,82%)		10 (79,62%)	13 (92,86%)	9 (75%)	
Esquerdo		n=14-15	n=15	n=13-15		n=13-15	n=15-16	n=14-15	
P8	Limpa	2 (16,67%)	3 (27,27%)	3 (37,5%)	p=0,607	4 (33,33%)	1 (9,09%)	0 (0%)	p=0,178
	Moradia	10 (83,33%)	8 (72,73%)	5 (62,5%)		8 (66,67%)	10 (90,91%)	8 (100%)	
P10	Limpa	2 (15,38%)	3 (21,43%)	1 (8,33%)	p=0,855	3 (23,08%)	1 (7,14%)	1 (8,33%)	p=0,486
	Moradia	11 (84,62%)	11 (78,57%)	11 (91,67%)		10 (79,92%)	13 (92,86%)	11 (91,67%)	
P12	Limpa	0 (0%)	0 (0%)	1 (9,09%)	p=0,296	1 (7,69%)	2 (14,29%)	1 (8,33%)	p=0,486
	Moradia	13 (100%)	13 (100%)	10 (90,91%)		12 (92,31%)	12 (85,71%)	11 (91,67%)	
P14	Limpa	1 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	p=1,000	1 (7,69%)	0 (0%)	0 (0%)	p=0,625
	Moradia	12 (92,93%)	13 (100%)	11 (100%)		12 (92,31%)	14 (100%)	11 (100%)	
Valor-p D vs. E		p>0,05	p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05	p>0,05	

3.11. Teste do Cilindro

A porcentagem de uso da pata anterior contralateral à isquemia carotídea no teste do cilindro, realizado em P20, é mostrada na Figura 18. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos sexos (machos: $F_{(2,37)}=0,65$; $p=0,528$; fêmeas $F_{(2,37)}=1,71$; $p=0,195$). O uso da pata anterior contralateral, para todos os grupos em ambos os sexos, foi em torno de 50%, indicando um uso simétrico das patas anteriores.

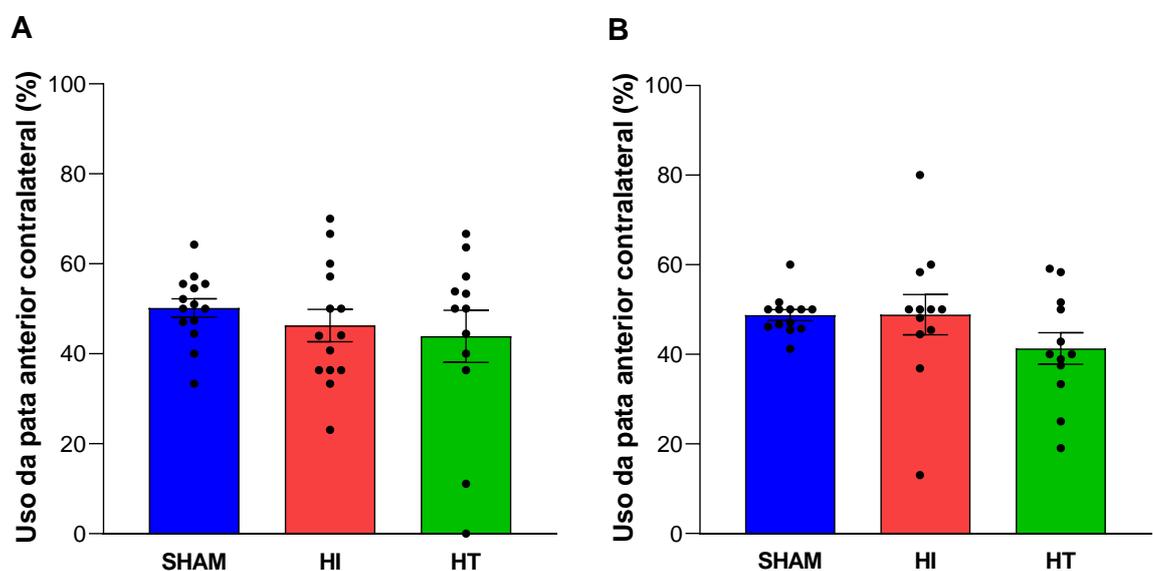


Figura 18. Percentual de uso da pata anterior contralateral à isquemia carotídea no comportamento exploratório, avaliado no teste do cilindro em P20, em machos (A) e fêmeas (B). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média \pm erro padrão da média.

3.12. Escore de Severidade Neurológica Modificado (mNSS)

Os resultados do escore de severidade neurológica modificado (mNSS), analisados em P20, são mostrados na Tabela 4. Como os escores atribuídos aos testes realizados no lado direito e esquerdo do animal foram idênticos, utilizou-se um único valor final de mNSS em cada grupo. Todos os testes que compõem o escore também tiveram respostas idênticas em todos os animais, com exceção do teste de equilíbrio (“beam walk”), que foi o único responsável pela atribuição de pontos diferentes para os animais no escore final. Não foram observadas diferenças

estatísticas na pontuação final entre os grupos experimentais, nem em machos ($H_{(2)}=1,07$; $p=0,584$) e nem em fêmeas ($H_{(2)}=3,55$; $p=0,169$).

Tabela 4. Pontuação obtida no escore de severidade neurológica modificado (mNSS) em animais machos e fêmeas.

	Machos (n=15)	Valor-p	Fêmeas (n=15)	Valor-p
SHAM	0 (0-4)	p=0,584	0 (0-0,5)	p=0,169
HI	1 (0-4)		0 (0-3)	
HT	2 (0-3)		1 (0-5)	

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Resultados representados como mediana e intervalos interquartis (25° e 75° percentis).

3.13. Contagem de Leucócitos

O resultado da contagem de leucócitos realizada a partir dos esfregaços sanguíneos é mostrado na Figura 19. Foi observada diferença estatisticamente significativa dentro dos machos ($H_{(2)}=31,83$; $p<0,001$), sendo que os grupos HI e HT apresentaram uma menor quantidade de leucócitos em relação ao grupo SHAM, e o grupo HT apresentou uma quantidade maior em relação ao grupo HI. Nas fêmeas, observou-se uma maior quantidade de leucócitos no grupo HI em relação aos demais grupos ($H_{(2)}=12,51$; $p=0,002$).

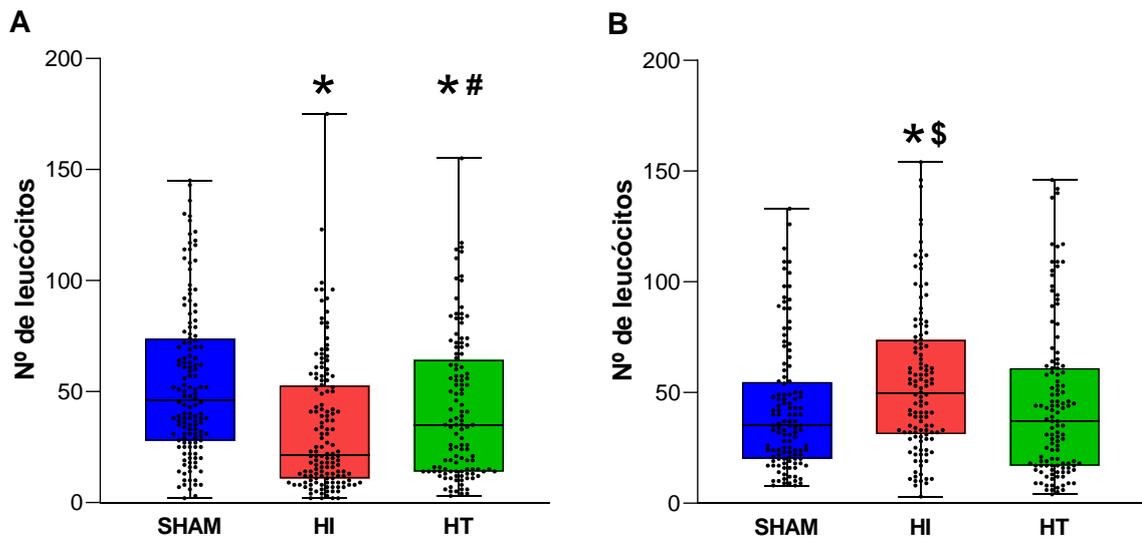


Figura 19. Contagem de leucócitos nos esfregaços sanguíneos realizados em P21 em machos (A) e fêmeas (B). Nos machos, observou-se uma menor quantidade de leucócitos nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM, e uma maior quantidade de leucócitos no grupo HT em relação ao grupo HI. Nas fêmeas, observou-se uma maior quantidade de leucócitos no grupo HI em relação aos grupos SHAM e HT. Resultados representados como mediana, intervalos interquartis (25º e 75º percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). *diferença em relação ao grupo SHAM; #diferença em relação ao grupo HI; \$diferença em relação a grupo HT ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn).

3.14. *Peso dos Órgãos Periféricos*

O peso percentual do baço (em relação ao peso corporal), mostrado na Figura 20, não apresentou diferença significativa entre os grupos em P9 (machos: $F_{(2,32)}=0,12$, $p=0,888$; fêmeas: $F_{(2,31)}=0,82$, $p=0,449$). Em P21, foi observado nas fêmeas um menor peso percentual do baço no grupo HI em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,42)}=3,64$, $p=0,035$), mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nos machos ($F_{(2,41)}=2,27$, $p=0,116$).

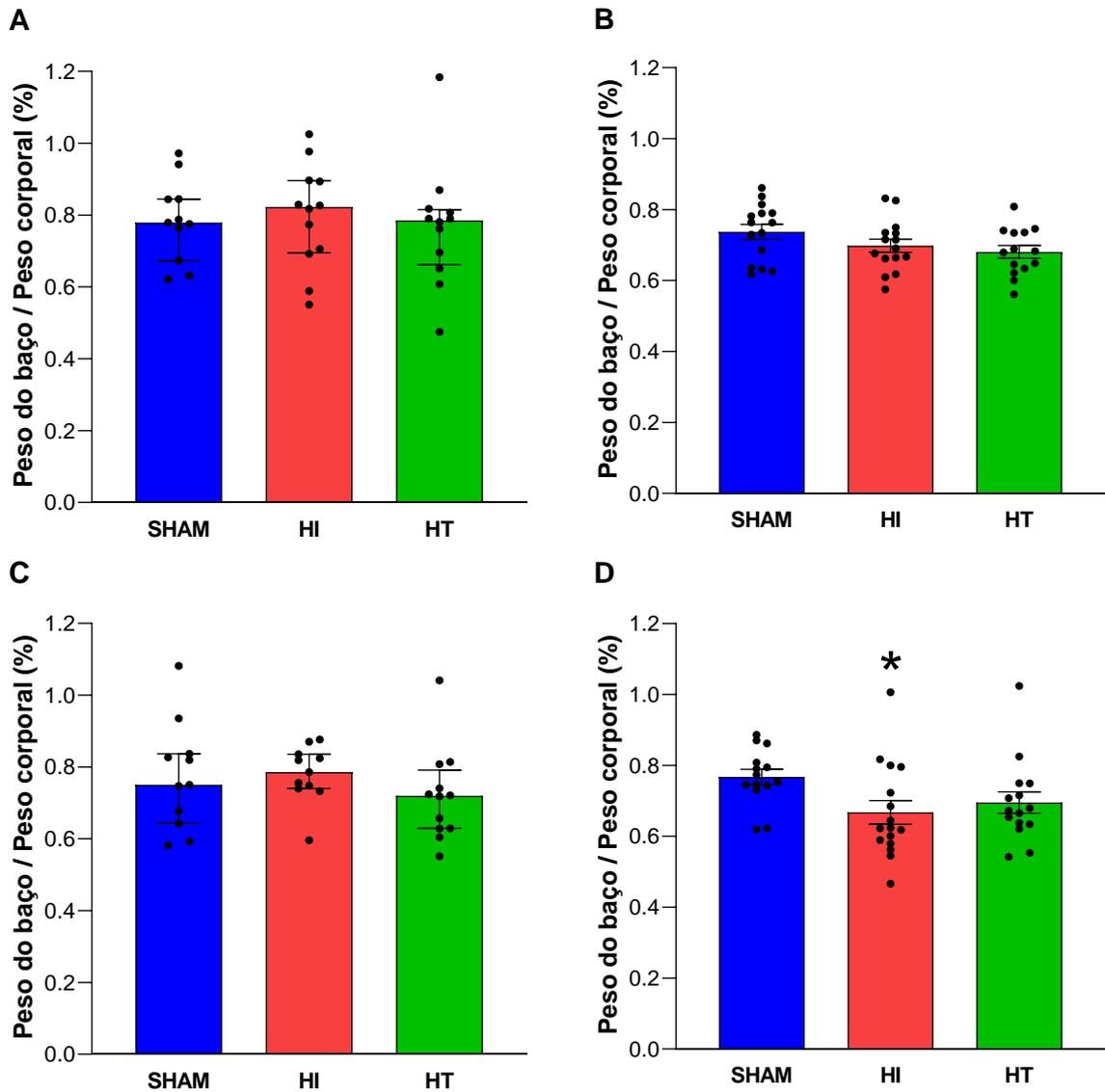


Figura 20. Percentual do peso do baço em relação ao peso corporal nos animais machos em P9 (A) e P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e P21 (D). Em P21, observou-se um menor peso percentual do baço nas fêmeas do grupo HI em relação ao grupo SHAM. Resultados representados como média \pm erro padrão da média. *diferença em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey).

O peso percentual do timo (Figura 21) não diferiu significativamente entre os grupos em nenhum dos sexos em P9 (machos: $H_{(2)}=4,53$, $p=0,104$; fêmeas: $H_{(2)}=4,62$, $p=0,099$) ou em P21 (machos: $H_{(2)}=3,24$, $p=0,198$; fêmeas: $H_{(2)}=2,51$, $p=0,285$).

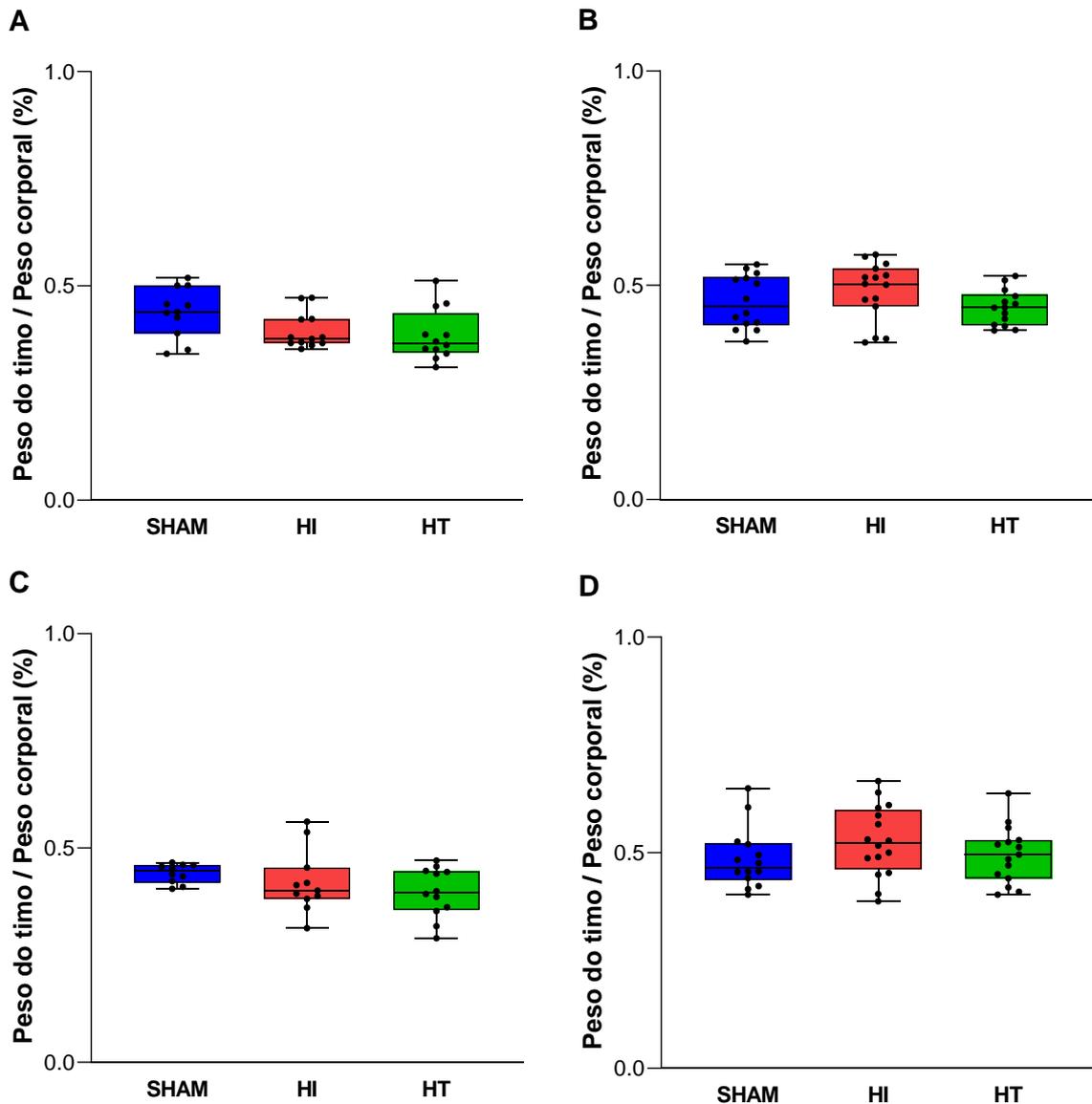


Figura 21. Percentual do peso do timo em relação ao peso corporal nos animais machos em P9 (A) e P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e P21 (D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Resultados representados como mediana, intervalos interquartis (25^o e 75^o percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras).

Em relação ao peso percentual do fígado (Figura 22), também não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (machos P9: $F_{(2,31)}=0,17$, $p=0,845$; fêmeas P9: $F_{(2,31)}=1,06$, $p=0,360$; machos P21: $F_{(2,40)}=0,49$, $p=0,618$; fêmeas P21: $F_{(2,31)}=0,05$, $p=0,954$).

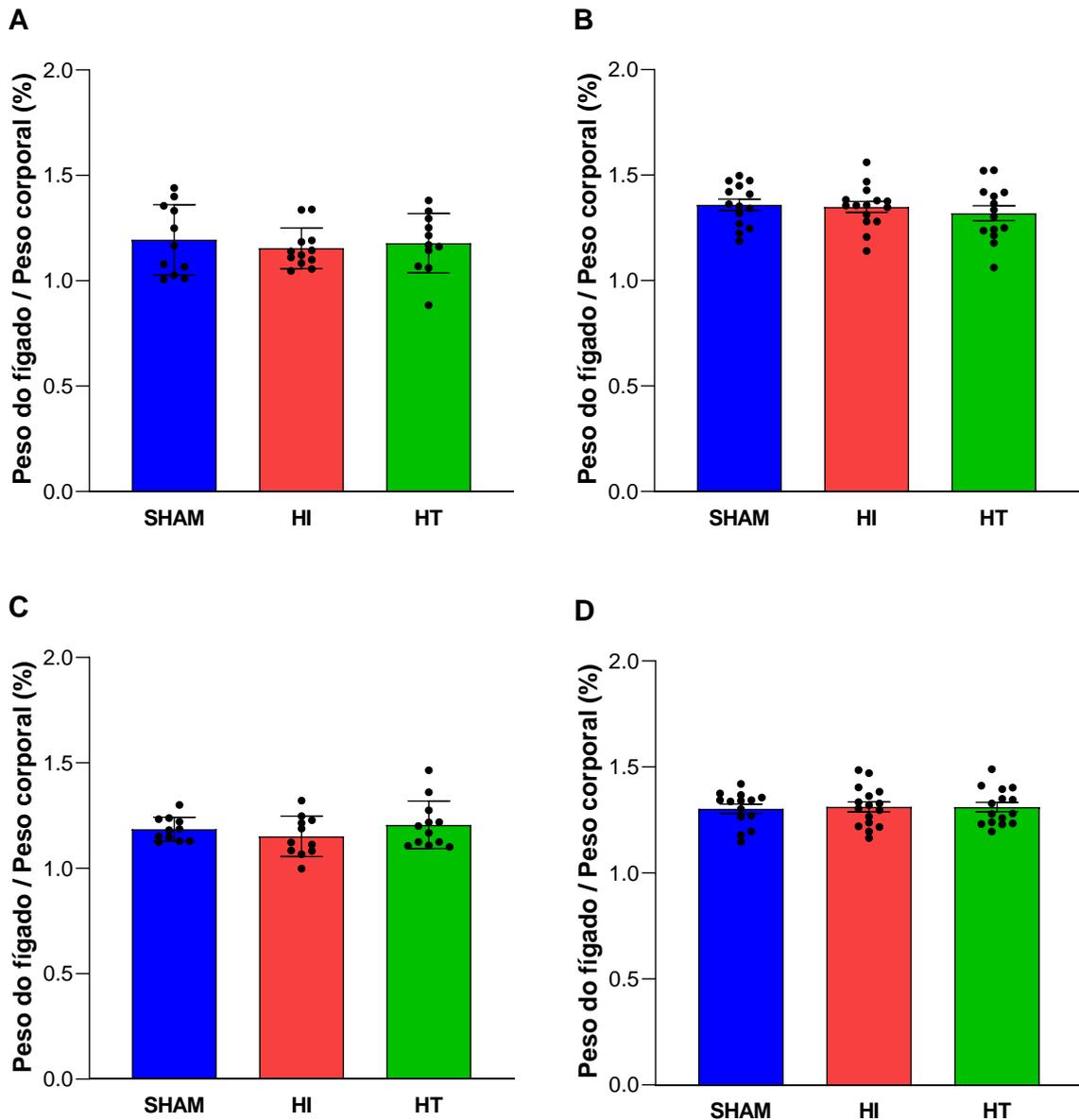


Figura 22. Percentual do peso do fígado (lobo lateral esquerdo) em relação ao peso corporal nos animais machos em P9 (A) e P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e P21 (D). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Tukey). Resultados representados como média \pm erro padrão da média.

O peso percentual do TAM está mostrado na Figura 23. O peso percentual do TAM não apresentou diferenças significativas em P9 para nenhum dos sexos (machos: $H_{(2)}=0,89$, $p=0,640$; fêmeas: $H_{(2)}=0,64$, $p=0,726$). Entretanto, em P21, os machos do grupo HT apresentaram um peso percentual do TAM maior em relação ao grupo HI ($H_{(2)}=7,70$, $p=0,021$), enquanto as fêmeas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($H_{(2)}=1,56$, $p=0,458$).

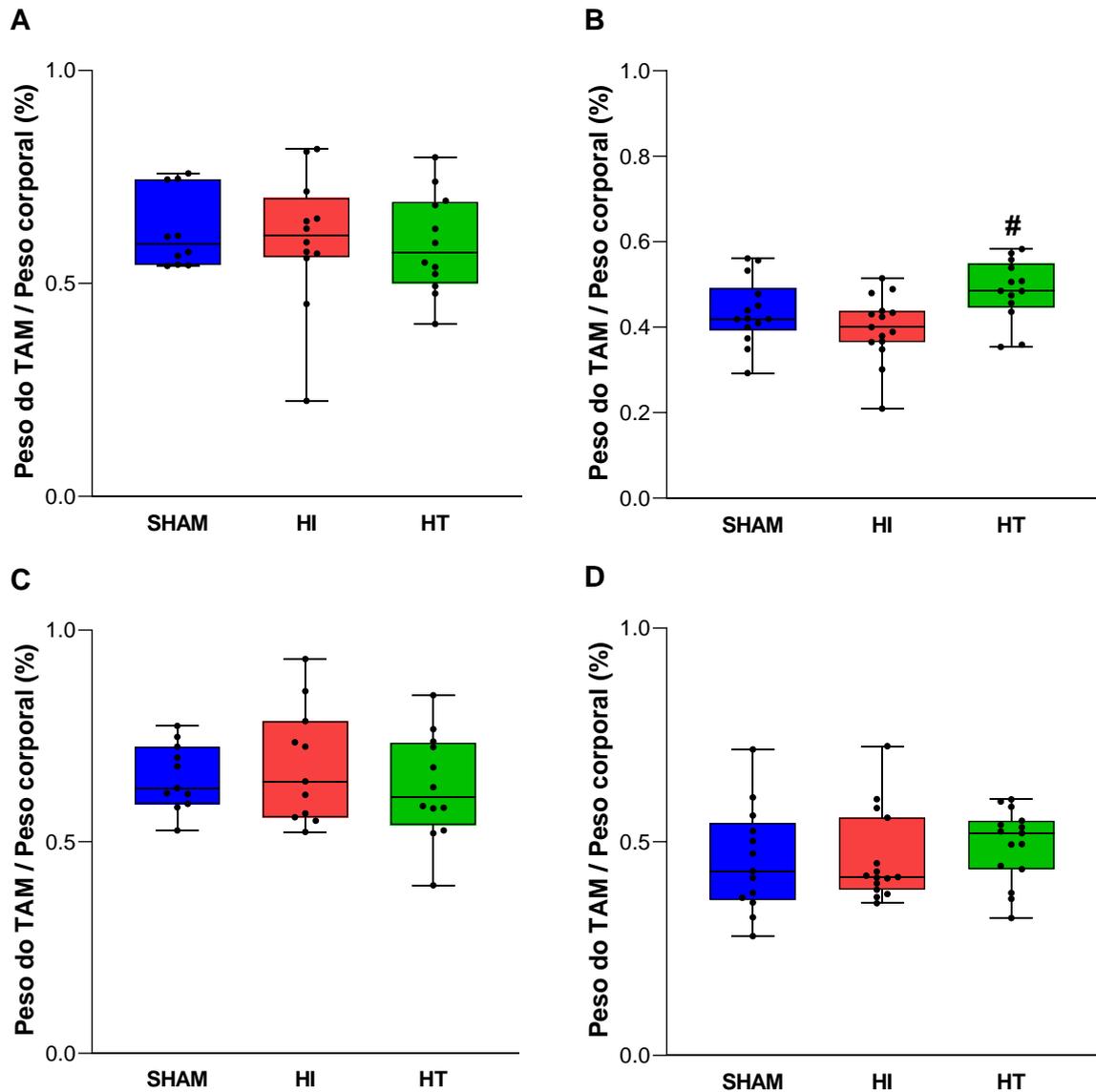


Figura 23. Percentual do peso tecido adiposo marrom (TAM) em relação ao peso corporal nos animais machos em P9 (A) e P21 (B) e fêmeas em P9 (C) e P21 (D). Em P21, foi observado um maior peso percentual nos machos do grupo HT em relação ao grupo HI. Resultados representados como mediana, intervalos interquartis (25^o e 75^o percentis) (caixas) e valores mínimo e máximo (barras). #diferença em relação ao grupo HI ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn)

Os pesos absolutos dos órgãos periféricos são mostrados na Tabela 5. O peso absoluto do baço, em P9, não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos machos ($F_{(2,32)}=2,57$, $p=0,093$), mas nas fêmeas apresentou um menor peso no grupo HT em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,31)}=5,25$, $p=0,011$). Em P21, o peso do baço foi significativamente menor nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM tanto nos machos ($F_{(2,42)}=12,09$, $p < 0,001$) quanto nas fêmeas ($F_{(2,41)}=14,69$, $p < 0,001$).

O peso absoluto do timo, em P9, foi significativamente menor, em relação ao grupo SHAM, nos grupos HI e HT nos machos ($F_{(2,32)}=13,75$, $p<0,001$), e somente no grupo HT nas fêmeas ($F_{(2,32)}=7,18$, $p=0,003$). Em P21, o peso do timo foi significativamente menor no grupo HT em relação aos grupos SHAM e HI nos machos ($F_{(2,41)}=9,39$, $p<0,001$), e nas fêmeas somente em relação ao grupo SHAM ($F_{(2,42)}=4,57$, $p=0,016$).

O peso absoluto do fígado, em P9, não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos machos ($H_{(2)}=3,99$, $p=0,136$), mas nas fêmeas apresentou um menor peso no grupo HT em relação ao grupo SHAM ($H_{(2)}=6,28$, $p=0,043$). Em P21, o peso do fígado foi significativamente menor nos grupos HI e HT em relação ao grupo SHAM em ambos os sexos (machos: $H_{(2)}=15,60$, $p<0,001$; fêmeas: $H_{(2)}=14,55$, $p<0,001$).

O peso do TAM não apresentou diferenças estatisticamente significativas, em P9, nem em machos ($H_{(2)}=5,07$, $p=0,079$), e nem em fêmeas ($H_{(2)}=5,61$, $p=0,061$). Em P21, não foram observadas diferenças significativas nas fêmeas ($H_{(2)}=2,33$, $p=0,110$), mas nos machos o peso do TAM foi significativamente menor no grupo HI em relação ao grupo SHAM ($H_{(2)}=10,01$, $p=0,007$).

Tabela 5. Pesos absolutos, em gramas, dos órgãos periféricos coletados em P9 e P21.

	Machos				Fêmeas			
	SHAM	HI	HT	Valor-p	SHAM	HI	HT	Valor-p
P9	n=11	n=12	n=11		n=11	n=11	n=12	
<i>Baço</i>	0,19±0,01	0,17±0,01	0,15±0,01	p=0,093	0,18±0,01	0,16±0,01	0,14±0,01*	p=0,011
<i>Timo</i>	0,10±0,003	0,08±0,004*	0,07±0,004*	p<0,001	0,10±0,005	0,09±0,005	0,08±0,004*	p=0,003
<i>Fígado</i>	0,28 (0,22-0,35)	0,24 (0,19-0,29)	0,25 (0,19-0,27)	p=0,136	0,27 (0,24-0,30)	0,23 (0,21-0,29)	0,25 (0,19-0,26)*	p=0,043
<i>TAM</i>	0,15 (0,13-0,17)	0,12 (0,10-0,17)	0,11 (0,09-0,15)	p=0,079	0,15 (0,13-0,18)	0,15 (0,11-0,15)	0,12 (0,10-0,13)	p=0,061
P21	n=15	n=15	n=15		n=15	n=15	n=15	
<i>Baço</i>	0,44±0,02	0,36±0,01*	0,33±0,02*	p<0,001	0,43±0,01	0,31±0,03*	0,31±0,01*	p<0,001
<i>Timo</i>	0,27±0,01	0,25±0,01	0,22±0,01*#	p<0,001	0,27±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01*	p=0,016
<i>Fígado</i>	0,78 (0,74-0,84)	0,68 (0,62-0,76)*	0,68 (0,54-0,71)*	p<0,001	0,75 (0,68-0,78)	0,57 (0,56-0,64)*	0,60 (0,55-0,69)*	p<0,001
<i>TAM</i>	0,26 (0,23-0,29)	0,21 (0,17-0,24)*	0,24 (0,19-0,25)	p=0,007	0,25 (0,21-0,27)	0,19 (0,17-0,24)	0,22 (0,21-0,25)	p=0,110

Resultados de peso do fígado e TAM representados como média e intervalor interquartis (25º percentil – 75º percentil) e comparados com Kruskal-Wallis seguido de Dunn. Resultados de peso do baço e timo representados como média±erro padrão da média e comparados com ANOVA de uma via seguida de Tukey. *diferença em relação ao grupo SHAM, #diferença em relação ao grupo HI.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliados os efeitos da HI e do tratamento com HT em ratos neonatos machos e fêmeas, em relação à lesão encefálica, parâmetros do desenvolvimento e comportamentais e imunidade periférica.

A partir dos experimentos preliminares para a padronização do processo de HT, buscou-se o melhor controle de dois fatores: a velocidade de resfriamento e a velocidade de reaquecimento após a HT. Buscou-se realizar o resfriamento de forma rápida, com a utilização de bolsas térmicas de gel congelado, diminuindo a variação individual e garantindo a realização de HT por 5 h em todos os animais. É importante considerar que a utilização de HT na clínica deve ser iniciada rapidamente, uma vez que a janela terapêutica do procedimento é curta (início da HT em até 6 h após o evento hipóxico-isquêmico) (SABIR *et al.*, 2012). Porém, na realidade das unidades de atendimento sempre ocorre um atraso para o início do tratamento com HT, sendo praticamente impossível, na prática clínica, iniciar o tratamento de forma imediata. Tentando mimetizar esse atraso, no presente estudo foi utilizado um período de 90 min entre a hipóxia e o início da HT. Vale ressaltar que esse período também é importante, no caso dos ratos neonatos, para diminuir o período de afastamento da mãe e possibilitar que os filhotes se alimentem antes do procedimento de HT, que tem uma longa duração (5 h ininterruptas).

Na prática clínica, é recomendado um reaquecimento lento, em uma taxa aproximada de 0,5°C por hora (ROEHR *et al.*, 2011). Porém, existem poucas avaliações do efeito da velocidade de reaquecimento, havendo estudos que mostram efeito benéfico do reaquecimento lento. Entretanto, este efeito benéfico do reaquecimento lento pode estar sendo confundido com um prolongamento da duração da HT, que em muitos estudos foi utilizada por períodos de tempo mais curtos e menos eficazes (DAVIDSON *et al.*, 2015). Além disso, há muita discrepância nos estudos que utilizam reaquecimento rápido, podendo os efeitos serem prejudiciais ou não (DAVIES *et al.*, 2019); e, novamente, os efeitos observados podem ter sido influenciados pelo protocolo de HT utilizado e pela espécie estudada. Logo, devido aos possíveis efeitos do reaquecimento, foi padronizado para este estudo uma velocidade de reaquecimento em torno de 0,16°C por minuto.

A mortalidade de 5,36% verificada neste estudo foi inferior ao esperado (em torno de 20%). Isso pode ser devido ao tempo de hipóxia utilizado, que foi de 75 min,

enquanto muitos estudos utilizam tempo maiores de 90 min ou 120 min de hipóxia. É bem descrito que o tempo de hipóxia, bem como a temperatura corporal durante a mesma, influenciam diretamente na severidade da lesão (SABIR *et al.*, 2012; WOOD *et al.*, 2016). A utilização de hipóxia de 90 min nos experimentos preliminares desse estudo resultou em uma mortalidade de 30,56%. Em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa, realizados no mesmo local, foi observada uma mortalidade de cerca de 20% com a utilização de 90 min de hipóxia (FABRES *et al.*, 2018), e de 15,8% com a utilização de 60min de hipóxia (TASSINARI *et al.*, 2020). Nesses dois estudos, entretanto, também foram realizadas injeções de substâncias nos animais, causando um maior estresse e perda de peso nos animais, fator que pode ter contribuído para uma maior mortalidade. A experiência do grupo com o modelo também é um fator que pode ter contribuído para a redução da mortalidade dos animais.

De qualquer forma, o procedimento de HI foi capaz de produzir uma lesão encefálica consistente. Em P9, foi possível observar a presença de edema (observação qualitativa) no hemisfério ipsilateral à isquemia nos animais que passaram pela HI. Em P21, observa-se que não há mais um edema pronunciado, embora a perda de tecido seja evidente. O edema cerebral é definido como o aumento da quantidade de água no parênquima do tecido nervoso, tanto no líquido intersticial quanto no meio intracelular, e envolve diversos processos como o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, a alteração na atividade de bombas iônicas e a ativação de processos inflamatórios (JHA *et al.*, 2019). A ocorrência de edema é característica das fases iniciais da lesão hipóxico-isquêmica, havendo uma posterior diminuição do volume de tecido encefálico (BACK *et al.*, 2004).

Foi observada uma maior perda de peso no hemisfério ipsilateral em P21 (em torno de 60%) do que em P9 (em torno de 15%). Sabe-se que ocorre um aumento da lesão ao longo dos dias após a HI, sendo a neuroinflamação prolongada uma das causas desse aumento (DAVIDSON *et al.*, 2015). Como o edema interfere na pesagem do encéfalo, isso pode explicar o porquê da HI ter causado uma redução no peso do hemisfério cerebral ipsilateral à isquemia muito mais pronunciada em P21 (em relação ao hemisfério contralateral). A HT não foi capaz de prevenir essa alteração de peso, porém, observando-se o aspecto do encéfalo, a HT parece ter reduzido parcialmente a lesão. Mais análises são necessárias com o intuito de avaliar histologicamente o encéfalo e quantificar o volume total da lesão encefálica e o volume

de lesão em áreas específicas, como o hipocampo e o estriado, conhecidas por serem vulneráveis à HI (SUTHERLAND *et al.*, 2004; VANNUCCI *et al.*, 1999).

Em P9, a HT aparenta ter aumentado o edema cerebral, causando um aumento no peso total dos hemisférios cerebrais. Dados presentes na literatura indicam que a HT pode diminuir o edema cerebral em modelos animais de parada cardíaca (LI *et al.*, 2017; XIAO *et al.*, 2002), de HI (MAIER *et al.*, 1998) e em pacientes humanos com hemorragia intracerebral (KOLLMAR *et al.*, 2010; VOLBERS *et al.*, 2016). Porém, outros estudos mostram a ausência de um efeito benéfico da HT em pacientes com edema após traumatismo cranioencefálico (ANDREWS *et al.*, 2015). Uma das explicações para a diminuição do edema pela hipotermia é a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral causada pela hipotermia (GONZÁLEZ-IBARRA *et al.*, 2011; LO & STEINBERG, 1992). Entretanto, também já foi mostrado um aumento do fluxo sanguíneo cerebral com a utilização de hipotermia leve em um modelo de parada cardíaca (WANG *et al.*, 2019), explicado por uma ativação do sistema nervoso simpático, que leva a uma vasoconstrição periférica, direcionando o fluxo sanguíneo para determinados órgãos, como o encéfalo. A utilização de hipotermia local pode gerar respostas simpáticas, como o aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e do nível de catecolaminas circulantes (KANSTRUP *et al.*, 1999). Logo, a relação entre hipotermia e fluxo sanguíneo cerebral pode ser dependente do grau de redução da temperatura corporal e deve ser melhor investigada. Esse fenômeno pode ser uma explicação para as discrepâncias encontradas na literatura e para explicar o aumento do edema e do peso percentual encefálico nos animais tratados com HT verificados no presente estudo, uma vez que a temperatura-alvo da HT nesse estudo foi de 32°C, considerada como uma hipotermia leve (WOOD *et al.*, 2018). Também seria interessante avaliar as respostas do sistema nervoso autônomo (SNA) em modelos de HI tratados com HT, uma vez que o SNA pode influenciar os processos mencionados e muitos outros, como será discutido posteriormente.

Já foi demonstrada a existência de 2 picos de edema cerebral seguindo a HI neonatal: o primeiro ocorre logo após a indução da HI, sendo reduzido cerca de 2h depois; posteriormente ocorre a formação de um edema secundário com um pico em 24h após a HI (WAGNER *et al.*, 2002). A utilização da HT iniciada 90 min após a HI (e não imediatamente) pode estar interferindo nesse processo de redução do edema.

O aumento do edema também pode ter ocorrido por um efeito da hipotermia de reduzir a drenagem linfática. Essa resposta já foi observada em um estudo antigo

utilizando cães, no qual foi avaliado o fluxo linfático no ducto torácico, o qual recebe a drenagem linfática da porção inferior do corpo, abdômen, braços e porção esquerda do pescoço (CHEN & CHIEN, 1977). No sistema nervoso central (SNC), essa drenagem ocorre pelo sistema glinfático, cuja função é dependente da aquaporina-4 presente nos pés-astrocíticos, cuja distribuição contribui para a geração de um fluxo unidirecional do líquido intersticial, dos espaços paravasculares arteriais em direção aos espaços paravasculares venosos. Esse fluxo acaba levando consigo os restos metabólicos para o líquido cefalorraquidiano, e este é retirado do SNC nas granulações aracnoides (JESSEN *et al.*, 2015; PLOG & NEDERGAARD, 2018). A presença de vasos linfáticos nas meninges também está associada com a drenagem do líquido cefalorraquidiano (MESQUITA *et al.*, 2018). Já foi demonstrado que em modelos de hidrocefalia em camundongos neonatos ocorrem prejuízos nesse sistema, podendo essa ser uma das causas para a progressão da hidrocefalia (EMMERT *et al.*, 2019).

A diminuição da drenagem pelo sistema glinfático durante a hipotermia foi observada em um trabalho recente apresentado em congresso, mas ainda não publicado (RAJPUT *et al.*, 2020). Não existem estudos avaliando a drenagem glinfática em animais neonatos que passaram por hipotermia. Estudos mais aprofundados desses mecanismos em modelos de HI e durante a HT são necessários, não somente para avaliar um possível efeito na formação do edema cerebral, mas também pela ação importante desse sistema na drenagem de metabólitos, fragmentos celulares e mediadores inflamatórios do sistema nervoso, podendo assim contribuir para a neuroproteção. Sabe-se também que o sistema glinfático possui um aumento de atividade durante o sono (BENVENISTE *et al.*, 2019; MENDELSON & LARRICK, 2013). Assim, seria interessante uma avaliação dos efeitos da HT, verificando se existe uma diferença na eficácia da mesma se executada na fase ativa ou na fase de repouso dos animais experimentais. Uma hipótese seria que, quando executada na fase ativa, a redução do metabolismo provocada pela HT seria neuroprotetora; já quando aplicada na fase de repouso, a HT poderia levar a uma diminuição da drenagem glinfática, levando ao acúmulo de metabólitos no interstício cerebral e diminuindo a eficácia do tratamento.

Porém, como a medida de peso percentual encefálico foi avaliada em relação ao peso corporal, não é possível descartar a possibilidade da diminuição do peso corporal observada no grupo HT ter sido desproporcional à alteração do peso encefálico, aumentando a relação peso encefálico/peso corporal. Essa possível

influência também deve ser levada em consideração em relação aos resultados de peso percentual dos outros órgãos avaliados neste estudo, discutidos ao final.

Foi observado um efeito negativo da HI no desenvolvimento dos ratos evidenciado pela redução no ganho de peso e pelo atraso na abertura do olho direito. Outros trabalhos também mostram o efeito negativo da HI no ganho de peso, o que pode ser explicado pela dificuldade motora dos animais para obter o leite materno (TASSINARI *et al.*, 2020). A influência dessa dificuldade motora no ganho de peso corporal pode ser constatada em estudos que utilizaram substâncias com um potencial efeito sedativo, como a morfina (FESTEKJIAN *et al.*, 2011) e a progesterona (FABRES *et al.*, 2018; TSUJI *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi demonstrado um atraso na abertura do olho direito, ipsilateral à lesão. Já foi demonstrado anteriormente um atraso na abertura dos olhos após a HI (FAN *et al.*, 2005; LUBICS *et al.*, 2005), porém, os poucos estudos que analisaram o olho esquerdo e direito independentemente, mostraram, em concordância com o presente estudo, um atraso na abertura apenas do olho ipsilateral à lesão (HUANG, Z. *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2010). No presente estudo, também foi observado que, nos grupos HI e HT, mesmo nos animais que não tiveram atraso na abertura do olho ipsilateral, havia uma abertura parcial do mesmo e a aparição, em alguns casos, de uma mancha branca no centro do olho, indicando uma possível lesão. Esses prejuízos visuais podem ser um fator que influenciou nos resultados dos testes comportamentais, discutidos mais adiante.

Já foi demonstrado que a realização de HI em ratos neonatos leva a lesões no olho, nas vias visuais e no córtex visual ipsilaterais à lesão na vida adulta (CHAN *et al.*, 2015). Particularmente na retina ipsilateral à oclusão carotídea, também foi demonstrada uma ativação microglial, reatividade astrocitária e ativação do processo de apoptose (HUANG, H.-M. *et al.*, 2012). A ocorrência de atraso apenas na abertura do olho ipsilateral pode ser explicada por uma lesão encefálica, prejudicando o controle motor das pálpebras, somada a uma lesão de forma direta no olho e nas estruturas associadas causada pela oclusão da carótida direita, uma vez que a artéria oftálmica que irriga o olho e os músculos oculares é um ramo da artéria carótida interna (STEELE *et al.*, 2008). A abertura dos olhos depende também da separação das pálpebras, sendo para isso essencial o processo de queratinização das mesmas (MOHAMED *et al.*, 2003).

Foi observado um maior índice anogenital (IAG) nos machos, em comparação com as fêmeas. Esse resultado indica um desenvolvimento sexual normal em ambos os sexos (KAIMAL *et al.*, 2021), não tendo sido observados efeitos após a HI. Outros estudos também mostraram a ausência de efeito de anoxia na distância anogenital (DAG) em ratos neonatos machos (BOKSA & ZHANG, 2008). Porém, entre os machos, foi observado um maior índice anogenital nos animais tratados com HT, podendo indicar um efeito da mesma no desenvolvimento sexual dos animais.

A realização de HT não foi capaz de prevenir os prejuízos no desenvolvimento observados (diminuição no ganho de peso e atraso na abertura do olho direito), e parece, inclusive, ter causado prejuízos maiores, mesmo que não significativos. Um estudo recente observou que o tratamento apenas com hipotermia, sem indução prévia de nenhum tipo de lesão, é capaz de diminuir o ganho de peso em ratos neonatos (MATSUDA *et al.*, 2021). Esse mesmo estudo, que utilizou um modelo de anoxia, também não observou efeitos da HT sozinha ou após a anoxia na abertura dos olhos, porém, também não verificou um atraso na abertura dos olhos nos animais após a anoxia (MATSUDA *et al.*, 2021). Porém, além da utilização de um modelo diferente (indução de anoxia sem oclusão carotídea), o estudo foi realizado 30 h após o nascimento dos ratos, o que é equivalente a um recém-nascido humano prematuro. De qualquer forma, o trabalho de Matsuda *et al.* (2021), em concordância com o presente trabalho, mostrou que a hipotermia não apenas foi incapaz de prevenir prejuízos no desenvolvimento após a HI, como também apresentou alguns efeitos prejudiciais.

A realização de testes comportamentais é importante para uma avaliação da condição geral do animal e dos desfechos neurológicos (FEATHER-SCHUSSLER & FERGUSON, 2016). Diversos testes comportamentais são amplamente utilizados na literatura, tanto em animais neonatos quanto em animais adultos. Porém, ainda existem muitas discrepâncias em relação aos resultados desses testes. Poucos estudos fazem um acompanhamento do desempenho do animal nesses testes em várias idades (geralmente utilizam-se um ou dois momentos isolados). Além disso, muitos estudos foram realizados somente em animais do sexo masculino, não possibilitando uma análise do dimorfismo sexual nos desfechos avaliados. Além disso, mesmo entre os trabalhos que avaliam o dimorfismo sexual, muitas discrepâncias ainda existem (NETTO *et al.*, 2017).

De uma forma geral, não foram observados efeitos marcantes da HI ou da HT nas avaliações comportamentais do presente estudo. Ao invés disso, foram observados efeitos pontuais nas idades de P12 e P14 em um dos sexos. Uma possível explicação para esse efeito pode ser um aumento progressivo da lesão, devido ao processo inflamatório (DAVIDSON *et al.*, 2015), ao longo do crescimento do animal, de forma que em P8 e P10 poderia haver uma lesão menor do que em P12 e P14. No presente estudo, de fato, observou-se uma aparente lesão aumentada a longo prazo (em P21) em relação a P9, evidenciada pelas diferenças de peso entre os hemisférios cerebrais e peso percentual total do encéfalo nessas idades, apesar de, como já discutido, poder ter havido uma influência do edema nesses resultados em P9. Muitos dos estudos da literatura mostram uma latência maior na geotaxia negativa ou reflexo de endireitamento em idades iniciais em protocolos que utilizaram uma hipóxia com duração de 90 ou 120min (JATANA *et al.*, 2006; ROUMES *et al.*, 2021). Por outro lado, um estudo realizando uma hipóxia de 60min, demonstrou prejuízos na geotaxia negativa e no reflexo de endireitamento em P14, somente nos machos (WADDELL *et al.*, 2016). No presente estudo, também foi demonstrado um prejuízo na geotaxia negativa somente nos machos em uma idade semelhante.

Para fazer uma análise mais completa, ao longo de todo o período avaliado, foram feitos gráficos de linha. Analisando-se de forma qualitativa os gráficos de linha, verifica-se uma redução da latência entre P8 e P10, mas esta tendeu a aumentar novamente em P12 e P14 nos comportamentos de geotaxia negativa e aversão à borda em todos os grupos. Isso pode ser explicado por uma possível influência da abertura dos olhos, que ocorreu em P12 em alguns animais e em P14 na maioria dos animais restantes. Já foi mostrada uma influência da informação visual na resposta obtida no teste de geotaxia negativa em ratos em P17 (RUHELA *et al.*, 2019). Já no reflexo de endireitamento e no teste de discriminação olfatória, observou-se uma redução progressiva da latência conforme o animal crescia, uma resposta esperada à medida que o animal desenvolve sua capacidade motora (FOX, 1965).

Para a avaliação quantitativa desses gráficos de linha, foi realizado o cálculo da área sob a curva (AUC), que permite averiguar diferenças entre os grupos em relação ao desempenho nos testes comportamentais durante todo o período avaliado. Entretanto, nesta análise, não foram observados prejuízos comportamentais causados pela HI, com exceção do aumento da latência no comportamento de discriminação olfatória nos machos do grupo HI.

A observação, no comportamento de discriminação olfatória, de uma maior AUC nos machos do grupo HI indica que o procedimento prejudica de uma forma geral esse comportamento. Prejuízos nesse comportamento em neonatos após a HI já foram observados em outros estudos (SANCHES *et al.*, 2012, 2015). A maior sensibilidade desse teste em relação aos demais utilizados neste estudo pode ser explicada por um maior envolvimento de áreas corticais afetadas pelo modelo, uma vez que, além da resposta sensório-motora, esse comportamento depende de um aprendizado prévio e de uma tomada de decisão (ALBERTS, 2007; GREGORY & PFAFF, 1971; SULLIVAN *et al.*, 1990).

No teste de discriminação olfatória, observaram-se efeitos do posicionamento da maravalha em P12 e P14, sendo que em P12 os machos do grupo HT apresentaram maior latência quando a maravalha-moradia estava na direita. Isso pode indicar um possível prejuízo para a detecção de estímulos ipsilaterais à lesão nessas idades. Outro fator que pode ter aumentado a latência nesses animais é um prejuízo motor unilateral, de forma que o animal teria mais dificuldade para se locomover em direção à maravalha-moradia quando esta se encontrava à direita. Este prejuízo motor parece ser responsável pela maior parte do prejuízo, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na preferência pela maravalha, havendo uma preferência em todos os grupos para se locomover em direção à maravalha-moradia.

A partir das respostas dos animais no teste de discriminação olfatória, parece haver um maior prejuízo nos machos, mostrando alterações provocadas pelo posicionamento da maravalha-moradia em P12 e P14; e também um aumento da AUC. Um maior prejuízo motor pode explicar esse efeito nos machos, uma vez que já foi demonstrado uma maior latência de animais machos em outros testes que avaliam funções motoras (NETTO *et al.*, 2017). No presente estudo, o aumento da latência na geotaxia negativa em P12 nos machos também pode ser reflexo de um maior prejuízo motor.

A ausência do aumento da AUC referente ao teste de discriminação olfatória nos machos do grupo HT indica uma melhora após o tratamento. Porém, foram encontrados somente dois estudos, de mesmo autor (SANCHES *et al.*, 2012, 2015), que utilizaram esse comportamento para avaliar os efeitos da HI. O presente estudo é o primeiro, em nosso conhecimento, a avaliar o efeito da HT na discriminação olfatória em ratos neonatos após a HI, a qual mostrou um efeito benéfico nos machos.

Sabe-se que o tronco encefálico não é um dos locais mais impactados pela HI, pois seu suprimento sanguíneo é garantido pelas artérias vertebrais. Assim, os efeitos prejudiciais provocados no tronco encefálico seriam provocados apenas pela hipóxia. Isso pode explicar a integridade, em todos os animais avaliados no presente estudo, dos reflexos utilizados no mNSS (“pinna reflex”, reflexo córneo e reflexo de susto), pois estes são integrados no tronco encefálico (HANDLEY & SINGH, 1986; HENRIQUEZ & EVINGER, 2007; LEITNER *et al.*, 1980). O mesmo pode ser discutido em relação à integridade do reflexo de endireitamento, mesmo nos grupos HI e HT, uma vez que este reflexo é integrado no tronco encefálico a partir de informações vestibulares, assim como o teste de geotaxia negativa (ALTMAN & SUDARSHAN, 1975). A geotaxia negativa, entretanto, pode sofrer uma maior modulação por áreas corticais, pois envolve uma resposta motora mais complexa. O teste de aversão à borda depende principalmente de informações táteis das vibrissas e das patas anteriores (ALTMAN & SUDARSHAN, 1975), podendo também ser menos dependente do tronco encefálico que o reflexo de endireitamento. Porém, estudos sobre as vias neurais envolvidas na maioria desses comportamentos são escassos, se não inexistentes: existem deduções baseadas na idade de surgimento dos comportamentos e no respectivo repertório sensorial disponível para o neonato, observados em trabalhos antigos e perpetuados nas publicações posteriores. Logo, pouco se sabe sobre as modulações desses comportamentos por áreas superiores do SNC e possibilidades compensatórias em situações de lesão.

Existe uma discussão na literatura sobre a validade do teste de geotaxia negativa para avaliação de modelos animais. Motz & Alberts (2005) sugerem que o comportamento observado em neonatos não se deve a um reflexo desencadeado pela informação gravitacional, mas sim a um reflexo postural frente à instabilidade causada pela inclinação. Esses autores demonstraram a existência de um comportamento de geotaxia positiva em ratos neonatos, utilizando inclinações menores, as quais representam um ambiente mais comumente encontrado por essa espécie na natureza (ALBERTS *et al.*, 2004). Além disso, um estudo utilizando diferentes inclinações e diferentes posicionamentos para os animais na geotaxia negativa obteve resultados diferentes, sendo que nem sempre os animais se direcionavam para cima no plano inclinado (KREIDER & BLUMBERG, 1999). Outro estudo já mostrou que após a HI, os animais tiveram uma latência menor na geotaxia negativa (DIAZ *et al.*, 2017), podendo esta estar associada com uma maior instabilidade postural, menor

comportamento exploratório e maior ansiedade. No presente estudo, observou-se uma menor latência no teste de aversão à borda em fêmeas do grupo HI em P12, podendo representar um fenômeno semelhante ao observado na geotaxia negativa. Porém, a influência da abertura dos olhos, que ocorre próximo à essa idade, como já foi mencionado, não pode ser descartada.

Foi observado um uso simétrico das patas anteriores, representado por um uso em torno de 50% de cada pata anterior no teste do cilindro após a HI. Por se tratar de um comportamento exploratório, nesse teste são avaliadas respostas motoras voluntárias, controladas por áreas superiores do SNC como o córtex motor e o corpo estriado (SCHALLERT *et al.*, 2000). O teste de remoção de um adesivo, também utilizado para avaliação da simetria no uso das patas anteriores, mostra um importante envolvimento do estriado (SCHALLERT *et al.*, 1983). Um estudo utilizando camundongos adultos mostrou, a partir da análise do teste do cilindro, uma preferência no uso da pata ipsilateral à lesão apenas 3 dias após a HI, havendo uma melhora espontânea quando os animais foram avaliados 10 dias após a HI (OGAWA *et al.*, 2021). Como no presente estudo o teste do cilindro foi utilizado 13 dias após a HI, mecanismos compensatórios do sistema nervoso podem já ter ocorrido, não demonstrando assimetria no uso das patas anteriores. Isso também pode explicar a ausência de diferenças na avaliação pelo mNSS, utilizado na mesma idade.

Porém, em outro estudo, a utilização do mNSS em P24 demonstrou prejuízo pela HI, utilizando hipóxia de 120 min (ROUMES *et al.*, 2021) mas infelizmente esse trabalho não mostra a contribuição de cada teste que compõe o mNSS para o resultado final. No presente estudo, foi observado que o teste de equilíbrio (“beam walk”) foi o único a apresentar respostas variadas. A utilização desse teste de forma isolada, avaliando outros parâmetros, já demonstrou prejuízos em ratos utilizando um modelo de traumatismo cranioencefálico (RUSSELL *et al.*, 2011). Em modelos de HI, já foram mostrados prejuízos no equilíbrio através da utilização do “beam walk” e uma melhora destes após o tratamento com HT (DIAZ *et al.*, 2017). A utilização do “beam walk” de forma isolada, com a avaliação de outros parâmetros como latência, distância percorrida, ocorrência de quedas e número de vezes que cada pata do animal escorrega da prancha, pode ser interessante para trabalhos futuros.

Outro resultado que reforçou a ideia de que o modelo de HI produz efeitos gerais foi o peso absoluto dos órgãos. De uma forma geral, os órgãos tenderam a apresentar pesos menores nos grupos HI e HT, em P21, sendo estatisticamente

significativos para o baço e o fígado. Essa diminuição no peso dos órgãos parece estar acompanhando a diminuição de peso corporal observada nos animais desses grupos, mostrando um efeito geral da HI no crescimento ao invés de efeitos específicos nesses órgãos. Em vista disso, utilizou-se a medida do peso percentual dos órgãos em relação ao peso corporal, visto que ambos estão variando em conjunto. Porém, vale ressaltar que a diminuição do peso absoluto pode estar comprometendo o desenvolvimento e a função dos órgãos em questão, sendo necessárias análises funcionais dos mesmos para uma melhor avaliação dos efeitos da HI e do tratamento com HT.

Houve uma diminuição no peso percentual do baço, avaliado em P21, apenas nas fêmeas do grupo HI. A diminuição do peso do baço já foi observada após modelo de isquemia em roedores adultos, havendo inclusive uma variação de tamanho visível a olho nu (OFFNER *et al.*, 2006; VENDRAME *et al.*, 2006). Também já foi demonstrado que a indução de HI em P7 leva, a longo prazo, à diminuição do peso do baço e ao aumento do estresse oxidativo (ODORCYK *et al.*, 2018). Uma das explicações atribuídas a esse fenômeno é um estado de imunossupressão desencadeada por uma ativação do sistema nervoso simpático (PRASS *et al.*, 2003).

Porém, nas fêmeas também foi observado um aumento do número de leucócitos circulantes no grupo HI, o que se opõe à ideia de imunossupressão. Logo, a diminuição do peso do baço pode ter uma outra explicação, como a ocorrência do processo de contração do baço, liberando células imunes no sangue (KIM & CHO, 2021). Esse processo também é conhecido por ocorrer em resposta à apneia, aumento de altitude e durante o exercício físico, liberando hemácias no sangue em resposta à hipóxia (LODIN-SUNDSTRÖM & SCHAGATAY, 2010). A contração do baço já foi observada anteriormente, em pacientes que sofreram um evento hipóxico-isquêmico (ZHA *et al.*, 2018) e em animais experimentais após isquemia, nos quais também se verificou o aumento de linfócitos T na circulação (OFFNER *et al.*, 2006). Porém, como a contração se trata de uma resposta rápida do baço, esta também não parece ser a única explicação, uma vez que a alteração de peso foi observada em P21 (14 dias após a HI), mas não em P9. Já nos machos em P21, foi observada uma diminuição na quantidade de leucócitos no sangue no grupo HI. Esse efeito pode indicar uma imunossupressão nesses animais, já mencionado como sendo um fenômeno observado nas fases tardias pós-HI (OFFNER *et al.*, 2006).

Uma vez que uma diminuição do peso percentual do baço foi observada somente em animais do sexo feminino e que os resultados da contagem de leucócitos foram opostos em machos e fêmeas, sugere-se um efeito do sexo na ativação da imunidade periférica. Observações mostram, em comparação com as fêmeas, há um pior desfecho nos machos, que apresentam maior volume de lesão, bem como uma maior ativação inflamatória na fase inicial, com uma maior ativação microglial, maiores níveis de citocinas inflamatórias e maior infiltração de leucócitos no tecido nervoso (AL MAMUN *et al.*, 2018; MIRZA *et al.*, 2015; VILLAPOL *et al.*, 2019). Dessa forma, sugere-se que, nos machos o aumento do processo inflamatório periférico já ocorreu, e, embora ainda deva estar ativo o processo neuroinflamatório, estímulos do SNC já estão causando um efeito imunossupressor periférico, tal qual está sendo observado em P21. Já nas fêmeas, essa resposta inflamatória periférica iniciou tardiamente, de forma que ainda está presente em P21. Análises de marcadores inflamatórios no encéfalo, plasma e órgãos periféricos, bem como a análise de leucócitos circulantes em um momento mais próximo da lesão, seriam importantes para averiguar essa hipótese.

De qualquer forma, tanto em machos quanto em fêmeas, a HT foi capaz de prevenir as alterações no número de leucócitos, sendo que nos machos foi uma prevenção parcial. A HT também preveniu a diminuição de peso do baço nas fêmeas. Já foi observado um aumento pronunciado do perfil pró-inflamatório, representado pelo aumento das razões entre as citocinas pró e anti-inflamatórias no soro (IL-1 β /IL-10, IL-6/IL-10 e IL-8/IL-10), após o reaquecimento dos animais em modelo de HI e tratamento com HT em porcos neonatos (ROCHA-FERREIRA *et al.*, 2017). Outras análises são necessárias para verificar como essas alterações estão afetando o processo neuroinflamatório, bem como os níveis de citocinas na circulação e nos tecidos linfoides. Também seria interessante a avaliação individualizada dos diferentes tipos de leucócitos, ao invés dos leucócitos totais.

Outro importante órgão linfóide que pode contribuir para a alteração no número de leucócitos e participar da resposta inflamatória é o timo. No presente estudo, o peso percentual do timo não foi afetado pela HI ou pela HT. Já foi demonstrada anteriormente uma diminuição no peso do timo após a isquemia em animais adultos (OFFNER *et al.*, 2006), bem como a diminuição na quantidade de leucócitos no órgão (PRASS *et al.*, 2003). Porém, sabe-se que o timo inicia um processo de atrofia e diminuição da atividade a partir da puberdade, sendo esse um dos processos

responsáveis pela baixa imunidade em idosos (BOEHM & SWANN, 2013). Já foram observadas respostas à hipóxia diferentes em timos de ratos jovens e velhos, entre elas uma diminuição nos jovens da expressão do NF- κ B, um fator de transcrição envolvido em processos inflamatórios (TRUBIANI *et al.*, 2002). Porém, também já foi demonstrado que no timo existe a manutenção de hipóxia local, importante para o desenvolvimento e sobrevivência de timócitos (HALE *et al.*, 2002), podendo esse ser um fator confundidor ao se estudar o efeito da hipóxia no timo. Além disso, já foi observado que a hipotermia é capaz de diminuir o peso do timo (JONES, 1962; MOURA-CAMPOS & SAVINO, 1988), efeito observado no presente estudo em relação ao peso absoluto do órgão. Mais análises são necessárias para verificar a participação do timo nas alterações da imunidade periférica após a HI em neonatos e averiguar se esta foi afetada pelo tratamento com HT.

O peso percentual do fígado não demonstrou alterações causadas pela HI ou pela HT. Sabe-se que o fígado é um órgão afetado em recém-nascidos que sofreram um evento hipóxico-isquêmico (SHAH *et al.*, 2004). Porém, a medida de peso não é suficiente para a avaliação de lesões hepáticas, sendo uma limitação do presente estudo. Em porcos, após a indução de hipóxia sistêmica, não houve diferença de peso no fígado de animais normais e com lesão hepática (avaliada histologicamente) (KARLSSON *et al.*, 2009), mostrando que mesmo um fígado lesionado pode não apresentar diferença de peso em relação ao órgão íntegro. Nesse mesmo estudo (KARLSSON *et al.*, 2009), também não se observaram variações nas enzimas hepáticas séricas, marcadores clínicos comuns de dano hepático, inclusive após um evento hipóxico-isquêmico severo (KARLSSON *et al.*, 2006; SHAH *et al.*, 2004). Também já foi observado um efeito benéfico da HT sobre biomarcadores associados à lesão hepática em recém-nascidos após a HI (MUNIRAMAN *et al.*, 2017). Logo, mais estudos são necessários avaliando o efeito da HI e da HT no fígado, utilizando marcadores histológicos que sejam capazes de detectar inclusive lesões hepáticas leves. Uma vez que o fígado em neonatos parece ser importante para a imunidade (NAKAGAKI *et al.*, 2018), trabalhos avaliando sua influência na imunidade periférica em modelos de HI também seriam interessantes.

O estudo da imunidade periférica é essencial para um melhor entendimento dos processos desencadeados pelo evento hipóxico-isquêmico. Sabe-se que a infiltração de leucócitos, como neutrófilos e monócitos, contribui para o aumento da lesão encefálica já nas fases iniciais (ELALI & LEBLANC, 2016; MÜLLING *et al.*, 2021;

PALMER *et al.*, 2004). Os linfócitos, embora menos estudados, também são capazes de se infiltrar mais tardiamente, aumentando a lesão nessa fase (CHAMORRO *et al.*, 2012; JIN *et al.*, 2010). O aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica na HI é um fator que facilita a infiltração dessas células no tecido nervoso, influenciando diretamente as ações da microglia e dos astrócitos no processo neuroinflamatório (BURDA & SOFRONIEW, 2014). Muitas das alterações dessas células, na periferia, ocorrem pela ação dos órgãos linfoides, sendo o baço o mais estudado, já tendo sido demonstrada sua capacidade de contribuir para a lesão encefálica (AJMO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013). Além da contribuição desses processos periféricos na lesão encefálica, é importante considerar que a hipóxia afeta o organismo de forma sistêmica, causando efeitos negativos em múltiplos órgãos (SHAH *et al.*, 2004).

Um outro tecido que pode ser afetado pela HI é o tecido adiposo marrom (TAM). Devido a sua função na produção de calor sem tremor e sendo o frio um dos seus principais estimuladores (RICQUIER, 2013), pode também ser afetado pelo tratamento com HT e até mesmo influenciar a eficácia do tratamento. No presente estudo, o TAM apresentou um peso maior no grupo HT, nos machos, em P21. Isso pode indicar que a realização de hipotermia foi um estímulo para a proliferação celular e captação de nutrientes pelo tecido adiposo marrom, levando ao seu crescimento a longo prazo. Uma vez que este tecido é estimulado pelo sistema nervoso simpático, via hipotálamo, em resposta ao frio (BRITO *et al.*, 2008; CANNON & NEDERGAARD, 2004), isso também está de acordo com a ideia de que a hipotermia leve pode aumentar o tônus simpático (WANG *et al.*, 2019). Um aumento na expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1), responsável pela atividade termogênica do TAM, já foi observado após exposição de ratos neonatos ao frio (GIRALT *et al.*, 1990). Efeitos da hipóxia também foram observados no TAM: a expressão do fator induzível pela hipóxia-1 alfa (HIF-1 α) no TAM, em resposta a uma condição hipóxica, causa uma inibição da termogênese (JUN *et al.*, 2017). Como isso resulta em uma diminuição do gasto energético e da captação de glicose pelo TAM, este efeito foi mais estudado de forma associada à obesidade (TRAYHURN & ALOMAR, 2015), havendo poucos estudos avaliando os efeitos da HI sobre o TAM.

5. CONCLUSÕES

Os principais resultados obtidos no presente estudo, para cada análise realizada, são mostrados resumidamente na Tabela 6.

Tabela 6. Resumo dos principais resultados do estudo

Parâmetro	Idade	Machos		Fêmeas	
		HI	HT	HI	HT
Diferença de peso dos hemisférios cerebrais	P9	↑	↑	=	↑
	P21	↑	↑	↑	↑
Peso percentual total do encéfalo	P9	=	↑	=	↑
	P21	↓	↓	=	↓
Peso corporal (AUC)	P7-P21	↓	↓	↓	↓
Dia de abertura do olho direito	P7-P21	atraso	atraso	atraso	atraso
Latência no teste de geotaxia negativa	P12	↑	=	=	=
Latência no teste de aversão à borda	P12	=	=	=	↓
Latência no teste de discriminação olfatória (AUC)	P8-P12	↑	=	=	=
Contagem de leucócitos	P21	↓↓	↓	↑	=
Peso percentual do baço	P21	=	=	↓	=

Estão representadas apenas as principais diferenças estatisticamente significativas, em relação ao grupo SHAM, observadas no estudo. = igualdade em relação ao grupo SHAM; ↑ aumento em relação ao grupo SHAM; ↓ diminuição em relação ao grupo SHAM; ↓↓ diminuição em relação aos grupos SHAM e HT; AUC: área sob a curva.

O modelo de HI utilizado no presente estudo causou uma lesão encefálica evidente e uma redução do peso encefálico, mas a HT, apesar de ter causado uma aparente diminuição da lesão, não foi capaz de prevenir a perda de peso encefálica. Além disso, a HT parece ter aumentado a formação de edema cerebral em P9. Prejuízos comportamentais foram observados em momentos mais tardios (P12 e P14), e estes foram, em sua maioria, revertidos pela HT. A HT apresentou efeitos positivos no controle da resposta imune periférica, porém, foi incapaz de diminuir os prejuízos no desenvolvimento dos animais, inclusive tendendo a apresentar efeitos

negativos em alguns casos. Esses resultados indicam que é necessária cautela ao utilizar a HT, uma vez que esta pode ter efeitos prejudiciais, de modo que mais estudos ainda são necessários para uma melhor padronização dos parâmetros a serem utilizados durante a aplicação da HT. Certamente, uma análise mais prolongada, ou seja, o acompanhamento dos animais até a idade adulta, será de grande valia para essa padronização e permitirá, também, uma avaliação de parâmetros cognitivos.

Além disso, a observação de respostas diferentes entre machos e fêmeas quanto aos prejuízos comportamentais e resposta imune periférica reforça a necessidade de estudos avaliando o dimorfismo sexual para um melhor direcionamento de tratamentos clínicos específicos para machos e fêmeas.

6. PERSPECTIVAS

Algumas análises planejadas originalmente para o presente estudo não puderam ser realizadas devido às limitações impostas pela pandemia de COVID-19. Entretanto, ainda existem amostras e dados que podem ser processados e analisados futuramente para complementar os resultados apresentados nesta dissertação.

Por exemplo, todos os órgãos pesados foram coletados e congelados, além de ter sido coletado o plasma sanguíneo, separado a partir do sangue troncular. Nestas amostras será possível a dosagem de citocinas inflamatórias (no sistema nervoso, no plasma e nos órgãos periféricos) como o TNF- α e a IL-1 β , por ELISA.

Além dos esfregaços sanguíneos realizados em P21, também foram realizados esfregaços sanguíneo em P9 (cujas contagens não puderam ser realizadas devido às restrições de acesso ao laboratório). Nessas lâminas, será possível realizar a contagem de leucócitos em um momento mais próximo daquele em que a HI foi induzida.

Alguns animais foram perfundidos, dos quais os tecidos foram coletados para análises histológicas, nas quais será possível avaliar o volume de lesão encefálica total e de áreas específicas, como o hipocampo. Além disso, será possível a avaliação por imuno-histoquímica da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um marcador astrocitário; e da molécula adaptadora ligadora de cálcio ionizado-1 (Iba-1), um marcador microglial. Além disso, será possível a verificação e quantificação de células imunes no encéfalo e tecidos linfoides, utilizando marcadores específicos.

Estas análises adicionais certamente contribuirão para uma avaliação mais refinada das respostas produzidas pelo tratamento com HT em animais neonatos submetidos ao modelo de HI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. Y. *et al.* Hypothermia broadens the therapeutic time window of mesenchymal stem cell transplantation for severe neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- AJMO, C. T. *et al.* The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 10, p. 2227–2234, 2008.
- AL MAMUN, A. *et al.* Inflammatory Responses are Sex Specific in Chronic Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 9, p. 1328–1339, 2018.
- ALBERTS, J. R. Huddling by rat pups: Ontogeny of individual and group behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 49, n. 1, p. 22–32, 2007.
- ALBERTS, J. R.; MOTZ, B. A.; SCHANK, J. C. Positive Geotaxis in Infant Rats (*Rattus norvegicus*): A Natural Behavior and a Historical Correction. **Journal of Comparative Psychology**, v. 118, n. 2, p. 123–132, 2004.
- ALMEIDA, M. F. B. de *et al.* Early neonatal deaths associated with perinatal asphyxia in infants ≥ 2500 g in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 576–584, 2017.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Animal Behaviour**, v. 23, p. 896–920, 1975.
- ALY, H. *et al.* IL-1 β , IL-6 and TNF- α and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. **Brain & Development**, v. 28, n. 3, p. 178–182, 2006.
- ANDREWS, P. J. D. *et al.* Hypothermia for Intracranial Hypertension after Traumatic Brain Injury. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 25, p. 2403–2412, 2015.
- AO, D. *et al.* Socio-demographic factors impact disabilities caused by perinatal asphyxia among Chinese children. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3, p. 1–12, 2021.
- ARTENI, N. S. *et al.* Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 92–98, 2010.
- ASLAM, H. M. uhamma. *et al.* “Risk factors of birth asphyxia”. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 40, n. 1, p. 94, 2014.
- AZZOPARDI, D. V. *et al.* Moderate Hypothermia to Treat Perinatal Asphyxial Encephalopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 14, p. 1349–1358, 2009.
- BACK, T.; HEMMEN, T.; SCHÜLER, O. G. Lesion evolution in cerebral ischemia. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 4, p. 388–397, 2004.
- BELETEW, B. *et al.* Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic- ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. p. 1–20, 2021.
- BENVENISTE, H. *et al.* Glymphatic System Function in Relation to Anesthesia and Sleep States. **Anesthesia & Analgesia**, v. 128, n. 4, p. 747–758, 2019.
- BOEHM, T.; SWANN, J. B. Thymus involution and regeneration: two sides of the same coin? **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 831–838, 2013.
- BOKSA, P.; ZHANG, Y. Global Birth Hypoxia Increases the Neonatal Testosterone Surge in the Rat. **Neuroendocrinology**, v. 88, n. 4, p. 266–275, 2008.
- BONESTROO, H. J. C. *et al.* Cerebral and Hepatic Inflammatory Response after Neonatal Hypoxia-Ischemia in Newborn Rats. **Developmental Neuroscience**, v. 35, n. 2–3, p. 197–211, 2013.
- BORNAVARD, M. *et al.* Morphine consumption during pregnancy exacerbates neonatal hypoxia- ischemia injury in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 2, p. 96–105, 2020.

- BRECKWOLDT, M. O. *et al.* Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18584–18589, 2008.
- BRITO, N. A.; BRITO, M. N.; BARTNESS, T. J. Differential sympathetic drive to adipose tissues after food deprivation, cold exposure or glucoprivation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 5, p. R1445–R1452, 2008.
- BROCHU, M. E. *et al.* Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 1–14, 2011.
- BRUCE, M. *et al.* Acute peripheral immune activation alters cytokine expression and glial activation in the early postnatal rat brain. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2019.
- BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, n. 2, p. 229–248, 2014.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 277–359, 2004.
- CARPENTIER, A. C. *et al.* Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, p. 1–21, 2018.
- CHAKKARAPANI, E. *et al.* Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 3, p. 330–341, 2010.
- CHAMORRO, Á. *et al.* The immunology of acute stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 7, p. 401–410, 2012.
- CHAN, K. C. *et al.* Long-Term Effects of Neonatal Hypoxia-Ischemia on Structural and Physiological Integrity of the Eye and Visual Pathway by Multimodal MRI. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 56, n. 1, p. 1–9, 2015.
- CHEN, J. *et al.* Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005–1011, 2001.
- CHEN, R. Y. Z.; CHIEN, S. Plasma volume, red cell volume, and thoracic duct lymph flow in hypothermia. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 2, n. 5, 1977.
- CHUNG, J. *et al.* Counting White Blood Cells from a Blood Smear Using Fourier Ptychographic Microscopy. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133489, 2015.
- CRISPE, I. N. The liver as a lymphoid organ. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 147–163, 2009.
- DAVIDSON, J. O. *et al.* Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy – Where to from Here? **Frontiers in Neurology**, v. 6, n. SEP, 2015.
- DAVIES, A. *et al.* Can we further optimize therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy? **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 10, p. 1678–1683, 2019.
- DIAZ, J. *et al.* Therapeutic Hypothermia Provides Variable Protection against Behavioral Deficits after Neonatal Hypoxia-Ischemia: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. **Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 1–4, p. 257–272, 2017.
- DINA, P.; MURASKAS, J. K. Hematologic Changes in Newborns with Neonatal Encephalopathy. **NeoReviews**, v. 19, n. 1, p. e29–e33, 2018.
- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. **Frontiers in Neurology**, v. NOV, n. November, p. 1–

- 5, 2012.
- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 4, p. 397, 2015.
- DU, L. *et al.* Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38563–38570, 2004.
- 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.* Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 485–497, 2019.
- DURBIN, C. *et al.* Estimating leukocyte, platelet, and erythrocyte counts in rats by blood smear examination. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 157–162, 2009.
- ELALI, A.; LEBLANC, N. J. The role of monocytes in ischemic stroke pathobiology: New avenues to explore. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. FEB, p. 1–7, 2016.
- EMMERT, A. S. *et al.* Impaired neural differentiation and glymphatic CSF flow in the Ccdc39 rat model of neonatal hydrocephalus: genetic interaction with L1cam. **Disease Models & Mechanisms**, v. 12, n. 11, p. dmm040972, 2019.
- ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.
- ESPINOSA-GARCIA, C. *et al.* Stress primes microglial polarization after global ischemia: Therapeutic potential of progesterone. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 177–192, 2017.
- EZQUER, M. E. *et al.* Advancement of reproductive senescence and changes in the early expression of estrogen, progesterone and μ -opioid receptors induced by neonatal hypoxia in the female rat. **Brain Research**, v. 1214, p. 73–83, 2008.
- 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.
- FAN, L. *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.
- FATHALI, N. *et al.* Splenic immune cells in experimental neonatal hypoxia-ischemia. **Translational Stroke Research**, v. 4, n. 2, p. 208–219, 2013.
- FAVERO, A. M. *et al.* Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 5, p. 607–616, 2006.
- FEATHER-SCHUSSLER, D. N.; FERGUSON, T. S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. n. November, p. 1–12, 2016.
- FERRIERO, D. M. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. **Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 198–202, 2001.
- FESTEKJIAN, A. *et al.* The Role of Morphine in a Rat Model of Hypoxic-ischemic Injury. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 2, p. 77–82, 2011.
- FILOSA, J. A.; MORRISON, H. W. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 4, 2013.
- FLEISS, B. *et al.* Microglia-mediated neurodegeneration in perinatal brain injuries. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2021.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234-IN5, 1965.

- GALLAVAN, R. H. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.
- GIRALT, M. *et al.* Ontogeny and perinatal modulation of gene expression in rat brown adipose tissue. Unaltered iodothyronine 5'-deiodinase activity is necessary for the response to environmental temperature at birth. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 297–302, 1990.
- GLUCKMAN, P. D. *et al.* Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 663–670, 2005.
- GONZÁLEZ-IBARRA, F. P. *et al.* Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. v. 2, n. February, p. 1–8, 2011.
- GOPAGONDANAHALLI, K. R. *et al.* Preterm Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, n. OCT, p. 1–10, 2016.
- GREGORY, E. H.; PFAFF, D. W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. **Physiology & Behavior**, v. 6, n. 5, p. 573–576, 1971.
- GUILLET, R. *et al.* Seven-to eight-year follow-up of the CoolCap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. **Pediatric Research**, v. 71, n. 2, p. 205–209, 2012.
- GÜLKE, E.; GELDERBLUM, M.; MAGNUS, T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 11, p. 175628641877425, 2018.
- HAGBERG, H. *et al.* PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 5, p. 1068–1075, 2004.
- HALE, L. P. *et al.* Hypoxia in the thymus: Role of oxygen tension in thymocyte survival. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 4 51-4, p. 1467–1477, 2002.
- HANDLEY, S. L.; SINGH, L. Neurotransmitters and shaking behaviour — more than a 'gut-bath' for the brain? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 7, n. C, p. 324–328, 1986.
- HEDTJÄRN, M. *et al.* Interleukin-18 Involvement in Hypoxic–Ischemic Brain Injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 14, p. 5910–5919, 2002.
- HENRIQUEZ, V. M.; EVINGER, C. The three-neuron corneal reflex circuit and modulation of second-order corneal responsive neurons. **Experimental Brain Research**, v. 179, n. 4, p. 691–702, 2007.
- HERRERA, T. I. *et al.* Outcomes of preterm infants treated with hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 125, n. August, p. 1–7, 2018.
- HEYSER, C. J. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2003.
- HOBBS, C. *et al.* Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1307–1313, 2008.
- HU, H. H. *et al.* MRI detection of brown adipose tissue with low fat content in newborns with hypothermia. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 32, n. 2, p. 107–117, 2014.
- HUANG, H.-M. *et al.* Hypoxic–ischemic retinal injury in rat pups. **Pediatric Research**, v. 72, n. 3, p. 224–231, 2012.
- 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.
- HUANG, Z. *et al.* Hypoxia-Ischemia Upregulates TRAIL and TRAIL Receptors in the

- Immature Rat Brain. **Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 519–530, 2011.
- ILAH, B. *et al.* Prevalence and Risk Factors for Perinatal Asphyxia as Seen at a Specialist Hospital in Gusau, Nigeria. **Sub-Saharan African Journal of Medicine**, v. 2, n. 2, p. 64, 2015.
- JACOBS, S. E. *et al.* Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 474–531, 2013.
- JATANA, M. *et al.* Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. **Pediatric Research**, v. 59, n. 5, p. 684–689, 2006.
- JESSEN, N. A. *et al.* The Glymphatic System: A Beginner's Guide. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 12, p. 2583–2599, 2015.
- JHA, R. M.; KOCHANNEK, P. M.; SIMARD, J. M. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 145, n. August 2018, p. 230–246, 2019.
- JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 779–789, 2010.
- JOHNSTON, M. V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, n. 4, p. 229–234, 2001.
- JONES, J. H. Tissue change following prolonged hypothermia in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 257–263, 1962.
- JUN, J. C. *et al.* Adipose HIF-1 α causes obesity by suppressing brown adipose tissue thermogenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 3, p. 287–297, 2017.
- KAIMAL, A. *et al.* Prenatal exposure to bisphenols affects pregnancy outcomes and offspring development in rats. **Chemosphere**, v. 276, p. 130118, 2021.
- KANSTRUP, I. *et al.* Blood pressure and plasma catecholamines in acute and prolonged hypoxia: effects of local hypothermia. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 2053–2058, 1999.
- KARLSSON, M. *et al.* Dynamics of hepatic enzyme activity following birth asphyxia. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 11, p. 1405–1411, 2006.
- KARLSSON, M. *et al.* Liver enzymes cannot be used to predict liver damage after global hypoxia-ischemia in a neonatal pig model. **Neonatology**, v. 96, n. 4, p. 211–218, 2009.
- KARNATOVSKAIA, L. V.; WARTENBERG, K. E.; FREEMAN, W. D. Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection: History, Mechanisms, Risks, and Clinical Applications. **The Neurohospitalist**, v. 4, n. 3, p. 153–163, 2014.
- KAWAKAMI, M. D. *et al.* Neonatal mortality associated with perinatal asphyxia: a population-based study in a middle-income country. v. 5, p. 1–10, 2021.
- KIM, E.; CHO, S. CNS and peripheral immunity in cerebral ischemia: partition and interaction. **Experimental Neurology**, v. 335, n. September 2020, p. 113508, 2021.
- KOLLMAR, R. *et al.* Hypothermia reduces perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 41, n. 8, p. 1684–1689, 2010.
- KREIDER, J. C.; BLUMBERG, M. S. Geotaxis in 2-week-old Norway rats (*Rattus norvegicus*): A reevaluation. **Developmental Psychobiology**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1999.
- KUMAR, A. J. *et al.* Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 73, n. November 2018, p. 50–58, 2019.
- 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.

- LEE, A. C. C. *et al.* Risk Factors for Neonatal Mortality Due to Birth Asphyxia in Southern Nepal: A Prospective, Community-Based Cohort Study. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. e1381–e1390, 2008.
- LEITNER, D. S.; POWERS, A. S.; HOFFMAN, H. S. The neural substrate of the startle response. **Physiology and Behavior**, v. 25, n. 2, p. 291–297, 1980.
- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 36, n. 1, p. 1–17, 1960.
- LI, J. *et al.* Therapeutic hypothermia attenuates brain edema in a pig model of cardiac arrest: Possible role of the angiotensin-1(2) system. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 35, n. 7, p. 993–999, 2017.
- LIU, Z. *et al.* Splenic Responses in Ischemic Stroke: New Insights into Stroke Pathology. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 21, n. 4, p. 320–326, 2015.
- LIU; YENARI, M. A. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 816–825, 2007.
- LO, E. H.; STEINBERG, G. K. Effects of hypothermia on evoked potentials, magnetic resonance imaging, and blood flow in focal ischemia in rabbits. **Stroke**, v. 23, n. 6, p. 889–893, 1992.
- LODIN-SUNDSTRÖM, A.; SCHAGATAY, E. Spleen Contraction During 20 min Normobaric Hypoxia and 2 min Apnea in Humans. **Aviation, Space, and Environmental Medicine**, v. 81, n. 6, p. 545–549, 2010.
- LUBICS, A. *et al.* Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research**, v. 157, p. 157–165, 2005.
- LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. SUPPL. 1, p. 232–240, 2006.
- MAIER, C. M. *et al.* Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: Effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. **Stroke**, v. 29, n. 10, p. 2171–2180, 1998.
- MATSUDA, V. D. V. *et al.* Impact of neonatal anoxia and hypothermic treatment on development and memory of rats. **Experimental Neurology**, p. 113691, 2021.
- MENDELSON, A. R.; LARRICK, J. W. Sleep Facilitates Clearance of Metabolites from the Brain: Glymphatic Function in Aging and Neurodegenerative Diseases. **Rejuvenation Research**, v. 16, n. 6, p. 518–523, 2013.
- MESQUITA, S. Da; FU, Z.; KIPNIS, J. Perspective The Meningeal Lymphatic System : A New Player in Neurophysiology. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 375–388, 2018.
- MEYBOHM, P. *et al.* Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. **Critical Care**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2010.
- MIRZA, M. A. *et al.* Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 32, 2015.
- MOHAMED, Y. H.; GONG, H.; AMEMIYA, T. Role of apoptosis in eyelid development. **Experimental Eye Research**, v. 76, n. 1, p. 115–123, 2003.
- MONDAL, T. *et al.* Epidemiology of newborn transport in India - The reality check. **Medical Journal of Dr. D.Y. Patil Vidyapeeth**, v. 14, n. 2, p. 196, 2021.
- MOROMOKE, O.; MATTHEW, F.; SHOKUNBI, T. Changes in Neuronal Density of the Sensorimotor Cortex and Neurodevelopmental Behaviour in Neonatal Mice with Kaolin-Induced Hydrocephalus. v. 7, 2020.
- MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents.

- Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n. 4, p. 529–533, 2005.
- MOURA-CAMPOS, L. C.; SAVINO, W. Morphometrical Analysis of the Thymus from Mice Submitted to Low Temperature. **Cells Tissues Organs**, v. 132, n. 1, p. 9–11, 1988.
- MÜLLING, K. *et al.* Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia–ischemia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 92, p. 234–244, 2021.
- MUNIRAMAN, H. *et al.* Biomarkers of hepatic injury and function in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy and with therapeutic hypothermia. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 10, p. 1295–1303, 2017.
- MUNTEANU, A. I. *et al.* Basic biochemical and hematological parameters in perinatal asphyxia and their correlation with hypoxic ischemic encephalopathy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 259, p. 1–6, 2021.
- NAKAGAKI, B. N. *et al.* Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 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, 2017.
- NIJBOER, C. H. A. *et al.* Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 282–292, 2007.
- ODORCYK, F. K. *et al.* Experimental neonatal hypoxia ischemia causes long lasting changes of oxidative stress parameters in the hippocampus and the spleen. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 46, n. 4, p. 433–439, 2018.
- OFFNER, H. *et al.* Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6523–6531, 2006.
- OGAWA, Y. *et al.* Brain damage caused by neonatal hypoxia-ischemia and the effects of hypothermia in severe combined immunodeficient (SCID) mice. **Experimental Neurology**, v. 337, n. July 2020, p. 113577, 2021.
- PALMER, C.; ROBERTS, R. L.; YOUNG, P. I. Timing of neutrophil depletion influences long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. **Pediatric Research**, v. 55, n. 4, p. 549–556, 2004.
- PANICKAR, K. S.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 287–298, 2005.
- PARK, Y. *et al.* Therapeutic hypothermia reduces inflammation and oxidative stress in the liver after asphyxial cardiac arrest in rats. **Acute and Critical Care**, v. 35, n. 4, p. 286–295, 2020.
- PATEL, A. R. *et al.* Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 73–90, 2013.
- PEREIRA, L. O. *et al.* Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Research**, v. 1218, p. 257–266, 2008.
- PLOG, B. A.; NEDERGAARD, M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, n. 1, p. 379–394, 2018.
- PRASS, K. *et al.* Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1–like Immunostimulation. **Journal of Experimental Medicine**, v.

- 198, n. 5, p. 725–736, 2003.
- QUEVEDO, S. *et al.* Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 436, n. 5, p. 689–695, 1998.
- QUIRKE, F. A. *et al.* COHESION: core outcomes in neonatal encephalopathy (protocol). **Trials**, v. 22, n. 125, p. 1–11, 2021.
- RAINALDI, M. A.; PERLMAN, J. M. Pathophysiology of Birth Asphyxia. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 3, p. 409–422, 2016.
- RAJPUT, P.; LAMB, J.; LYDEN, P. D. Effects of Therapeutic Hypothermia on Lymphatic Clearance. **Circulation**, v. 142, n. Suppl_4, 2020.
- RAO, R. *et al.* Safety and Short-Term Outcomes of Therapeutic Hypothermia in Preterm Neonates 34-35 Weeks Gestational Age with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **Journal of Pediatrics**, v. 183, p. 37–42, 2017.
- 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.
- RICQUIER, D. Brown Adipose Tissue: Function and Development. *In: PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF ADIPOSE TISSUE*. Paris: Springer Paris, 2013. v. 9782817803, p. 51–66. *E-book*.
- RIDDER, D. A.; SCHWANINGER, M. NF- κ B signaling in cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 995–1006, 2009.
- ROBINSON, S. *et al.* Extended Combined Neonatal Treatment With Erythropoietin Plus Melatonin Prevents Posthemorrhagic Hydrocephalus of Prematurity in Rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. September, p. 1–20, 2018.
- ROCHA-FERREIRA, E. *et al.* Systemic pro-inflammatory cytokine status following therapeutic hypothermia in a piglet hypoxia-ischemia model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.
- 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, 2018.
- ROEHR, C. C. *et al.* The 2010 Guidelines on Neonatal Resuscitation (AHA, ERC, ILCOR): Similarities and Differences – What Progress Has Been Made since 2005? **Klinische Pädiatrie**, v. 223, n. 05, p. 299–307, 2011.
- ROUMES, H. *et al.* Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 342–358, 2021.
- RUHELA, R. K. *et al.* Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. **Annals of Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 25–31, 2019.
- RUSSELL, K. L. *et al.* Sensorimotor behavioral tests for use in a juvenile rat model of traumatic brain injury: Assessment of sex differences. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 199, n. 2, p. 214–222, 2011.
- SABIR, H. *et al.* Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. **Stroke**, v. 43, n. 12, p. 3364–3370, 2012.
- SANCHES, E. F. *et al.* Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, v. 1438, p. 85–92, 2012.
- SANCHES, E. F. *et al.* Pregnancy swimming causes short- and long-term neuroprotection against hypoxia-ischemia in very immature rats. **Pediatric Research**, v. 82, n. 3, p. 544–553, 2017.
- SANCHES, E. F. *et al.* Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats.

- Neuroscience**, v. 290, p. 581–593, 2015.
- SAW, C. L. *et al.* Current Practice of Therapeutic Hypothermia for Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy. v. 34, n. 7, p. 402–409, 2019.
- SCHAAR, K. L.; BRENNEMAN, M. M.; SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. p. 1–11, 2010.
- SCHALLERT, T. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777–787, 2000.
- SCHALLERT, T. *et al.* Posture-independent sensorimotor analysis of inter-hemispheric receptor asymmetries in neostriatum. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 18, n. 5, p. 753–759, 1983.
- SENDEKU, F. W.; AZEZE, G. G.; FENTA, S. L. Perinatal asphyxia and its associated factors in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. **BMC Pediatrics**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020.
- SEPEKU, A.; KOHI, T. W. Treatment outcomes of neonatal asphyxia at a national hospital in dar es salaam, Tanzania. **Africa Journal of Nursing and Midwifery**, v. 13, n. 2, p. 43–56, 2011.
- SHAH, P. *et al.* Multiorgan dysfunction in infants with post-asphyxial hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 89, n. 2, p. 152–155, 2004.
- SHANKARAN, S. *et al.* Childhood Outcomes after Hypothermia for Neonatal Encephalopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 22, p. 2085–2092, 2012.
- SHANKARAN, S. *et al.* Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic–ischemic encephalopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 15, p. 1574–1584, 2005.
- SIEGEL, C.; TURTZO, C.; MCCULLOUGH, L. D. Sex differences in cerebral ischemia: Possible molecular mechanisms. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 13, p. 2765–2774, 2010.
- SIMBRUNER, G. *et al.* Systemic Hypothermia After Neonatal Encephalopathy: Outcomes of neo.nEURO.network RCT. **Pediatrics**, v. 126, n. 4, p. e771–e778, 2010.
- SMITH, A. *et al.* Sex Differences in Behavioral Outcomes Following Temperature Modulation During Induced Neonatal Hypoxic Ischemic Injury in Rats. **Brain Sciences**, v. 5, n. 2, p. 220–240, 2015.
- SONG, L.; HUANG, Z.; CHEN, C. Significance of hypoxia ischemia on cerebral cortex injury and neurofunctional development in immature rats brain. **Journal of Applied Clinical Pediatrics**, 2010.
- SPENCER, A. P. C. *et al.* Disrupted brain connectivity in children treated with therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. **NeuroImage: Clinical**, v. 30, p. 102582, 2021.
- STEELE, E. C.; GUO, Q.; NAMURA, S. Filamentous Middle Cerebral Artery Occlusion Causes Ischemic Damage to the Retina in Mice. **Stroke**, v. 39, n. 7, p. 2099–2104, 2008.
- SULLIVAN, R. M. *et al.* Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. **Developmental Brain Research**, v. 53, n. 2, p. 243–247, 1990.
- SUTHERLAND, B. A. *et al.* Neuroprotective effects of (–)-epigallocatechin gallate following hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 2, p. 258–260, 2004.

- SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. Ambivalent Aspects of Interleukin-6 in Cerebral Ischemia: Inflammatory versus Neurotrophic Aspects. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 464–479, 2009.
- 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.
- TRAYHURN, P.; ALOMAR, S. Y. Oxygen Deprivation and the Cellular Response to Hypoxia in Adipocytes - Perspectives on White and Brown Adipose Tissues in Obesity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2015.
- TRUBIANI, O. *et al.* Thymic sensitivity to hypoxic condition in young and old rats. Age-dependent expression of NF- κ B. **Experimental Gerontology**, v. 37, n. 8–9, p. 1077–1088, 2002.
- TSUJI, M. *et al.* Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 214–220, 2012.
- VAN DER KOOIJ, M. A. *et al.* NF- κ B inhibition after neonatal cerebral hypoxia–ischemia improves long-term motor and cognitive outcome in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 38, n. 2, p. 266–272, 2010.
- VANNUCCI, R. C. *et al.* Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 2, p. 158–163, 1999.
- VENDRAME, M. *et al.* Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 1, p. 191–200, 2006.
- VILLAPOL, S. *et al.* Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3809, 2019.
- VOLBERS, B. *et al.* Impact of Hypothermia Initiation and Duration on Perihemorrhagic Edema Evolution after Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, v. 47, n. 9, p. 2249–2255, 2016.
- WADDELL, J. *et al.* Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 285–295, 2016.
- WAGNER, B. P.; NEDELCO, J.; MARTIN, E. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 51, n. 3, p. 354–360, 2002.
- WANG, Q. *et al.* Therapeutic hypothermia promotes cerebral blood flow recovery and brain homeostasis after resuscitation from cardiac arrest in a rat model. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1961–1973, 2019.
- WOOD, T. *et al.* Rectal temperature in the first five hours after hypoxia–ischemia critically affects neuropathological outcomes in neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 83, n. 2, p. 536–544, 2018.
- WOOD, T. *et al.* Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23430, 2016.
- WOOD, T. *et al.* Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic–ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- XIAO, F. *et al.* Mild Hypothermia Induced before Cardiac Arrest Reduces Brain Edema Formation in Rats. **Academic Emergency Medicine**, v. 9, n. 2, p. 105–114, 2002.
- XIONG, M. *et al.* Post-ischemic hypothermia for 24 h in P7 rats rescues hippocampal neuron: Association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine

- expression. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 351–357, 2009.
- YILDIZ, E. P.; EKICI, B.; TATLI, B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 17, n. 5, p. 449–459, 2017.
- ZHA, A. *et al.* Association Between Splenic Contraction and the Systemic Inflammatory Response After Acute Ischemic Stroke Varies with Age and Race. **Translational Stroke Research**, v. 9, n. 5, p. 484–492, 2018.
- 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, 2013.
- ZHOU, W. H. *et al.* Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A multicenter randomized controlled trial in China. **Journal of Pediatrics**, v. 157, n. 3, p. 367-372.e3, 2010.
- 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, 2006.
- ZIEMKA-NALECZ, M.; JAWORSKA, J.; ZALEWSKA, T. Insights into the neuroinflammatory responses after neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 76, n. 8, p. 644–654, 2017.