

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

Isadora D'Ávila Tassinari

**ADMINISTRAÇÃO DE LACTATO COMO AGENTE NEUROPROTETOR EM  
RATOS NEONATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA  
ENCEFÁLICA**

Porto Alegre

2020

Isadora D'Ávila Tassinari

**ADMINISTRAÇÃO DE LACTATO COMO AGENTE NEUROPROTETOR EM  
RATOS NEONATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA  
ENCEFÁLICA**

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

2020

## CIP - Catalogação na Publicação

Tassinari , Isadora DÁvila  
ADMINISTRAÇÃO DE LACTATO COMO AGENTE NEUROPROTETOR  
EM RATOS NEONATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE  
HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA / Isadora DÁvila  
Tassinari . -- 2020.

74 f.

Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientador: 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, 2020.

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

Dedico essa dissertação à minha mãe, Tatiana D'Ávila, que sempre me ensinou o valor e a importância do conhecimento, da educação e da ciência.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Ana Helena Paz, minha coorientadora, que desde a graduação na PUCRS confiou em mim e me ajudou a entender que, com certeza, meu lugar é na pesquisa. Além disso, sou eternamente grata por ter me apresentado ao professor Luciano Stürmer de Fraga, orientador desta dissertação, portanto:

Agradeço imensamente ao professor e orientador Luciano, por todo companheirismo, por toda ajuda e confiança desde o início. Tu és um orientador excepcional, puxa minha orelha, ouve meus desabafos, investe e confia no meu potencial, sobretudo quando eu mesma não acredito. Obrigada por todo incentivo, paciência e amizade sempre.

Agradeço, também, à tua família: Renata e Ceci. Professora e amiga Renata Padilha Guedes, obrigada por ter me escutado, apoiado, pelas *poker nights*, pelas conversas e muitas risadas... Tu és uma inspiração para mim. Vocês podem contar comigo sempre.

Um agradecimento especial vai para a pessoa que incentiva e apoia todos os meus sonhos, independentemente da situação: minha mãe, Tatiana de Oliveira D'Ávila. Tu és meu exemplo de pessoa, de ser humano, de justiça, de força, de carinho, de profissionalismo, de vida. Um dia eu quero ser a metade de mulher que tu és!

Agradeço ao apoio de toda minha família, meu pai, Luciano, minha prima Rosa (que ouviu todos os meus ensaios de aulas, seminários...), aos meus tios e meus avós. Obrigada por entenderem a minha ausência em alguns eventos importantes e pelo incentivo nessa caminhada.

Agradeço ao Gabriel Schirmbeck por todo companheirismo e toda ajuda ao longo desses 2 anos, por acompanhar e entender os finais de semana em que tive que estudar, escrever, fazer experimento... Tudo foi mais leve ao teu lado. Obrigada pela parceria, pelas viagens para congressos (e férias), pelos ótimos e inesquecíveis momentos que passamos juntos.

Ao meu grande amigo, praticamente gêmeos, Jeferson Jantsch, pelo incentivo, pela parceria, pelas conversas diárias, pelas riquíssimas discussões científicas e pela grande amizade que construímos.

Aos amigos que ingressaram comigo no mestrado: Marjoriane Amaral, Leonardo Simões, Amanda Chaves, Eduardo Echer e Marina Brião, obrigada por todo apoio durante o “cadeirão” e pela linda amizade que construímos. Ressalto um agradecimento especial aos dois primeiros, que foram/são colegas de laboratório: Marjoriane Amaral e Leonardo Simões só posso realmente agradecer a tudo que já passamos juntos, todo companheirismo nos “perrengues”, toda conversa importante, todo aprendizado e toda parceria. Agradeço, também, à pós-doc Mariana Leivas Müller Hoff pela amizade construída nesse ano; pelas grandes contribuições nessa dissertação e pela parceria nos experimentos (inclusive em feriados!).

Agradeço a todo grupo de pesquisa do professor Luciano, Neurobiologia e Metabolismo. Em especial, agradeço à aluna de iniciação científica Mirella Andrade

(que me orgulha de ver uma futura nutricionista com tantos questionamentos dentro da pesquisa, é disso que a nossa área precisa) por todo companheirismo, por fazer jus ao nosso trabalho, por abraçar o projeto comigo; ao mestrando Ricardo Ribeiro por todo apoio, por me ouvir, pelo companheirismo em todos os experimentos e pelas ricas discussões que tivemos; e à aluna de iniciação científica Anna Clara que foi parceira e abraçou o projeto assim que entrou no grupo de pesquisa. Agradeço, também, à Luciana Abreu que surgiu na hora certa como um anjo nos experimentos. Obrigada pela parceria, pelas considerações, pelas ideias e pelos altos papos na UEA quando tínhamos experimentos até às 23h.

A todos os funcionários da Unidade de Experimentação Animal do HCPA que sempre foram muito solícitos. Em especial, meu agradecimento à enfermeira Marta Justina Giotti Cioato e às veterinárias Daniela Campagnol e Tuane Garcez: nada teria sido tão bem conduzido sem a ajuda e o apoio de vocês!

Aos professores e alunos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) por todos os ensinamentos, discussões e confraternizações. Agradeço ao pessoal do professor Carlos Alexandre Netto e a todo laboratório 35 do Departamento de Bioquímica pela ajuda e acolhimento, principalmente ao pós doc Eduardo Sanches pela paciência e disponibilidade para me ensinar as cirurgias.

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

Ao laboratório de Neurobiologia Comparada pelo auxílio nas técnicas histológicas e parcerias nesses últimos 2 anos.

Agradeço às minhas melhores amigas de infância e adolescência: Ana Paula Spohr, Letícia Saldanha Scherer e Greice Cristianetti, e às minhas amigas de graduação: Bettina Del Pino, Bianca Guimarães, Georgia Regla, Camila Monticelli e Marcelli Gomes por entenderem a minha ausência, incentivarem minhas escolhas e sempre terem me escutado quando eu precisei.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Às demais agências de fomento, como, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a PROPESQ-UFRGS pelo apoio financeiro.

Concluindo, agradeço a todas as pessoas que resistiram junto comigo, principalmente neste último ano de 2019, que não foi nada fácil dentro da Universidade. Sigamos na luta!

## RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (EHI) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em recém-nascidos. Atualmente, a hipotermia é a única terapia utilizada para o tratamento da EHI. Entretanto, a hipotermia possui algumas limitações, não sendo eficaz em todos os casos de EHI. Assim, outros possíveis agentes neuroprotetores têm sido testados em modelos animais. O presente trabalho avaliou a utilização de lactato em um modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal (HI), que mimetiza em ratos neonatos os danos observados em recém-nascidos humanos. O lactato é um potencial substrato energético do sistema nervoso central (SNC), além de ter demonstrado ação neuroprotetora em modelos de isquemia cerebral em animais adultos. Para a padronização inicial dos experimentos, as concentrações endógenas de lactato foram avaliadas em diferentes momentos após a HI e também após uma injeção intraperitoneal de lactato exógeno. Para investigar o possível papel neuroprotetor do lactato sobre a lesão encefálica e parâmetros comportamentais, ratos Wistar machos e fêmeas com 7 dias de vida foram submetidos à oclusão permanente da artéria carótida comum direita (isquemia) combinada com a exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 60 minutos (hipóxia). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: grupo HI (animais submetidos ao procedimento de HI neonatal); grupo HI+LAC (animais submetidos ao procedimento de HI neonatal e que receberam injeções de lactato após a HI); grupo SHAM (animais submetidos a uma cirurgia fictícia e mantidos em normoxia); grupo SHAM+LAC (animais submetidos a uma cirurgia fictícia, mantidos em normoxia e que receberam injeções de lactato). O lactato foi administrado 30 minutos e 2h após a hipóxia (na dose de 2 g/kg) no grupo HI+LAC e nos mesmos momentos no grupo SHAM+LAC. Os grupos HI e SHAM receberam apenas a injeção de veículo (tampão fosfato-salino, PBS). O volume de lesão encefálica foi calculado a partir de fatias coronais dos encéfalos de animais (em P9) coradas com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), que marca as regiões de células vivas. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de geotaxia negativa e reflexo de endireitamento (em P8 e P14); teste olfatório (em P14); e teste do cilindro (em P20). As concentrações endógenas de lactato retornam aos valores controle 30 minutos após a HI. O lactato exógeno administrado atinge um pico aos 5 minutos (concentração cerca de 4 vezes maior do que a basal) e retorna aos valores basais aos 90 minutos após a injeção. Nos animais submetidos à HI, a administração de lactato reduziu o volume de lesão em P9 e melhorou alguns parâmetros comportamentais em P8 (geotaxia negativa) e em P20 (teste do cilindro), tanto em machos quanto em fêmeas. Assim, parece que o lactato exerce um efeito neuroprotetor de curto prazo, reduzindo a lesão encefálica 48h após a HI (P9), o que parece ter sido importante para a melhora dos desfechos comportamentais observada. Estudos adicionais são necessários para permitir a compreensão dos mecanismos de ação do lactato e sua utilização no tratamento de recém-nascidos que passaram por eventos hipóxicos-isquêmicos encefálicos.

**Palavras-chave:** Neurodesenvolvimento. Lactato. Hipóxia-isquemia neonatal. Neuroproteção. Lesão encefálica.

## ABSTRACT

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is a major cause of mortality and disability in newborns. Currently, the standard approach for treating HIE is therapeutic hypothermia (TH). However, TH shows some limitations, not being efficient in all cases of HIE. Thus, other putative neuroprotective agents have been tested in animal models. The present study evaluated the lactate administration in an animal model of HIE that mimics, in neonatal rats, the brain damage observed in human newborns. Lactate is a potential energy substrate of the central nervous system (CNS), besides its neuroprotective effects have been shown in adult animals following cerebral ischemia. Endogenous concentrations of lactate were evaluated at different time points after HIE and after an intraperitoneal injection of lactate. To investigate the putative neuroprotective role of lactate following brain injury, seven-days-old (P7) male and female Wistar rats underwent permanent common right carotid occlusion (ischemia) combined with an exposition to a hypoxic atmosphere (8% oxygen) for 60 minutes. Animals were assigned to four experimental groups: HI group (animals submitted to HI procedure); HI+LAC group (animals submitted to HI procedure, which received lactate following HI); SHAM group (animals submitted to a fictitious surgery and kept in normoxia); SHAM+LAC group (animals submitted to a fictitious surgery, kept in normoxia and receiving lactate injections). Lactate (2 g/kg) was administered 30 minutes and 2 h after hypoxia in HI+LAC group and at the same times in SHAM+LAC group. HI and SHAM groups received vehicle (phosphate-saline buffer, PBS) injections at the same time points. Volume of brain damage was quantified in coronal brain slices of the animals (P9) stained with 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC), indicative of viable tissue. Animals underwent behavioral assessments such as negative geotaxis and righting reflex (at P8 and P14), olfactory discrimination (at P14), and cylinder test (P20). Endogenous plasma lactate concentrations return to basal levels 30 minutes after HI. Levels of exogenous lactate reach a peak at 5 minutes and return to basal levels at 90 minutes after injections. In HI animals, lactate administration reduced brain lesion volume in P9 and improved some behavioral parameters in P8 (negative geotaxis) and P20 (cylinder test), for both sexes. Therefore, lactate seems to exert a short-term neuroprotective effect, reducing brain damage 48h following HI (P9), which appear to influence the improvement of behavioral outcomes. Additional studies are necessary in order to understand the mechanisms of action of lactate and its application in the treatment of newborns that underwent hypoxia-ischemia encephalopathy.

**Keywords:** Neurodevelopment. Lactate. Neonatal hypoxia-ischemia. Neuroprotection. Brain injury.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da lançadeira de lactato.....	16
Figura 2. Fisiopatologia da HI.....	21
Figura 3. Esquema representativo do modelo animal de HI.....	27
Figura 4. Linha do tempo do experimento-piloto.....	29
Figura 5. Peso dos animais ao longo dos dias do experimento-piloto.....	30
Figura 6. Linha do tempo da curva de concentração plasmática de lactato após a HI.....	31
Figura 7. Linha do tempo da curva de concentração plasmática de lactato em condições basais.....	32
Figura 8. Linha do tempo dos experimentos finais.....	34
Figura 9. Concentrações plasmáticas de lactato após o evento hipóxico-isquêmico.....	41
Figura 10. Concentrações plasmáticas de lactato após a injeção de lactato ou PBS.....	42
Figura 11. Concentrações teciduais de lactato no hipotálamo.....	43
Figura 12. Peso dos animais ao longo dos 21 dias de experimento.....	44
Figura 13. Índice anogenital (IAG) mensurado em P21.....	45
Figura 14. Volume de lesão encefálica avaliado em P9.....	46
Figura 15. Imagens representativas do dano encefálico em P21.....	47
Figura 16. Latência no teste de geotaxia negativa.....	48
Figura 17. Latência no teste do reflexo de endireitamento.....	49
Figura 18. Latência no teste de reconhecimento olfatório.....	50
Figura 19. Percentual do uso da pata contralateral à isquemia no teste do cilindro.....	51

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Taxa de mortalidade dos animais.....	40
Tabela 2. Dia de abertura dos olhos nos animais machos.....	45
Tabela 3. Dia de abertura dos olhos nos animais fêmeas.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC: monofosfato de adenosina cíclico  
ANLS: lançadeira de lactato astrócito-neurônio  
ATP: trifosfato de adenosina  
BHE: barreira hematoencefálica  
Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio  
DAG: distância anogenital  
EHI: encefalopatia hipóxico-isquêmica  
EAAT: transportador de aminoácidos excitatórios  
GFAP: proteína glial fibrilar ácida  
GLUT: proteína transportadora de glicose  
GPCR: receptor acoplado à proteína G  
H<sup>+</sup>: íon hidrogênio  
HCAR: receptor de ácido carboxílico  
HI: hipóxia-isquemia  
HIF-1 $\alpha$ : fator de transcrição induzido pela hipóxia-1 alfa  
IAG: índice anogenital  
IL-1 $\beta$ : interleucina-1 beta  
IL-6: interleucina-6  
K<sup>+</sup>: íon potássio  
LPS: lipopolissacarídeo  
MCT: transportador de monocarboxilato  
Na<sup>+</sup>: íon sódio  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada  
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida  
NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B  
OGD: privação de glicose e oxigênio  
PBS: tampão fosfato-salino

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	23
3. HIPÓTESE .....	24
4. OBJETIVO GERAL .....	24
4.1. Objetivos específicos .....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
5.1. Animais.....	25
5.2. Aspectos éticos .....	25
5.3. Modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal.....	26
5.4. Grupos experimentais .....	27
5.5. Administração de lactato.....	28
5.6. Experimentos-piloto .....	29
5.7. Curva de concentração plasmática de lactato após a HI .....	31
5.8. Curva de concentração de lactato em condições basais .....	31
5.9. Desenho experimental final .....	32
5.10. Dosagens plasmáticas e teciduais de lactato .....	35
5.11. Parâmetros de desenvolvimento .....	35
5.12. Volume de lesão encefálica (P9) .....	36
5.13. Análise qualitativa dos encéfalos em P21 .....	37
5.14. Testes comportamentais.....	37
5.14.1. Reflexo de geotaxia negativa.....	37
5.14.2. Reflexo de endireitamento .....	38
5.14.3. Reconhecimento olfatório .....	38
5.14.4. Teste do cilindro .....	38
5.15. Análise Estatística .....	39
6. RESULTADOS.....	39
6.1. Taxa de mortalidade .....	40
6.2. Dosagens plasmáticas de lactato .....	40
6.2.1. Concentrações plasmáticas de lactato após a HI.....	40
6.2.2. Concentrações plasmáticas de lactato em condições basais .....	42
6.2.3. Concentrações de lactato no hipotálamo em condições basais .....	43
6.3. Parâmetros de desenvolvimento .....	43
6.4. Volume de lesão (P9).....	45
6.5. Análise qualitativa dos encéfalos em P21 .....	46
6.6. Testes comportamentais.....	47
6.6.1. Geotaxia negativa .....	47
6.6.2. Reflexo de endireitamento .....	48
6.6.3. Reconhecimento olfatório .....	49
6.6.4. Teste do cilindro .....	50
7. DISCUSSÃO .....	51
8. CONCLUSÕES .....	64
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. REFERÊNCIAS.....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A encefalopatia neonatal decorrente de um evento hipóxico-isquêmico, também conhecida como encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), é uma importante consequência da asfixia perinatal (Rennie e Robertson, 2012), com uma prevalência de 1-8 casos a cada 1000 recém-nascidos vivos nos países desenvolvidos e de 1-26/1000 em países subdesenvolvidos (Airede, 1991; Kurinczuk *et al.*, 2010). A hipóxia-isquemia (HI) é uma das principais causas de deficiências neurológicas (Ferriero, 2004) e mortalidade precoce em recém-nascidos (Bryce *et al.*, 2005). Além disso, entre os sobreviventes, 25% apresentam deficiências neuropsicológicas, como dificuldade de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral (Douglas-Escobar e Weiss, 2012; Charriaut-Marlangue *et al.*, 2018).

O evento hipóxico-isquêmico encefálico é caracterizado pela redução do fluxo sanguíneo e consequente interrupção da disponibilização de oxigênio e substrato energético ao tecido nervoso, o que resulta na redução da concentração de ATP intracelular (Rennie e Robertson, 2012), levando a uma falha energética. A lesão neural produzida pelo evento hipóxico-isquêmico é causada tanto por morte neuronal aguda (devido a essa falha energética inicial) quanto tardia (por exemplo, pela ativação de vias de apoptose e de um processo inflamatório de longo prazo). A manifestação dos danos neurais depende de diversos fatores, como a área cerebral avaliada (Sanches *et al.*, 2019), o tempo após o evento hipóxico-isquêmico (Northington *et al.*, 2001) e o dimorfismo sexual (Mirza *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Entretanto, como a lesão é progressiva (Northington *et al.*, 2001), torna-se possível a busca por estratégias neuroprotetoras que possam ser aplicadas mesmo após a ocorrência do evento hipóxico-isquêmico.

A concepção de intervenções eficazes com o feto e o recém-nascido que sofreram eventos hipóxicos-isquêmicos encefálicos depende diretamente da compreensão da fisiopatologia envolvida na EHI (Procianoy e Silveira, 2001; Vannucci e Hagberg, 2004; Douglas-Escobar e Weiss, 2015; Silveira e Procianoy, 2015). As causas que provocam a EHI, em sua maioria, ocorrem antes do nascimento, porém podem ocorrer também durante e após o nascimento (Douglas-Escobar e Weiss, 2012) e incluem prolapso do cordão umbilical, deslocamento prematuro da placenta, prematuridade, entre outros (Rennie e Robertson, 2012).

Existe uma escassez de opções terapêuticas para o tratamento da EHI, embora a busca por estratégias para superar este problema venha de longa data (Ferriero,

2004; Knox *et al.*, 2013; Dixon *et al.*, 2015; Thoresen, 2018). Atualmente, a única terapia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e bem estabelecida na clínica para o tratamento da EHI em neonatos nascidos a termo é a hipotermia terapêutica (Dixon *et al.*, 2015), que consiste no resfriamento corporal do recém-nascido, com uma redução de 2 a 5°C na temperatura encefálica (Shankaran *et al.*, 2005; Lupton *et al.*, 2017; Rocha-Ferreira *et al.*, 2018). Entretanto, a hipotermia terapêutica só é eficaz em recém-nascidos humanos se for iniciada dentro de uma janela terapêutica de no máximo 6h (Gunn e Gluckman, 2007), e promove neuroproteção apenas em casos de eventos hipóxico-isquêmicos moderados. A hipotermia isolada não é neuroprotetora em casos de injúrias severas (Sabir *et al.*, 2012), podendo, inclusive, aumentar a lesão encefálica em casos mais graves ou quando iniciada tardiamente (Shankaran *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2016). Devido a isso, a eficácia de outras terapias tem sido testada, principalmente em modelos animais (Castillo *et al.*, 2010; Rees *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017; Millar *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Fabres *et al.*, 2018).

Alguns exemplos dessas outras terapias envolvem o uso de agentes que melhoram a capacidade de transporte de oxigênio, como a eritropoietina (Wu e Gonzalez, 2015); substâncias antioxidantes e anti-apoptóticas, como a melatonina (Hu *et al.*, 2017), ou que reduzam a produção de espécies ativas de oxigênio, como o alopurinol (Williams *et al.*, 1992); administração de células tronco como agentes imunomoduladores (Yoo *et al.*, 2013); bloqueadores de receptores glutamatérgicos, como xenônio, neônio, sulfato de magnésio e topiramato, que reduzem a excitotoxicidade glutamatérgica (Allen, 2012). Embora algumas dessas terapias já tenham sido testadas em *trials* clínicos, nenhuma mostrou um resultado mais efetivo do que a hipotermia (Dixon *et al.*, 2015). Além disso, a utilização de um tratamento neuroprotetor em conjunto com a hipotermia nem sempre é benéfica, podendo inclusive provocar uma piora no desfecho final (Thoresen, 2018).

Uma possível estratégia neuroprotetora ainda pouco testada na HI neonatal é a utilização de substratos metabólicos: por exemplo, já foi demonstrado que o butirato de sódio suprime a resposta inflamatória causada pela HI (Jaworska *et al.*, 2017; Ziemka-Nalecz *et al.*, 2017). Entretanto, uma das características interessantes do butirato (um ácido graxo de cadeia curta que pode ser metabolizado em corpos cetônicos) (Hird e Symons, 1962) é que ele pode ser utilizado como um substrato metabólico pelo sistema nervoso de neonatos (Dombrowski *et al.*, 1989), mesmo em

situações de privação de glicose (Schurr *et al.*, 1988). O lactato também tem mostrado efeitos promissores em situações de isquemia cerebral (Berthet *et al.*, 2009). Entretanto a utilização desse potencial substrato energético (o lactato) tem sido testada apenas em modelos de animais adultos (Berthet *et al.*, 2009, 2012; Castillo *et al.*, 2015).

A disponibilização de um substrato energético durante a HI parece ser uma estratégia interessante, já que o encéfalo é responsável por cerca de 25% da utilização diária de glicose do organismo, apesar de representar apenas 2% da massa corporal de um ser humano adulto (Attwell e Laughlin, 2001; Alle *et al.*, 2009). A manutenção e a recuperação dos gradientes iônicos após a sinalização sináptica, além da reciclagem dos neurotransmissores, são os fatores responsáveis pela maior parte deste gasto energético (Pellerin e Magistretti, 2012). De modo geral, a glicose é considerada como o substrato energético obrigatório do encéfalo (Dienel, 2018) e por muito tempo se acreditou que a utilização da glicose ocorreria via metabolismo oxidativo, levando em consideração o alto fluxo sanguíneo e o elevado consumo de oxigênio cerebral (Madsen *et al.*, 1999; Bélanger *et al.*, 2011). Entretanto, as diferentes células que compõem o sistema nervoso central (SNC) apresentam perfis metabólicos distintos: os neurônios, que apresentam um metabolismo principalmente oxidativo, parecem utilizar o lactato como substrato energético preferencial; já os astrócitos, que apresentam metabolismo principalmente glicolítico (anaeróbico), atuam como produtores e exportadores de lactato: essas células captariam a glicose circulante, a qual seria convertida em lactato pela via glicolítica e transferida para os neurônios na forma de lactato (Pellerin e Magistretti, 1994, 2012; Magistretti e Allaman, 2018).

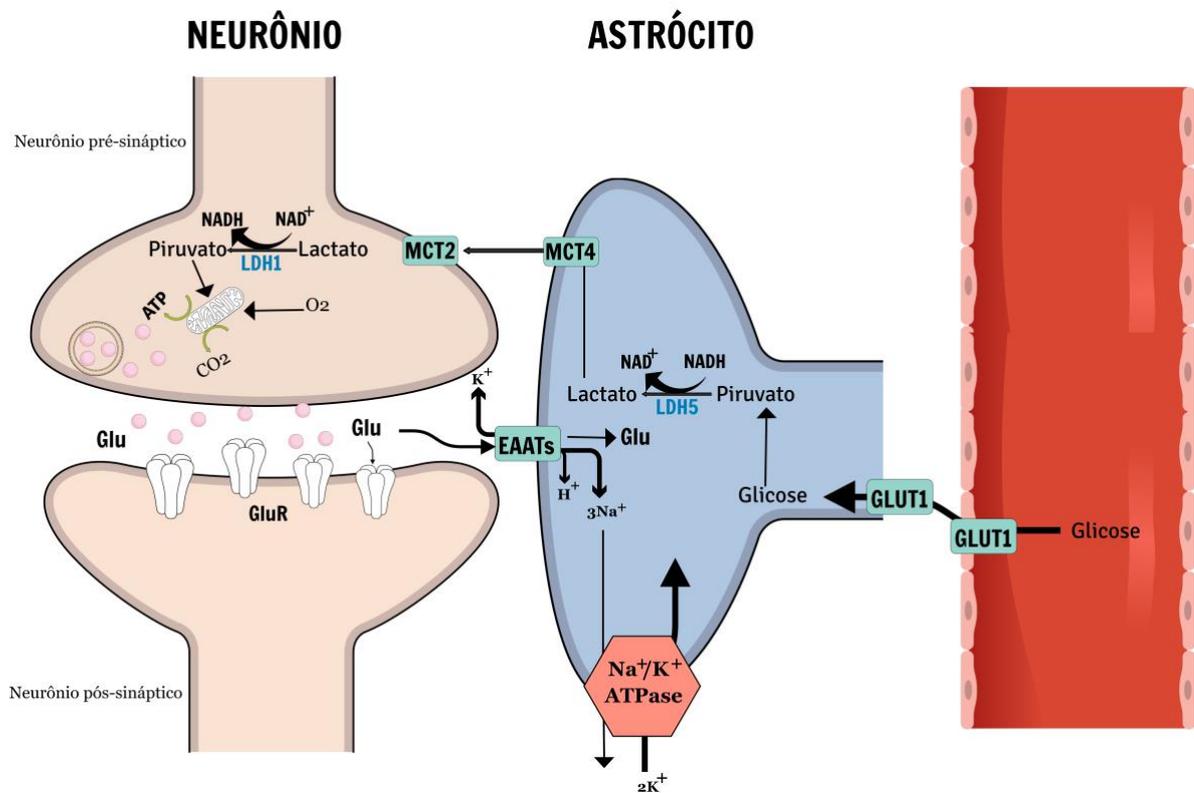
O lactato está presente no espaço extracelular do SNC em concentrações semelhantes às concentrações de glicose (entre 0,5 mM e 1,5 mM) e pode ser transportado pelos chamados transportadores de monocarboxilatos (MCT) (Pellerin *et al.*, 1998; Schurr *et al.*, 1999; Boumezbeur *et al.*, 2010). Os MCTs são transportadores de membrana responsáveis pelo transporte de lactato, piruvato, acetato e beta-hidroxiacetato (Dombrowski *et al.*, 1989; Halestrap e Price, 1999). O lactato pode ser captado pelos neurônios através do MCT2, uma isoforma de alta afinidade dos MCTs (Schurr *et al.*, 1999; Boumezbeur *et al.*, 2010; Magistretti e Allaman, 2018). Esse lactato captado é prontamente metabolizado em piruvato pela enzima lactato desidrogenase (LDH), sendo utilizado como substrato para a produção de ATP pela

fosforilação oxidativa mitocondrial (Pellerin *et al.*, 2007; Magistretti, 2009; Bélanger *et al.*, 2011).

Esse processo de transferência de lactato entre astrócitos e neurônios é conhecido como "lançadeira de lactato astrócito-neurônio" ou "desvio lactato-glicose" (Pellerin e Magistretti, 1994). A existência dessa lançadeira foi proposta originalmente em 1994 por Pellerin e Magistretti (Pellerin e Magistretti, 1994), com base em estudos *in vitro* e estudos de imageamento da captação de glicose (Figura 1). O modelo sugere que a utilização de glicose pelo SNC refletiria muito mais o metabolismo astrocítico do que o neuronal: o astrócito captaria a maior parte da glicose circulante e utilizaria a mesma como substrato para a via glicolítica. O lactato formado seria exportado para o espaço extracelular e captado pelos neurônios (Allaman *et al.*, 2011; Pellerin e Magistretti, 2012; Mächler *et al.*, 2016; Magistretti e Allaman, 2018). Esse processo seria regulado pela atividade das sinapses glutamatérgicas, auxiliando na disponibilização de um substrato energético para a manutenção da alta demanda energética dessas sinapses excitatórias (Pellerin *et al.*, 2007; Magistretti e Allaman, 2018; Vohra *et al.*, 2019). Assim, fica claro que neurônios e astrócitos apresentam perfis metabólicos distintos, mas complementares, proporcionando um ambiente de extensiva cooperação metabólica intercelular.

Diversos estudos subsequentes auxiliaram na confirmação do modelo da lançadeira de lactato e da existência de uma cooperação metabólica entre astrócitos e neurônios. Por exemplo: 1- o baixo conteúdo neuronal da enzima frutose 2,6 bifosfatase, uma enzima regulatória-chave da via glicolítica, sugere ineficácia da via glicolítica em neurônios (Almeida *et al.*, 2004). Os astrócitos, entretanto, são altamente glicolíticos, apresentando transportadores de glicose nos pés astrocíticos que envolvem os capilares (Allaman *et al.*, 2011; Bélanger *et al.*, 2011); 2- os neurônios apresentam a isoforma de alta afinidade dos transportadores de lactato (MCT2), indicando que o lactato será captado pelos neurônios a partir do espaço extracelular mesmo quando presente em baixas concentrações (Gandhi *et al.*, 2009; Bergersen, 2015). Os astrócitos, por outro lado, apresentam a isoforma MCT4 de baixa afinidade, mas de elevada capacidade de transporte, indicando que o lactato produzido será exportado quando estiver presente em elevadas concentrações no meio intracelular (Gandhi *et al.*, 2009; Bergersen, 2015); 3- a isoforma 5 da lactato desidrogenase (LDH) parece ser mais expressa em astrócitos, e favorece a redução do piruvato em lactato.

Nos neurônios, entretanto, a isoforma mais expressa é a LDH1, que favorece a oxidação do lactato em piruvato (Bélanger *et al.*, 2011).



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

A lançadeira de lactato também pode ser regulada em situações adversas, por exemplo, com um aumento na expressão de MCT4 nos astrócitos durante condições de hipóxia (aumento regulado pelo fator de transcrição induzido pela hipóxia-1 alfa - HIF-1 $\alpha$ ), a fim de favorecer a transferência para os neurônios das elevadas quantidades de lactato produzidas pelos astrócitos, para que esse lactato possa ser oxidado e utilizado como substrato energético (Ullah *et al.*, 2006; Rosafio e Pellerin, 2014; Vohra *et al.*, 2019). A transferência de lactato entre astrócitos e neurônios afeta inclusive funções superiores do sistema nervoso como processos complexos de consolidação da memória de longo-prazo (Suzuki *et al.*, 2011).

Todas essas evidências sobre o importante papel metabólico do lactato em neurônios parecem suficientes para explicar os efeitos neuroprotetores da administração exógena de lactato em diferentes modelos experimentais (Ros *et al.*, 2001; Berthet *et al.*, 2009; E *et al.*, 2013; Morland *et al.*, 2017). O lactato atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) por difusão facilitada através do MCT1 presente nas células endoteliais e nos astrócitos (os astrócitos também expressam o MCT4, necessário para a exportação do lactato) (Halestrap, 2013). Dentro do sistema nervoso central, o lactato promove a angiogênese cerebral (Morland *et al.*, 2017) e produz efeitos antidepressivos (Carrard *et al.*, 2016). Em modelos de lesão do SNC *in vivo*, o lactato apresentou efeitos neuroprotetores após a indução de isquemia cerebral em animais adultos (Berthet *et al.*, 2009, 2012; Castillo *et al.*, 2015; Mosienko *et al.*, 2015), reduzindo o volume de lesão estriatal (Berthet *et al.*, 2009) e a morte neuronal (Berthet *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2015). Em culturas organotípicas de hipocampo submetidas à privação de glicose e oxigênio (OGD, um modelo *ex vivo* que mimetiza a hipóxia-isquemia cerebral), a aplicação de L-lactato ao meio reduziu a morte neuronal (Berthet *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2015).

A administração de lactato também melhorou as respostas comportamentais pós-lesão, reduzindo os déficits neurológicos avaliados com a utilização de testes comportamentais como *RotaRod*, *BeamWalk* e testes de reflexos motores em modelos de isquemia em camundongos adultos (Berthet *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2015) e o déficit cognitivo observado no labirinto aquático de Morris em modelo de traumatismo crânio-encefálico em ratos adultos (Rice *et al.*, 2002). Em um modelo de hemorragia cerebral, o lactato parece se acumular ao redor do hematoma para promover angiogênese e neurogênese, demonstrando um efeito neuroprotetor (Zhou *et al.*, 2018).

Além dos estudos em modelos animais, o lactato também tem mostrado efeitos benéficos em seres humanos. Em um estudo prospectivo randomizado realizado com pacientes que sofreram traumatismo crânio-encefálico, a administração de lactato de sódio foi eficiente na redução da pressão intracraniana (Ichai *et al.*, 2013). Um viés experimental é que esse desfecho ocorreu quando uma solução hipertônica de lactato ou de manitol foi administrada, podendo ser um efeito osmótico e não do lactato *per se*. Entretanto, os autores reforçam que a solução hipertônica de lactato é mais segura e efetiva quando comparada à solução de manitol, principalmente na redução da pressão intracraniana, além de atenuar a redução das concentrações cerebrais de ATP (Ichai *et al.*, 2009), o que pode sugerir que o lactato está sendo usado como um substrato energético.

Além da ação como substrato energético, outro mecanismo sugerido para todos esses efeitos neuroprotetores do lactato seria a existência e ativação de um receptor cerebral de lactato. Tem sido sugerido que o lactato poderia atuar como um sinalizador celular através de um receptor conhecido como GPR81 (do inglês, *G protein-coupled receptor 81*) ou HCAR1 (do inglês, *hydroxy-carboxylic acid receptor 1*), um receptor acoplado à proteína G que vem sendo mostrado como um importante alvo para a ligação do lactato (Morland *et al.*, 2015). Esse receptor foi inicialmente descrito em adipócitos atuando na regulação da lipólise (Ahmed *et al.*, 2010), mas sua presença também já foi descrita no SNC (Lauritzen *et al.*, 2014; Morland *et al.*, 2017). A existência deste receptor, que responde às concentrações fisiológicas de lactato (Mosienko *et al.*, 2015), poderia explicar em parte os efeitos neuroprotetores do lactato (além da função clássica como substrato energético do SNC).

Recentemente, a presença do GPR81 foi identificada na membrana plasmática de diferentes células do sistema nervoso, como na membrana pós-sináptica dos neurônios e nas células endoteliais e processos astrocíticos perivasculares que formam a BHE (Lauritzen *et al.*, 2014). Nos espinhos dendríticos, o GPR81 foi identificado em vesículas logo abaixo da membrana (vesículas subplasmalemais), sugerindo que possa haver uma regulação do receptor por processos de translocação a partir dos estoques intracelulares e internalização a partir da membrana plasmática (Lauritzen *et al.*, 2014). Em concentrações fisiológicas (0,1-1,4 mmol/L), o L-lactato pode ativar o seu receptor, causando a redução do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular (Mosienko *et al.*, 2015) e mostrando que o GPR81 cerebral é

plenamente funcional e capaz de mediar os efeitos fisiológicos do lactato via receptor (Lauritzen *et al.*, 2014).

Apesar da sua presença no SNC, estudos funcionais recentes mostraram que o bloqueio farmacológico sistêmico do HCAR1/GPR81 não impede o processo de neurogênese hipocampal. Entretanto, se o transportador de lactato MCT2 for bloqueado, a neurogênese hipocampal não ocorre (Lev-Vachnisch *et al.*, 2019). Em vista disso, parece que o papel neuroprotetor do lactato não envolve apenas a ativação do receptor HCAR1/GPR81, mas também é dependente do transporte de lactato pelos MCTs. Além disso, também não pode ser excluída a possibilidade de os dois processos estarem interrelacionados.

Por outro lado, fora do SNC, a ativação do receptor GPR81 foi necessária para mediar os efeitos anti-inflamatórios do lactato em um modelo de pancreatite induzida (Hoque *et al.*, 2014).

Considerando que a EHI envolve um déficit energético inicial, seguido por um processo inflamatório, fica claro que o lactato pode ser uma alternativa para o tratamento dessa condição. As etapas da fisiopatologia da HI neonatal estão representadas na Figura 2 e detalhadas a seguir. Geralmente ocorre uma sequência de eventos, iniciando com uma falha energética seguida de um período de reperfusão e estresse oxidativo (Dugan e Choi, 1994; Bågenholm *et al.*, 1998), levando à morte celular (McDonald e Johnston, 1990; Olney, 2003) e à inflamação (Northington *et al.*, 2011). Essa sequência de eventos pode ser dividida nas seguintes fases:

**1. Fase aguda (durante o evento):** o evento hipóxico-isquêmico inicia-se com a interrupção do fluxo sanguíneo e a subsequente redução da disponibilização de glicose e oxigênio ao encéfalo neonatal, o que leva à queda da concentração de ATP intracelular e ao desequilíbrio dos gradientes eletroquímicos. O acúmulo de neurotransmissores como o glutamato (aminoácido excitatório) no meio extracelular leva à excitotoxicidade e, conseqüentemente, ao dano oxidativo (Rothman e Olney, 1995). No momento em que ocorre a redução da concentração de ATP intracelular, a atividade das enzimas glutamina sintetase e Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (ambas dependentes de ATP) também é reduzida, levando à diminuição da conversão de glutamato em glutamina pelos astrócitos (Bak *et al.*, 2006), além da falta de manutenção do gradiente iônico utilizado pelos transportadores de glutamato (Rothman e Olney, 1987). A captação e conversão de glutamato (dependente de energia) são prejudicadas e o glutamato permanece no meio extracelular estimulando seus

receptores e levando à excitotoxicidade (Rothman e Olney, 1995; Wassink *et al.*, 2014) e à morte celular (Brady *et al.*, 2011).

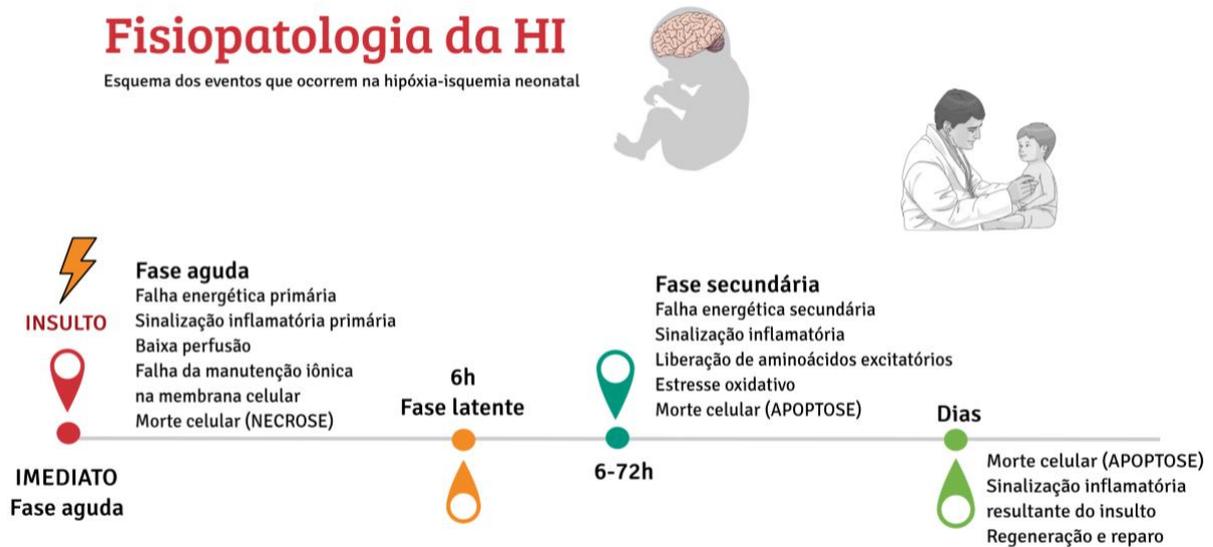
**2. Fase latente:** com a restauração do fluxo sanguíneo, existe um pequeno período de normalização do metabolismo cerebral chamado de fase latente (Gopagondanahalli *et al.*, 2016). Essa fase varia de acordo com a severidade do evento hipóxico-isquêmico: quanto mais severo for o insulto, mais curto é esse período de recuperação (Shalak e Perlman, 2004; Allen e Brandon, 2011). A fase latente ocorre entre a fase aguda e a fase secundária, perdurando em torno de 1-6h em recém-nascidos humanos (Azzopardi *et al.*, 2014). De acordo com alguns autores (Gunn e Gluckman, 2007), a fase latente é uma janela de oportunidade clínica, momento em que possivelmente novas terapias possam ser utilizadas para complementar a hipotermia terapêutica (Roelfsema *et al.*, 2004; Gunn e Gluckman, 2007).

**3. Fase secundária:** a severidade da fase secundária é proporcional à severidade da fase primária em recém-nascidos (Lorek *et al.*, 1994). O déficit energético secundário produz os efeitos mais deletérios para o neurodesenvolvimento. Entretanto, por ser um período estendido de apoptose e ativação de caspase-3 após a HI (Li *et al.*, 1998), é possível prolongar a janela terapêutica de intervenção clínica (Cheng *et al.*, 1998). Essa cascata subsequente de eventos envolve o acúmulo de cálcio citosólico e a ativação de várias proteínas envolvidas no processo de morte celular (Rothman e Olney, 1995). Após a ruptura da membrana, os conteúdos celulares são liberados levando a um processo inflamatório adicional (Volpe, 2001). Há migração da microglia para a área lesionada, causando a liberação de mediadores inflamatórios e danos adicionais à substância branca, além de comprometer a formação de uma cicatriz tecidual adequada (Alvarez-Díaz *et al.*, 2007).

A redução controlada da temperatura encefálica, obtida com o procedimento de hipotermia terapêutica é capaz de reduzir a taxa metabólica (Shankaran *et al.*, 2005; Wood *et al.*, 2016) e, assim, diminuir a ativação de todos esses processos de morte celular associados à HI (Gunn e Gluckman, 2007). Contudo, conforme já comentado, a hipotermia terapêutica tem uma eficácia limitada, sendo efetiva apenas em casos moderados de HI (Laptook *et al.*, 2017) e dentro de uma janela terapêutica de curta duração (Sabir *et al.*, 2012).

# Fisiopatologia da HI

Esquema dos eventos que ocorrem na hipóxia-isquemia neonatal



**Figura 2.** Diferentes etapas organizadas cronologicamente para representar a fisiopatologia da HI neonatal. A fase aguda do evento (o episódio hipóxico-isquêmico e as horas seguintes) é caracterizada pela falha na disponibilização de oxigênio e de substratos energéticos para o SNC, levando à morte celular. A fase latente se encontra entre a aguda e a secundária, sendo essa última considerada o momento em que mais se observam efeitos deletérios (Figura de autoria própria com base em Volpe, 2017 (Volpe *et al.*, 2017)).

Devido a isso, modelos animais têm sido utilizados com o objetivo de avaliar outras possibilidades de neuroproteção, sempre tendo como base a fisiopatologia da EHI. Entre estes, o modelo animal de Rice-Vanucci (Rice *et al.*, 1981) já está bem estabelecido como uma ferramenta experimental para o estudo da HI neonatal, mimetizando em ratos neonatos o dano cerebral observado em humanos (Cuaycong *et al.*, 2011), tanto em relação às lesões nas estruturas cerebrais, quanto em relação aos déficits cognitivos e sensorio-motores (Netto *et al.*, 2017). O hipocampo é uma das estruturas mais vulneráveis à lesão hipóxico-isquêmica nesse modelo em animais neonatais (Vannucci *et al.*, 1999; Sutherland *et al.*, 2004; Fabres *et al.*, 2018). O modelo consiste na oclusão permanente unilateral da artéria carótida comum combinada com a exposição do animal a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio), resultando em dano encefálico unilateral. Em ratos, esta abordagem é realizada 7 dias após o nascimento (P7), período em que o grau de maturação do SNC do rato se assemelha a um neonato humano nascido a termo (Ferriero, 2004; Rakhade e Jensen, 2009; Netto *et al.*, 2017). Cabe salientar que alguns trabalhos sugerem que a idade de P7 se refere a um humano “prematuro tardio” (*late preterm*), com idade gestacional de 34-36 semanas (Smith *et al.*, 2016; Deniz *et al.*, 2018). Ainda assim, P7 é a idade

mais utilizada na literatura com o modelo de HI neonatal (Xiong *et al.*, 2009; Alexander *et al.*, 2014; Netto *et al.*, 2017, 2018).

Alguns poucos estudos com animais submetidos ao modelo de Rice-Vannucci têm mostrado a existência de diferenças entre animais machos e fêmeas em relação à extensão da lesão induzida pela HI (Hagberg *et al.*, 2004; Nijboer *et al.*, 2007; Sanches *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015; Netto *et al.*, 2017). Os machos parecem ser mais suscetíveis à perda tecidual específica de certas regiões como o córtex e o hipocampo, enquanto as fêmeas parecem reduzir o volume hemisférico total (Netto *et al.*, 2017). Em relação ao processo inflamatório pós-HI, foi demonstrado que animais machos têm maior ativação microglial, além de uma resposta inflamatória periférica mais intensa em comparação às fêmeas (Mirza *et al.*, 2015). Ademais, em animais machos, a morte celular parece ocorrer com mais frequência por necrose, enquanto em fêmeas a morte celular parece ocorrer, com mais frequência, por apoptose (Weis *et al.*, 2014).

Dessa forma, estudar uma ação sexualmente dimórfica da administração exógena de lactato seria uma contribuição adicional para a literatura científica (além da descrição de um possível efeito neuroprotetor geral do lactato).

Acreditamos que o lactato administrado exogenamente é capaz de elevar as concentrações de lactato no encéfalo, devido à capacidade do mesmo de cruzar a BHE (Halestrap, 2013; Mosienko *et al.*, 2015; Gerhart *et al.*, 2017; Brooks, 2018). Além disso, embora a glicose seja o substrato energético principal no encéfalo de adultos, em neonatos o lactato parece ser o substrato energético preferencial dos neurônios (Schurr *et al.*, 1997; Bergersen *et al.*, 2001; Schurr, 2006; Wyss *et al.*, 2011). Essa preferência do sistema nervoso central neonatal por lactato está relacionada à elevada expressão de MCT2 nos neurônios durante os primeiros dias de vida (Rafiki *et al.*, 2003). Associado a tudo isso, o comprometimento da BHE produzido pela HI neonatal (Muramatsu *et al.*, 1997) pode facilitar ainda mais a entrada desse substrato energético no SNC.

Embora não existam estudos com a administração de lactato em neonatos, em animais adultos a administração periférica de lactato (por vias intraperitoneal ou subcutânea), na dose de 2 g/kg, foi suficiente para produzir uma concentração plasmática de 10 mM de lactato, equivalente a uma concentração cerebral de 2 mM, a qual já demonstrou ser neuroprotetora (Morland *et al.*, 2017), inclusive em modelos de isquemia cerebral (Berthet *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2015).

Dessa forma, hipotetizamos que a administração periférica de uma dose de lactato de 2 g/kg logo após a HI poderia fornecer o substrato metabólico necessário para evitar a falha energética, reduzindo a lesão neural e melhorando os desfechos comportamentais dos animais após a lesão.

Devido à inexistência de dados da literatura avaliando a administração de lactato no modelo de HI neonatal, apesar de resultados promissores em animais adultos, o presente trabalho é original e pode contribuir de maneira significativa para a redução das sequelas produzidas pela HI neonatal, a qual ainda afeta um grande número de neonatos, além de não possuir um tratamento adequado de alta eficácia. Além disso, a comparação entre machos e fêmeas realizada no presente trabalho pode auxiliar na padronização de estratégias terapêuticas específicas para cada gênero, o que permitiria a obtenção de melhores desfechos clínicos no tratamento da HI neonatal.

## **2. Justificativa**

A HI neonatal ainda desperta grande interesse científico, já que é uma das principais causas de morte em recém-nascidos (Kurinczuk *et al.*, 2010). Quando esses sobrevivem, após o evento hipóxico-isquêmico, apresentam graves sequelas que comprometem o desenvolvimento adequado (Vannucci e Hagberg, 2004; Bano *et al.*, 2017), gerando um problema de saúde pública.

Além disso, a compreensão das respostas específicas relacionadas ao sexo durante a EHI também é crucial para o planejamento de intervenções clínicas adequadas para cada um dos sexos em recém-nascidos que sofreram um evento hipóxico-isquêmico.

Até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito da administração de lactato como estratégia terapêutica na HI neonatal e a única terapia validada em seres humanos para o tratamento da HI cerebral é a hipotermia terapêutica (Shankaran *et al.*, 2005, 2017; Tagin *et al.*, 2012). Entretanto essa terapia tem eficácia limitada, sobretudo se o evento hipóxico-isquêmico for severo ou a terapia for iniciada tardiamente (Laptook *et al.*, 2017).

Está claro que a privação energética, a inflamação e a excitotoxicidade são fatores importantes na fisiopatologia da HI. Assim, considerando a necessidade de terapias para a HI alternativas ou complementares à hipotermia e que o lactato é um importante substrato energético para o SNC, capaz de modular as respostas

inflamatórias (Hoque *et al.*, 2014), exercer papel protetor *in vitro* para excitotoxicidade (Jourdain *et al.*, 2016) e reduzir o estresse oxidativo (Tauffenberger *et al.*, 2019), se torna plausível a investigação dos possíveis efeitos neuroprotetores da administração de lactato no modelo animal de HI neonatal.

### **3. Hipótese**

A hipótese do presente trabalho é de que a administração exógena de lactato será capaz de elevar as concentrações plasmáticas deste substrato energético. A elevação das concentrações plasmáticas causará um aumento das concentrações encefálicas de lactato, o qual poderá atuar como um potente substrato energético no SNC de animais submetidos à HI neonatal, produzindo um efeito neuroprotetor a curto prazo de redução do volume de lesão cerebral e, conseqüentemente, reduzindo os déficits comportamentais subsequentes produzidos pela HI.

### **4. Objetivo geral**

Padronizar a administração sistêmica de lactato no modelo de HI em ratos Wistar com 7 dias de vida e investigar seu efeito sobre a lesão encefálica e as respostas reflexas e comportamentais em machos e fêmeas submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

#### **4.1. Objetivos específicos**

-Quantificar as concentrações plasmáticas de lactato (produzido endogenamente), em animais com 7 dias de vida, em diferentes tempos de recuperação (5, 20, 30 e 45 minutos) após a HI para a montagem de uma curva de recuperação de lactato;

-Quantificar as concentrações plasmáticas (aos 5, 30, 45 e 90 minutos) e hipotalâmicas (aos 5 e 30 minutos) de lactato, em animais com 7 dias de vida, após a administração de lactato exógeno (na dose de 2 g/kg), para a montagem de uma curva de lactato em condições basais (sem o evento hipóxico-isquêmico);

-Avaliar, em fatias cerebrais coradas com cloreto de tetrazólio (TTC), o volume de lesão encefálica a curto prazo (48h após a HI, em P9) em animais submetidos à HI e tratados ou não com lactato;

-Avaliar as respostas reflexas e comportamentais em ratos submetidos à HI e que receberam ou não a administração de lactato, com o uso dos testes de geotaxia

negativa e reflexo de endireitamento (em P8 e P14), reconhecimento olfatório (em P14) e teste do cilindro (em P20).

## **5. Materiais e métodos**

### **5.1. Animais**

Foram utilizados 288 ratos Wistar neonatos (P7), machos e fêmeas (36 ninhadas), provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, os quais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As ninhadas foram padronizadas logo após o nascimento, sendo compostas por 4 filhotes machos e 4 filhotes fêmeas, juntamente com as respectivas ratas-mães. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno de 49 x 34 x 16 cm. O assoalho das caixas foi recoberto com maravalha. As mães receberam alimentação e água *ad libitum* e os animais foram mantidos sob períodos de 12h luz/12h escuro e temperatura média de 22°C com umidade relativa do ar controlada (40-60%).

### **5.2. Aspectos éticos**

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução normativa nº30, de 02 de fevereiro de 2016, resolução normativa nº33 de 18 de novembro de 2016 e resolução normativa nº37, de 15 de fevereiro de 2018 do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011)* do *National Research Council of the National Academies* (National Research Council (US) Committee For The Update Of The Guide For The Care And Use Of Laboratory, 2011). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS (número 35651) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA, projeto número 2018-0258). Todas as fêmeas adultas (36 ratas mães não utilizadas nos experimentos) foram eutanasiadas após o período experimental pelo método da sobredose anestésica com isoflurano, de acordo com a RN nº 37 do CONCEA. Para isso, foram colocadas em uma câmara e foi administrado isoflurano na concentração de 5%. Após a observação de parada respiratória, a exposição ao

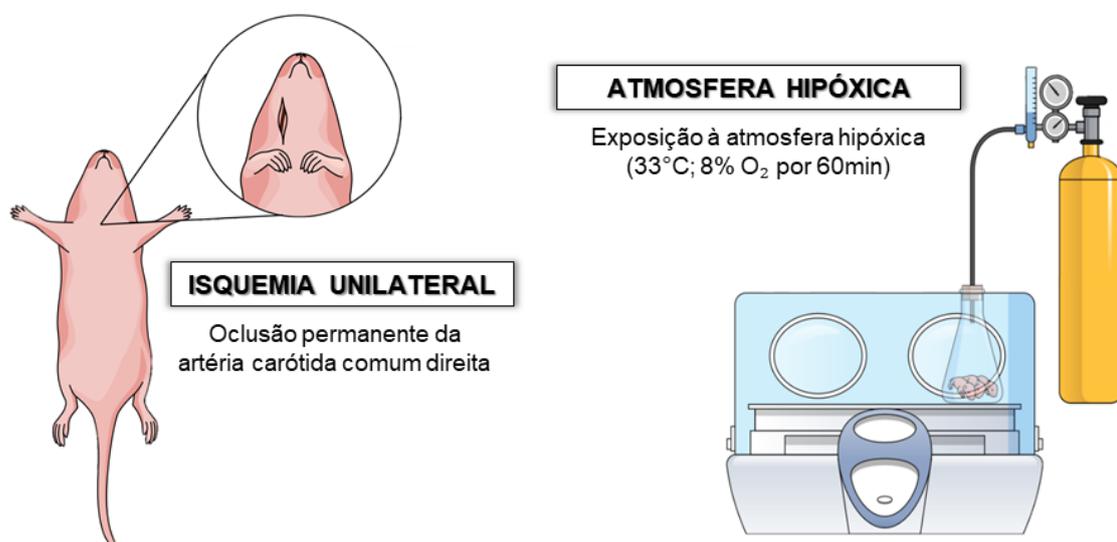
isoflurano continuou por mais dez minutos. Para o monitoramento das condições gerais dos animais filhotes e para limitar qualquer sofrimento que não tenha sido previsto, foram utilizados pontos finais humanitários (“*endpoints*”) de acordo com a resolução normativa nº25 do CONCEA de 2015 (Kassab e Zacarias, 2016). Foram analisados os seguintes parâmetros: baixo peso, extremidades azuladas e cianose, e má condição geral do animal. Em caso de necessidade, os animais em más condições foram eutanasiados por sobredose anestésica com isoflurano, conforme já descrito para as ratas-mães.

### **5.3. Modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal**

O procedimento de HI neonatal foi baseado em um modelo já bastante consolidado na literatura científica, conhecido como modelo de Rice-Vannuci (Rice *et al.*, 1981). Todos os procedimentos de HI foram executados na UEA do HCPA. Os animais (P7) eram retirados das caixas-moradia e colocados em uma incubadora (Fanem C186TS) com a temperatura controlada, para manutenção da temperatura corporal a 37°C e escolhidos aleatoriamente por sorteio para a cirurgia. Em uma cama cirúrgica aquecida e sob anestesia com isoflurano (5% para indução e 3% para manutenção), os animais foram submetidos à cirurgia para a oclusão da artéria carótida comum direita. Para isso, foi realizada uma incisão longitudinal na superfície ventral do pescoço (paralela e aproximadamente dois milímetros lateral à traqueia), facilitando o acesso à carótida comum direita, que foi isolada do nervo vago com o auxílio de duas pinças de precisão (anguladas a 45°). A carótida comum direita foi ocluída permanentemente, por meio de nó com fio cirúrgico (Seda 4.0). Após a oclusão, a ferida operatória foi suturada com dois pontos internos (com fio Seda 4.0). Todo o processo cirúrgico (incluindo o tempo para o início da anestesia) foi executado em menos de 10 minutos. Após a cirurgia, os filhotes voltaram para a incubadora para que se recuperassem e, então, retornaram às respectivas caixas-moradia, juntamente com as ratas-mães, onde foram mantidos por aproximadamente 2h. Após esse período de recuperação, os animais foram alocados em câmara para hipóxia (4 animais por câmara) e expostos à atmosfera hipóxica (mistura certificada de 8% de O<sub>2</sub> e 92% de N<sub>2</sub>) por 60 minutos a 33°C. A câmara consistia de um kitasato de 2L colocado dentro da incubadora Fanem C186TS (Fabres *et al.*, 2018). O fluxo de gás infundido para a câmara de hipóxia foi de 5L/min. O gás era previamente umidificado e a umidade dentro da câmara foi mantida em aproximadamente 70%. A temperatura

de 33°C (temperatura da câmara) corresponde à temperatura do ninho (Hulshof *et al.*, 2011) e a temperatura corporal dos animais foi monitorada com o uso de um termômetro clínico infravermelho (Incoterm TCI1000) e se manteve em torno de 36,5-37°C. A temperatura e a umidade da câmara foram verificadas com a utilização de um termo-higrômetro (Incoterm, TH50). Terminada a exposição hipóxica, os filhotes eram retirados da câmara hipóxica e colocados em recuperação em uma caixa sob aquecimento (dentro da incubadora) para a manutenção da temperatura por aproximadamente 30 minutos e, então, retornavam às caixas-moradia com as ratas-mães. Os animais do grupo SHAM foram submetidos à cirurgia fictícia, sem a oclusão carotídea e foram mantidos em normóxia. Uma representação detalhada do modelo de HI pode ser vista na Figura 3.

Esse modelo experimental tem uma taxa de mortalidade descrita na literatura de aproximadamente 20% (Lafemina *et al.*, 2006; Fabres *et al.*, 2018). Portanto, nessa dissertação, também foi realizada uma análise do percentual das mortes nos experimentos conduzidos (item 6.1 da seção Resultados).



**Figura 3.** Esquema representativo do modelo animal de HI neonatal de Rice e Vannucci (Rice *et al.*, 1981). Basicamente, o modelo consiste em duas etapas. Primeiro, uma incisão é feita no pescoço do animal para a localização da artéria carótida comum direita, que é ocluída permanentemente causando uma isquemia cerebral unilateral no encéfalo do animal. Os animais passam por um período de recuperação de cerca de 2h juntamente com as ratas-mães e, em seguida, são alocados em uma câmara com atmosfera hipóxica (8% O<sub>2</sub>) por 60 minutos (Figura de autoria própria).

#### 5.4. Grupos experimentais

Para o desenvolvimento deste trabalho, os ratos Wistar com 7 dias de vida (P7) foram divididos em 4 grupos experimentais: **grupo HI**, **grupo HI+LAC**, **grupo SHAM** e **grupo SHAM+LAC** (descritos abaixo). Todos os grupos continham animais machos e fêmeas para permitir a análise do dimorfismo sexual:

- **Grupo HI:** os animais do grupo HI foram submetidos ao procedimento de HI neonatal (oclusão carotídea e exposição hipóxica), mas receberam apenas a administração de tampão fosfato-salino (PBS) após a HI;
- **Grupo HI+LAC:** os animais do grupo HI+LAC foram submetidos ao procedimento de HI neonatal (oclusão carotídea e exposição hipóxica) e receberam a administração de lactato após a HI (os detalhes da administração de lactato estão descritos a seguir, no item 5.5);
- **Grupo SHAM:** os animais do grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia fictícia (sem a oclusão da carótida), colocados em uma câmara normóxica exposta ao ar ambiente (sem exposição hipóxica) e receberam apenas a administração de veículo (PBS) nos mesmos momentos dos animais do grupo SHAM+LAC;
- **Grupo SHAM+LAC:** os animais do grupo SHAM+LAC foram submetidos a uma cirurgia fictícia (sem a oclusão carotídea), colocados em uma câmara normóxica exposta ao ar ambiente (sem exposição hipóxica) e receberam a administração de lactato nos mesmos momentos dos animais do grupo HI+LAC;

Cada ninhada era composta por 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). Assim, cada animal de uma mesma ninhada foi alocado em um grupo experimental distinto (4 grupos experimentais x 2 sexos = 8 animais), evitando o efeito ninhada.

### 5.5. Administração de lactato

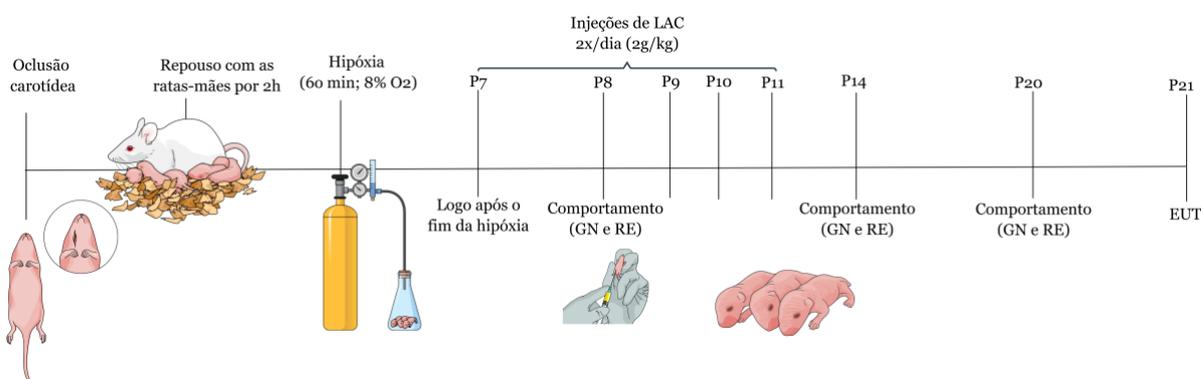
Com base em estudos prévios que avaliaram a administração de L-lactato de sódio e observaram efeitos neuroprotetores em animais adultos, a dose de lactato utilizada no presente trabalho foi de 2 g/kg (E *et al.*, 2013; Morland *et al.*, 2017). Após a indução da HI, a solução de lactato de sódio (Sigma, L71718), diluído em solução de PBS (pH 7,4), foi administrada por via intraperitoneal na dose determinada de 2 g de lactato por kg de peso corporal, em um volume de solução de 5 µL por grama de peso nos animais dos grupos HI+LAC e SHAM+LAC. Os animais dos grupos HI e SHAM receberam apenas injeções de veículo (PBS) na mesma frequência e nos mesmos volumes dos animais que receberam lactato. Uma solução estoque foi

preparada em ambiente asséptico e os materiais utilizados no preparo e na administração foram previamente autoclavados.

## 5.6. Experimentos-piloto

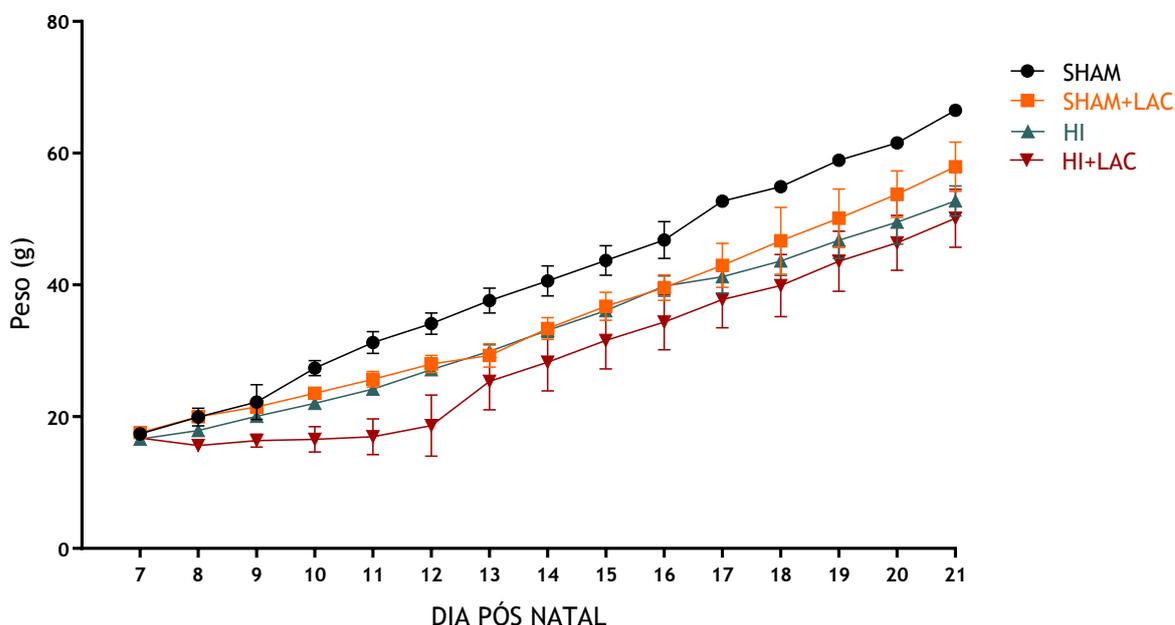
Devido à falta de dados na literatura acerca da administração de lactato em neonatos, inicialmente foram realizados alguns experimentos para a padronização do desenho experimental. A partir disso, chegamos ao desenho experimental determinado para esta dissertação, descrito a seguir, no item 5.9.

O nosso primeiro desenho experimental envolveu a administração de lactato por 5 dias consecutivos, desde o P7 até o P11 (Figura 4). A administração intraperitoneal de L-lactato (ou veículo) foi iniciada imediatamente após a HI e mantida por 5 dias (P7 a P11; 2x/dia, uma às 7:30h e outra às 15:30h). No P8, P14 e P20, os animais foram submetidos a dois testes comportamentais: geotaxia negativa, teste em que o animal é posicionado em um plano inclinado de 35° e é medida a latência para retornar à posição inicial; e o reflexo de endireitamento, teste em que o animal é posicionado em decúbito dorsal e é medida a latência para o animal se desvirar e colocar as 4 patas novamente em contato com a superfície. A eutanásia foi realizada em P21 (14 dias após a HI).



**Figura 4.** Linha do tempo do experimento-piloto. Em P7, os animais foram submetidos à HI neonatal (cirurgia de oclusão carotídea unilateral seguida de um período de recuperação com as ratas-mães e subsequente exposição hipóxica). Imediatamente após a hipóxia, os animais receberam a primeira injeção de lactato ou PBS, que era mantida por 5 dias (de P7 a P11; 2x por dia). Em P8, P14 e P20, os animais foram submetidos a dois testes comportamentais: geotaxia negativa e reflexo de endireitamento. A eutanásia foi realizada em P21 (14 dias após a HI). LAC: lactato; GN: geotaxia negativa; RE: reflexo de endireitamento; EUT: eutanásia.

Nesse experimento-piloto, foi observado que os animais que recebiam lactato apresentaram uma dificuldade em ganhar peso: tanto nos animais do grupo HI+LAC quanto nos animais do grupo SHAM+LAC (Figura 5).

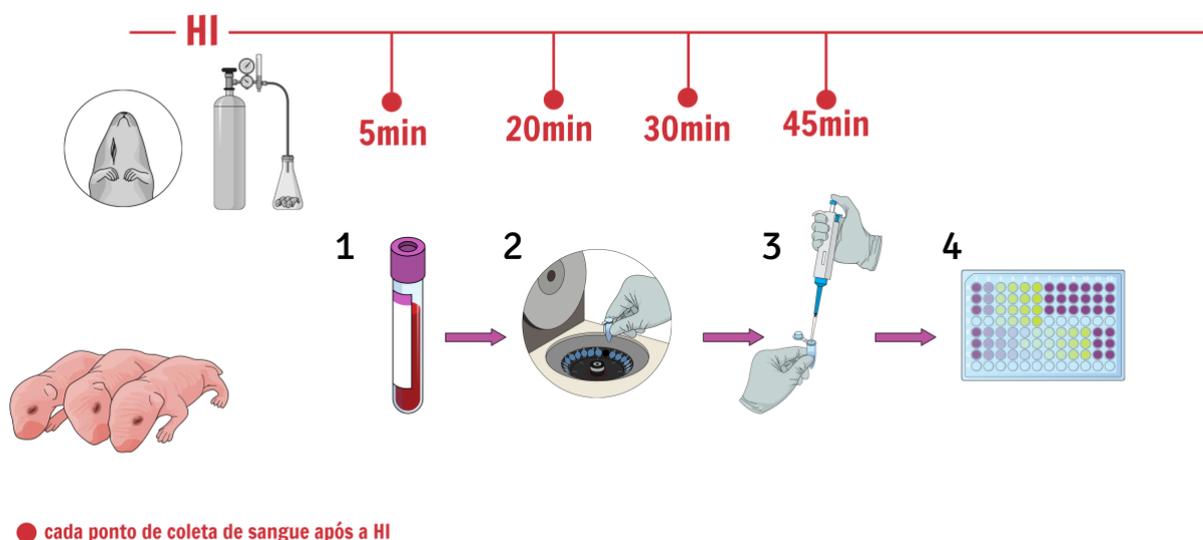


**Figura 5.** Peso dos animais ao longo dos dias do experimento-piloto. Em P7, todos os grupos iniciaram com o mesmo peso corporal médio. Os animais do grupo SHAM ganharam peso normalmente ao longo do tempo. Os animais do grupo HI apresentaram um peso corporal menor ao longo do tempo, conforme seria esperado. Entretanto, os animais do grupo SHAM+LAC também apresentaram esse menor padrão de peso e os animais do grupo HI+LAC apresentaram um peso corporal médio ainda menor. Os dados estão expressos como média±EPM (n=2-4; como o n foi muito baixo no experimento-piloto, não foi realizada análise estatística, apenas a observação qualitativa da condição geral dos animais).

Também foi observada uma piora na condição geral dos animais, principalmente nos primeiros dias após a cirurgia (P7-P11, período em que estavam recebendo lactato). O peso dos animais HI+LAC chegou a ser cerca de 45% menor em relação aos animais do grupo SHAM em P11, último dia de injeção, e o grupo SHAM+LAC teve um peso aproximadamente 18% menor nesse mesmo momento. Não se encontram dados na literatura em relação à perda de peso após a administração de lactato em neonatos. Entretanto, um efeito anorexígeno do lactato já foi descrito em ratos adultos (Silberbauer *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 2008). Dessa forma, em conjunto com a equipe de veterinários da UEA/HCPA definimos um novo desenho experimental, com menor manipulação e um número menor de injeções de lactato. Sabe-se que a manipulação pode ser um fator que eleva os níveis endógenos de lactato (Carrard *et al.*, 2016) e, juntamente com as injeções de lactato exógeno, poderiam causar este efeito anorexigênico.

### 5.7. Curva de concentração plasmática de lactato após a HI

Não se encontram dados na literatura acerca do papel do lactato na hipóxia-isquemia neonatal. Portanto, foi realizada uma curva de tempo para compreender a resposta do lactato endógeno após o evento hipóxico-isquêmico (Figura 6). Como é conhecido que o lactato endógeno aumenta durante a HI (Shalak e Perlman, 2004), coletamos o sangue troncular dos animais em 4 tempos diferentes após o final da hipóxia: 5, 20, 30 ou 45 minutos. Essa curva permitiu avaliar o tempo de retorno da concentração de lactato endógeno aos níveis basais (após a HI), a fim de evitar que uma administração exógena pudesse causar uma sobrecarga de lactato nos animais (e intensificar a perda de peso dos animais devido a um possível efeito anorexigênico, conforme descrito anteriormente).

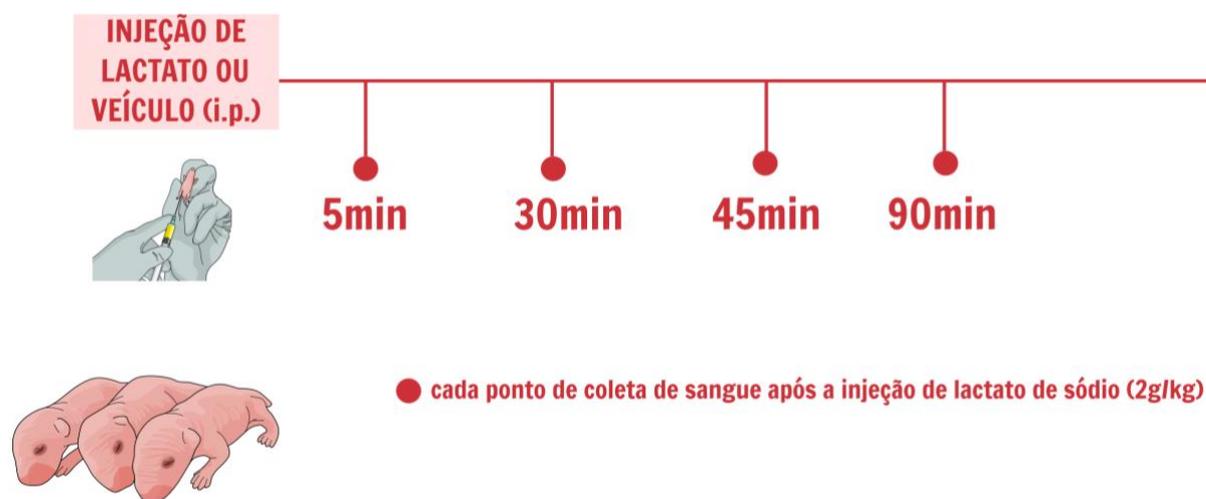


**Figura 6.** Linha do tempo indicando os momentos de coleta do sangue troncular para a curva de concentração plasmática de lactato após a HI. Após o procedimento de HI, os animais neonatos (P7) foram decapitados em diferentes tempos (5, 20, 30 ou 45 minutos) para a coleta do sangue troncular. O sangue foi coletado em microtubos contendo EDTA (passo 1), e centrifugado (passo 2). O sobrenadante foi coletado com uma pipeta após a centrifugação e transferido para outro tubo (passo 3). O lactato foi dosado no sobrenadante por método colorimétrico (passo 4) utilizando um espectrofotômetro com leitor de microplacas (ver item 5.10 para mais detalhes sobre o procedimento de dosagem).

### 5.8. Curva de concentração de lactato em condições basais

Para analisar se a concentração plasmática de lactato aumentava após a injeção de lactato exógeno e em quanto tempo essas concentrações retornavam aos valores basais, foi realizada uma curva de tempo com a injeção de uma solução de lactato (dose de lactato de 2 g/kg) ou veículo (PBS pH 7,4). Para isso, foi feita uma

injeção intraperitoneal de lactato na dose escolhida (2 g/kg) e o sangue troncular foi coletado em 4 momentos distintos: 5, 30, 45 ou 90 minutos após a injeção de lactato ou veículo (Figura 7). Logo após a coleta de sangue, o hipotálamo foi rapidamente dissecado e colocado em nitrogênio líquido para armazenamento em freezer -80°C, para posterior dosagem das concentrações de lactato no tecido nervoso. Entretanto, por limitações técnicas (restrição de reagentes e por algumas ninhadas não terem nascido nas datas esperadas), apenas dois tempos foram escolhidos para a análise do lactato hipotalâmico (5 ou 30 minutos após a injeção). O tecido escolhido foi o hipotálamo uma vez que o efeito anorexígeno do lactato (conforme observado no experimento-piloto) pode ocorrer via ação do lactato no hipotálamo, uma das principais estruturas envolvidas no controle da fome e da saciedade (Elizondo-Vega *et al.*, 2016).

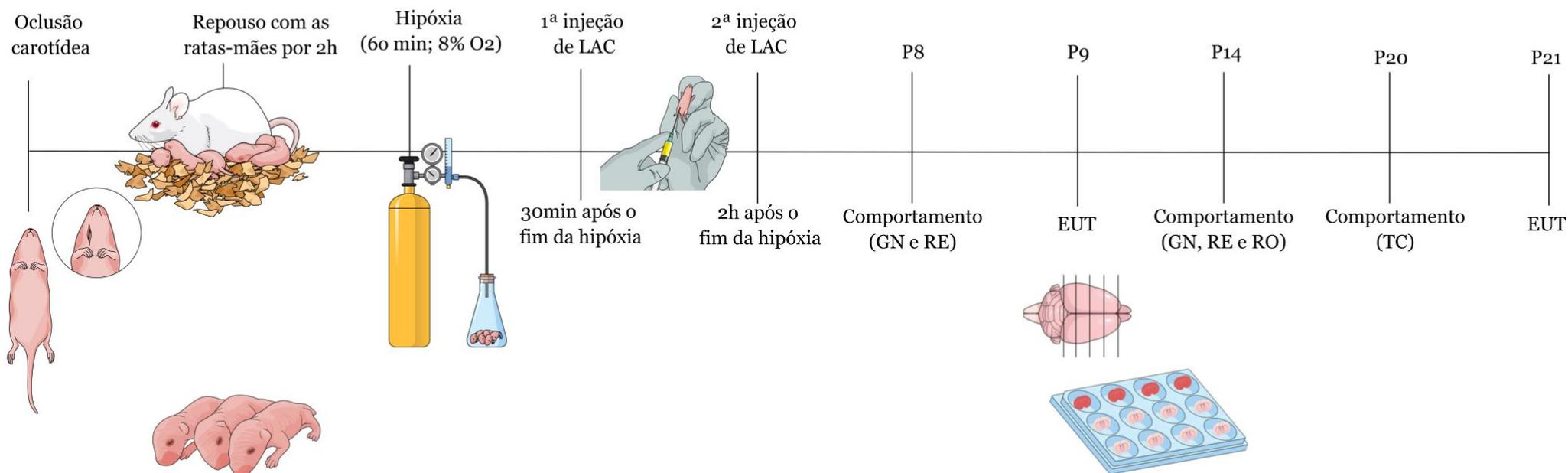


**Figura 7.** Linha do tempo indicando os momentos de coleta do sangue troncular para a curva de concentração plasmática e tecidual de lactato em condições basais. Após a injeção intraperitoneal de lactato ou PBS, os animais neonatos (P7) foram decapitados em diferentes tempos (5, 30, 45 ou 90 minutos) para a coleta do sangue troncular. O sangue foi coletado em microtubos contendo EDTA e centrifugado. O lactato foi dosado no sobrenadante por método colorimétrico utilizando um espectrofotômetro com leitor de microplacas (ver item 5.10 para mais detalhes sobre o procedimento de dosagem).

### 5.9. Desenho experimental final

Com os resultados dos experimentos descritos acima, conseguimos definir o melhor desenho experimental de acordo com a metabolização do lactato em ratos com 7 dias de vida que passaram pelo evento hipóxico-isquêmico. A primeira injeção de L-lactato (ou veículo) foi aplicada 30 minutos após a retirada dos animais da câmara hipóxica e a segunda 2h após a hipóxia (ou seja, 90 minutos após a primeira

injeção). A escolha do momento da primeira administração foi baseada na curva pós-HI, e utilizou um período em que os valores de lactato endógeno já estavam retornando aos valores basais, ou seja, em torno de 30 minutos após a HI (ver Figura 9, na seção Resultados, para detalhes). A segunda injeção foi realizada com base nos resultados da curva basal de administração de lactato. De acordo com o resultado encontrado no experimento da curva basal, o lactato administrado parece retornar às concentrações basais dentro de 90 minutos após a administração da dose de 2 g/kg (ver Figura 10, na seção Resultados, para detalhes). Por essas razões, esses foram os dois momentos definidos para as duas injeções de lactato. Além disso, para reduzir a manipulação dos animais (fator estressante para as ratas-mães e filhotes), foram realizadas apenas essas duas injeções e apenas em P7 (Figura 8).



**Figura 8.** Linha do tempo dos experimentos finais. Os animais passaram pelo procedimento de HI em P7. Para isso, foram submetidos à oclusão carotídea e então devolvidos às ratas-mães para um período de recuperação de 2h. Após, os animais foram alocados em câmara de hipóxia por 60 minutos. Passados 30 minutos após a hipóxia, os animais recebiam a primeira injeção de lactato (2 g/kg, i.p.) e retornavam às caixas-moradia, juntamente com as ratas-mães, até a segunda injeção de lactato (2 g/kg, i.p.), realizada 90 minutos após a primeira (2h após o fim da hipóxia). Em P8, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de geotaxia negativa e reflexo de endireitamento. Em P9, um grupo de animais foi eutanasiado para a coleta dos encéfalos e avaliação do volume de lesão encefálica. Os demais animais foram submetidos, em P14, aos testes comportamentais de geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e reconhecimento olfatório. Estes mesmos animais foram submetidos ao teste do cilindro em P20 e eutanasiados em P21. Todos os testes comportamentais foram realizados sempre no mesmo horário do dia, às 17h. LAC: lactato; GN: geotaxia negativa; RE: reflexo de endireitamento; RO: reconhecimento olfatório; TC: teste do cilindro; EUT: eutanásia.

### **5.10. Dosagens plasmáticas e teciduais de lactato**

Para as dosagens de lactato, os animais foram decapitados sem anestesia por um pesquisador treinado em uma sala separada de onde estavam os demais ratos e o sangue troncular foi coletado. Sabe-se que as concentrações plasmáticas de lactato são sensíveis à anestesia, aumentando quando os animais são expostos a anestésicos (Horn e Klein, 2013). Assim, a morte rápida por decapitação é necessária para preservar ao máximo as características morfológicas e neuroquímicas dos tecidos, bem como as concentrações plasmáticas de lactato, evitando possíveis alterações associadas à utilização de qualquer tipo de anestésico ou analgésico (Mazzanti *et al.*, 1986; Balcombe *et al.*, 2004; Kalenka *et al.*, 2010).

O sangue foi coletado e armazenado em tubos de coleta (BD Vacutainer EDTA/fluoreto) contendo fluoreto de sódio e EDTA, para prevenir a coagulação e a formação de lactato *ex-vivo* pela via glicolítica. A seguir, o sangue foi centrifugado (3000 x g) e o plasma foi coletado e armazenado a -20°C até o momento da dosagem. A dosagem de lactato plasmático foi realizada por um método enzimático colorimétrico utilizando um kit comercial (LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e as concentrações foram quantificadas em 5µL de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK), com comprimento de onda de 550 nm.

Os hipotálamos foram retirados do freezer -80°C no dia da quantificação. Para a determinação da concentração tecidual de lactato no hipotálamo, as amostras de tecido foram homogeneizadas em 100 µL de PBS 1X (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8,1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM; pH 7,4) em tubos contendo NaF 0,1 mM em um homogeneizador do tipo *Potter*. Após homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e utilizado para a determinação da concentração de lactato com o uso de um kit enzimático comercial (LABTEST Diagnóstica®, Brasil) e a leitura espectrofotométrica realizada em um espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200RT, Bichrom, UK) a 550 nm. A concentração de lactato no hipotálamo foi expressa em miligrama de lactato por grama de tecido e transformada para mM (Gleeson, 1982).

### **5.11. Parâmetros de desenvolvimento**

Ao longo do período de experimentos, foram observados alguns parâmetros físicos de desenvolvimento dos animais, como o peso corporal, o dia de abertura dos olhos e o índice anogenital (IAG).

Os animais eutanasiados em P9 foram pesados diariamente de P7 a P9. Os animais eutanasiados em P21 foram pesados em P7 e P8 e, a partir de então, a cada 2 dias até o momento da eutanásia.

A abertura dos olhos e o peso foram avaliados uma vez a cada dois dias e todos os animais da ninhada foram analisados (De Castro *et al.*, 2004). A média do dia da abertura dos olhos foi calculada.

A distância anogenital (DAG) é a medida entre o ânus e os órgãos genitais, usada como parâmetro de desenvolvimento sexual, normalmente como marcador fetal de ação dos andrógenos (van den Driesche *et al.*, 2011). O índice anogenital (IAG) foi calculado dividindo-se a DAG pelo peso do animal ao cubo ( $DAG/peso^3$ ) (Gallavan *et al.*, 1999). A distância anogenital (DAG) foi mensurada em milímetros com a utilização de um paquímetro digital (Faithfull Tools, Kent, UK) (Cavalari *et al.*, 2018).

#### **5.12. Volume de lesão encefálica (P9)**

Para o cálculo do volume de lesão encefálica, que foi realizado em P9, fatias dos encéfalos dos animais foram primeiramente corados com TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio), conforme descrito a seguir. O TTC sofre redução na presença de enzimas mitocondriais das células vivas, formando um sal de formazan que tem a coloração avermelhada, indicando as áreas de tecido viável.

Para a coloração com TTC, a retirada dos encéfalos foi realizada após anestesia profunda dos animais com isoflurano, seguida de perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%). Primeiramente, os animais foram anestesiados e submetidos à toracotomia para a exposição do coração. A seguir, um cateter foi introduzido através do ventrículo esquerdo até atingir a luz da aorta e um pequeno corte foi feito no átrio direito para produzir um orifício que permitisse a saída da solução de perfusão (NaCl 0,9%). A solução de perfusão foi infundida por ação da gravidade, a partir de um reservatório colocado cerca de 80 cm acima do nível dos animais. Após a perfusão, os encéfalos foram dissecados e cortados coronalmente, de modo manual, com o auxílio de navalhas, em 4 secções de 3 mm de espessura cada com o auxílio de um molde (*brain slicer*) confeccionado sob medida para as dimensões do encéfalo de um rato Wistar com 9 dias de vida. As secções de tecido foram incubadas por 20 minutos em uma solução de TTC 1% a temperatura ambiente e, em seguida, fixadas em paraformaldeído 4%. As secções coradas com TTC foram digitalizadas e analisadas utilizando o programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Cada

imagem digitalizada foi capturada juntamente com uma régua para permitir a criação de uma barra de calibração. Assim, foi possível delimitar as áreas de interesse com o auxílio do *mouse* do computador (Tu *et al.*, 2019). As áreas calculadas correspondentes às células vivas (coradas de vermelho com TTC) e células mortas (não-coradas) foram multiplicadas pela espessura das fatias (3mm) para a obtenção do volume (mm<sup>3</sup>). A partir disso, o cálculo do volume de lesão encefálica foi realizado de acordo com a fórmula a seguir e expresso como porcentagem do volume do hemisfério contralateral (Sun *et al.*, 2015):

$$\text{Volume de lesão encefálica (\%)} = \frac{(\text{volume do hemisfério contralateral} - \text{volume de tecido corado no hemisfério ipsilateral})}{\text{Volume total do hemisfério contralateral}} \times 100$$

### **5.13. Análise qualitativa dos encéfalos em P21**

Os encéfalos coletados em P21 estão em processamento para análises histológicas de volume de lesão pela técnica de hematoxilina e eosina, uma perspectiva do presente estudo. Entretanto, alguns destes encéfalos foram fotografados para permitir uma análise qualitativa da lesão.

### **5.14. Testes comportamentais**

No presente trabalho foram empregados quatro testes (descritos a seguir) para a avaliação comportamental dos animais. Dois destes testes (geotaxia negativa e reflexo de endireitamento) são testes de reflexos e foram realizados em P8 e P14, idades apropriadas para a realização dos mesmos (Heyser, 2004; Sanches *et al.*, 2012). Os outros dois foram o teste de reconhecimento olfatório (P14), para a análise sensorial (Favero *et al.*, 2006), e o teste do cilindro (P20) (Altman e Sudarshan, 1975), para a análise motora. Todos os testes foram realizados no mesmo horário do dia, sempre às 17h.

#### **5.14.1. Reflexo de geotaxia negativa**

Os animais foram posicionados sobre um plano inclinado em um ângulo de 35° (Teo *et al.*, 2017) e orientados para a direção negativa (base) do mesmo. Foi medido o tempo necessário para o animal realizar uma volta de 180°, voltando a cabeça para o ápice do plano inclinado, com tempo máximo de 60 segundos (Sanches *et al.*, 2017). O teste foi realizado em P8 e P14 e cada animal foi testado apenas uma vez (Teo *et*

*al.*, 2017). Conforme descrito na literatura (Heyser, 2004), o aparato de geotaxia negativa deve consistir de um plano inclinado com a superfície revestida por uma tela de tecido firme que permita o estabelecimento de uma leve fricção (evitando que o animal escorregue em uma superfície muito lisa). Na base da prancha que constitui o plano inclinado, foi colocado um coxim de tecido (similar a uma almofada) para suavizar uma possível queda do animal.

#### **5.14.2. Reflexo de endireitamento**

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma superfície plana e foi medida a latência do animal para voltar à postura inicial, apoiado sobre as quatro patas, com um tempo máximo de 15 segundos (Sanches *et al.*, 2017). O teste foi realizado em P8 e P14 e cada animal foi testado por 3 vezes (Teo *et al.*, 2017). A primeira medida foi feita no primeiro animal da ninhada, seguindo uma ordem até os outros 7 animais executarem o teste. Após a primeira rodada de testes, quando todos os animais da ninhada já haviam sido testados uma vez, a ordem de testagem foi repetida até que todos os animais passassem 3 vezes pelo teste. Para a apresentação e análise dos resultados, foi calculada a média dos 3 valores obtidos.

#### **5.14.3. Reconhecimento olfatório**

Para verificar a capacidade de reconhecimento e localização quando separados da mãe, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento olfatório em P14. Neste teste, os animais foram retirados da caixa-moradia e colocados no centro de uma caixa acrílica regular transparente (40 cm de comprimento x 20 cm de largura x 20 cm de altura). Em um dos lados da caixa foi colocada uma porção de maravalha proveniente da caixa moradia daquele animal e, no outro lado, uma porção de maravalha limpa. O animal foi colocado com a porção rostral direcionada para um dos lados da caixa não ocupados por maravalha e a latência para reconhecimento da maravalha proveniente da caixa-moradia foi cronometrada, com um limite de 60 segundos (Adaptado de SANCHES *et al.*, 2012).

#### **5.14.4. Teste do cilindro**

Em P20, os animais foram colocados dentro de um cilindro de *Plexiglass* (13 cm de diâmetro x 19 cm de altura). Para o teste do cilindro, o diâmetro do cilindro deve

ser aproximadamente 4 cm maior do que o comprimento do rato do nariz até a base da cauda (Russell *et al.*, 2011). O cilindro foi colocado sobre uma mesa transparente (de vidro) e os animais foram filmados de baixo, utilizando uma câmera de vídeo colocada sob a mesa, de modo que fosse possível a visualização do movimento das 4 patas dos animais. A atividade espontânea de contato das patas dianteiras com a parede do cilindro foi gravada durante 5 minutos e o número de toques com as patas dianteiras foi representado pela fórmula [(número de contatos contralateral/número total de toques) x 100 (Durán-Carabali *et al.*, 2017b).

### 5.15. Análise Estatística

Todos os dados foram analisados para a detecção de *outliers* pelo teste de ROUT, com o Q determinado como 1%. Após a exclusão dos *outliers*, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os dados foram considerados normais e submetidos ao teste de análise da variância (ANOVA) de duas vias seguida do *post hoc* de Bonferroni, para comparações múltiplas.

Para as dosagens de lactato após a HI, os fatores avaliados pela ANOVA de duas vias foram a hipóxia-isquemia (ou seja, a submissão ou não do animal à HI) e o tempo de análise (5, 20, 30 ou 45 minutos após a hipóxia).

Para análise das dosagens plasmáticas e teciduais de lactato após a injeção em condições basais (curva basal) os fatores utilizados foram o tempo (ou seja, o momento avaliado: 5, 30, 45 ou 90 minutos após a injeção) e a administração de lactato (ou seja, se o animal recebeu lactato ou PBS).

Para a análise do peso corporal, foi calculada a área sob a curva relativa ao peso de cada animal ao longo dos dias de experimento. Foram utilizados como fatores para a análise estatística da área sob a curva: a hipóxia-isquemia (ou seja, a submissão ou não do animal à HI) e o tratamento com lactato (ou seja, a administração de lactato ou de PBS). Estes mesmos dois fatores foram utilizados para a análise estatística do volume de lesão encefálica e dos testes comportamentais.

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). O nível de significância foi determinado como 0,05 e os testes foram realizados utilizando o programa GraphPad versão 8.0. O número amostral utilizado em cada uma das análises está detalhado na legenda de cada figura, na seção Resultados.

## 6. Resultados

## 6.1. Taxa de mortalidade

Os resultados da mortalidade ao longo dos experimentos estão representados na Tabela 1. Do total de 288 animais utilizados nesta dissertação, 48 foram utilizados para a curva basal de lactato (ou seja, não passaram pelos experimentos de hipóxia-isquemia). Em relação aos 240 animais que passaram pelo evento hipóxico-isquêmico ou pela cirurgia fictícia (SHAM), 31 animais morreram, correspondendo a uma porcentagem de perdas de 12,9%. Destes, 17 animais (7,1%) morreram por rompimento da carótida durante a cirurgia, 6 animais (2,5%) por canibalização materna e 8 animais (3,3%) foram eutanasiados por questões éticas, devido à condição geral dos mesmos (perda excessiva ou baixo ganho de peso e/ou exclusão do ninho pela rata-mãe).

**Tabela 1:** Taxa de mortalidade dos animais ao longo dos experimentos

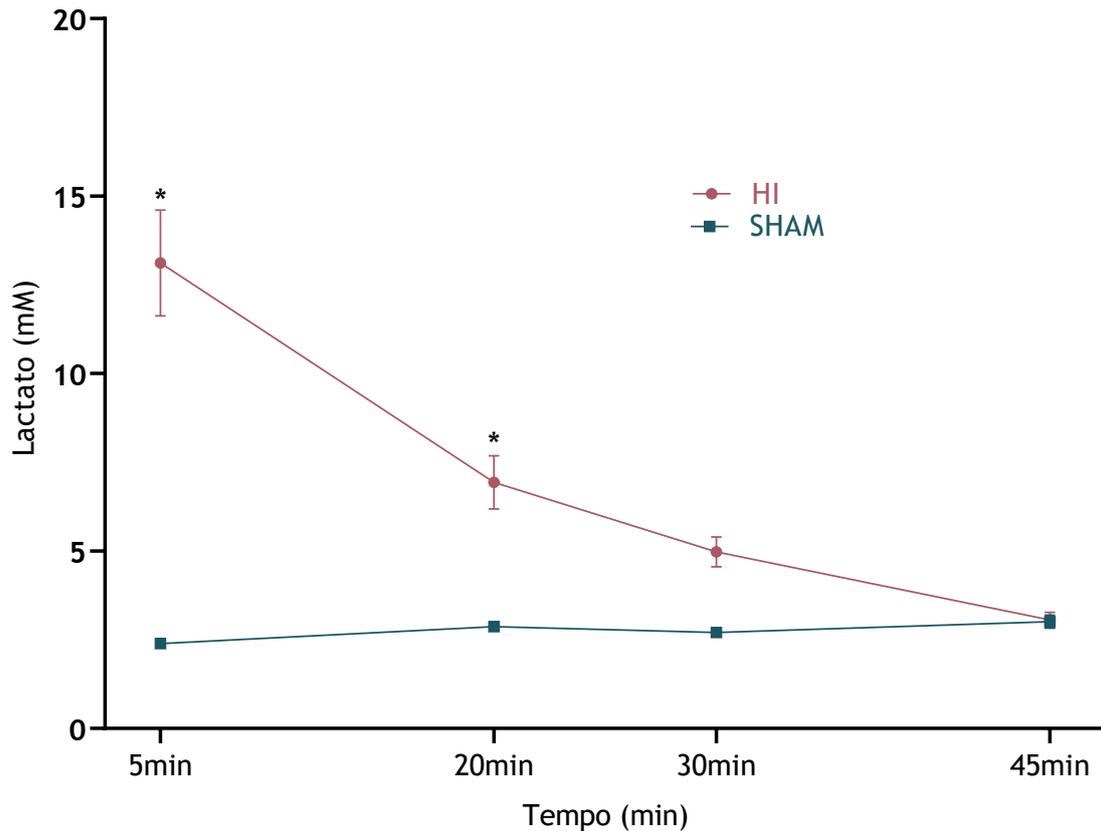
CAUSA DA MORTE	Nº de animais	%
Rompimento da carótida	17	7,1%
Canibalização materna	6	2,5%
Eutanásia por baixo peso	8	3,3%
<hr/>		
Total de animais	240	
Animais que morreram	31	12,9%
<b>TOTAL</b>	<b>31/240</b>	<b>12,9%</b>

## 6.2. Dosagens plasmáticas de lactato

Os dados das dosagens plasmáticas de lactato estão representados nas Figuras 9 e 10. Diversos pontos foram avaliados ao longo do tempo para a montagem das duas curvas de lactato (curva de recuperação pós-HI e curva basal após a administração de lactato) e, por isso, optamos por usar um número amostral mais baixo para cada ponto. A partir disso, como não observamos diferenças significativas entre machos e fêmeas (dados não mostrados) e, para a realização de uma análise estatística apropriada, os dados de machos e de fêmeas foram agrupados para a análise das dosagens plasmáticas de lactato.

### 6.2.1. Concentrações plasmáticas de lactato após a HI

Os valores da concentração plasmática de lactato após a HI estão representados na Figura 9.

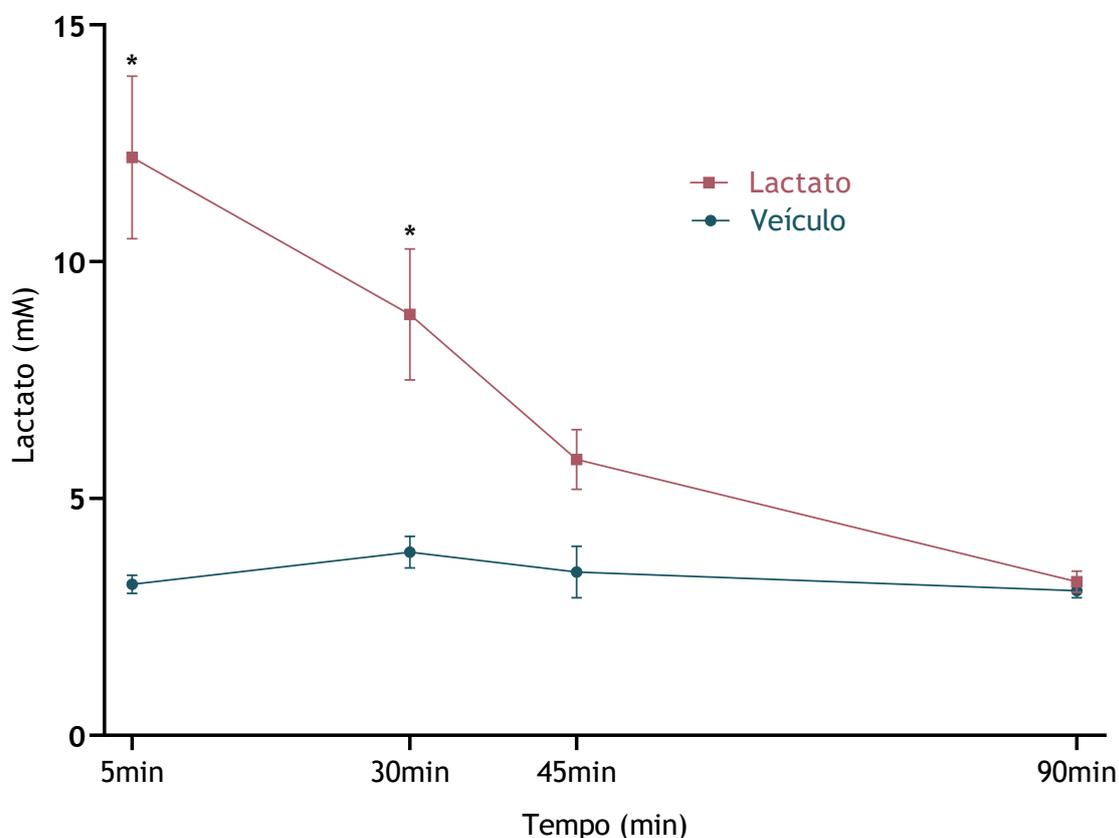


**Figura 9.** Concentrações plasmáticas de lactato (em mM) ao longo do tempo após o evento hipóxico-isquêmico. Os animais foram submetidos à HI e eutanasiados em 4 momentos diferentes após a HI. O sangue troncular foi coletado 5, 20, 30 ou 45 minutos após o fim da hipóxia para a determinação das concentrações plasmáticas endógenas de lactato. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média±EPM (n=8-10 animais por ponto); \*p<0,05 *versus* SHAM em um mesmo tempo avaliado.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito dos dois fatores avaliados: hipóxia-isquemia ( $F(1, 55)=69,54$ ,  $p<0,0001$ ) e tempo ( $F(3, 55)=16,51$ ,  $p<0,0001$ ), além da interação entre os fatores ( $F(3, 55)=20,63$ ,  $p<0,0001$ ). Nas comparações entre os grupos HI e SHAM, foi observado que os valores plasmáticos de lactato foram mais elevados no grupo HI, após o evento hipóxico-isquêmico, sendo o valor mais alto de cerca de 15 mM observado no primeiro ponto de coleta (5 minutos após a hipóxia,  $p<0,05$ ). As concentrações plasmáticas de lactato ainda se encontravam significativamente elevadas aos 20 minutos após a HI ( $p<0,05$ ), retornando a valores similares aos do grupo SHAM aos 30 minutos e mantendo-se assim aos 45 minutos ( $p>0,05$ ). Nos animais do grupo SHAM, as concentrações plasmáticas mantiveram-se baixas, em torno de 2,4 a 3 mM, ao longo de todos os tempos analisados.

### 6.2.2. Concentrações plasmáticas de lactato em condições basais

Os valores da concentração plasmática de lactato após uma injeção intraperitoneal de lactato ou veículo estão representados na Figura 10.

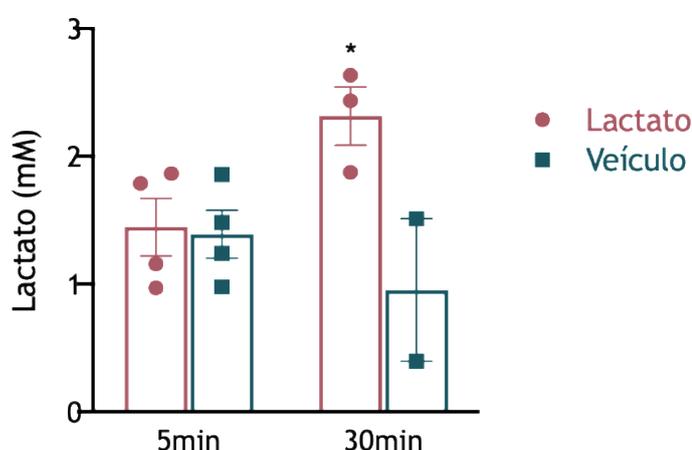


**Figura 10.** Concentrações plasmáticas de lactato (em mM) ao longo do tempo após a injeção de lactato ou tampão fosfato salino (veículo) PBS. Os animais com 7 dias de vida receberam injeções de lactato (2 g/kg) ou de PBS e tiveram o sangue troncular coletado em 4 momentos diferentes após a injeção. O sangue troncular foi coletado 5, 30, 45 ou 90 minutos após as injeções para determinação das concentrações plasmáticas de lactato. As concentrações plasmáticas de lactato aumentam rapidamente 5 minutos após a injeção de lactato exógeno, retornando aos valores basais entre 45 e 90 minutos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média±EPM (n=6-8 animais por ponto). \*p<0,05 versus Veículo em um mesmo tempo avaliado.

A ANOVA de duas vias mostrou efeito significativo dos dois fatores avaliados: a injeção de lactato ( $F(1, 40)=20,95$ ,  $p<0,0001$ ) e o tempo ( $F(3, 40)=4,809,51$ ,  $p=0,0059$ ), além da interação entre os fatores ( $F(3, 40)=4,540$ ,  $p<0,0079$ ). Como observado na Figura 10, as concentrações plasmáticas de lactato aumentam rapidamente após a administração de uma única injeção de lactato de sódio na dose de 2 g/kg ( $p<0,05$ ) e retornam aos valores basais entre 45 e 90 minutos. Os animais que receberam veículo (PBS) mantiveram concentrações plasmáticas de lactato de aproximadamente 3 mM ao longo do tempo ( $p>0,05$ ).

### 6.2.3. Concentrações de lactato no hipotálamo em condições basais

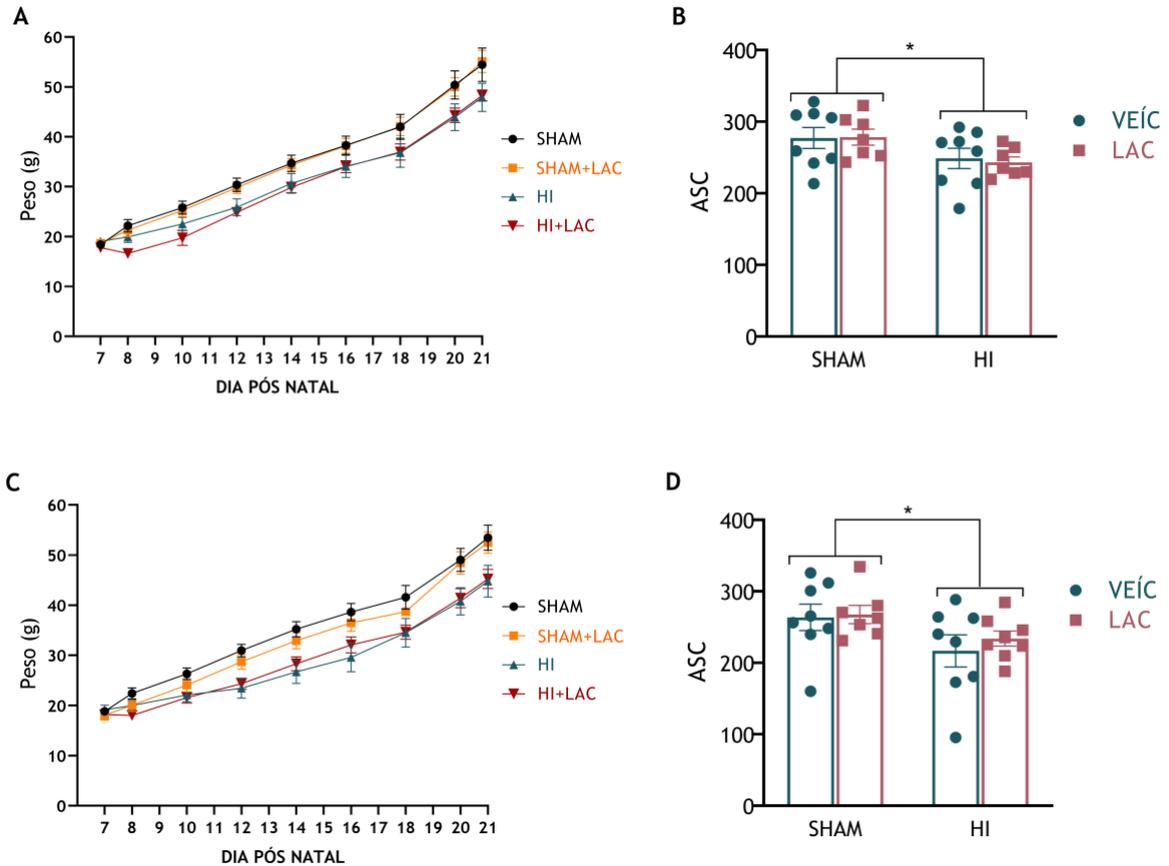
O resultado das dosagens da concentração de lactato no hipotálamo está representado na Figura 11. A ANOVA de duas vias detectou um efeito da injeção de lactato ( $F(1, 9)=6,937$ ,  $p=0,0272$ ), além da interação entre os fatores ( $F(1, 9)=5,885$ ,  $p=0,0382$ ). Aos 5 minutos após a injeção, as concentrações hipotalâmicas de lactato não apresentaram diferenças significativas entre os animais que receberam lactato e os que receberam PBS ( $p>0,05$ ). Entretanto, 30 minutos após a injeção, as concentrações hipotalâmicas de lactato foram significativamente maiores nos animais que receberam a injeção intraperitoneal de lactato ( $p<0,05$ ).



**Figura 11.** Concentrações teciduais de lactato (em mM) no hipotálamo após a injeção de lactato (2 g/kg, i.p.) ou PBS. Aos 5 minutos, não foi observada diferença nas concentrações hipotalâmicas de lactato entre os animais que receberam lactato e os que receberam PBS. Entretanto as concentrações de lactato no hipotálamo dos animais que receberam lactato foram significativamente maiores em relação aos que receberam PBS aos 30 minutos após a administração. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média±EPM ( $n=2-3$ ); \* $p<0,05$  versus Veículo 30 min.

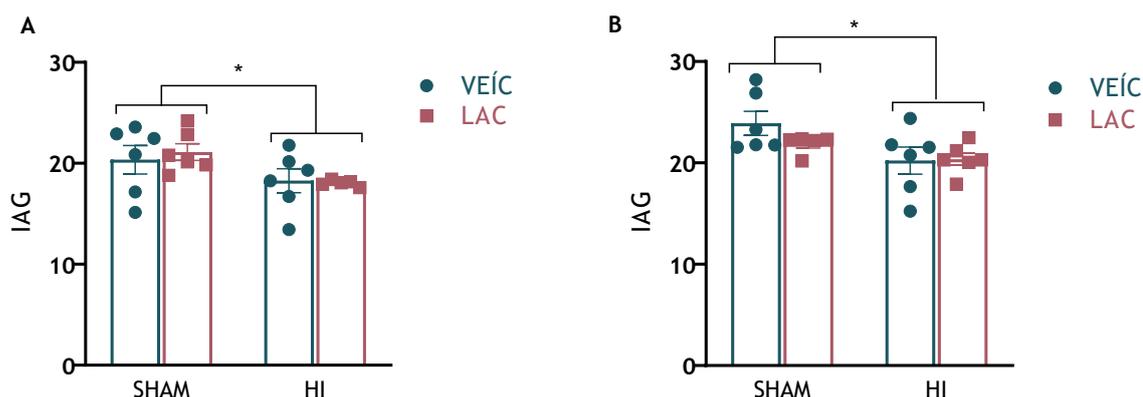
### 6.3. Parâmetros de desenvolvimento

Os resultados relativos ao peso corporal dos animais ao longo do tempo estão representados nas Figuras 12A (machos) e 12C (fêmeas). A análise da área sob a curva (ASC) relativa ao peso corporal (Figuras 12B e 12D) mostrou a existência de um efeito da hipóxia-isquemia, tanto em machos ( $F(1, 26)=6,376$ ,  $p=0,0180$ ) quanto em fêmeas ( $F(1, 27)=5,610$ ,  $p=0,0253$ ), com uma área menor nos animais submetidos à HI em relação aos animais SHAM. Não foi encontrada interação entre os fatores ( $p>0,05$ ). Nas comparações múltiplas não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ).



**Figura 12.** Peso dos animais ao longo dos 21 dias de experimento nos animais machos (A) e fêmeas (C) e a área sob a curva (ASC) de cada grupo experimental nos animais machos (B) e fêmeas (D). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator HI, indicando que os animais que passaram pela HI apresentaram uma ASC significativamente menor em relação aos animais dos grupos SHAM (\* $p < 0,05$ , efeito do fator HI). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média $\pm$ EPM ( $n=7-8$ ). VEÍC: veículo; LAC: lactato.

Os resultados do IAG estão na Figura 13. A ANOVA de duas vias mostrou a existência de efeito da hipóxia-isquemia em relação ao IAG, e este efeito foi observado tanto em machos ( $F(1, 19)=5,846$ ,  $P=0,0258$ ) quanto em fêmeas ( $F(1, 19)=6,615$ ,  $p=0,0187$ ). Os animais do grupo HI tiveram um IAG menor em relação aos animais do grupo SHAM, tanto nos machos (Figura 13A), quanto nas fêmeas (Figura 13B). Não foi encontrada interação entre os fatores ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13.** Índice anogenital (IAG) mensurado em P21 nos animais machos (A) e fêmeas (B). A ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo do fator HI, indicando que os animais que passaram pela HI apresentaram um IAG significativamente menor em relação aos animais dos grupos SHAM (\* $p < 0,05$ , efeito do fator HI). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média $\pm$ EPM ( $n=7-8$ ). VEÍC: veículo; LAC: lactato.

Em relação ao dia de abertura dos olhos, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, nem nos machos (Tabela 2) e nem nas fêmeas (Tabela 3) ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Dia de abertura dos olhos nos animais machos

Grupo experimental	Dia (média $\pm$ EPM)
SHAM	13,75 $\pm$ 0,25
SHAM+LAC	13,29 $\pm$ 0,35
HI	13,75 $\pm$ 0,25
HI+LAC	13,43 $\pm$ 0,36

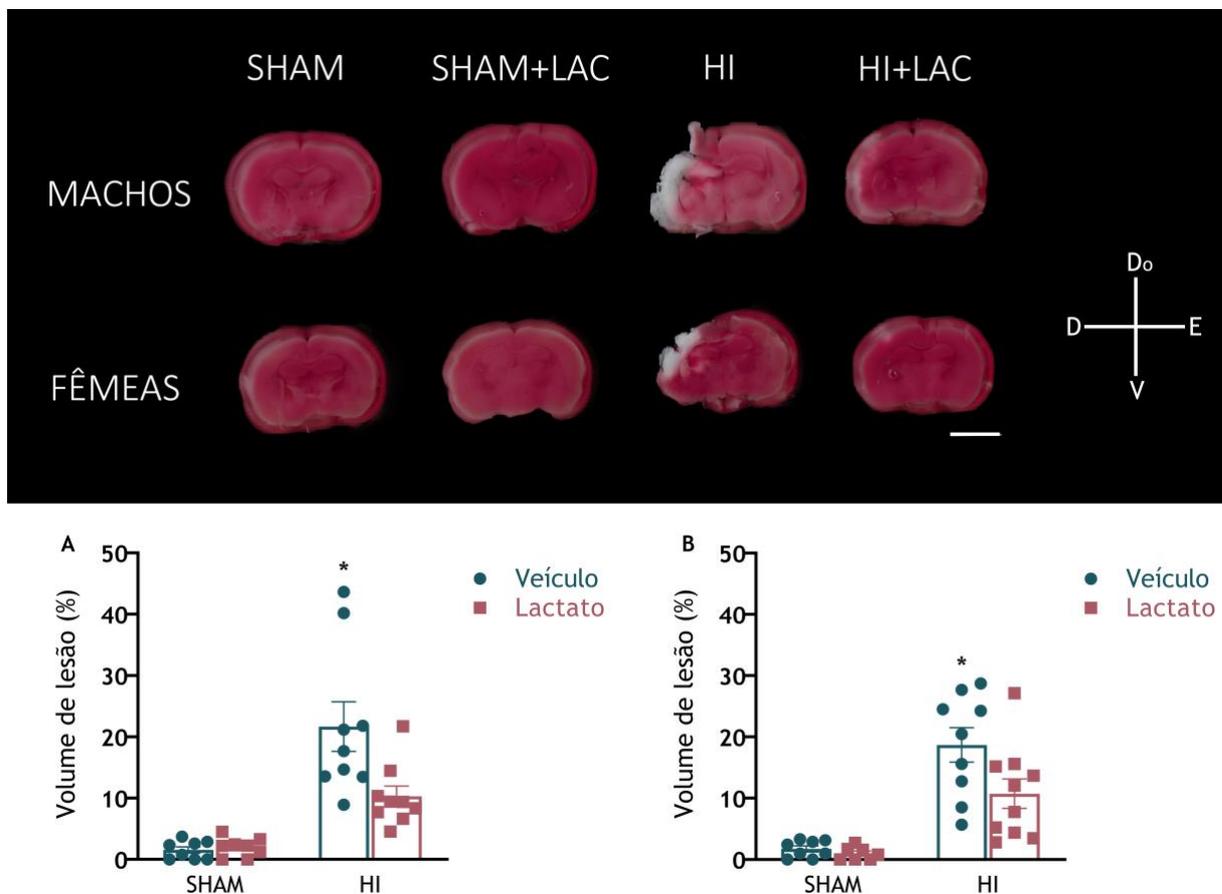
**Tabela 3.** Dia de abertura dos olhos nos animais fêmeas

Grupo experimental	Dia (média $\pm$ EPM)
SHAM	13,75 $\pm$ 0,25
SHAM+LAC	13,29 $\pm$ 0,35
HI	13,88 $\pm$ 0,12
HI+LAC	13,5 $\pm$ 0,32

#### 6.4. Volume de lesão (P9)

O volume de lesão encefálica (%) causada pela HI está representado na Figura 14. Em ambos os sexos, a ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores hipóxia-isquemia (machos:  $F(1, 30)=36,07$ ,  $p < 0,0001$ ; fêmeas:  $F(1, 30)=40,54$ ,  $p < 0,0001$ ) e tratamento com lactato (machos:  $F(1, 30)=5,333$ ,  $p=0,0280$ ; fêmeas:  $F(1, 30)=4,287$ ,  $p=0,0471$ ). A interação entre os fatores foi observada apenas nos machos ( $F(1,30)=6,263$ ,  $p=0,0180$ ). O *post hoc* de Bonferroni detectou diferença estatística significativa entre os grupos HI e HI+LAC ( $p < 0,05$ ), sendo o volume de lesão maior

nos grupos HI e menor nos grupos HI+LAC, tanto nos machos ( $p<0,05$ ) quanto nas fêmeas ( $p<0,05$ ).

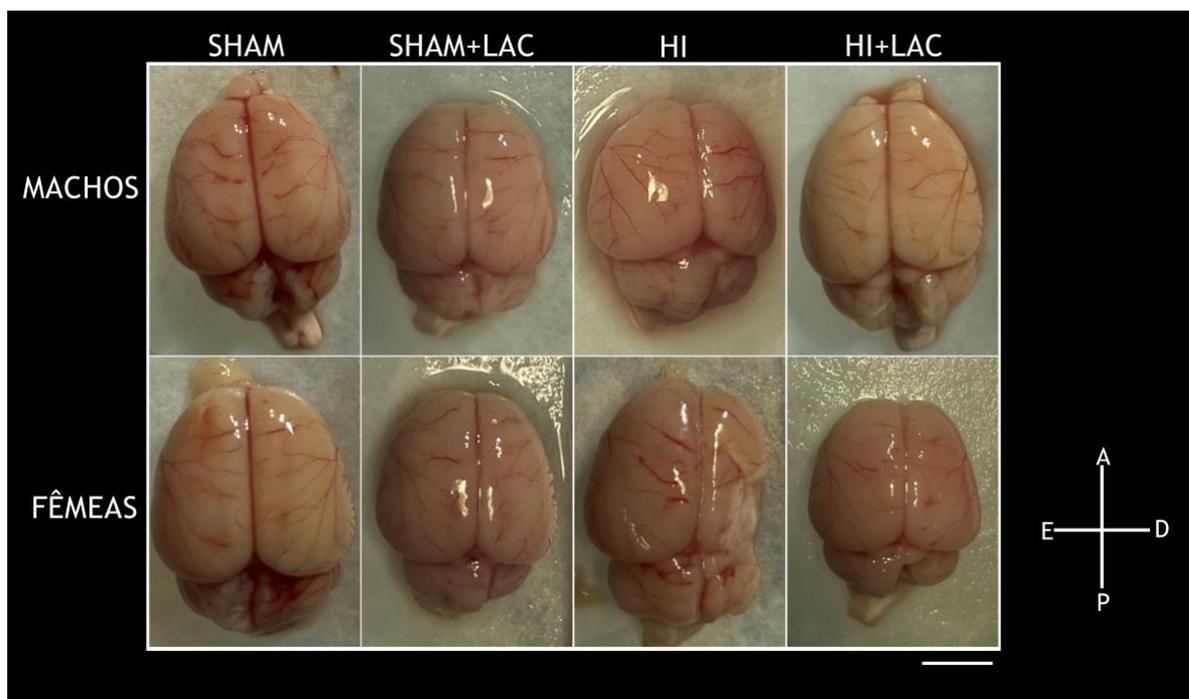


**Figura 14.** Volume de lesão encefálica avaliado em P9. A administração sistêmica de lactato reduziu o volume de lesão encefálica em animais neonatos submetidos à hipóxia-isquemia cerebral. A figura superior refere-se às imagens representativas de fatias cerebrais dos diferentes grupos experimentais coradas com cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). As áreas coradas em vermelho representam as regiões contendo células viáveis. As áreas em branco indicam regiões onde houve morte tecidual (lesão). As figuras A e B representam a quantificação do volume de lesão (% do hemisfério contralateral) em machos (A) e em fêmeas (B). Os animais submetidos à HI e tratados com lactato (grupo HI+LAC) apresentaram um volume de lesão encefálica menor do que os animais submetidos à HI e que receberam veículo (grupo HI+VEIC). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média±EPM ( $n=8-9$ ); \* $p<0,05$  versus HI+LAC. Orientação da figura do painel superior: Do, dorsal; V, ventral; D, direito, E, esquerdo. Barra de calibração: 0,5cm. VEÍC: veículo; LAC: lactato.

### 6.5. Análise qualitativa dos encéfalos em P21

A Figura 15 apresenta imagens representativas dos encéfalos de animais de cada um dos grupos experimentais, para a observação qualitativa da lesão encefálica. Essas imagens foram fotografadas logo após a dissecação dos encéfalos. Pode ser observado que os animais do grupo HI apresentaram uma redução no tamanho ou

uma perda tecidual no hemisfério ipsilateral à isquemia carotídea, o que parece ter sido revertido, ao menos parcialmente, com a administração de lactato (grupos HI+LAC). Essa diferença parece bem marcante quando são observados os encéfalos das fêmeas dos grupos HI e HI+LAC. Nos animais dos grupos SHAM (SHAM e SHAM+LAC) não foi observada lesão evidente.



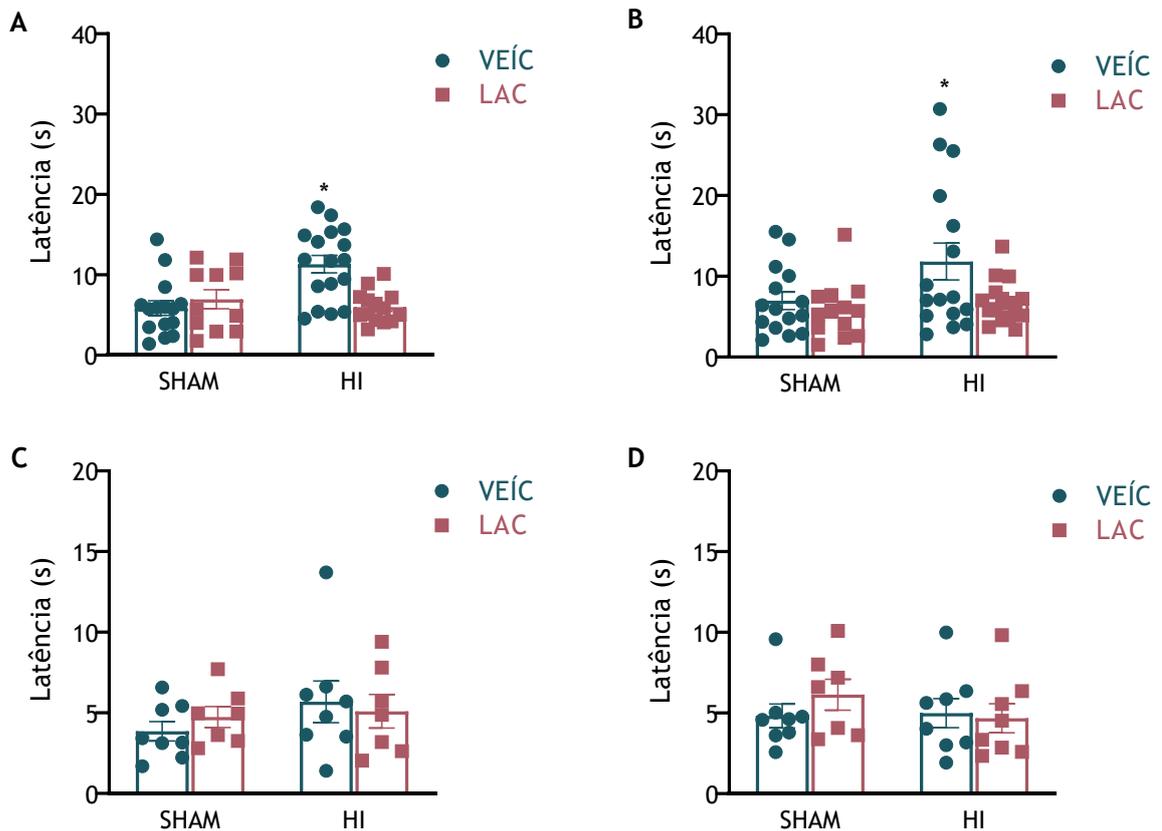
**Figura 15.** Imagens representativas de cada um dos grupos experimentais para a observação do dano encefálico em P21. As imagens foram fotografadas logo após a dissecação dos encéfalos. Os animais que passaram pela HI aparentam ter o hemisfério direito (ipsilateral à isquemia carotídea) menor ou com uma lesão mais evidente, principalmente nas fêmeas, o que parece ter sido revertido pela administração de lactato (grupos HI+LAC). Orientação da figura: A, anterior; P, posterior; D, direito; E, esquerdo. Barra de calibração: 0,5 cm.

## 6.6. Testes comportamentais

### 6.6.1. Geotaxia negativa

Os resultados do teste de geotaxia negativa estão representados nas Figuras 16A (machos, P8), 16B (fêmeas, P8), 16C (machos, P14) e 16D (fêmeas, P14). Nos animais machos em P8 (Figura 16A), a ANOVA de duas vias não detectou efeito dos fatores hipóxia-isquemia e lactato ( $p > 0,05$ ). Entretanto, se observou uma interação entre os fatores ( $F(1, 54) = 12,63$ ,  $p = 0,0008$ ). Nas fêmeas em P8 (Figura 16B), a ANOVA de duas vias mostrou a existência de efeito dos dois fatores: hipóxia-isquemia ( $F(1, 56) = 4,125$ ,  $p = 0,0470$ ) e tratamento com lactato ( $F(1, 56) = 4,125$ ,  $p = 0,0378$ ), porém não se observou interação entre os fatores. A exposição à HI leva ao aumento

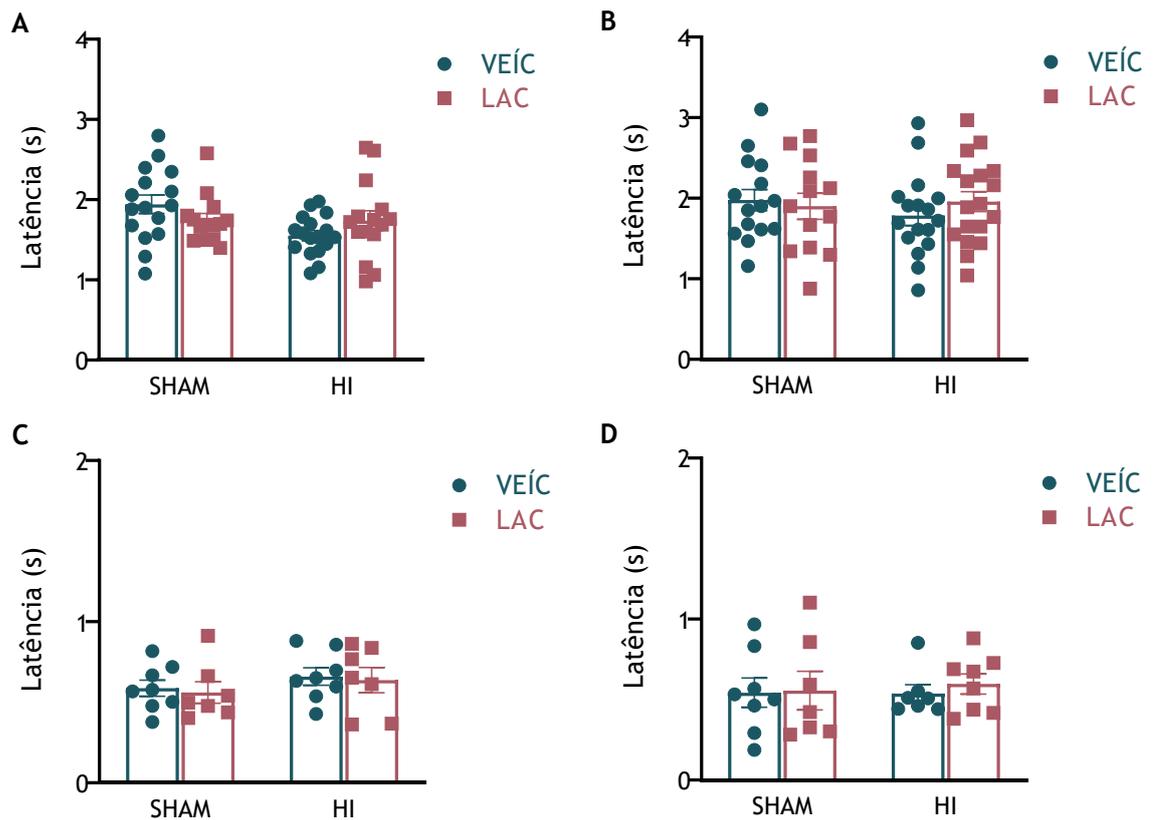
da latência para completar o teste em P8: a análise de Bonferroni detectou diferença estatística significativa entre os grupos HI e HI+LAC ( $p < 0,05$ ), de maneira que os animais do grupo HI apresentaram maior latência para completar a tarefa. Em P14, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na latência para completar o teste, nem em machos e nem em fêmeas ( $p > 0,05$ , Figuras 16C e 16D).



**Figura 16.** Latência (s) no teste de geotaxia negativa em P8 em machos (A) e fêmeas (B) ( $n=15-16$ ) e em P14 em machos (C) e fêmeas (D) ( $n=7-8$ ). Os animais que passaram pela HI levaram mais tempo para completar a tarefa em P8 ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média $\pm$ EPM; \* $p < 0,05$  versus HI+LAC. VEÍC: veículo; LAC: lactato.

### 6.6.2. Reflexo de endireitamento

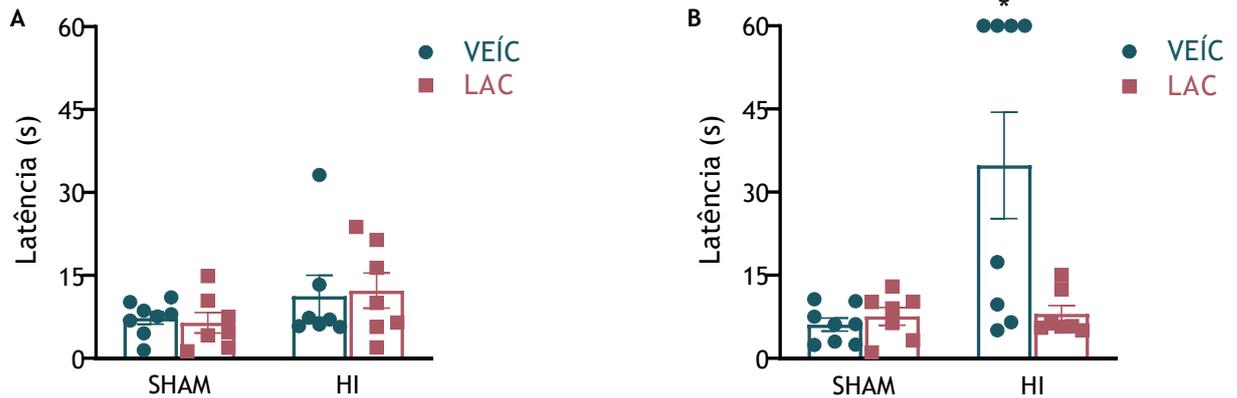
Os resultados do teste do reflexo de endireitamento estão representados nas Figuras 17A (machos, P8), 17B (fêmeas, P8), 17C (machos, P14) e 17D (fêmeas, P14). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na latência para completar o teste ( $p > 0,05$ ), independentemente da idade (P8 e P14) ou do sexo analisado.



**Figura 17.** Latência (s) no teste do reflexo de endireitamento em P8 em machos (A) e fêmeas (B) (n=15-16) e em P14 em machos (C) e fêmeas (D) (n=7-8). Não foi detectada diferença entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média±EPM. VEÍC: veículo; LAC: lactato.

### 6.6.3. Reconhecimento olfatório

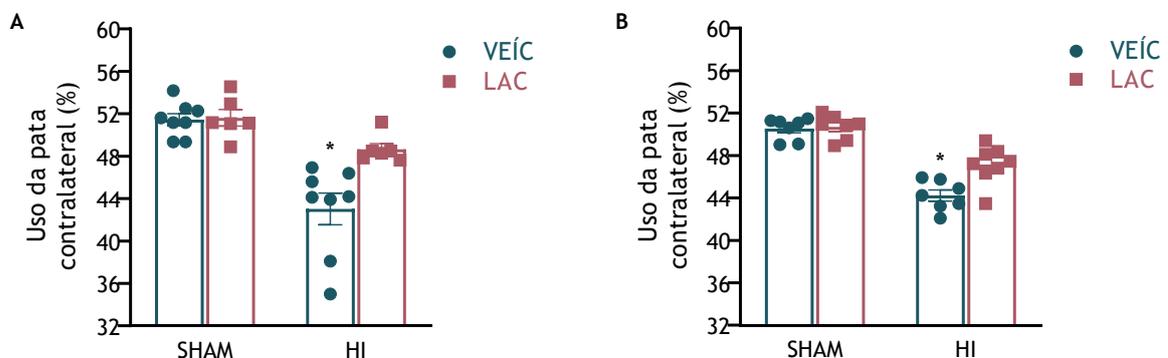
Os resultados do teste de reconhecimento olfatório estão representados nas Figuras 18A (machos) e 18B (fêmeas). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no desempenho dos animais machos no teste ( $P > 0,05$ ). Nas fêmeas (Figura 18B), entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou efeito dos fatores hipóxia-isquemia ( $F(1, 26)=7,598$   $P=0,0105$ ) e tratamento com lactato ( $F(1, 26)=5,736$ ;  $P=0,0241$ ), além da existência de interação ( $F(1, 26)=7,161$ ;  $p=0,0127$ ) entre os mesmos. Nas comparações múltiplas, se observou diferença estatística entre os grupos HI e HI+LAC ( $p < 0,5$ ), com um melhor desempenho no teste entre as fêmeas que receberam lactato após a HI (grupo HI+LAC).



**Figura 18.** Latência (s) para detecção da maravalha da caixa-moradia no teste do reconhecimento olfatório realizado em P14 em machos (A) e fêmeas (B). As fêmeas que passaram pela HI levaram mais tempo para reconhecer a maravalha da caixa-moradia ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas e estão representados como média $\pm$ EPM ( $n=7-8$ ); \* $p < 0,05$  versus HI+LAC. VEÍC: veículo; LAC: lactato.

#### 6.6.4 Teste do cilindro

Os resultados do teste do cilindro estão representados nas Figuras 19A (machos) e 19B (fêmeas). Em ambos os sexos, a ANOVA de duas vias detectou efeito dos fatores hipóxia-isquemia (machos:  $F(1, 24)=31,34$ ,  $p < 0,0001$ ; fêmeas:  $F(1, 25)=91,63$ ,  $p < 0,0001$ ) e tratamento com lactato (machos:  $F(1, 24)=8,118$ ,  $p=0,0089$ ; fêmeas:  $F(1, 25)=8,997$ ,  $p=0,0060$ ), além de interação entre os fatores (machos:  $F(1, 24)=7,185$ ,  $p=0,0131$ ; fêmeas:  $F(1, 25)=7,190$ ,  $p=0,0128$ ). O *post-hoc* de Bonferroni mostrou diferença significativa entre os grupos HI e HI+LAC tanto em machos ( $p < 0,05$ ) quanto em fêmeas ( $p < 0,05$ ). Os animais que passaram pela HI e não receberam lactato apresentaram uma redução na utilização da pata contralateral à isquemia cerebral, o que não foi observado nos animais submetidos à HI e que receberam o tratamento com lactato (grupo HI+LAC).



**Figura 19.** Percentual (%) do uso da pata contralateral à isquemia, avaliado pelo teste do cilindro, em machos (A) e fêmeas (B). Os animais que passaram pela HI utilizaram menos a pata contralateral (pata esquerda) à isquemia carotídea. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni e estão representados como média $\pm$ EPM ( $n=6-8$ ); \* $p < 0,05$  versus HI+LAC. VEÍC: veículo; LAC: lactato.

## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo padronizou e avaliou o uso do lactato no modelo de HI neonatal. Nossos resultados fornecem evidências indicativas de um possível uso da administração de lactato como uma terapia na HI neonatal, capaz de reduzir em cerca de 50% o volume de lesão encefálica logo após o episódio hipóxico-isquêmico (a curto prazo), tanto em machos quanto em fêmeas. Além disso, a administração de lactato parece ter melhorado os desfechos motores analisadas nos testes comportamentais, recuperando o desempenho dos animais submetidos à HI e que receberam o tratamento com lactato (grupo HI+LAC). Assim, com base na fisiopatologia da HI neonatal, parece que a administração de lactato pode ser uma estratégia de intervenção interessante e eficaz.

No presente estudo foi utilizado o modelo experimental de HI neonatal de Rice e Vannucci (Rice *et al.*, 1981). Está bem estabelecido na literatura que nesse modelo podem ocorrer perdas de até 20% no número de animais, associadas à alta severidade do modelo, tanto por mortalidade durante a cirurgia, anestesia ou hipóxia e período de recuperação (Sun *et al.*, 2004; Tsuji *et al.*, 2012; Fabres *et al.*, 2018). No presente trabalho, a mortalidade total foi de 12,9%, um pouco abaixo do que é visto na literatura. Em um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa, utilizando este mesmo modelo, a mortalidade foi em torno de 20% (Fabres *et al.*, 2018). Entretanto, vale ressaltar que neste trabalho prévio, a exposição à atmosfera hipóxia tinha duração de 90 minutos, levando a uma lesão mais severa em relação ao presente estudo que utilizou um período de hipóxia de 60 minutos (lesão leve a moderada). Esse pode ter sido um dos fatores que contribuiu para uma menor taxa de mortalidade no presente estudo. De qualquer forma, este resultado é um indicativo de que o modelo foi bem padronizado, já que não foram observados valores de mortalidade mais elevados do que os descritos na literatura.

A padronização apropriada do modelo garante que a avaliação do efeito do lactato (principal objetivo desse trabalho) em ratos neonatos com sete dias de vida também foi adequada.

O sistema nervoso central de neonatos apresenta uma preferência por alguns substratos energéticos, como o lactato e os corpos cetônicos (Dombrowski *et al.*, 1989). Em um trabalho com o modelo de HI neonatal em ratos, a administração de butirato de sódio (2x/dia durante 5 dias, iniciando imediatamente após a HI) causou

uma redução do volume de lesão encefálica, uma polarização do fenótipo microglial de inflamatório para anti-inflamatório e a supressão da produção de citocinas inflamatórias (Jaworska *et al.*, 2017), indicando, portanto, uma ação neuroprotetora do butirato. Pensando que o lactato também é um substrato metabólico, nosso protocolo-piloto de padronização foi baseado nestes mesmos trabalhos (Jaworska *et al.*, 2017; Ziemka-Nalecz *et al.*, 2017) e utilizou um padrão de administração de lactato por cinco dias. Entretanto, quando o lactato foi administrado nessa frequência, os animais perderam muito peso (Figura 5), o que levou à necessidade de uma reorganização do desenho experimental proposto.

Como nos baseamos no trabalho citado anteriormente (Jaworska *et al.*, 2017) para o protocolo de administração, nos experimentos-piloto a primeira injeção de lactato foi realizada imediatamente após o final da hipóxia. Todavia, diferente do butirato, as concentrações de lactato aumentam durante o evento hipóxico-isquêmico, devido ao metabolismo anaeróbico dos tecidos (Shalak e Perlman, 2004). O lactato é considerado, inclusive, um marcador da severidade do evento hipóxico-isquêmico: quanto mais elevadas as concentrações de lactato estiverem durante a hipóxia, pior é o prognóstico daquele indivíduo (Shalak e Perlman, 2004). Por isso, decidimos avaliar as concentrações plasmáticas de lactato após a HI. A compreensão da janela de recuperação destas concentrações plasmáticas elevadas de lactato endógeno pós-HI foi crucial para o desenvolvimento do trabalho e, certamente, para os resultados encontrados. Nossos resultados demonstraram que, em ratos Wistar com 7 dias de vida, as concentrações plasmáticas de lactato após os 60 minutos de hipóxia atingiram valores de 13,12 mM nos primeiros 5 minutos após o término da hipóxia. Esses valores são cerca de 4 vezes maiores do que nos animais controle (grupo SHAM). Essas concentrações elevadas retornam aos valores basais entre 30 (4,97 mM) e 45 minutos (3,06 mM), quando as concentrações plasmáticas chegaram a valores médios entre 4,97 e 3,06 mM. Portanto, é possível que, no nosso experimento-piloto, tenhamos gerado uma sobrecarga de lactato ao administrar este substrato imediatamente após o término da hipóxia (momento em que as concentrações endógenas ainda se encontravam elevadas). Essa elevada concentração de lactato produzida de forma endógena poderia ser uma das causas do efeito anorexigênico do lactato. Embora sendo considerado como uma ótima alternativa neuroprotetora, o lactato estava sendo administrado no momento errado.

Parece que o momento de administração é crucial para que o lactato possa exercer seus efeitos neuroprotetores. Por exemplo, em um modelo de isquemia em camundongos adultos, o lactato reduziu o volume de lesão encefálica quando administrado 30 minutos após a oclusão da artéria cerebral média (MCAO). Por outro lado, quando a administração foi realizada 120 minutos após a MCAO, não houve redução do volume de lesão, embora tenha ocorrido uma melhora em alguns desfechos neurológicos avaliados por neuro-escores (Berthet *et al.*, 2009). Portanto, fica claro que a compreensão do tempo de metabolização do lactato é um fator de extrema importância na elaboração de um desenho experimental adequado. Dessa forma, decidimos realizar a primeira administração de lactato exógeno aos 30 minutos após o término da hipóxia, momento em que as concentrações plasmáticas de lactato endógeno (elevadas pela hipóxia) já haviam retornado aos valores basais.

Além disso, como o presente trabalho foi o primeiro a avaliar o uso de lactato em ratos Wistar neonatos, também foi importante montar um curva de lactato em situação basal, para entender o comportamento do lactato administrado: o tempo necessário para que as concentrações plasmáticas aumentassem e retornassem aos valores basais.

Após a injeção intraperitoneal de lactato na dose de 2 g/kg, nossos resultados demonstraram que as concentrações plasmáticas de lactato atingem os valores máximos dentro de 5 minutos, chegando a uma concentração plasmática de cerca de 12,20 mM. Os valores plasmáticos de lactato nos animais que receberam PBS não variaram consideravelmente em nenhum dos tempos, mantendo-se em cerca de 3 mM independentemente do ponto da curva analisado (5, 30, 45 ou 90 minutos). Os valores plasmáticos dos animais que receberam lactato alcançaram concentrações 4 vezes maiores que os animais que receberam PBS, retornando aos valores basais entre 45 (5,8 mM) e 90 minutos (3,2 mM) após a injeção. Na literatura, uma dose de 2,5g/kg administrado por via subcutânea aumentou as concentrações plasmáticas de lactato rapidamente, entre 5 e 15 minutos. Esses dados são similares aos nossos resultados e demonstraram que o lactato administrado atinge um pico plasmático rapidamente, nos primeiros 5 minutos após a injeção (Morland *et al.*, 2017).

Devido ao número elevado de animais utilizados no presente estudo, não foi realizada uma curva de dose. Entretanto sabe-se que aumentos na concentração plasmática levam a aumentos proporcionais na concentração cerebral de lactato. Uma infusão de lactato que aumente as concentrações plasmáticas de cerca 1,5 para cerca

de 9,5 mM faz com que as concentrações cerebrais de lactato (avaliadas no hipocampo) atinjam valores de cerca de 2 mM (praticamente o dobro das concentrações basais) (Masato, 1992). Esses valores de 2 mM no sistema nervoso vão de encontro aos nossos achados: 30 minutos após a injeção de lactato as concentrações teciduais de lactato no hipotálamo atingiram valores de 2,3 mM.

Assim, a escolha da dose foi baseada exclusivamente em trabalhos da literatura (E *et al.*, 2013; Morland *et al.*, 2017) e parece ter sido adequada para os propósitos do presente estudo. Uma dose de lactato de sódio de 2 g/kg, administrada 2 vezes por dia periféricamente (por via i.p. ou s.c.) é suficiente para produzir uma concentração plasmática de cerca de 10 mM de lactato, levando a uma concentração cerebral de lactato de 2 mM (Masato, 1992; Morland *et al.*, 2015), a qual já demonstrou efeitos neuroprotetores (E *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2015; Carrard *et al.*, 2016; Morland *et al.*, 2017). No presente trabalho, a injeção de lactato foi capaz de elevar as concentrações plasmáticas de lactato até um valor de pico de cerca de 12,20 mM (aos 5 minutos), o que elevou as concentrações teciduais de lactato no hipotálamo para cerca de 2,3 mM (Figura 11), atingindo esses valores aproximadamente 30 minutos após a administração (momento em que os valores plasmáticos de lactato se encontravam em aproximadamente 8,9 mM). Esse valor é praticamente o dobro da concentração de 1,2 mM verificada no hipotálamo dos animais controle que receberam a administração de PBS (1,2 mM). Isso comprova que a dose escolhida foi efetiva, já que aumentou a concentração de lactato plasmático e as concentrações cerebrais (dosadas no hipotálamo), de forma semelhante às descrições da literatura para animais adultos. Doses mais baixas, de 0,25 g/kg, não foram efetivas em elevar as concentrações cerebrais de lactato por mais do que 20% (Horn e Klein, 2013). Doses de 1 g/kg elevam as concentrações plasmáticas para 8 mM (Carrard *et al.*, 2016), as quais retornam aos valores basais em menos de 30 minutos, enquanto em nossos animais as concentrações retornaram aos valores basais entre 45 e 90 minutos após a injeção. Assim, o uso de doses menores do que 2 g/kg não pareceu ser adequado para o nosso propósito.

Além disso, os trabalhos na literatura têm descrito que o EC<sub>50</sub> do receptor de L-lactato (HCAR1) está na faixa de concentração de 1-5 mM (Cai *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Morland *et al.*, 2017). A extrapolação dos valores usando regressão linear mostra que abaixo do EC<sub>50</sub> o efeito seria proporcional à concentração de lactato, mas o receptor começaria a ser ativado já em concentrações de 0,1 mM (Cai *et al.*, 2008;

Liu *et al.*, 2009; Morland *et al.*, 2017). Logo, em nosso protocolo de administração o lactato ativaria o receptor, já que foram alcançadas concentrações de 2 mM no tecido hipotalâmico. Dessa forma, podemos sugerir que além de ser utilizado como um substrato energético, os efeitos benéficos do lactato observados no presente estudo também podem ter ocorrido via ativação do seu receptor e consequente ativação de cascatas de sinalização intracelular.

Trabalhos que demonstraram efeitos tóxicos do lactato *in vivo* (Herbst *et al.*, 1971; Peskind *et al.*, 1998) utilizaram concentrações acima de 0,5 M (500 mM) no sistema nervoso, ou seja, bem acima da nossa concentração cerebral esperada de 2 mM. Esse não parece ter sido o caso do presente estudo, já que foram obtidas concentrações fisiológicas de cerca de 2 mM no hipotálamo. Entretanto, algo a ser considerado em relação aos resultados das dosagens teciduais de lactato é que a variabilidade dos dados foi grande: isso pode estar associado ao pequeno número amostral (n=3) e à própria manipulação dos animais (inclusive do grupo SHAM) que pode interferir nos valores de lactato. Certamente o aumento do número amostral e a dosagem de lactato em outras regiões cerebrais e no líquido permitirão um refinamento dos resultados.

De qualquer forma, os dados obtidos permitem afirmar que o lactato administrado exogenamente nesta dose de 2 g/kg chegou ao SNC em uma concentração não-tóxica e capaz de ativar o receptor de lactato.

A partir disso, um novo desenho experimental foi definido com base nos resultados obtidos nas dosagens plasmáticas de lactato após a hipóxia-isquemia e em condições basais. Após a definição do novo desenho, o primeiro desfecho avaliado foi o peso dos animais, que havia sofrido uma redução evidente no experimento-piloto (Figura 5).

Nossos resultados mostraram que o peso corporal dos animais do grupo HI foi menor do que nos animais dos demais grupos ao longo do tempo. Sabe-se que os animais que passam pela HI apresentam algumas dificuldades motoras (Huang *et al.*, 2009) e, por isso, podem apresentar dificuldade alimentar, principalmente nos primeiros dias após a HI (Fabres *et al.*, 2018). Um detalhe interessante é que no desenho experimental final (no qual foram realizadas apenas duas injeções de lactato em P7), não se observou qualquer interferência negativa da administração de lactato sobre o ganho de peso. Isso parece confirmar a hipótese de que a perda de peso observada no experimento-piloto no grupo HI+LAC poderia estar relacionada à

combinação da HI com a alta frequência de injeções de lactato. Cabe salientar que essa perda de peso (ou menor ganho) foi um efeito específico do lactato, e não do estresse de manipulação, visto que os animais do grupo SHAM que receberam lactato (grupo SHAM+LAC) apresentaram um padrão de ganho de peso pior do que os animais que receberam PBS (e que passaram pela mesma manipulação). Já foi demonstrado que o lactato controla a ingestão alimentar e que sua captação através de transportadores MCT2 presentes em neurônios hipotalâmicos (Cortes-Campos *et al.*, 2013) reduz o consumo alimentar, levando à perda de peso, pelo menos em animais adultos (Lam *et al.*, 2008). Assim, nossa hipótese é de que as injeções contínuas de lactato (realizadas no experimento-piloto) estariam causando saciedade, como já demonstrado na literatura (Silberbauer *et al.*, 2000), reduzindo o comportamento de sucção do leite dos filhotes. Contudo, essa hipótese não foi testada no presente estudo.

Além do peso corporal, no presente trabalho também avaliamos se a HI teria algum efeito sobre outros marcadores do neurodesenvolvimento, como o IAG e o dia de abertura dos olhos. A abertura dos olhos é um marcador cujo atraso pode indicar retardos no desenvolvimento (Sobotka *et al.*, 1974).

O momento de abertura dos olhos não foi influenciado pela HI, ocorrendo em todos os animais ao redor do 13º dia de vida, o que está de acordo com a literatura (Santillán *et al.*, 2010; Deniz *et al.*, 2018). O IAG é um marcador de desenvolvimento normalmente utilizado como um indicador da produção adequada de andrógenos (Cavalari *et al.*, 2018). Observamos que o evento hipóxico-isquêmico causou uma redução deste parâmetro, o que provavelmente está associado a um atraso no neurodesenvolvimento de estruturas envolvidas na produção de hormônios esteroides (Mitchell *et al.*, 2015). Na literatura, entretanto, não se encontram dados avaliando o IAG no modelo de HI neonatal, dificultando a comparação com os resultados obtidos no presente estudo. Salientamos, no entanto, que o IAG é um índice corrigido pelo peso corporal dos animais, portanto o resultado obtido não parece estar associado às diferenças de peso entre os distintos grupos experimentais. Ademais, a administração de lactato não teve influência no IAG e não foi capaz de recuperar o IAG nos animais do grupo HI+LAC.

Em relação à avaliação do sistema nervoso, os resultados mostraram que os animais que passaram pela HI e receberam lactato apresentam menor volume de lesão encefálica (%) em relação aos animais do grupo HI, quando avaliados em P9.

Este trabalho foi o primeiro a avaliar a administração de lactato no modelo de HI neonatal em ratos. Na literatura, existem apenas dados mostrando um efeito benéfico da administração de lactato em animais adultos, tanto em modelos de isquemia cerebral (Berthet *et al.*, 2009, 2012; Castillo *et al.*, 2015; Mosienko *et al.*, 2015) quanto em modelos de traumatismo crânio-encefálico (Rice *et al.*, 2002). O lactato foi capaz de reduzir o volume de lesão após a isquemia cerebral em ratos adultos, quando administrado 30 minutos após a oclusão da artéria cerebral média (Berthet *et al.*, 2009).

Por essa razão, o presente trabalho vem a acrescentar dados importantes à literatura científica, principalmente quando consideramos a preferência do encéfalo neonatal pelo lactato como substrato metabólico (Dombrowski *et al.*, 1989; Kasischke, 2011). Nosso resultado mostrou a redução do volume de lesão encefálica em um período curto, de apenas 2 dias após a HI (P9). Isso pode indicar que o lactato está protegendo o encéfalo por atuar como um substrato metabólico, fornecendo uma fonte de energia necessária para manter as demandas encefálicas durante a fase latente e a fase secundária de falha energética (Perlman, 2006), logo após o evento hipóxico-isquêmico.

O lactato também se mostrou neuroprotetor em um modelo de indução de neurotoxicidade a partir da administração de glutamato no sistema nervoso central. A administração de 100 mM de glutamato foi feita pela técnica de microdiálise no córtex de ratos adultos, resultando em neurotoxicidade. Quando se administrava lactato (6 mM) juntamente com o glutamato, a lesão foi reduzida significativamente, 4h após a indução da neurotoxicidade. Os autores sugerem que esse efeito pode ter ocorrido devido ao uso do lactato como substrato energético (Ros *et al.*, 2001). Outro dado interessante é que o lactato parece proteger as células ganglionares da retina (RGC), cuja perda é uma das principais causas de cegueira. Em um modelo de cultura primária de RGCs, o lactato foi rapidamente captado após a privação de glicose e, conseqüentemente, de ATP. Quando o lactato foi colocado no meio, a produção de ATP aumentou e a sua captação pelas RGCs também. O lactato é secretado pelas células de Müller (células da glia presentes na retina) para assegurar a integridade das RGCs em condições fisiológicas e para contribuir na neuroproteção das RGCs em condições patológicas, como a privação de glicose, por exemplo (Vohra *et al.*, 2019a). Esse mecanismo sugere a existência de uma lançadeira de lactato entre as células de Müller e as RGCs, garantindo o aporte energético dessas células (Vohra *et*

*al.*, 2019a). Interessante ressaltar aqui é que a avaliação 4h após a injeção de glutamato (Ros *et al.*, 2001) e a rápida captação de lactato (pelos MCTs) pelas células de Müller em situação de privação de glicose (Vohra *et al.*, 2019b, a), sugerem um efeito protetor agudo, de curto prazo do lactato, indo de encontro à nossa ideia de que o lactato reduziu a lesão encefálica no presente estudo por estar atuando como um substrato energético.

Outro possível efeito do lactato no presente estudo é a possibilidade de uma redução da excitotoxicidade, que pode ter levado à redução do volume de lesão cerebral. Além disso, a menor perda tecidual observada nos animais do grupo HI+LAC (em relação ao grupo HI) pode estar associada aos efeitos benéficos da administração de lactato observados nos testes comportamentais neste mesmo grupo.

A avaliação dos reflexos neurológicos a partir do desempenho dos animais nos testes comportamentais pode ser um indicativo do grau de maturação do sistema nervoso (Antonelli, 2015), principalmente após o evento hipóxico-isquêmico. Sabe-se que a HI causa diversos déficits funcionais (Lubics *et al.*, 2005) e a administração de lactato realizada no presente estudo parece ser capaz de reverter alguns destes déficits. Além disso, é importante salientar que as respostas sensório-motoras em animais submetidos à HI durante o período juvenil, e mesmo em animais adultos, também podem apresentar diferenças relacionadas ao sexo (Netto *et al.*, 2017). Por isso, no presente estudo, os comportamentos foram avaliados separadamente em machos e fêmeas.

O reflexo de endireitamento aparece nos filhotes a partir do segundo dia de vida (Heyser, 2004) e sua observação pode ser utilizada para avaliar a função e a coordenação motora (Durán-Carabali *et al.*, 2017a). Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças significativas na latência do reflexo de endireitamento entre os grupos experimentais em nenhum dos sexos, e isso já é discutido na literatura (Netto *et al.*, 2017; Deniz *et al.*, 2018). Além de ser um reflexo rápido, o efeito da HI sobre o teste do reflexo de endireitamento apresenta dados conflitantes (Netto *et al.*, 2017). Um dos fatores que pode influenciar os resultados é o tempo de exposição ao ambiente hipóxico. No presente trabalho, o tempo de hipóxia foi de 60 minutos, o qual causa um dano encefálico de leve a moderado. É possível considerar que as estruturas envolvidas neste reflexo sejam menos suscetíveis ao evento hipóxico-isquêmico. Entretanto, em um trabalho que utilizou um tempo de hipóxia muito mais prolongado de 210 minutos (Peterson *et al.*, 2015) também não foi observado nenhum

efeito da HI sobre este comportamento, nos mesmos momentos avaliados na presente dissertação (P8 e P14), o que reforça e ajuda a validar esses resultados.

Já o teste de geotaxia negativa reflete a função vestibular e a atividade motora (Altman e Sudarshan, 1975), além de avaliar os reflexos labirínticos indicativos de força e coordenação motora (Sisa *et al.*, 2019). A administração de lactato após a HI melhorou os desfechos comportamentais no teste de geotaxia negativa, reduzindo a latência dos animais do grupo HI+LAC para valores similares aos dos animais do grupo SHAM. Embora os animais neonatos machos submetidos à HI tenham a tendência de serem mais vulneráveis no teste de geotaxia negativa (Huang *et al.*, 2016; Waddell *et al.*, 2016), no presente estudo isso não foi observado: tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram uma redução da latência quando receberam lactato após a HI. O lactato, portanto, parece modular essas respostas motoras produzindo desfechos comportamentais positivos em ambos os sexos.

O teste de reconhecimento olfatório avalia a habilidade do animal localizar o ninho (Tonkiss *et al.*, 1996). No teste de reconhecimento olfatório realizado em P14, a administração de lactato pareceu ser eficaz apenas nas fêmeas. É bem descrito que os filhotes apresentam, a partir de P5, preferência pelo odor do ninho das mães (Polan e Hofer, 1998). Existem trabalhos na literatura que indicam que ratos machos parecem ser mais responsivos às pistas olfatórias quando comparados com as fêmeas em estágios iniciais do desenvolvimento (Buelke-Sam *et al.*, 1984), o que pode explicar a facilidade com que os machos, independentemente do grupo experimental, encontram a maravalha da caixa-moradia. Já nas fêmeas, que são menos responsivas às pistas olfatórias nesta idade (Buelke-Sam *et al.*, 1984), a HI prejudicou a capacidade de encontrar a maravalha do ninho, o que parece ter sido revertido pela administração de lactato.

O teste do cilindro foi realizado para quantificar a utilização das patas anteriores quando o animal se apoiava sobre as patas traseiras e erguia as patas dianteiras. Na literatura, os dados do teste do cilindro são frequentemente descritos para animais adultos. Entretanto, a partir do P12 esse teste já pode ser realizado adequadamente, pois os animais já são capazes de elevar suas patas dianteiras sem perder o equilíbrio (Altman e Sudarshan, 1975): apenas as dimensões do cilindro devem ser ajustadas para a idade do animal (Russell *et al.*, 2011). Como no presente estudo a lesão foi realizada no hemisfério direito, que controla o lado contralateral do corpo para movimentação (Durán-Carabali *et al.*, 2017b), espera-se que a pata contralateral à

lesão isquêmica (esquerda) seja menos recrutada para os movimentos (Durán-Carabali *et al.*, 2017b). Por isso, o número de toques da pata dianteira contralateral foi calculado em relação à pata dianteira ipsilateral à isquemia cerebral.

Os animais que passaram pelo evento hipóxico-isquêmico apresentaram uma redução no uso da pata contralateral, evidenciando a assimetria sensório-motora produzida pelo modelo de HI neonatal. Já foi demonstrado que animais que passam pela HI apresentam uma redução no uso da pata contralateral à isquemia (Durán-Carabali *et al.*, 2017b). Entretanto os animais que receberam lactato após a HI apresentaram simetria no uso das duas patas dianteiras, sugerindo que o lactato pode ter influencia na recuperação sensório-motora. Sabe-se que danos no córtex e no estriado estão associados com déficits sensório-motores (Lubics *et al.*, 2005). Assim, essa melhora pode estar diretamente relacionada à redução do volume de lesão encefálica observada em P9 nos animais que receberam lactato após a HI. De qualquer forma, uma perspectiva deste trabalho é analisar essas regiões (córtex e estriado) em relação à integridade tecidual, morte neuronal e diferentes tipos celulares do SNC, o que permitirá a geração de um quadro mais completo.

Em suma, os dados comportamentais do presente trabalho não verificaram alterações provocadas pela hipóxia-isquemia no teste do reflexo de endireitamento. Também não foi observada nenhuma alteração significativa no teste de reconhecimento olfatório nos animais machos. Entretanto, nas tarefas de geotaxia negativa e no teste do cilindro, os animais submetido à HI apresentaram um desempenho prejudicado. Os dois primeiros testes são baseados na percepção de um estímulo sensorial seguida de uma ação motora simples. No reflexo de endireitamento, esse estímulo é principalmente derivado do sistema vestibular (Altman e Sudarshan, 1975; Hermans *et al.*, 1992), visto que em P7 os animais ainda não apresentam abertura dos olhos, seguida da ação de endireitamento. No teste de reconhecimento olfatório, o animal deve se deslocar na direção da maravalha que contém o odor familiar da fêmea progenitora em detrimento de outra sem odor. No presente trabalho observamos que o reconhecimento olfatório foi afetado nas fêmeas submetidas à HI, porém não se observou o mesmo nos machos. Portanto, nossos resultados indicaram a existência de dimorfismo sexual na identificação da maravalha da caixa-moradia, fator importante e bastante discutido no estudo da HI neonatal (Mirza *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015; Waddell *et al.*, 2016). Nossos resultados

sugerem, então, que o lactato resgatou a habilidade de reconhecimento olfatório nas fêmeas.

Na tarefa de geotaxia negativa, além do estímulo sensorial do sistema vestibular, é necessária a ação motora coordenada dos quatro membros, que possibilitam ao animal mudar a sua orientação, portanto, parece ser um gesto motor mais complexo do que o endireitamento (Motz e Alberts, 2005). Neste teste, encontramos um prejuízo provocado pela HI que foi revertido pelo tratamento com lactato. No teste do cilindro, é avaliada a simetria no uso dos membros a partir do comportamento exploratório dos roedores, portanto não se caracteriza como um reflexo, mas uma ação motora espontânea, de ordem superior (Schallert *et al.*, 2000), na qual foi observada assimetria nos animais submetidos à HI. É possível portanto, que no nosso trabalho, as áreas sensoriais não tenham sido tão afetadas, enquanto as áreas necessárias para a execução de tarefas motoras coordenadas (como o córtex motor e o estriado) sejam mais suscetíveis ao dano hipóxico-isquêmico. Mais trabalhos são necessários para compreender o efeito da HI e do tratamento com o lactato sobre o sistema somatossensorial e sobre o sistema motor.

Em relação aos danos neurais produzidos, tem sido descrito que a HI neonatal primariamente causa danos aos neurônios e à substância branca (Volpe, 2001). Nesta última, são abundantes os oligodendrócitos, as únicas células do SNC capazes de formar a bainha de mielina (Dewar *et al.*, 2003), estrutura de suma importância para o isolamento, preservação e manutenção da estrutura e função axonal (Fünfschilling *et al.*, 2012, Saab *et al.*, 2016). Os oligodendrócitos são bastante prejudicados pela EHI devido à excitotoxicidade glutamatérgica e ao estresse oxidativo existentes (Volpe, 2001), e o dano a essas células pode levar a prejuízos mentais ou físicos (Volpe e Zipurksy, 2001). Os oligodendrócitos utilizam lactato como substrato energético (Micu *et al.*, 2018) e como substrato para a síntese de lipídeos envolvidos na formação da mielina (Sánchez-Abarca *et al.*, 2001). A privação energética, portanto, causa um atraso na mielinização (Yan e Rivkees, 2006) e, conseqüentemente, degeneração das estruturas presentes na substância branca. Este processo constitui um aspecto fundamental nos déficits motores que caracterizam a paralisia cerebral e outras deficiências neurológicas (Ness *et al.*, 2001; Volpe *et al.*, 2017). Os oligodendrócitos também exportam lactato aos axônios, o qual é prontamente captado pelos axônios via MCT2 (Rinholm *et al.*, 2011; Micu *et al.*, 2018), de modo semelhante à lançadeira de lactato já previamente descrita entre astrócitos e terminais axonais neuronais (Micu

*et al.*, 2006, 2016). Essa transferência de lactato pelos oligodendrócitos ocorre principalmente em situações de baixo aporte energético (Rinholm *et al.*, 2011; Micu *et al.*, 2018), como acontece na HI neonatal. Considerando que as células do SNC de recém-nascidos apresentam uma preferência por lactato como substrato energético (Vicario *et al.*, 1988; Vicario e Medina, 1992; Wyss *et al.*, 2011) e que já foi demonstrado que os oligodendrócitos expressam transportadores de lactato MCT1 (Lee *et al.*, 2012), se torna evidente a presença de um sistema de comunicação celular na substância branca envolvendo o lactato (Fünfschilling *et al.*, 2012; Saab *et al.*, 2013). Embora isso não possa ser afirmado, é possível que o lactato administrado no presente estudo também tenha sido utilizado pelos oligodendrócitos e transferido aos axônios, influenciando na transmissão axo-mielínica, que pode ser prejudicada devido às consequências da HI neonatal (Schlaepfer, 1977; Micu *et al.*, 2006), e melhorando funções motoras como aquelas avaliadas no teste do cilindro. De qualquer forma, para chegar a essa conclusão, são necessários experimentos avaliando a lesão à substância branca e a integridade da bainha de mielina. Em roedores, o período em torno de P7 é o momento em que as células precursoras de oligodendrócitos estão se transformando em oligodendrócitos imaturos (Craig *et al.*, 2003; Nair e Kumar, 2018), que são altamente suscetíveis aos eventos hipóxico-isquêmicos (Back *et al.*, 2001, 2002). Adicionalmente, durante o período analisado no nosso trabalho (entre P7 e P21), ocorre a maior parte da mielinização do encéfalo dos roedores, evidenciando a importância dos oligodendrócitos nessa etapa do desenvolvimento (Downes e Mullins, 2014; van Tilborg *et al.*, 2018). Logo, proteger os oligodendrócitos expostos à HI nesse período (com a administração de lactato, por exemplo), parece ser uma estratégia interessante para evitar a maturação inadequada da substância branca que pode estar associada a déficits motores futuros (Wu *et al.*, 2008).

Além de todos esses efeitos metabólicos diretos, de curto-prazo, o lactato também pode atuar na sinalização celular (Morland *et al.*, 2015) via seu receptor HCAR1 (Ahmed *et al.*, 2010). No SNC, já foi descrito (Morland *et al.*, 2017) que a administração sistêmica de lactato é capaz de promover a angiogênese cerebral de forma semelhante ao encontrado em um modelo de exercício físico (Morland *et al.*, 2017). Este efeito sobre a angiogênese cerebral foi atribuído à ativação do receptor HCAR1/GPR81, pois quando animais *knockout* para o gene deste receptor foram submetidos à administração de lactato não foi observado efeito sobre a angiogênese. A angiogênese parece ser um bom alvo para recém-nascidos com EHI, pois já foi

demonstrado que as vias envolvidas no crescimento de novos vasos podem estar desreguladas pelo evento hipóxico-isquêmico (Shaikh *et al.*, 2015).

Com o intuito de tentar diferenciar os efeitos do lactato como substrato energético dos efeitos produzidos via receptor, um agonista do HCAR1 vem sendo utilizado na literatura (Sakurai *et al.*, 2014). Esse agonista é o 3,5 ácido diidroxibenzoico, que apresenta uma afinidade pelo receptor aproximadamente 50 vezes maior do que o próprio lactato (Liu *et al.*, 2012). A ativação do receptor por este agonista promove a redução do AMPc intracelular (Liu *et al.*, 2009).

Recentemente, foi demonstrado que o lactato pode apresentar um efeito anti-inflamatório e sua administração reduziu o dano tecidual, bem como a expressão de mediadores inflamatórios como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) em um modelo animal de pancreatite utilizando lipopolissacarídeo (LPS) (Hoque *et al.*, 2014). Em modelo de colite induzida por TNBS (ácido trinitrobenzenossulfônico), o lactato reduziu o dano tecidual e o aumento de interleucina-6 (IL-6) (Iraporda *et al.*, 2016). Além disso, a exposição de células dendríticas ao lactato aumentou a produção de citocinas anti-inflamatórias enquanto reduziu as pró-inflamatórias (Nasi *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2017). É bem sabido que após a HI neonatal existe um processo inflamatório progressivo (Saliba e Henrot, 2001) e o lactato poderia reduzir essa sinalização inflamatória.

Em relação às respostas relacionadas ao sexo observadas no modelo de HI, bastante discutidas na literatura (Mirza *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015; Waddell *et al.*, 2016), nossos resultados não mostraram diferenças nas respostas entre machos e fêmeas, exceto no teste olfatório. Os dados na literatura em relação ao dimorfismo são discrepantes (Netto *et al.*, 2017; Charriaut-Marlangue *et al.*, 2018) e não foi possível observar um padrão claro de dimorfismo em relação aos parâmetros avaliados no presente estudo.

De forma geral, os resultados do presente trabalho trazem uma contribuição importante para a compreensão de uma possível nova estratégia neuroprotetora a ser utilizada na HI neonatal. Até o momento, não existem terapias bem estabelecidas de alta eficácia para o tratamento desses eventos, que afetam uma porcentagem relativamente alta dos recém-nascidos. O lactato parece ter reduzido a lesão tecidual produzida pela HI. Esse efeito observado a curto prazo pode estar associado à redução nos déficits motores observada tanto a curto (P8) quanto a longo prazo (P20). O presente trabalho está na fronteira entre o conhecimento científico básico e a terapia

clínica e poderá abrir uma diversidade de linhas de investigação científica. O caráter inovador do projeto refere-se à possibilidade da utilização de lactato, na prática clínica, como parte das terapias para o tratamento da encefalopatia hipóxico-isquêmica.

De qualquer modo, mais estudos são necessários com o objetivo de avaliar os mecanismos de ação do lactato, além da avaliação de áreas cerebrais e tipos celulares específicos, permitindo a montagem de um quadro mais completo sobre a ação neuroprotetora do lactato frente a um evento hipóxico-isquêmico.

## **8. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que a hipóxia-isquemia neonatal desencadeia uma lesão encefálica significativa, além de produzir déficits motores tanto em animais neonatos machos quanto em fêmeas, os quais foram parcialmente revertidos pela administração de lactato após a HI. A redução da lesão encefálica parece estar associada aos benefícios observadas nos testes comportamentais.

A administração intraperitoneal de lactato na dose de 2 g/kg foi suficiente para aumentar as concentrações plasmáticas e hipotalâmicas de lactato, sugerindo que os efeitos benéficos dessa administração estejam associados às ações desse substrato energético diretamente no SNC.

Dessa forma, a administração de lactato pode ser uma possível estratégia neuroprotetora a ser considerada como terapia para o tratamento da HI neonatal, a qual ainda afeta uma porcentagem significativa de recém-nascidos humanos.

## **9. PERSPECTIVAS**

A padronização do uso do lactato como possível estratégia neuroprotetora no modelo de HI neonatal, estabelecida no presente estudo, forneceu a base necessária para experimentos futuros (alguns já em processamento) com o intuito de compreender melhor os mecanismos de ação do lactato na HI neonatal. Algumas das perspectivas do presente estudo estão descritas a seguir e serão realizadas em amostras de tecido de animais submetidos à HI e tratados ou não com lactato, conforme o desenho experimental já descrito nesta dissertação. Estas perspectivas incluem a:

-Análise do volume de lesão em outras áreas encefálicas, além do hipotálamo, como o córtex cerebral, o hipocampo e o corpo estriado em um período mais

prolongado (P21), em cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina e eosina;

-Avaliação da imunorreatividade à proteína glial fibrilar ácida (GFAP, como um indicador de astrogliose) e à caspase-3 (como um marcador de morte celular);

-Quantificação, pela técnica *Western blotting*, da expressão proteica do receptor de lactato (HCAR1/GPR81) e dos transportadores de monocarboxilato (MCT2 e MCT4) em homogeneizados de diferentes regiões encefálicas (como o hipotálamo, o córtex cerebral, o hipocampo e o corpo estriado).

## 10. REFERÊNCIAS

- Ahmed K, Tunaru S, Tang C, Müller M, Gille A, Sassmann A, et al. An Autocrine Lactate Loop Mediates Insulin-Dependent Inhibition of Lipolysis through GPR81. *Cell Metab* 2010; 11: 311–319.
- Airede AI. Birth asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy: incidence and severity. *Ann Trop Paediatr* 1991; 11: 331–5.
- Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav Brain Res* 2014; 259: 85–96.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: For better and for worse. *Trends Neurosci* 2011; 34: 76–87.
- Alle H, Roth A, Geiger JRP. Energy-efficient action potentials in hippocampal mossy fibers. *Science* (80- ) 2009; 325: 1405–1408.
- Allen KA. Hypoxic Ischemic Encephalopathy: Pathophysiology Experimental Treatments. 2012; 11: 125–133.
- Allen KA, Brandon DH. Hypoxic ischemic encephalopathy: Pathophysiology and experimental treatment. *Newborn Infant Nurs Rev* 2011; 11: 125–133.
- Almeida A, Moncada S, Bolaños JP. Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 45–51.
- Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* 1975; 23: 896–920.
- Alvarez-Díaz A, Hilario E, Goñi De Cerio F, Valls-I-Soler A, Alvarez-Díaz FJ. Hypoxic-ischemic injury in the immature brain - Key vascular and cellular players. *Neonatology* 2007; 92: 227–235.
- Antonelli MC. Perinatal Programming of Neurodevelopment. Volume 10. Springer US; 2015
- Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1133–45.
- Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, et al. Effects of Hypothermia for Perinatal Asphyxia on Childhood Outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371: 140–149.
- Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002; 22: 455–463.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci* 2001; 21: 1302–1312.
- Bågenholm R, Nilsson U, Götberg CW, I K. Free Radicals Are Formed in the Brain of Fetal Sheep during Reperfusion after Cerebral Ischemia. *Pediatr Res* 1998; 43: 76–76.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 2006; 98: 641–653.
- Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004; 43: 42–51.

- Bano S, Chaudhary V, Garga UC. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A radiological review. *J Pediatr Neurosci* 2017; 12
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 2011; 14: 724–738.
- Bergersen L, Wærhaug O, Helm J, Thomas M, Laake P, Davies AJ, et al. A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with  $\delta$ -glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Exp Brain Res* 2001; 136: 523–534.
- Bergersen LH. Lactate transport and signaling in the brain: Potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 176–185.
- Berthet C, Castillo X, Magistretti PJ, Hirt L. New evidence of neuroprotection by lactate after transient focal cerebral ischaemia: Extended benefit after intracerebroventricular injection and efficacy of intravenous administration. *Cerebrovasc Dis* 2012; 34: 329–335.
- Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ, Hirt L. Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 1780–1789.
- Boumezbeur F, Petersen KF, Cline GW, Mason GF, Behar KL, Shulman GI, et al. The Contribution of Blood Lactate to Brain Energy Metabolism in Humans Measured by Dynamic  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Neurosci* 2010; 30: 13983–13991.
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW (Robert W, Price DL (Donald L. Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology. 2011
- Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell Metab* 2018; 27: 757–785.
- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365: 1147–1152.
- Buelke-Sam J, Sullivan PA, Kimmel CA, Nelson CJ. Sex and strain differences in the developmental activity profile of the rat tested over clean vs home cage bedding. *Dev Psychobiol* 1984; 17: 67–77.
- Cai TQ, Ren N, Jin L, Cheng K, Kash S, Chen R, et al. Role of GPR81 in lactate-mediated reduction of adipose lipolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377: 987–991.
- Carrard A, Elsayed M, Margineanu M, Boury-Jamot B, Fagnière L, Meylan EM, et al. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry* 2016: 1–8.
- Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB2 and adenosine receptors. *Neurobiol Dis* 2010; 37: 434–440.
- Castillo X, Rosafio K, Wyss MT, Drandarov K, Buck A, Pellerin L, et al. A probable dual mode of action for both L- and D-lactate neuroprotection in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 1561–1569.
- De Castro VL, Goes KP, Chiorato SH. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. *Int J Environ Health Res* 2004; 14: 371–380.
- Cavalari FC, da Rosa LA, Escott GM, Dourado T, de Castro AL, Kohek MB da F, et al. Epitestosterone- and testosterone-replacement in immature castrated rats changes main testicular developmental characteristics. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 461: 112–121.
- Charriaut-Marlangue C, Besson VC, Baud O. Sexually dimorphic outcomes after neonatal stroke and hypoxia-ischemia. *Int J Mol Sci* 2018; 19
- Cortes-Campos C, Elizondo R, Carril C, Martínez F, Boric K, Nualart F, et al. MCT2 Expression and Lactate Influx in Anorexigenic and Orexigenic Neurons of the Arcuate Nucleus. *PLoS One* 2013; 8
- Craig A, Luo NL, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, et al. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 2003; 181: 231–240.
- Cuaycong M, Engel M, Weinstein SL, Salmon E, Perlman JM, Sunderam S, et al. A novel approach to the study of hypoxia-ischemia-induced clinical and subclinical seizures in the neonatal rat. *Dev Neurosci* 2011; 33: 241–250.
- Deniz BF, Confortim HD, Deckmann I, Miguel PM, Bronauth L, de Oliveira BC, et al. Gestational folic acid supplementation does not affect the maternal behavior and the early development of rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia but the high supplementation impairs the dam's memory and the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the pup's. *Int J Dev Neurosci* 2018; 71: 181–192.

- Dewar D, Underhill SM, Goldberg MP. Oligodendrocytes and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 263–274.
- Dienel GA. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol Rev* 2018; 99
- Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. 2015
- Dombrowski GJ, Swiatek KR, Chao KL. Lactate, 3-hydroxybutyrate, and glucose as substrates for the early postnatal rat brain. *Neurochem Res* 1989; 14: 667–675.
- Douglas-Escobar M, Weiss MD. Biomarkers of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Newborns. *Front Neurol* 2012; 3: 144.
- Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy A Review for the Clinician. *JAMA Pediatr* 2015; 169: 397–403.
- Downes N, Mullins P. The Development of Myelin in the Brain of the Juvenile Rat. *Toxicol Pathol* 2014; 42: 913–922.
- van den Driesche S, Witarski W, Pastorekova S, Breiteneder H, Hafner C, Vellekoop MJ. A label-free indicator for tumor cells based on the CH<sub>2</sub>-stretch ratio. *Analyst* 2011; 136: 2397.
- Dugan LL, Choi DW. and Cell Membrane Changes. *Ann Neurol* 1994; 35: S17–S21.
- Durán-Carabali LE, Arcego DM, Odorcyk FK, Reichert L, Cordeiro JL, Sanches EF, et al. Prenatal and Early Postnatal Environmental Enrichment Reduce Acute Cell Death and Prevent Neurodevelopment and Memory Impairments in Rats Submitted to Neonatal Hypoxia Ischemia. *Mol Neurobiol* 2017; 55: 3627–3641.
- Durán-Carabali LE, Sanches EF, Marques MR, Aristimunha D, Pagnussat A, Netto CA. Longer hypoxia-ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience* 2017; 340: 291–298.
- E L, Lu J, Selfridge JE, Burns JM, Swerdlow RH. Lactate administration reproduces specific brain and liver exercise-related changes. *J Neurochem* 2013; 127: 91–100.
- Elizondo-Vega R, Cortés-Campos C, Barahona MJ, Carril C, Ordenes P, Salgado M, et al. Inhibition of hypothalamic MCT1 expression increases food intake and alters orexigenic and anorexigenic neuropeptide expression. *Sci Rep* 2016; 6: 1–13.
- Fabres RB, da Rosa LA, de Souza SK, Cecconello AL, Azambuja AS, Sanches EF, et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. *Metab Brain Dis* 2018; 33: 813–821.
- Favero AM, Weis SN, Zeni G, Rocha JBT, Nogueira CW. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28: 607–616.
- Ferriero DM. Neonatal Brain Injury. *N Engl J Med* 2004; 351: 1985–1995.
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 2012; 485: 517–521.
- Gallavan RH, Holson JF, Stump DG, Knapp JF, Reynolds VL. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 383–390.
- Gandhi GK, Cruz NF, Ball KK, Dienel GA. Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *J Neurochem* 2009; 111: 522–536.
- Gerhart DZ, Enerson BE, Zhdankina OY, Leino RL, Drewes LR. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats. *Am J Physiol Metab* 2017; 273: E207–E213.
- Gleeson TT. Lactate and glycogen metabolism during and after exercise in the lizard *Sceloporus occidentalis*. *J Comp Physiol ■ B* 1982; 147: 79–84.
- Gopagondanahalli KR, Li J, Fahey MC, Hunt RW, Jenkin G, Miller SL, et al. Preterm Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Front Pediatr* 2016; 4: 1–10.
- Gunn AJ, Gluckman PD. Head cooling for neonatal encephalopathy: The state of the art. *Clin Obstet Gynecol* 2007; 50: 636–651.
- Hagberg H, Wilson MA, Matsushita H, Zhu C, Lange M, Gustavsson M, et al. PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem* 2004; 90: 1068–1075.
- Halestrap AP. The SLC16 gene family-Structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med* 2013; 34: 337–349.

- Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343 Pt 2: 281–299.
- Herbst A, Ulfelder H, Poskanzer D. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at SAN DIEGO (UCSD) on June 9, 2015. For personal use only. No other uses without permission. From the NEJM Archive. Copyright © 2010 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *N Engl J Med* 1971; 284: 878–881.
- Hermans RHM, Hunter DE, McGivern RF, Cain CD, Longo LD. Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicol Teratol* 1992; 14: 119–129.
- Heyser CJ. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. *Curr Protoc Neurosci* 2004: 1–15.
- Hird FJ, Symons RH. The mechanism of ketone-body formation from butyrate in rat liver. *Biochem J* 1962; 84: 212–216.
- Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via gpr81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology* 2014; 146: 1763–1774.
- Horn T, Klein J. Neuroprotective effects of lactate in brain ischemia: Dependence on anesthetic drugs. *Neurochem Int* 2013; 62: 251–257.
- Hu Y, Wang Z, Liu Y, Pan S, Zhang H, Fang M, et al. Melatonin reduces hypoxic-ischaemic (HI) induced autophagy and apoptosis: An in vivo and in vitro investigation in experimental models of neonatal HI brain injury. *Neurosci Lett* 2017; 653: 105–112.
- 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. *Int J Neurosci* 2016; 126: 647–657.
- Huang Z, Liu J, Cheung PY, Chen C. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res* 2009; 1301: 100–109.
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PGM, den Boer JA, Meerlo P. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 2011; 216: 552–560.
- Ichai C, Armando G, Orban JC, Berthier F, Rami L, Samat-Long C, et al. Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients. *Intensive Care Med* 2009; 35: 471–479.
- Ichai C, Payen JF, Orban JC, Quintard H, Roth H, Legrand R, et al. Half-molar sodium lactate infusion to prevent intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain injured patients: A randomized controlled trial. *Intensive Care Med* 2013; 39: 1413–1422.
- Iraporda C, Romanin DE, Bengoa AA, Errea AJ, Cayet D, Folignì B, et al. Local treatment with lactate prevents intestinal inflammation in the TNBS-induced colitis model. *Front Immunol* 2016; 7: 1–9.
- Jaworska J, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T. The potential neuroprotective role of a histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, after neonatal hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 1–17.
- Jourdain P, Allaman I, Rothenfusser K, Fiumelli H, Marquet P, Magistretti PJ. L-Lactate protects neurons against excitotoxicity: Implication of an ATP-mediated signaling cascade. *Sci Rep* 2016; 6: 1–13.
- Kalenka A, Gross B, Maurer MH, Thierse H-J, Feldmann RE. Isoflurane Anesthesia Elicits Protein Pattern Changes in Rat Hippocampus. *J Neurosurg Anesthesiol* 2010; 22: 144–154.
- Kasischke K. Lactate Fuels the Neonatal Brain. *Front Neuroenergetics* 2011; 3: 3–5.
- Kassab G, Zacarias ESF. Normativas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) - 3ª Edição. *MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, Tecnol INOVAÇÕES E Comun* 2016; 3ª Edição
- Knox R, Zhao C, Miguel-Perez D, Wang S, Yuan J, Ferriero D, et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression. *Neurobiol Dis* 2013; 51: 113–9.
- Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86: 329–338.
- Lafemina MJ, Sheldon RA, Ferriero DM. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res* 2006; 59: 680–3.
- Lam CKL, Chari M, Wang PYT, Lam TKT. Central lactate metabolism regulates food intake. *Am J Physiol Metab* 2008; 295: E491–E496.

- Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, Munoz B, Bell EF, Goldberg RN, et al. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy a randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2017; 318: 1550–1560.
- Lauritzen KH, Morland C, Puchades M, Holm-Hansen S, Hagelin EM, Lauritzen F, et al. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb Cortex* 2014; 24: 2784–2795.
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012; 487: 443–448.
- Lev-Vachnish Y, Cadury S, Rotter-Maskowitz A, Feldman N, Roichman A, Illouz T, et al. L-lactate promotes adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci* 2019; 13: 1–13.
- Liu C, Kuei C, Zhu J, Yu J, Zhang L, Shih A, et al. 3,5-Dihydroxybenzoic Acid, a Specific Agonist for Hydroxycarboxylic Acid 1, Inhibits Lipolysis in Adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 341: 794–801.
- Liu C, Wu J, Zhu J, Kuei C, Yu J, Shelton J, et al. Lactate inhibits lipolysis in fat cells through activation of an orphan G-protein-coupled receptor, GPR81. *J Biol Chem* 2009; 284: 2811–2822.
- Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed ('secondary') cerebral energy failure following acute hypoxia-ischaemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994; 36: 699–706.
- Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005; 157: 157–165.
- Mächler P, Wyss MT, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, Von Faber-Castell A, et al. In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell Metab* 2016; 23: 94–102.
- Madsen PL, Cruz NF, Sokoloff L, Dienel GA. Cerebral oxygen/glucose ratio is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery: excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 393–400.
- Magistretti PJ. Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. 2009
- Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: From metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19: 235–249.
- Masato H. Cerebral Extracellular Glucose and Lactate concentrations. 1992
- Mazzanti L, Pastuszko A, Lenaz G. Effects of ketamine anesthesia on rat-brain membranes: fluidity changes and kinetics of acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 1986; 861: 105–110.
- McDonald JW, Johnston M V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 1990; 15: 41–70.
- Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, et al. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature* 2006; 439: 988–992.
- Micu I, Plemel JR, Caprariello A V., Nave KA, Stys PK. Axo-myelinic neurotransmission: A novel mode of cell signalling in the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19: 49–57.
- Micu I, Plemel JR, Lachance C, Proft J, Jansen AJ, Cummins K, et al. The molecular physiology of the axo-myelinic synapse. *Exp Neurol* 2016; 276: 41–50.
- Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 1–36.
- Mirza MA, Ritzel R, Xu Y, McCullough LD, Liu F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 1–10.
- Mitchell RT, Mungall W, McKinnell C, Sharpe RM, Cruickshanks L, Milne L, et al. Anogenital distance plasticity in adulthood: Implications for its use as a biomarker of fetal androgen action. *Endocrinology* 2015; 156: 24–31.
- Morland C, Andersson KA, Haugen ØP, Hadzic A, Kleppa L, Gille A, et al. Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat Commun* 2017; 8: 1–9.
- Morland C, Lauritzen KH, Puchades M, Holm-Hansen S, Andersson K, Gjedde A, et al. The lactate

- receptor, G-protein-coupled receptor 81/hydroxycarboxylic acid receptor 1: Expression and action in brain. *J Neurosci Res* 2015; 93: 1045–1055.
- Mosienko V, Teschemacher AG, Kasparov S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35: 1069–1075.
- Motz BA, Alberts JR. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 529–533.
- Muramatsu K, Fukuda A, Togari H, Wada Y, Nishino H. Vulnerability to cerebral hypoxic-ischemic insult in neonatal but not in adult rats is in parallel with disruption of the blood-brain barrier. *Stroke* 1997; 28: 2281–2289.
- Nair J, Kumar V. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. *Children* 2018; 5: 99.
- Nasi A, Fekete T, Krishnamurthy A, Snowden S, Rajnavölgyi E, Catrina AI, et al. Dendritic Cell Reprogramming by Endogenously Produced Lactic Acid. *J Immunol* 2013; 191: 3090–3099.
- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1697671/pdf/canvetj00382-0052.pdf>
- Ness JK, Romanko MJ, Rothstein RP, Wood TL, Levison SW. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci* 2001; 23: 203–208.
- Netto CA, Sanches E, Odorcyk FK, Duran-Carabali LE, Weis SN. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J Neurosci Res* 2017; 95: 409–421.
- Netto CA, Sanches EF, Odorcyk F, Duran-Carabali LE, Sizonenko S V. Pregnancy as a valuable period for preventing hypoxia-ischemia brain damage. *Int J Dev Neurosci* 2018; 70: 12–24.
- Nijboer CHA, Kavelaars A, Van Bel F, Heijnen CJ, Groenendaal F. Gender-dependent pathways of hypoxia-ischemia-induced cell death and neuroprotection in the immature P3 rat. *Dev Neurosci* 2007; 29: 385–392.
- Northington FJ, Chavez-Valdez R, Graham EM, Razdan S, Gauda EB, Martin LJ. Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 178–189.
- Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 207–219.
- Olney JW. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 101–109.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 2007; 55: 1251–1262.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 10625–10629.
- Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1152–1166.
- Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther* 2006; 28: 1353–1365.
- Peskind ER, Jensen CF, Pascualy M, Tsuang D, Cowley D, Martin DC, et al. Sodium lactate and hypertonic sodium chloride induce equivalent panic incidence, panic symptoms, and hyponatremia in panic disorder. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 1007–1016.
- Peterson BL, Won S, Geddes RI, Sayeed I, Stein DG. Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. *Behav Brain Res* 2015; 286: 152–165.
- Polan HJ, Hofer MA. Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev Psychobiol* 1998; 33: 5–20.
- Procianoy RS, Silveira R de C. Síndrome hipóxico-esquêmica. *J Pediatr S63 J Pediatr (Rio J)* 2001; 77: 63–70.
- Rafiki A, Boulland JL, Halestrap AP, Ottersen OP, Bergersen L. Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* 2003; 122:

- 677–688.
- Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: Emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol* 2009; 5: 380–391.
- Rees S, Harding R, Walker D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 551–563.
- Rennie JM, Robertson NRC. Rennie and Robertson's textbook of neonatology. Churchill Livingstone; 2012
- Rice AC, Zsoldos R, Chen T, Wilson MS, Alessandri B, Hamm RJ, et al. Lactate administration attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury. *Brain Res* 2002; 928: 156–159.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9: 131–141.
- Rinholm JE, Hamilton NB, Kessar N, Richardson WD, Bergersen LH, Attwell D. Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination by Glucose and Lactate. *J Neurosci* 2011; 31: 538–548.
- Rocha-Ferreira E, Vincent A, Bright S, Peebles DM, Hristova M. The duration of hypothermia affects short-term neuroprotection in a mouse model of neonatal hypoxic ischaemic injury. *PLoS One* 2018; 13
- Roelfsema V, Bennet L, George S, Wu D, Guan J, Veerman M, et al. Window of Opportunity of Cerebral Hypothermia for Postischemic White Matter Injury in the Near-Term Fetal Sheep. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 877–886.
- Ros J, Pecinska N, Alessandri B, Landolt H, Fillenz M. Lactate reduces glutamate-induced neurotoxicity in rat cortex. *J Neurosci Res* 2001; 66: 790–794.
- Rosafio K, Pellerin L. Oxygen tension controls the expression of the monocarboxylate transporter MCT4 in cultured mouse cortical astrocytes via a hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -mediated transcriptional regulation. *Glia* 2014; 62: 477–490.
- Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci* 1987; 10: 299–302.
- Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor - still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995; 18: 57–58.
- Russell KL, Kutchko KM, Fowler SC, Berman NEJ, Levant B. Sensorimotor behavioral tests for use in a juvenile rat model of traumatic brain injury: Assessment of sex differences. *J Neurosci Methods* 2011; 199: 214–222.
- Saab AS, Tzvetanova ID, Nave KA. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol* 2013; 23: 1065–1072.
- Saab AS, Tzvetanova ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, et al. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron* 2016; 91: 119–132.
- Sabir H, Scull-Brown E, Liu X, Thoresen M. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke* 2012; 43: 3364–3370.
- Sakurai T, Davenport R, Stafford S, Grosse J, Ogawa K, Cameron J, et al. Identification of a novel GPR81-selective agonist that suppresses lipolysis in mice without cutaneous flushing. *Eur J Pharmacol* 2014; 727: 1–7.
- Saliba E, Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate* 2001; 79: 224–227.
- Sanches EF, Arteni N, Nicola F, Aristimunha D, Netto CA. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience* 2015; 290: 581–593.
- Sanches EF, Arteni NS, Spindler C, Moysés F, Siqueira IR, Perry ML, et al. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Res* 2012; 1438: 85–92.
- Sanches EF, Durán-Carabali LE, Tosta A, Nicola F, Schmitz F, Rodrigues A, et al. Pregnancy swimming causes short- and long-term neuroprotection against hypoxia-ischemia in very immature rats. *Pediatr Res* 2017; 82: 544–553.
- Sanches EF, van de Looij Y, Toulotte A, Sizonenko SV, Lei H. Mild Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia in Very Immature Rats Causes Long-Term Behavioral and Cerebellar Abnormalities at Adulthood. *Front Physiol* 2019; 10: 1–12.

- Sánchez-Abarca LI, Tabernero A, Medina JM. Oligodendrocytes use lactate as a source of energy and as a precursor of lipids. *Glia* 2001; 36: 321–329.
- Santillán ME, Vincenti LM, Martini AC, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD, Mangeaud A, et al. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different  $\omega$ -6: $\omega$ -3 ratios in mice. *Nutrition* 2010; 26: 423–431.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000; 39: 777–787.
- Schlaepfer WW. Neurofilaments were isolated from desheathed and minced segments of rat pe- Preparation of Anti , era and Gamma Globulin ( IgG ) Derivatives Polyacrylamide Gel Electrophoresis Extraction of Nerve by Osmotic Shock WILLIAM W . SCHLAEPFER *Immune Electron Mic.* 1977: 226–240.
- Schurr A. Lactate: The ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 142–152.
- Schurr A, Miller JJ, Payne RS, Rigor BM. An Increase in Lactate Output by Brain Tissue Serves to Meet the Energy Needs of Glutamate-Activated Neurons. *J Neurosci* 1999; 19: 34–39.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: An in vitro study. *Brain Res* 1997; 744: 105–111.
- Schurr A, West CA, Rigor BM. Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Sci Sci* 1988; 240: 1326–1328.
- Shaikh H, Lechpammer M, Jensen FE, Warfield SK, Hansen AH, Kosaras B, et al. Increased Brain Perfusion Persists over the First Month of Life in Term Asphyxiated Newborns Treated with Hypothermia: Does it Reflect Activated Angiogenesis? *Transl Stroke Res* 2015; 6: 224–233.
- Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004; 80: 125–41.
- Shankaran S, Lupton AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Hypothermia Perinat asphyxial Enceph* 2005; 353: 1574–1584.
- Shankaran S, Lupton AR, Pappas A, McDonald SA, Das A, Tyson JE, et al. Effect of depth and duration of cooling on death or disability at age 18 months among neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy a randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2017; 318: 57–67.
- Silberbauer CJ, Surina-Baumgartner DM, Arnold M, Langhans W. Prandial lactate infusion inhibits spontaneous feeding in rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: 646–653.
- Silveira RC, Procianny RS. Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr (Versão em Port)* 2015; 91: S78–S83.
- Sisa C, Kholia S, Naylor J, Sanchez MBH, Bruno S, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stromal cell derived extracellular vesicles reduce hypoxia-ischaemia induced perinatal injury. *Front Physiol* 2019; 10
- Smith A, Garbus H, Rosenkrantz T, Fitch R. Sex Differences in Behavioral Outcomes Following Temperature Modulation During Induced Neonatal Hypoxic Ischemic Injury in Rats. *Brain Sci* 2015; 5: 220–240.
- Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Effects of Sex and Mild Intrainsult Hypothermia on Neuropathology and Neural Reorganization following Neonatal Hypoxic Ischemic Brain Injury in Rats. *Neural Plast* 2016; 2016: 1–11.
- Sobotka TJ, Cook MP, Brodie RE. Neonatal Malnutrition: Neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Res* 1974; 65: 443–457.
- Sun HS, Xu B, Chen W, Xiao A, Turlova E, Alibraham A, et al. Neuronal KATP channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol* 2015; 263: 161–171.
- Sun S, Li H, Chen J, Qian Q. Lactic Acid: No Longer an Inert and End-Product of Glycolysis. *Physiology* 2017; 32: 453–463.
- Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of Erythropoietin-induced Brain Protection in Neonatal Hypoxia-Ischemia Rat Model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 259–270.

Sutherland BA, Shaw OM, Clarkson AN, Jackson DM, Sammut IA. of action. 2004; 19: 258–260.

Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 2011; 144: 810–23.

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

Tauffenberger A, Fiumelli H, Almustafa S, Magistretti PJ. Lactate and pyruvate promote cellular stress resistance and longevity through ROS signaling. *bioRxiv* 2019: 542316.

Teo JD, Morris MJ, Jones NM. Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. *Brain Behav Immun* 2017; 63: 186–196.

Thoresen M. Combining two good treatments makes it worse. *Brain Behav Immun* 2018; 71: 7–8.

van Tilborg E, de Theije CGM, van Hal M, Wagenaar N, de Vries LS, Benders MJ, et al. Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *Glia* 2018; 66: 221–238.

Tonkiss J, Harrison RH, Galler JR. Differential effects of prenatal protein malnutrition and prenatal cocaine on a test of homing behavior in rat pups. *Physiol Behav* 1996; 60: 1013–1018.

Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Ikeda T. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Exp Neurol* 2012; 233: 214–220.

Tu X, Wang M, Liu Y, Zhao W, Ren X, Li Y, et al. Pretreatment of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Exerts Neuroprotective Effect in Murine Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury by Its Antiapoptotic Property. *Cell Mol Neurobiol* 2019; 39: 953–961.

Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 $\alpha$ -dependent mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 9030–9037.

Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999; 55: 158–163.

Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3149–3154.

Vicario C, Arizmendi C, Malloch G, Clark JB, Medina JM. Lactate Utilization by Isolated Cells from Early Neonatal Rat Brain. 1988

Vicario C, Medina JM. Metabolism of Lactate in the Rat Brain During the Early Neonatal Period. *J Neurochem* 1992; 59: 32–40.

Vohra R, Aldana BI, Bulli G, Skytt DM, Waagepetersen H, Bergersen LH, et al. Lactate-Mediated Protection of Retinal Ganglion Cells. *J Mol Biol* 2019; 431: 1878–1888.

Vohra R, Aldana BI, Waagepetersen H, Bergersen LH, Kolko M. Dual properties of lactate in müller cells: The effect of GPR81 activation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2019; 60: 999–1008.

Volpe JJ. Perinatal brain injury: From pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7: 56–64.

Volpe JJ, Inder T, Darras B. *Volpe's Neurology of the Newborn*. 6th Editio. Elsevier; 2017

Volpe JJ, Zipurksy A. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res* 2001; 50: 553–562.

Waddell J, Hanscom M, Shalon Edwards N, McKenna MC, McCarthy MM. Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. *Exp Neurol* 2016; 275: 285–295.

Wassink G, Gunn ER, Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. The mechanisms and treatment of asphyxial encephalopathy. *Front Neurosci* 2014; 8: 1–11.

Weis SN, Toniazzo AP, Ander BP, Zhan X, Careaga M, Ashwood P, et al. Autophagy in the brain of neonates following hypoxia–ischemia shows sex- and region-specific effects. *Neuroscience* 2014; 256: 201–209.

Williams GD, Palmer C, Heitjan DF, Smith MB. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia-ischemia: A 31P NMR study in unanesthetized immature rats. *Neurosci Lett* 1992; 144: 103–106.

Wood T, Osredkar D, Puchades M, Maes E, Falck M, Flatebø T, et al. Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* 2016; 6: 1–12.

Wu L ling, Zhang L, Shao J, Qin Y feng, Yang R wang, Zhao Z yan. Effect of perinatal iron deficiency

- on myelination and associated behaviors in rat pups. *Behav Brain Res* 2008; 188: 263–270.
- Wu YW, Gonzalez FF. Erythropoietin: A novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Dev Med Child Neurol* 2015; 57: 34–39.
- Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B. In Vivo Evidence for Lactate as a Neuronal Energy Source. *J Neurosci* 2011; 31: 7477–7485.
- Xiong M, Yang Y, Chen GQ, Zhou WH. Post-ischemic hypothermia for 24 h in P7 rats rescues hippocampal neuron: Association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain Res Bull* 2009; 79: 351–357.
- Yan H, Rivkees SA. Hypoglycemia influences oligodendrocyte development and myelin formation. *Neuroreport* 2006; 17: 55–59.
- Yoo J, Kim H-S, Hwang D-Y. Stem cells as promising therapeutic options for neurological disorders. *J Cell Biochem* 2013; 114: 743–753.
- Zhang L, Wang L, Ning FB, Wang T, Liang YC, Liu YL. Erythropoietin reduces hippocampus injury in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage via targeting matrix metalloprotein-2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 4327–4333.
- Zhou J, Liu T, Guo H, Cui H, Li P, Feng D, et al. Lactate potentiates angiogenesis and neurogenesis in experimental intracerebral hemorrhage. *Exp Mol Med* 2018; 50
- Ziemka-Nalecz M, Jaworska J, Sypecka J, Polowy R, Filipkowski RK, Zalewska T. Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase Inhibitor, Exhibits Neuroprotective/Neurogenic Effects in a Rat Model of Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Mol Neurobiol* 2017; 54: 5300–5318.