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

Andrey Vinicios Soares Carvalho

ESTRATÉGIAS NEUROPROTETORAS PARA A HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL: EFEITOS DA LACTOFERRINA E DO BEZAFIBRATO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MITOCONDRIAL E REDOX

Porto Alegre
2025

Andrey Vinicios Soares Carvalho

ESTRATÉGIAS NEUROPROTETORAS PARA A HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL: EFEITOS DA LACTOFERRINA E DO BEZAFIBRATO SOBRE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA, MITOCONDRIAL E REDOX

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto
Coorientador: Prof. Dr. Guilhian Leipnitz

Porto Alegre
2025

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Professor Carlos Alexandre Netto, por ter me recebido em seu laboratório desde a iniciação científica e por confiar em mim para a realização deste trabalho. Sou grato pelo seu incentivo à pesquisa e pelas conversas sempre com palavras sabias e otimistas.

Ao meu coorientador, Professor Guilhian Leipnitz, pelo planejamento e suporte para a execução deste projeto. Ao Professor Moacir Wajner e seus alunos, pela realização dos experimentos de bioenergética mitocondrial inclusos nesta tese. À Professora Angela Wyse e seus alunos, por sua colaboração na realização dos experimentos bioquímicos presentes neste trabalho. À Professora Larissa Bobermim, por ter realizado e me ensinado técnicas de biologia molecular desenvolvidas neste trabalho.

Agradeço ao Dr. Eduardo Sanches e à Professora Luz Elena Durán-Carabali por todos os ensinamentos científicos transmitidos desde a iniciação científica e pela constante disposição em ajudar sempre que necessário. Vocês são duas grandes referências como pesquisadores, em quem busco me espelhar!

Sou grato aos meus colegas de laboratório, em especial à Danielli, Diorlon, Eduarda e Kiara, pela colaboração nos projetos, pelas discussões científicas, pelas boas risadas — e por estarem sempre dispostos a comprar um bolo. Às alunas de iniciação cientifica, Bruna e Djuly, que sem dúvidas foram essenciais na realização destes trabalhos. E agradeço também às amizades que foram construídas durante o período deste doutorado.

Agradeço ao meu amor, Rafael, que além de ser um colaborador científico incansável, é a pessoa com quem divido meus sonhos, meus anseios e a minha vida.

Aos meus pais e avós, por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar. Serei eternamente grato por ter vocês na minha vida!

Muito obrigado a todos!

APRESENTAÇÃO DA TESE

Esta tese é constituída por:

PARTE I

- Introdução: Embasamento teórico para o acompanhamento deste estudo e seus objetivos.
- Hipótese: Expõe os principais resultados esperados.
- Objetivos: Propósitos centrais do trabalho, desenvolvidos ao longo dos *Capítulos 1, 2* e *3*.

PARTE II

- *Capítulo 1*: Artigo publicado no periódico *Free Radical Biology and Medicine*:
  "Maternal lactoferrin supplementation prevents mitochondrial and redox homeostasis dysfunction, and improves antioxidant defenses through Nrf2 and UCP2 signaling after neonatal hypoxia-ischemia"
- *Capítulo 2*: Artigo submetido ao periódico *Brain, Behavior, and Immunity*:
  "Bezafibrate preserves hippocampal integrity, modulates neuroinflammation, and improves cognitive outcomes after a neonatal hypoxia–ischemia model in rats"
- *Capítulo 3*: Artigo submetido ao periódico *Metabolic Brain Disease*:
  "Activation of PGC-1α signaling by bezafibrate mitigates mitochondrial dysfunction and redox imbalance in the hippocampus after neonatal hypoxia-ischemia"

PARTE III

- Discussão Geral: Interpretação integrada dos dados obtidos nos *Capítulos 1, 2* e *3.*
- Conclusões: Apresenta as conclusões gerais da tese.
- Perspectivas futuras.
- Referências: Lista as referências citadas nas seções Introdução e Discussão.

SUMÁRIO

RESUMO *6*
ABSTRACT *7*
LISTA DE ABREVIATURAS *8*
PARTE I *10*
1. INTRODUÇÃO *11*
1.1 Hipóxia-isquemia neonatal (HI) **11**
1.2 Fisiopatologia da HI **14**
1.3 Disfunção mitocondrial após a HI **18**
1.4 Estresse oxidativo após a HI **21**
1.5 Abordagens neuroprotetoras para a HI **23**
1.6 Lactoferrina como composto neuroprotetor para a HI **24**
1.7 Bezafibrato como estratégia neuroprotetora **26**
1.8 Hipótese **28**
2. OBJETIVOS *29*
2.1 Objetivo geral **29**
2.2 Objetivos específicos **29**
PARTE II *31*
Capítulo 1 ..... **32**
Capítulo 2 ..... **45**
Capítulo 3 ..... **82**
PARTE III *114*
3. DISCUSSÃO *115*
4. CONCLUSÕES *128*
5. PERSPECTIVAS *129*
6. REFERÊNCIAS *130*

RESUMO

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) é uma das principais causas de lesão cerebral no período neonatal, podendo comprometer o desenvolvimento neurológico e resultar em déficits cognitivos, sensoriais e motores. A fisiopatologia da HI resulta da redução do suprimento sanguíneo e da oferta de oxigênio ao encéfalo, levando ao colapso energético mitocondrial, ao estresse oxidativo e à neuroinflamação. Atualmente, o único tratamento clínico para indivíduos acometidos pela HI neonatal é a Hipotermia Terapêutica, no entanto, em alguns casos esta intervenção pode ser ineficiente. Desta forma, novas estratégias neuroprotetoras devem ser estudas para prevenir ou tratar os efeitos deletérios desta patologia. No contexto experimental da HI, dois compostos parecem ser promissores: a Lactoferrina (Lf), uma glicoproteína presente no colostro e no leite materno, apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Por outro lado, o Bezafibrato (BZ) é um medicamento que tem demonstrado efeitos protetores em doenças metabólicas e neurodegenerativas. Os principais mecanismos de ação deste fármaco envolvem biogênese mitocondrial com consequente estimulação da cadeia respiratória mitocondrial e redução do estresse oxidativo. Desta forma, este trabalho investigou os efeitos neuroprotetores destes dois compostos em experimentos distintos. A Lf foi suplementada na dieta materna e os efeitos foram observados na prole submetida ao modelo experimental de HI. Em outro experimento, o Bz foi administrado 1 hora após a HI e continuado por 3 dias. A suplementação com Lf preveniu o estresse oxidativo induzido pela HI e promoveu aumento da expressão de Nrf2 e UCP2, sugerindo que estes podem ser os mecanismos neuroprotetores da Lf. O Bz foi capaz de impedir o dano tecidual ao hipocampo e preservar a função cognitiva após a HI. O Bz também foi capaz de reduzir os níveis de estresse oxidativo, resposta neuroinflamatória e ativação do inflamassoma NLRP3 após a HI. Além disto, o Bz desempenhou papel em regular a dinâmica mitocondrial, que estava prejudicada após a HI. Este efeito pode estar relacionado com a ativação de via de PGC-1α, como evidenciado pelo aumento dos níveis desta proteína nos animais submetidos à HI. Este trabalho investigou estratégias distintas (nutricional e farmacológica) para prevenir os efeitos prejudiciais da HI em diferentes estágios do neurodesenvolvimento sobre a mitocôndria e o estresse oxidativo, ambos Lf e Bz foram capazes de conferir proteção nos parâmetros avaliados, porém por mecanismos celulares diferentes.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia neonatal (HI), neuroproteção, Lactoferrina (Lf), Bezafibrato (Bz), neuroinflamação, mitocôndria, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is one of the main causes of brain injury in the neonatal period, potentially compromising neurological development and resulting in cognitive, sensory, and motor deficits. The pathophysiology of HI results from reduced blood supply and oxygen delivery to the brain, leading to mitochondrial energy collapse, oxidative stress, and neuroinflammation. Currently, the only clinical treatment for individuals affected by neonatal HI is Therapeutic Hypothermia; however, in some cases, this intervention may be ineffective. Therefore, new neuroprotective strategies must be explored to prevent or treat the deleterious effects of this condition. In the experimental context of HI, two compounds appear to be promising: Lactoferrin (Lf), a glycoprotein present in colostrum and breast milk, exhibits antioxidant and anti-inflammatory properties. On the other hand, Bezafibrate (Bz) is a drug that has shown protective effects in metabolic and neurodegenerative diseases. The main mechanisms of action of this drug involve mitochondrial biogenesis with consequent stimulation of the mitochondrial respiratory chain and reduction of oxidative stress. Thus, this study investigated the neuroprotective effects of these two compounds in separate experiments. Lf was supplemented in the maternal diet, and its effects were observed in the offspring subjected to the experimental HI model. In another experiment, Bz was administered 1 hour after HI and continued for 3 days. Lf supplementation prevented HI-induced oxidative stress and increased the expression of Nrf2 and UCP2, suggesting that these may be the neuroprotective mechanisms of Lf. Bz was able to prevent hippocampal tissue damage and preserve cognitive function after HI. Bz also reduced oxidative stress levels, neuroinflammatory responses, and activation of the NLRP3 inflammasome following HI. In addition, Bz played a role in regulating mitochondrial dynamics, which were impaired after HI. This effect may be related to the activation of the PGC-1α pathway, as evidenced by increased levels of this protein in animals subjected to HI. This study investigated distinct strategies (nutritional and pharmacological) to prevent the detrimental effects of HI at different stages of neurodevelopment, focusing on mitochondria and oxidative stress. Both Lf and Bz were capable of conferring protection in the evaluated parameters, although through different cellular mechanisms.

Keywords: Neonatal hypoxia-ischemia (HI), neuroprotection, Lactoferrin (Lf), Bezafibrate (Bz), neuroinflammation, mitochondria, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

HI: Hipóxia-Isquemia

SNC: Sistema Nervoso Central

DPN: Dias Pós-Natal

ATP: Adenosina Trifosfato

Na^+/K^+-ATPase: Bomba de sódio-potássio dependente de ATP

Lf: Lactoferrina

Bz: Bezafibrato

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos)

LPL: Lipoproteína Lipase

HDL-C: High Density Lipoprotein Cholesterol (Colesterol de lipoproteína de alta densidade)

PGC-1α: Coativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos 1 alfa

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

ERN: Espécies Reativas de Nitrogênio

SOD: Superóxido Dismutase

CAT: Catalase

GPx: Glutationa Peroxidase

GSH: Glutationa Reduzida

MRI: Imagem por Ressonância Magnética (Magnetic Resonance Imaging)

LPS: Lipopolissacarídeo

IL: Interleucina (ex: IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10)

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral alfa

AIF: Fator Indutor de Apoptose

EndoG: Endonuclease G

Smac/Diablo: Proteína promotora de apoptose

DRP1: Proteína relacionada à dinamina 1

Fis1: Proteína de fissão mitocondrial 1

MFN1/MFN2: Mitofusinas 1 e 2

OPA1: Proteína de atrofia óptica 1

PINK1: Quinase induzida por PTEN

LRP-1: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1

Nrf2: Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

UCP2: Proteína desacopladora mitocondrial 2

NLRP3: Inflamassoma NLRP3

ASC: Proteína adaptadora do inflamassoma

COX-2: Ciclooxigenase 2

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível

BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

PARTE I

Introdução e objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipóxia-isquemia neonatal (HI)

A hipóxia-isquemia neonatal (HI) representa uma das principais causas de lesões no Sistema Nervoso (SNC) na infância. A HI pode resultar em diversos níveis de danos ao cérebro, e esse comprometimento pode desencadear o desenvolvimento de várias doenças neurológicas, como a paralisia cerebral, epilepsia, distúrbios motores e dificuldades de aprendizado (Lawn et al., 2005). A gravidade das deficiências cognitivas e intelectuais associadas a essas condições está diretamente relacionada ao grau do dano cerebral causado pela HI, que pode ser categorizado desde leve até grave (Airede, 1991; De Haan et al., 2006). De modo geral, a ocorrência de HI é de 1 e 3 a cada 1000 nascidos vivos em países desenvolvidos, enquanto em países em desenvolvimento pode variar de 2,3 a 30,6 a cada 1.000 nascidos vivos (Kurinczuk et al., 2010; Namusoke et al., 2018; Park et al., 2023).

A HI pode ser gerada por diversas condições maternas ou fetais, como por exemplo disfunções circulatórias e/ou complicações obstétricas, descolamento prematuro da placenta ou também com a compressão do cordão umbilical, tais condições podem interferir na transferência de oxigênio e levar à asfixia fetal (Ferriero, 2001; Volpe, 2009). A privação de oxigênio e do fluxo sanguíneo pode gerar danos no encéfalo que afetam o desenvolvimento cognitivo e motor do recém-nascido (Volpe, 2009). A ausência de substratos energéticos pode resultar em lesões, principalmente, no SNC; entretanto, é

possível observar em alguns casos alterações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas e renais (Vannucci & Perlman, 1997).

Além dos fatores de risco previamente mencionados, a prematuridade e o risco de parto prematuro também se configuram como determinantes importantes para o desenvolvimento da HI. Recém-nascidos com idade gestacional inferior a 37 semanas, especialmente os prematuros extremos (< 32 semanas), apresentam maior vulnerabilidade à instabilidade hemodinâmica e à imaturidade vascular e metabólica cerebral, fatores que aumentam a suscetibilidade à hipóxia-isquemia. Em países de alta renda, a incidência de HI entre recém-nascidos a termo (≥ 37 semanas) é de aproximadamente 1,5 casos por 1.000 nascidos vivos, enquanto nos pré-termo a frequência é substancialmente maior, variando de 20 a 60 por 1.000, a depender da idade gestacional e das condições perinatais (Douglas-Escobar & Weiss, 2015).

Por outro lado, mesmo gestações consideradas saudáveis podem evoluir com eventos hipóxicos agudos durante o parto, como descolamento prematuro de placenta, prolapso de cordão umbilical ou sofrimento fetal, que também resultam em HI em recém-nascidos a termo, com incidência relatada próxima de 1,7 por 1.000 nascimentos (Lundgren et al., 2018). Dessa forma, compreende-se que os fatores que contribuem para a HI são amplos e multifatoriais, abrangendo desde condições maternas e placentárias até complicações intraparto e vulnerabilidades neonatais. Essa diversidade reforça a importância de novas estratégias neuroprotetoras que considerem tanto a prevenção em gestações de risco, quanto a intervenção terapêutica imediata após o insulto hipóxico-isquêmico.

Para investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na HI, foi desenvolvido um modelo experimental descrito por Levine (1960) e posteriormente aprimorado por Rice, Vannucci e colaboradores (1981). Esse modelo, amplamente utilizado em estudos pré-clínicos, consiste na oclusão unilateral da artéria carótida comum, seguida pela exposição dos animais a um ambiente hipóxico controlado por um período determinado. Esta intervenção cirúrgica reproduz, de forma consistente, o episódio de asfixia perinatal em humanos, permitindo o estudo das alterações metabólicas, inflamatórias e comportamentais associadas à HI.

Além disso, a idade pós-natal (DPN) em que o modelo é realizado em roedores permite representar diferentes estágios do neurodesenvolvimento humano. Estudos comparativos indicam que o desenvolvimento do encéfalo de um filhote de rato no DPN7 corresponde, aproximadamente, ao de um recém-nascido humano prematuro tardio, enquanto o DPN10–11 se assemelha ao estágio de um neonato termo, considerando parâmetros como mielinização, sinaptogênese, desenvolvimento glial e maturação metabólica cerebral (Semple et al., 2013; Zeiss, 2021). Sendo assim, a indução da HI no DPN7 é utilizada para mimetizar o insulto no encéfalo imaturo, característico de prematuridade, ao passo que a indução entre DPN10 e DPN11 representa de forma mais fidedigna a HI em recém-nascidos a termo (Patel et al., 2015). Essa correspondência é fundamental para interpretar adequadamente os resultados obtidos e sua relevância translacional, uma vez que os mecanismos de vulnerabilidade e reparo variam de acordo com o estágio de maturação do sistema nervoso central.

1.2 Fisiopatologia da HI

Os mecanismos de lesão da HI são progressivos, iniciando pela ausência de substratos energéticos e oxigênio levando a um colapso metabólico, o qual resulta em morte celular por ativação de diferentes mecanismos (Figura 1) (Davidson et al., 2015). Este processo de lesão se inicia no momento do evento hipóxico-isquêmico e permanece após o período de recuperação (Hassell et al., 2015). Dessa forma, a progressão temporal da lesão decorrente da HI pode ser dividida em fases distintas, conforme as alterações patológicas predominantes em cada período. Essa classificação compreende uma fase primária, caracterizada pelo insulto energético inicial; uma fase latente, na qual ocorrem processos de recuperação parcial e ativação de vias de sinalização celular; seguida pela fase secundária, marcada por excitotoxicidade, estresse oxidativo e neuroinflamação; e, por fim, uma fase terciária (ou crônica), associada a alterações estruturais persistentes e déficits funcionais a longo prazo (Chakkarapani et al., 2021; Ranjan & Gulati, 2023).

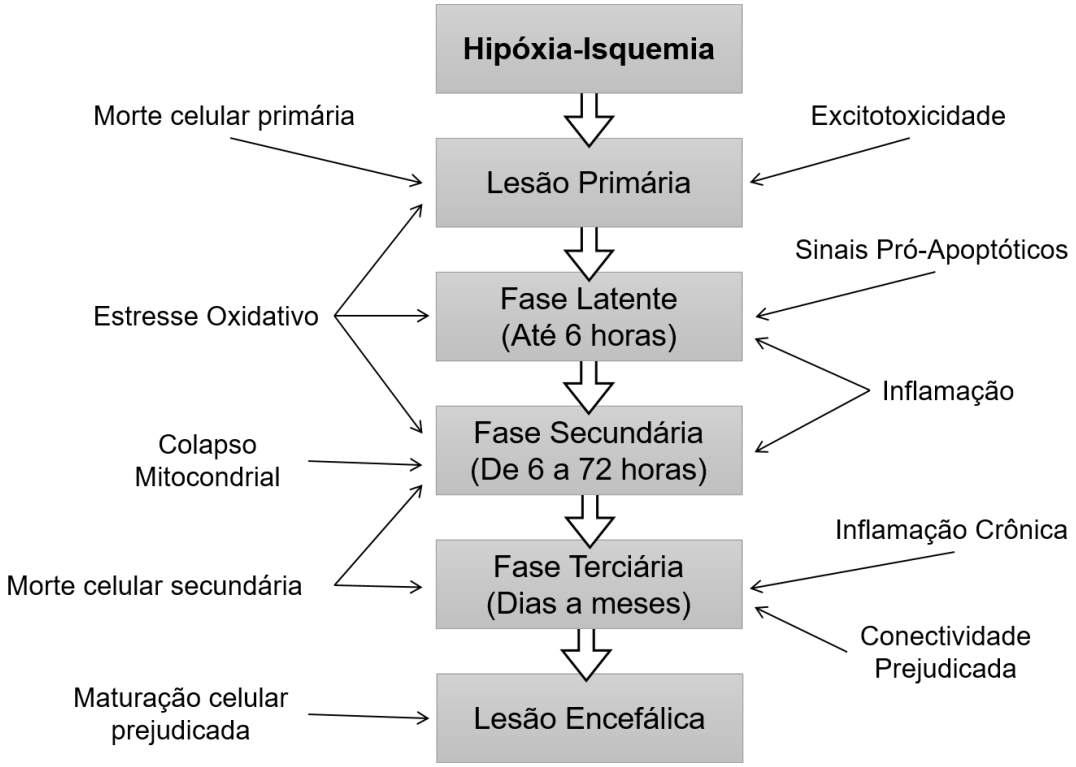

Figura 1 – Mecanismos fisiopatológicos da lesão HI (Adaptado de Davidson et al., 2015).

A lesão primária acontece imediatamente após o insulto, sendo caracterizada pela diminuição do suprimento de substratos energéticos e oxigênio, que causa uma falha energética primária e desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos que afetam a integridade de neurônios e células gliais (Thornton & Hagberg, 2015; Vannucci & Hagberg, 2004). A falta de glicose, um dos substratos energéticos mais importantes do SNC, e também diminuição de oxigênio contribuem para a inibição da síntese de ATP (adenosina trifosfato) que prejudica a atividade das bombas iônicas, como a bomba Na^+/K^+-ATPase e promove um desequilíbrio homeostático, invertendo as concentrações iônicas, e a despolarização celular e consequente liberação de neurotransmissores, especialmente do aminoácido excitatório glutamato (Arnaiz & Ordieres, 2014; Johnston et al., 2001). A inversão de concentrações iônicas intracelular causa

um processo de tumefação celular e a ruptura das membranas celulares, desencadeando um processo de morte celular por necrose (Barks & Silverstein, 1992; Portera-Cailliau et al., 1997). A falha energética permanece durante a fase latente, a qual ocorre até as 6 primeiras horas após o evento hipóxico (Johnston et al., 2001). Contudo, durante este período muitos neurônios podem se recuperar do insulto, ou pelo menos parcialmente.

A lesão secundária está relacionada com a reperfusão do tecido lesado que acontece entre 6 e 72 horas após a lesão (Davidson et al., 2015). Nesta fase, se observa recuperação inicial do metabolismo celular por consequente aumento da oxigenação (Davidson et al., 2015). Neste momento ocorre a falha energética "secundária" com o grande influxo de Ca^{2+}, culminando em disfunção mitocondrial, produção excessiva de radicais livres e consequentemente dano tecidual por estresse oxidativo, contribuindo para o aumento da resposta inflamatória (Lai & Yang, 2011; Shankaran et al., 2012; Volpe, 2009b). A morte celular por apoptose tem seu auge 24 horas após a lesão HI (Zhang et al., 2021).

A ativação da resposta imunológica é um dos fatores mais importantes na determinação da gravidade da lesão, sendo mais graves as sequelas quanto maior for a resposta imune (Jin et al., 2009). A resposta inflamatória aguda no SNC inicia com a infiltração de leucócitos periféricos e ativação da micróglia e de astrócitos. Estas células gliais detectam padrões moleculares associados ao dano (PMADs) e tornam-se reativas, atuando como secretores de citocinas pró-inflamatórias (Zhao et al., 2013).

As células microgliais atuam como células de defesa no tecido nervoso e quando estimuladas pela presença de PMADs, alteram sua morfologia e

adquirem a capacidade de fagocitose. Os astrócitos, ao detectarem PMADs, tornam-se reativos em um processo de reativiadade astrocitaria, onde é observado hipertrofia destas células e a formação da cicatriz astrocítica nas áreas mais danificadas pela lesão (Järlestedt et al., 2010; Yu et al., 2021). A liberação de citocinas pelas células gliais, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10) e TNF-α (Fator de Necrose Tumoral-alfa), atuam como um sinalizador para inflamação, como por exemplo: a IL-1β que promovem o agravamento da resposta inflamatória e consequentemente a mobilização de células de defesa no SNC e pode promover a morte de células cerebrais (Fathali et al., 2013). Em contrapartida, a liberação de IL-10 tem papel antagônico na resposta inflamatória, produzida também pelas células gliais, esta citocina regula a resposta inflamatória inibindo o recrutamento de células de defesa para o tecido nervoso (Albrecht et al., 2019).

A lesão terciaria, também chamada de fase crônica, é caracterizada pela astrogliose reativa, neuroinflamação crônica, alterações epigenéticas e o reparo tecidual. Durante este processo também há morte celular, ainda que em menor quantidade em comparação a lesão secundária, que podem acontecer de dias a meses após o evento hipóxico-isquêmico (Davidson et al., 2015). As células remanescentes têm seu desenvolvimento e maturação neural comprometidos, resultando na formação de conexões sinápticas anômalas e circuitos neuronais desorganizados. Consequentemente, observa-se, a longo prazo, uma redução do volume de estruturas encefálicas críticas, como o hipocampo e o corpo estriado, o que se reflete em déficits cognitivos e motores persistentes, frequentemente associados a alterações de memória, aprendizagem e coordenação motora fina (Arteni et al., 2003; E. F. Sanches et al., 2012).

1.3 Disfunção mitocondrial após a HI

Mitocôndrias são organelas complexas que têm papel central no metabolismo energético através da fosforilação oxidativa. Além disto, participam do controle do processo de apoptose e são importantes para a manutenção da homeostase do cálcio celular (Thornton & Hagberg, 2015). As mitocôndrias são corpúsculos envoltos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria das moléculas e íons, incluindo prótons (Nelson & Cox, 2017). A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o oxigênio é reduzido a água por elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$ que fluem por vários pares de redução-oxidação (cadeia respiratória), ocorrendo concomitantemente a produção de ATP a partir de ADP e Pi (Nelson & Cox, 2017). O fluxo de elétrons a partir de NADH e $FADH_2$ até o oxigênio (aceptor final de elétrons) se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna com centros redox com afinidade crescente por elétrons.

No contexto da HI neonatal, a privação de oxigênio inibe a respiração mitocondrial, reduzindo a produção de energia no cérebro. Isso ocorre devido à interrupção da cadeia de transporte de elétrons, impedindo a fosforilação oxidativa essencial para a síntese de ATP (Odorcyk et al., 2021; Weis et al., 2012). A escassez de ATP compromete funções vitais dos neurônios, como a atividade da bomba Na^+/K^+-ATPase, responsável por manter o equilíbrio eletroquímico celular por meio da troca de íons entre os meios intra e extracelular (da Costa et al., 2025). Como mencionado anteriormente, tais alterações eletroquímicas celulares intensificam o quadro de excitotoxicidade

glutamatérgica, promovendo liberação excessiva de glutamato e consequente influxo exacerbado de cálcio para o interior neuronal, eventos que desencadeiam disfunção mitocondrial e apoptose (Hagberg et al., 2014).

A formação da permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) envolve o recrutamento de proteínas da família Bcl-2, incluindo Bcl-xL e Bcl-2, que exercem função antiapoptótica, inibindo a morte celular, enquanto Bax atua de forma pró-apoptótica (Liu et al., 2025). A heterodimerização entre Bax e Bcl-2 representa um mecanismo central na regulação da via apoptótica. Após a ativação de um estímulo pró-apoptótico, os níveis de Bax superam os de Bcl-2 e Bcl-xL, promovendo sua translocação para a membrana mitocondrial, onde interage com Bak para formar a MOMP (Hagberg et al., 2014). A formação dessa permeabilidade permite a liberação de citocromo c, do fator indutor de apoptose (AIF), da endonuclease G (EndoG) e da Smac/Diablo do interior da mitocôndria para o citosol. Uma vez no citosol, o citocromo c se liga à Apaf-1, formando o apoptossomo, que recruta a procaspase-9, culminando na ativação da caspase-3. A ativação da caspase-3 resulta em fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e, consequentemente, morte celular programada (Thornton et al., 2018).

As mitocôndrias são organelas altamente dinâmicas que se adaptam às demandas do microambiente celular. Em condições de estresse ou depleção energética, essas organelas podem sofrer alterações morfológicas, como fusão ou fissão mitocondrial. A fissão é mediada principalmente pela ação da proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1) e da proteína de fissão mitocondrial 1 (Fis1), enquanto a fusão é conduzida pelas mitofusinas (MFN1 e MFN2) e pela proteína de atrofia óptica 1 (OPA1), responsáveis pela fusão das membranas externa e

interna da mitocôndria, respectivamente (Hagberg et al., 2014; Youle & Van Der Bliek, 2012).

Esses processos são essenciais para a manutenção da integridade e funcionalidade mitocondrial. A fusão permite a troca de conteúdos entre mitocôndrias e a diluição de proteínas danificadas, enquanto a fissão facilita a segregação e remoção de mitocôndrias disfuncionais. A fragmentação mitocondrial é uma consequência comum após a lesão HI, representando uma tentativa celular de isolar regiões comprometidas da organela (Nair et al., 2022). A degradação dessas mitocôndrias disfuncionais ocorre por meio de um processo seletivo conhecido como mitofagia.

A mitofagia mitocondrial é definida como o processo seletivo de degradação de mitocôndrias danificadas por meio da via autofagossomal-lisossomal. Esse mecanismo pode depender da ação da quinase induzida por PTEN (PINK1) e da proteína Parkin. Em mitocôndrias danificadas, ocorre o acúmulo de PINK1 na membrana externa, o que promove o recrutamento de Parkin. Essa interação leva à ubiquitinação de proteínas mitocondriais, que posteriormente se ligam à LC3B presente na membrana do autofagossomo. O autofagossomo então encapsula a mitocôndria danificada e se funde ao lisossomo, onde enzimas lisossomais degradam a organela comprometida (Picca et al., 2023).

O papel da mitofagia na lesão HI neonatal ainda não está completamente elucidado, e permanece incerto se a indução da mitofagia após a lesão exerce efeitos neuroprotetores ou deletérios, dependendo do contexto e da intensidade do estímulo. Outro aspecto fundamental é a biogênese mitocondrial, processo

essencial para o aumento da densidade mitocondrial nas células. Essa biogênese envolve a fissão de mitocôndrias pré-existentes, seguida por um programa coordenado de transcrição e tradução, regulado principalmente pelo coativador do receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos 1 alfa (PGC-1α) (Abu Shelbayeh et al., 2023). A biogênese mitocondrial é, portanto, crucial para restaurar e expandir a rede mitocondrial após a depleção causada pela mitofagia, contribuindo para o restabelecimento do metabolismo energético celular.

1.4 Estresse oxidativo após a HI

A produção excessiva de radiais livres contribui para o agravamento lesão HI. Após a reperfusão subsequente à fase primária da HI, ocorre uma rápida produção de radicais livres, que ultrapassam a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos do cérebro imaturo (Thornton et al., 2017). Os radicais livres são átomos ou moléculas que contém um número desigual de elétrons na camada de valência mais externa e tem a capacidade de existir de forma independente (Southorn; Powis, 1988; Halliwell and Gutteridge, 2007. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical (Halliwell and Gutteridge, 2007). Além disto, quando um radical livre reage com um composto não-radical, gera uma sequência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) que leva a formação de um produto radical livre que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical (Maxwell, 1995). O termo genérico, espécies reativas de oxigênio (ERO) incluí os radicais formados pela redução do superóxido (O_2) e de radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$), mas também de alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além das EROs, existem as

espécies reativas de nitrogênio (ERN), tendo como representantes principais o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o peroxinitrito ($ONOO^{-}$) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Espécies reativas são importantes para a fisiologia da célula, atuando como moléculas de sinalização em diversos mecanismos celulares. As espécies reativas são frequentemente produzidas e neutralizadas pelo sistema de defesas antioxidantes (Boveris et al., 1973). Entretanto, quando produzidas em altas concentrações, ou quando há um declínio na atividade dessas defesas, as espécies reativas podem causar danos às células. O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e os antioxidantes é descrito como estresse oxidativo, e este mecanismo está envolvido com diversas patologias (Halliwell and Gutteridge, 2007).

As defesas antioxidantes podem ser constituídas por defesas enzimáticas ou não-enzimáticas. Defesas enzimáticas atuam cataliticamente removendo os radicais livres, como por exemplo, a enzima superóxido-dismutase (SOD) que converte superóxido (O_2) em peróxido de hidrogênio, que também é uma ERO. O peróxido de hidrogênio pode ser reduzido pela ação das enzimas catalase (CAT) ou da glutationa peroxidase (GPx) que o converte em água e oxigênio. As defesas não-enzimáticas agem aprisionando as ERO e ERN, como por exemplo a glutationa reduzida (GSH), o α-tocoferol, o ácido ascórbico e a bilirrubina (Halliwell and Gutteridge, 2007).

O SNC neonatal é especialmente suscetível aos danos celulares causados pelo aumento da liberação de radicais livres após a lesão HI, esta sensibilidade deve-se às suas características: ácidos graxos insaturados

abundantes, alta taxa de consumo de oxigênio, menor quantidade de defesas antioxidantes, alto teor de água e baixa mielinização (Mavelli et al., 1982).

A mitocôndria é a organela celular responsável pela produção de energia celular. Durante a fase secundária da HI, com a reperfusão e a reoxigenação, o metabolismo mitocondrial é acelerado na tentativa de compensar a falha energética por meio do aumento da síntese de ATP (Mavelli et al., 1982). O alto consumo de O_2 pela mitocôndria, neste processo, significa uma alta atividade da cadeia respiratória, culminando em um aumento na produção do radical superóxido pela dispersão dos elétrons (Mavelli et al., 1982).

Devido a superprodução de EROs durante o processo de lesão da HI, o sistema de defesas antioxidantes é sobrecarregado pelo estresse oxidativo. Sabe-se que a produção excessiva de espécies reativas induzida pela HI causa o aumento do produto da peroxidação lipídica (malondialdeído) e dos níveis de nitratos e nitritos. Além disto, o estresse oxidativo pode levar a danos adicionais, como por exemplo: a desnaturação de proteínas, inativação de enzimas, dano ao DNA e danos ao citoesqueleto (Gaschler & Stockwell, 2017).

1.5 Abordagens neuroprotetoras para a HI

Diversas intervenções farmacológicas e não-farmacológicas têm sido estudadas para prevenir ou reverter os efeitos deletérios da HI neonatal. Tais estratégias podem atuam sobre diferentes vias de sinalização celular que podem resultar em proteção cerebral, como estimulação de fatores neurotróficos, redução da inflamação ou melhora o metabolismo celular (Dixon et al., 2015).

A lesão HI causa prejuízos ao SNC de diversas maneiras e isso se reflete na maturação e na função cerebral. Clinicamente, o tratamento mais utilizado em

recém-nascidos que sofrem HI é a hipotermia terapêutica. Porém, a hipotermia terapêutica não promove recuperação completa mesmo em casos moderados (Thoresen, 2018; Wassink et al., 2018). Em pesquisas pré-clínicas foram investigados diversos agentes neuroprotetores capazes de prevenir ou retardar o processo de lesão, como por exemplo: eritropoietina, melatonina, terapia com células-tronco, entre outras (Procianoy et al., 2001). Desta forma, é importante estudar outras estratégias que possam contribuir para a inibição dos fatores de progressão da lesão HI. Neste trabalho foram investigadas duas abordagens neuroprotetoras em diferentes momentos do neurodesenvolvimento: a suplementação materna com Lactoferrina e o tratamento neonatal com Bezafibrato.

1.6 Lactoferrina como composto neuroprotetor para a HI

A Lactoferrina (Lf) é produzida por glândulas exócrinas e encontrada em altos níveis no colostro e no leite materno (Ochoa & Sizonenko, 2017; Ronayne de Ferrer et al., 2000). A Lf atua em inúmeros processos biológicos, como no metabolismo do ferro, e tem ação anti-inflamatória, imunomoduladora e antioxidante (Edwards & Tan, 2006; Ronayne de Ferrer et al., 2000). Há evidências pré-clínicas demonstrando que a Lf é capaz de prevenir os danos causados por infecções perinatais, entretanto apenas alguns estudos relatam efeitos anti-inflamatórios em animais prenhes (Blais et al., 2022a).

No modelo de infecção intrauterina em coelhas, o tratamento com Lf humana recombinante promoveu maior taxa de sobrevivência fetal e maior duração da gestação, em comparação aos animais infectados não tratados (Sasaki et al., 2004). Animais não tratados apresentam intensa resposta inflamatória local, caracterizada por necrose endometrial e elevação de

mediadores pró-inflamatórios. Em contraste, animais tratados com Lf exibem normalização dos níveis de interleucinas e redução significativa do dano tecidual, indicando um efeito modulador direto sobre a resposta imune materna. Além disso, a Lf demonstrou robusta ação anti-inflamatória em modelos nos quais fêmeas gestantes foram desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS), levando à redução dos níveis séricos de IL-6 e contribuindo para uma gestação mais longa e estável, sugerindo um papel protetor contra inflamação sistêmica induzida durante a prenhez. (Hasegawa et al., 2005; Sasaki et al., 2004).

Evidências pré-clínicas indicam que o tratamento com Lf durante a gestação pode favorecer um melhor prognóstico para o neurodesenvolvimento da prole ao atenuar os prejuízos decorrentes da neuroinflamação. Em modelos nos quais a suplementação com Lf é iniciada ao nascimento e mantida durante a lactação observa-se redução significativa da lesão cerebral em ratos submetidos, no DPN3, à injeção intracerebroventricular de LPS. Nesses animais, a Lf foi capaz de reduzir a dilatação ventricular, além de melhorar a mielinização e aumentar o diâmetro axonal, indicando um efeito neuroprotetor robusto sobre processos de maturação neuronal e integridade da substância branca. (van de Looij et al., 2014a).

Estudos em modelos de hipóxia perinatal e HI neonatal relatam o papel da Lf como quelante de ferro, anti-inflamatório, antioxidante e antiapoptótico (Ginet et al., 2016; E. Sanches et al., 2021; van de Looij et al., 2014a). Zakravova e colegas (2012) observaram os efeitos protetores da Lf humana em diversos órgãos, incluindo o encéfalo, após evento hipóxico em camundongos(Zakharova et al., 2012). Os animais receberam injeções intraperitoneais (ip) ou gavagem de Lf na dose de 75 mg/kg, os tratamentos resultaram no aumento da sobrevivência

dos animais em 40% e os autores atribuem estes achados a estabilização da expressão do fator induzível por hipóxia 1-alpha (HIF-1α). Sokolov e colaboradores (2022) administraram 10 mg/kg de Lf humana recombinante durante a lactação e observaram que após o episódio de hipóxia perinatal, os filhotes apresentaram função cognitiva preservada (Sokolov et al., 2022). No modelo de HI realizada em ratos de 3 dias de vida, observou-se que a suplementação com Lf reduziu a perda de massa cortical, melhorou a mielinização e preservou os parâmetros de difusidade avaliados pela MRI no DPN25 (van de Looij et al., 2014a). Acompanhados destes achados, também foram observadas atividades anti-inflamatórias (diminuição de IL-6 e TNFα) e antiapoptóticas (diminuição da expressão de caspase-3 clivada). Em um estudo recente, Sanches e colaboradores (2021), avaliaram três diferentes doses (0,1, 1 e 10 g/kg) de Lf na dieta materna e observaram os efeitos na prole submetida ao modelo de HI. Observou-se que as doses de 0,1 e 1 g/kg foram capazes de prevenir a diminuição do volume cerebral e a alteração do metabolismo de amino ácidos excitatórios no córtex nos animais HI. Além disto, a dose de 1 g/kg reduziu a reatividade dos astrócitos induzida pela HI. A dose mais alta de Lf, de 10 g/kg não demonstrou efeitos protetores sobre a perda de volume cerebral e a reatividade dos astrócitos após a HI (E. Sanches et al., 2021). Apesar dos avanços obtidos, ainda são necessários estudos adicionais para esclarecer os mecanismos pelos quais a Lf exerce sua ação neuroprotetora e para definir sua aplicabilidade translacional em diferentes contextos de HI neonatal.

1.7 Bezafibrato como estratégia neuroprotetora

O Bezafibrato (Bz) é um fármaco aprovado pela agência estadunidense, Food and Drug Administration (FDA), e amplamente utilizado no tratamento de

distúrbios metabólicos, especialmente aqueles relacionados a dislipidemias e alterações no metabolismo lipídico. O mecanismo de ação do Bz é relacionado com a ativação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor). Os PPARs são um grupo de proteínas receptoras nucleares que atuam como fatores de transcrição gênica (Kliewer et al., 1994). O Bz é um fármaco considerado ativador pan-PPAR, pois atua sobre as isoformas: PPAR-α, PPAR-δ/β e PPAR-γ. Através destes receptores, o Bz pode estimular a β-oxidação de ácidos graxos, aumenta a expressão de lipoproteína lipase (LPL) e diminui a produção de apolipoproteína CIII, promovendo a redução de triglicerídeos (Scholar, 2007).

A ativação dos receptores PPARs, em estudos pré-clínicos, tem sido relacionada com efeitos neuroprotetores em diversas patologias, como doença de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Ghannam et al., 2025). Agonistas dos PPARs promovem neuroproteção principalmente por modular respostas inflamatórias e redox, por exemplo: a ativação de PPAR reduziu a liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF-α, IL-1β, COX-2, iNOS) ao inibir a via NF-κB, e simultaneamente diminuiu a geração de EROs ao aumentar a expressão de genes antioxidantes (Korbecki et al., 2019; Muzio et al., 2021). Além disso, PPARs contribuem para preservar a função proteostática, mitigando a disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma e reduzindo o acúmulo de proteínas mal dobradas (Ghannam et al., 2025).

Em relação ao Bz, estudos recentes têm demonstrado efeitos protetores em doenças metabólicas e neurodegenerativas, através de mecanismos que envolvem biogênese mitocondrial com consequente estimulação da cadeia

respiratória mitocondrial, redução do estresse oxidativo e inflamação (Grings et al., 2017; Parmeggiani et al., 2019). Embora ainda não existam estudos avaliando o uso do Bz como tratamento para a HI, seus efeitos sobre a função mitocondrial tornam esse fármaco um candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias neuroprotetoras.

1.8 Hipótese

A hipótese deste estudo é que a suplementação materna com Lf, de forma prévia ao insulto hipóxico-isquêmico, e/ou o tratamento com Bz, administrado no filhote após a HI, exercem efeitos neuroprotetores. À curto prazo, essas intervenções são capazes de atenuar a resposta neuroinflamatória, a disfunção mitocondrial e as perturbações da homeostase redox no hipocampo, e à longo prazo, preservam da integridade histológica do hipocampo, prevenindo o declínio cognitivo (memória) associado ao dano estrutural.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo investigar os efeitos neuroprotetores da suplementação materna com Lf sobre a prole posteriormente submetida ao evento experimental de HI, bem como avaliar, em experimentos distintos, os efeitos da administração de Bz após a HI em ratos Wistar. O principal objetivo é determinar se tais estratégias são capazes de modular o metabolismo e a dinâmica mitocondrial, bem como a homeostase redox no hipocampo após a HI. Além disto, investigar se tais efeitos são capazes de preservar o hipocampo e a capacidade cognitiva dos animais submetidos à HI.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar se a suplementação materna com Lf é capaz de prevenir o estresse oxidativo induzido pela HI, através dos parâmetros de produção de EROs, lipoperoxidação, níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes. Investigar também se a Lf preserva a função mitocondrial comprometida pela HI. Além disso, avaliar se a Lf pode regular vias associadas à defesa antioxidante e ao metabolismo mitocondrial, como Nrf2 e UCP2, contribuindo para a neuroproteção em animais submetidos à HI.

2.2.2 Investigar se o tratamento com Bz pode exercer efeitos neuroprotetoras após a HI, através da modulação da resposta neuroinflamatória, como os níveis de citocinas e o possível papel do inflamassoma NLRP3. Além disto, verificar se

o Bz é capaz de preservar os neurônios do hipocampo e contribuir para melhores desfechos cognitivos associados à memória de referência e de trabalho.

2.2.3 Avaliar se o tratamento com Bz após a HI neonatal reduz a produção de EROs e a lipoperoxidação, modulando os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes. Também investigar se o Bz preserva a função mitocondrial e dinâmica mitocondrial, através da expressão de PGC-1α. Além disso, examinar se o Bz regula vias associadas à morte celular, contribuindo para atenuação dos danos induzidos pela HI.

PARTE II

Capítulos 1, 2 e *3*

PARTE III

Discussão, conclusões e perspectivas

3. DISCUSSÃO

A HI permanece como uma das principais causas de mortalidade e de lesões cerebrais no período perinatal (Victor et al., 2021). Embora a hipotermia terapêutica seja atualmente o único tratamento recomendado na prática clínica, sua eficácia é limitada já que seu uso pode não impedir totalmente a progressão do dano neurológico, especialmente nos casos mais graves (Fabres et al., 2022, 2025; Spies et al., 2025). Nesse contexto, torna-se essencial a busca por novas estratégias terapêuticas capazes de melhorar o prognóstico de recém-nascidos afetados pela HI. Dentre os mecanismos patológicos envolvidos na HI destacam-se o dano mitocondrial, o estresse oxidativo e a neuroinflamação (Carvalho et al., 2022; Fabres et al., 2025; Y. Lv et al., 2020; Netto et al., 2017; Odorcyk et al., 2021), os quais representam importantes alvos para intervenções neuroprotetoras. Desta forma, este estudo investigou os efeitos de duas abordagens terapêuticas no contexto da HI: a administração intraperitoneal de Bz, um agonista pan-PPAR, e a suplementação materna com Lf, uma proteína presente no colostro e no leite materno. Ambas as estratégias têm sido associadas à modulação da função mitocondrial, à redução do estresse oxidativo e à atenuação da neuroinflamação, podendo, portanto, influenciar na evolução da progressão do dano encefálico pós-HI.

Observa-se no *Capítulo 1* da presente tese que a suplementação com a Lf na dieta das ratas-mães foi capaz de melhorar as defesas antioxidantes e reduzir o quadro de estresse oxidativo, bem como recuperar a atividade mitocondrial na prole submetida à HI aos 7 dias de vida – idade pós-natal que é

compreendida com o mesmo nível de maturação encefálica de um recém-nascido humano prematuro tardio (Semple et al., 2013; Zeiss, 2021). A Lf é uma glicoproteína multifuncional pertencente à família das transferrinas, amplamente distribuída em secreções biológicas como leite, saliva e lágrimas, e reconhecida por sua alta afinidade pelo ferro (Ochoa & Sizonenko, 2017; Ronayne de Ferrer et al., 2000).

Neste trabalho, a Lf foi oferecida às mães e os efeitos neuroprotetores foram observados na prole. Após a ingestão, a Lf é parcialmente resistente à digestão enzimática, preservando fragmentos bioativos capazes de exercer funções sistêmicas (Blais & Blachier, 2025; Rizzi et al., 2025). A absorção intestinal ocorre por meio de receptores de Lf (LfR) expressos nas células epiteliais entéricas, que permitem sua internalização e posterior liberação na circulação (Takeuchi et al., 2004). Uma vez na corrente sanguínea, a Lf pode interagir com o receptor LRP-1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*), e gerar efeitos celulares (Aizawa et al., 2017). O LRP-1 é amplamente expresso na barreira hematoencefálica (BHE), permitindo seu transporte através do endotélio para o SNC (Cutone et al., 2020). Esse mecanismo mediado por LRP-1 é considerado uma das principais rotas pelas quais a Lf atinge o parênquima cerebral, especialmente em regiões metabolicamente ativas e vulneráveis a processos inflamatórios. Além de sua função na homeostase do ferro, a Lf exerce ações antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras, incluindo a modulação da ativação microglial e o estímulo à expressão de fatores tróficos neuronais (Cutone et al., 2020; Rizzi et al., 2025). Assim, a suplementação materna com Lf representa uma estratégia biologicamente

plausível para promover efeitos sobre o desenvolvimento e a proteção cerebral da prole.

Estudos experimentais demonstram que a suplementação materna com Lf durante a gestação e lactação resulta em elevadas concentrações dessa proteína, tanto no plasma quanto no leite das fêmeas tratadas. Também foi observada a presença de Lf no plasma dos filhotes, evidenciando que a proteína presente no leite materno é absorvida através do epitélio intestinal neonatal e alcança a circulação sistêmica da prole (Blais et al., 2022b). Além da presença dos LfR no intestino, esse fenômeno também é compreensível pela elevada permeabilidade intestinal característica do período pós-natal, o que favorece o transporte ativo da proteína intacta (Blais et al., 2022b). Essa via de transferência materno-neonatal viabiliza os efeitos sistêmicos observados na prole, sugerindo que a Lf proveniente do leite materno pode exercer influência sobre processos metabólicos, antioxidantes e neurotróficos durante o desenvolvimento da prole.

A suplementação materna com Lf durante a gestação ou lactação tem sido amplamente investigada como uma intervenção capaz de modular o desenvolvimento e a resposta fisiológica da prole (Sanches et al., 2021, 2023; Tain et al., 2024). Evidências experimentais indicam que a Lf presente na dieta materna influencia positivamente o crescimento, a maturação intestinal e o desempenho cognitivo dos filhotes, sugerindo que seus efeitos extrapolam o papel nutricional e envolvem mecanismos regulatórios sistêmicos (Chen et al., 2015; Cutone et al., 2020; Zhang et al., 2025). Em diferentes modelos animais, a exposição neonatal à Lf derivada do leite materno foi associada à melhora da plasticidade sináptica e ao aumento da expressão de fatores neurotróficos, como o BDNF, contribuindo para o desenvolvimento funcional do sistema nervoso

central (Chen et al., 2015; Schirmbeck et al., 2022; Somm et al., 2014). Além disso, em condições de HI neonatal, a Lf demonstrou ser capaz de reduzir o volume de lesão, preservar a integridade neuronal e melhorar desfechos neurofuncionais, evidenciando um relevante papel neuroprotetor (Sanches et al., 2021, 2023; van de Looij et al., 2014b). Esses efeitos parecem decorrer da capacidade da Lf de modular múltiplas vias celulares, incluindo a regulação da homeostase redox e a atenuação de processos inflamatórios exacerbados. Em especial, a Lf tem sido descrita como um agente imunomodulador que limita a ativação microglial e reduz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1β, TNF-α e IL-6, promovendo um microambiente cerebral mais favorável à reparação tecidual (van de Looij et al., 2014b; Wang et al., 2025). Dessa forma, a suplementação materna com Lf surge como uma estratégia com potencial translacional para a mitigação dos danos inflamatórios e oxidativos associados à HI neonatal.

Além de suas propriedades anti-inflamatórias, a Lf apresenta propriedades antioxidantes diretas, atribuídas à sua alta capacidade de se ligar ao ferro, que reduz a disponibilidade de ferro livre e, consequentemente, a geração de EROs (Bolesławska et al., 2025; Rascón-Cruz et al., 2024). O íon ferroso (Fe^{2+}) pode reagir com o H_2O_2 por meio da chamada reação de Fenton. Nessa reação, o Fe^{2+} atua como catalisador, promovendo a decomposição do H_2O_2 e levando à formação do radical hidroxila (•OH), uma espécie reativa de oxigênio altamente reativa e prejudicial às células, além de oxidar Fe^{2+} a Fe^{3+} (Lei et al., 2022). O radical hidroxila é extremamente tóxico e capaz de atacar diversos componentes celulares, especialmente os lipídios das membranas, iniciando o processo de lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2015). Esse

dano resulta em perda da integridade e funcionalidade das membranas mitocondriais, prejudicando o metabolismo energético (Thornton et al., 2017). A afinidade da Lf em se ligar ao ferro reduz a disponibilidade de Fe^{2+} livre, limitando a geração desses radicais livres via reação de Fenton (Gai et al., 2025; Xiao et al., 2022). Com isso, a Lf ajuda a proteger a mitocôndria contra o estresse oxidativo e a preservar sua função, já que a mitocôndria é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido. Esses mecanismos sustentam a hipótese de que a Lf atua de forma integrada sobre os eixos inflamatório, antioxidante e bioenergético, conferindo uma resposta neuroprotetora abrangente em situações de estresse celular, como ocorre na HI neonatal. Desta forma, ao promover tanto a eficiência antioxidante e mitocondrial quanto o controle da inflamação, a Lf torna-se um agente promissor para estratégias terapêuticas voltadas à manutenção da viabilidade neuronal e ao reparo do tecido cerebral imaturo.

Portanto, como apresentado no *Capítulo 1* desta tese, a suplementação materna com Lf exerceu efeitos protetores significativos sobre a função mitocondrial da prole submetida à HI. Observou-se que a Lf foi capaz de preservar a função das mitocôndrias, reduzir a produção de EROs e melhorar a capacidade das defesas antioxidantes após a HI. Esses achados foram acompanhados pelo aumento da expressão de Nrf2 e UCP2, sugerindo uma ativação concomitante de mecanismos antioxidantes e de desacoplamento mitocondrial voltados à prevenção do dano oxidativo. A modulação dessas vias pode contribuir para a manutenção do potencial de membrana e a limitação de eventos apoptóticos dependentes de mitocôndria. Embora não tenha sido investigada a ativação da via PGC-1α, os resultados indicam que a Lf atua sobre vias celulares envolvendo PPARs, SIRT1, AMPK e p62, que podem culminar na

ativação de PGC-1α e restaurar a homeostase mitocondrial (Li et al., 123 C.E.; Mashhadi Kholerdi et al., 2024; Xia et al., 2025).

Considerando que a HI pode ocorrer não apenas em gestações de alto risco, mas também como consequência de eventos inesperados em gestações consideradas normais, uma outra estratégia neuroprotetora frente à lesão por HI foi investigada nos *Capítulos 2* e *3* desta tese. Nesses capítulos, avaliamos o Bz como tratamento farmacológico no modelo de HI em ratos neonatos com 11 dias de vida, com o objetivo de mimetizar a ocorrência do evento hipóxico-isquêmico em recém-nascidos humanos a termo. O Bz é um derivado ácido fíbrico amplamente utilizado como agente hipolipemiante, cuja ação farmacológica se dá por meio da ativação dos receptores PPARs (Honda et al., 2022). Apesar de que administração do fármaco tenha sido, neste trabalho, por meio de injeções intraperitoneais após a HI, na literatura há apenas informações sobre a farmacocinética da administração oral do Bz. O Bz apresenta boa biodisponibilidade quando administrado via oral, com absorção rápida no trato gastrointestinal e metabolização hepática predominante, sendo excretado principalmente na urina sob forma conjugada (Scholar, 2007). Sua capacidade de atravessar barreiras biológicas, incluindo a BHE em alguns modelos experimentais, tem sido demonstrada de forma limitada (Crockett et al., 2025). Entretanto, é bem descrito que no modelo de HI, a BHE apresenta alta permeabilidade (Ek et al., 2015), tornando plausível a transferência de moléculas, como o Bz, da corrente sanguínea ao parênquima cerebral de forma facilitada.

Diferentes agonistas dos receptores PPAR têm demonstrado potencial neuroprotetor em múltiplos modelos de isquemia e hipóxia, atuando por

mecanismos que combinam redução da inflamação e estabilização da função mitocondrial (Ding et al., 2020; Fang et al., 2024a; Gamdzyk et al., 2018; Mannan et al., 2021). Estudos utilizando outros tipos de agonistas específicos de PPAR-γ (por exemplo, rosiglitazona/pioglitazona ou análogos) apresentam atenuação da ativação microglial, redução de citocinas pró-inflamatórias e proteção neuronal em modelos de lesão HI; por exemplo, foi visto que a ativação de PPAR-γ reduz a resposta inflamatória e limita a morte celular pós-HI (Fang et al., 2024b). Agonistas de PPAR-β/δ também exibem efeitos benéficos no sistema nervoso imaturo. Já foi relatado que a administração intranasal do agonista GW0742 atenuou a apoptose neuronal em modelo neonatal, possivelmente via PPAR-β/δ–miR-17–TXNIP, o que sugere uma ação antiapoptótica e antiinflamatória relevante para a HI neonatal (Gamdzyk et al., 2018, 2020). Quanto aos receptores PPAR-α, agonistas como o fenofibrato mostraram proteção em modelos de isquemia focal, reduzindo dano vascular e neuronal, modulando respostas inflamatórias e favorecendo adaptações metabólicas que preservam a função mitocondrial pós-insulto (Ouk et al., 2014). Estes mecanismos são mediados pela indução de cascatas de sinalizações celulares que levam à biogênese mitocondrial via PGC-1α, o que explicaria a melhora do perfil redox observada após tratamento com agonistas de PPAR (Oidor-Chan et al., 2024; Ribeiro et al., 2024). Apesar destas evidências promissoras em modelos adultos e em alguns estudos neonatais, a literatura específica sobre Bz em HI neonatal permanece escassa ou ausente, o que reforça a necessidade de estudos que use este fármaco para atenuar os mecanismos fisiopatológicos da HI neonatal.

Diante disto, o *Capítulo 2* desta tese dedicou-se a estudar se o tratamento com Bz poderia impedir a progressão da lesão HI e melhorar o prognóstico cognitivo. Observou-se que o tratamento com Bz na concentração de 10 mg/kg foi capaz de impedir os danos ao hipocampo e atenuar a resposta inflamatória após a HI. Diversos estudos pré-clínicos têm demonstrado que o Bz exerce efeitos anti-inflamatórios no SNC em diferentes doenças. Em um modelo de doença de Alzheimer, o Bz foi capaz de reduzir a ativação microglial e astrocitária, evidenciando a capacidade de modular a resposta neuroimune (Lin et al., 2022; Lu et al., 2023). De forma semelhante, o tratamento com Bz em ratos que receberam sulfito via intra-estriatal demonstrou ser capaz de diminuir a reatividade das micróglias. Este efeito anti-inflamatório foi atribuído redução da expressão de IL-6 e iNOS e aumento da expressão de IL-10 após o tratamento com Bz (Glänzel et al., 2023). Portanto, estas evidências indicam que o Bz atua como modulador da neuroinflamação, provavelmente pela sua capacidade de ativar os receptores PPAR.

Observou-se também que o Bz foi capaz de reduzir a expressão do gene que codifica o NLRP3 e atenuar os níveis da proteína NLRP3 após a HI. O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico central na amplificação da resposta inflamatória, sendo ativado por uma variedade de estímulos, incluindo estresse oxidativo, dano mitocondrial, níveis elevados de EROs, detecção de PMADs e alterações de fluxo iônico (como efluxo de K^+) (Kumar et al., 2025). Uma vez ativado, o sensor NLRP3 recruta a proteína adaptadora ASC, que por sua vez permite o recrutamento e a autoativação da caspase-1, culminando na formação do inflamassoma funcional. A caspase-1 ativada promove então a clivagem das formas precursoras pro-IL-1β e pro-IL-18 em suas formas maduras

e ativas (IL-1β e IL-18), que são secretadas para o meio extracelular, contribuindo para a propagação da inflamação. Além disso, a ativação robusta do inflamassoma pode desencadear piroptose, uma forma de morte celular inflamatória mediada pela clivagem de gasdermina D, amplificando ainda mais o processo inflamatório (Kumar et al., 2025). Não há, até o momento, outros estudos relacionando o tratamento com Bz e a inibição do inflamossoma NLRP3 no tecido cerebral. No entanto, dados provenientes de outros tecidos sugerem que o Bz é capaz de influenciar essa via inflamatória. Em um modelo de diabetes em camundongos, demonstraram que o tratamento com Bz atenuou a disfunção espermatogênica por meio da redução da expressão de NLRP3, além de diminuir os níveis de IL-1β, IL-18 e a atividade de caspase-1, indicando supressão do inflamassoma no tecido testicular (Mu et al., 2024).

De forma geral, a ativação dos receptores PPAR tem demostrado capacidade de suprimir o inflamassoma NLRP3, um dos principais mediadores da neuroinflamação após a lesão no SNC. Por exemplo, em neurônios da medula espinhal, o agonista rosiglitazona reduziu a expressão de caspase-1 e NLRP3, demonstrando que a ativação de PPAR-γ atua como reguladora negativa deste complexo proteico (Meng et al., 2019). No presente estudo, o tratamento com Bz após HI resultou em atenuação da ativação do inflamassoma NLRP3 no hipocampo, sugerindo que a modulação farmacológica de PPARs pode atenuar o dano secundário após a HI ao impedir a montagem e ativação do NLRP3. Esse efeito pode ser mediado pela melhora da função mitocondrial e/ou redução de EROs que predispõe à ativação do inflamassoma. Dessa forma, o *Capítulo 3* teve por objetivo a investigação dos efeitos do Bz sobre a homeostase redox e função mitocondrial após a HI.

O Bz é um agente farmacológico que tem sido investigado por sua capacidade de regular a biogênese mitocondrial e a função energética no SNC. Em modelos de encefalopatia mitocondrial em roedores, o tratamento com Bz resultou em aumento da expressão de PGC-1α, maior atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial no córtex e hipocampo, além da redução da reatividade astrocitária e marcadores de inflamação (Noe et al., 2012). Em culturas de células-neurais derivadas de iPSC humanas, o Bz induziu a expressão de TFAM, elevou o número de cópias de DNA mitocondrial e melhorou o potencial de membrana mitocondrial, bem como, reduziu a produção de EROs (Augustyniak et al., 2019). Em um modelo animal de acidúria D-2-hidroxiglutárica, a ativação de PGC-1α pelo Bz melhorou a bioenergética mitocondrial, homeostase redox e reduziu a ativação glial no córtex cerebral (Ribeiro et al., 2024). Esses achados sugerem que o Bz promove a melhora da bioenergética e controle redox, reforçando o potencial de essa molécula exercer neuroproteção em condições de disfunção mitocondrial.

No *Capítulo 3,* verificamos que o tratamento com Bz foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e restaurar a função mitocondrial após a HI. Um dos possíveis mecanismos responsáveis por esses efeitos do Bz envolve a ativação de PGC-1α, uma via clássica de promoção da biogênese mitocondrial, aumento da capacidade antioxidante e recuperação do metabolismo energético. Estes efeitos sobre função mitocondrial e redox também poderiam estar relacionados com inibição do inflamassoma NLRP3 encontradas nos animais HI tratados com Bz no *Capítulo 2*. Assim, a modulação desses processos pelo Bz pode representar um dos mecanismos responsáveis por seus efeitos neuroprotetores no modelo experimental de HI. Em conjunto, tais efeitos citoprotetores favorecem

a sobrevivência neuronal e contribuem para um melhor desfecho cognitivo após a HI.

Os resultados obtidos nesta tese sugerem que a escolha da estratégia neuroprotetora frente à HI possa depender do momento do insulto em relação ao desenvolvimento neural. A suplementação materna com Lf, avaliada no modelo em que a HI foi induzida no DPN7, representa uma intervenção preventiva, capaz de preparar o ambiente neonatal contra possíveis eventos hipóxico-isquêmicos. Em contraste, o tratamento com Bz após modelo com HI induzida no DPN11 reflete uma intervenção terapêutica voltada à atenuação do dano em progressão. Assim, as duas abordagens poderiam se complementar, oferecendo proteção em momentos distintos da vulnerabilidade cerebral neonatal.

A suplementação materna com Lf mostrou efeitos neuroprotetores mediados por mecanismos antioxidantes e mitocondriais, incluindo a ativação de Nrf2 e UCP2, redução da geração de EROs e preservação da função mitocondrial no hipocampo. Esses efeitos, observados após transferência da Lf pelo leite materno, sustentam o potencial de uso desse suplemento em gestantes com fatores de risco para HI, como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino ou complicações placentárias. Essa abordagem, além de segura e não invasiva, pode modular precocemente a resposta neonatal a algum desafio patológico (como a HI), contribuindo para uma neuroproteção preventiva durante períodos críticos do desenvolvimento.

Por outro lado, o Bz demonstrou ser capaz de reduzir a ativação do inflamassoma NLRP3 no hipocampo após HI induzida no DPN11, indicando que a modulação de PPARs pode mitigar a neuroinflamação secundária ao evento

HI. Esse efeito parece estar associado à melhora da função mitocondrial e à diminuição da liberação de EROs e de PMDAs que disparam a montagem do inflamassoma. Assim, em situações nas quais o insulto hipóxico ocorre durante o parto ou no período pós-natal imediato, o Bz desponta como uma estratégia terapêutica pós-insulto, atuando de forma complementar à prevenção conferida pela Lf. No entanto, não podemos descartar a possibilidade de que a Lf também apresente efeitos neuroprotetores no modelo de HI induzido no DPN11, e que o Bz exerça efeitos benéficos na HI induzida no DPN7. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar essas hipóteses.

Em relação aos efeitos adversos ou toxicidade dos compostos avaliados nesta tese, estudos relatam que a suplementação oral com Lf em ratos na dose máxima de 2.000 mg/kg (2 g/kg) não resultou em efeitos adversos como: peso corporal, alimentação, peso dos órgãos ou alterações oftálmicas, sanguíneas e renais ao longo de 4 semanas de observação, sugerindo um amplo índice de segurança em modelos animais (Peterson et al., 2025). No que diz respeito ao Bz, existem relatos de hepatotoxicidade causada pela administração crônica deste fármaco (Onishi et al., 2020). Além disto, é descrito na literatura que a hiperativação crônica dos receptores PPAR-γ, pode ser prejudicial às células. Estes estudos sugerem que os efeitos celulares deletérios podem estar relacionados pela inibição da via PI3K/AKT, que fazem parte de uma via central para sobrevivência e resistência ao estresse (Chi et al., 2021; S. Lv et al., 2019). Estes mecanismos prejudicais de agonistas PPAR, podem estar relacionados com a ausência de efeitos neuroprotetores das doses mais altas de Bz (50 mg e 100 mg/kg) apresentadas no *Capítulo 2*, entretanto novos experimentos são

necessários para elucidar os mecanismos relacionados com estes achados após a HI.

De forma integrada, esses achados apontam para duas soluções neuroprotetoras para a HI neonatal: uma estratégia preventiva, baseada na suplementação materna com Lf em contextos de risco gestacional; e uma estratégia terapêutica quando não foi possível a prevenção, baseada no uso do Bz após o evento que causa HI. Ambas convergem na preservação da função mitocondrial e na modulação da neuroinflamação, ainda que por vias moleculares distintas. Esse duplo enfoque contribui para o avanço do desenvolvimento de novas abordagens neuroprotetoras para indivíduos afetados pela HI.

Considerando os aspectos translacionais do modelo de HI induzido em diferentes idades neonatais, em que ratos de 7 dias de vida apresentam maturação cerebral semelhante ao recém-nascido humano prematuro tardio, enquanto filhotes de 11 dias de vida tem nível de maturação comparável ao recém-nascido a termo, pode-se inferir que as propostas terapêuticas abordadas nesta tese contribuem para o avanço acerca dos tratamentos preconizados para a HI neonatal. Sendo assim, os resultados em conjunto deste trabalho sugerem que seria possível prevenir o dano em gestações de risco pela suplementação de Lf durante a gestação, ou tratar os recém-nascidos com Bz logo após a ocorrência do evento hipóxico-isquêmico.

4. CONCLUSÕES

Esta tese investigou duas estratégias neuroprotetoras distintas para a hipóxia-isquemia neonatal: prevenção pela suplementação materna com Lf e o tratamento pós-HI com Bz. Os resultados demonstraram que ambas as abordagens foram eficazes em modular mecanismos-chave envolvidos na fisiopatologia do modelo experimental de HI, como a disfunção mitocondrial, o desequilíbrio redox e a neuroinflamação.

A suplementação materna com Lf mostrou-se capaz de prevenir o estresse oxidativo, restaurar a função mitocondrial e ativar vias antioxidantes, como Nrf2 e UCP2, protegendo o hipocampo dos animais submetidos à HI. Esses efeitos sugerem que a Lf pode ser uma estratégia preventiva promissora, especialmente em gestantes com fatores de risco para HI. Por outro lado, o tratamento com Bz após a HI foi capaz de impedir danos teciduais ao hipocampo, reduzir a ativação do inflamassoma NLRP3 e restaurar a homeostase mitocondrial e redox. A ativação da via PGC-1α pelo Bz contribuiu para a biogênese mitocondrial e para a melhora dos parâmetros antioxidantes, indicando que o Bz pode ser uma alternativa terapêutica eficaz para atenuar os efeitos da HI quando a prevenção não é possível. De forma integrada, os achados experimentais deste trabalho apontam que seria possível prevenir o dano em gestações de risco pela suplementação de Lf durante a gestação, ou tratar os recém-nascidos com Bz logo após a ocorrência do evento hipóxico-isquêmico.

5. PERSPECTIVAS

I. Avaliar se a Lf proporciona efeitos a longo-prazo nos animais submetidos à HI, através de testes comportamentais relacionados com memória.

II. Investigar se a Lf exerce mecanismos protetores contra a ferroptose induzida pela HI.

III. Verificar se o Bz pode influenciar a microestrutura mitocondrial, através da microscopia eletrônica de transmissão, após a HI.

IV. Investigar se o Bz pode modular a autofagia e/ou mitofagia após a HI.

6. REFERÊNCIAS

Abu Shelbayeh, O., Arroum, T., Morris, S., & Busch, K. B. (2023). PGC-1α Is a Master Regulator of Mitochondrial Lifecycle and ROS Stress Response. *Antioxidants 2023, Vol. 12, Page 1075*, *12*(5), 1075. https://doi.org/10.3390/ANTIOX12051075

Airede, A. I. (1991). Birth asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy: Incidence and severity. *Annals of Tropical Paediatrics*, *11*(4), 331–335. https://doi.org/10.1080/02724936.1991.11747524

Aizawa, S., Hoki, M., & Yamamuro, Y. (2017). Lactoferrin promotes autophagy via AMP-activated protein kinase activation through low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(1), 509–513. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.08.160

Albrecht, M., Zitta, K., Groenendaal, F., van Bel, F., & Peeters-Scholte, C. (2019). Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 142, pp. 123–131). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.025

Arnaiz, G. R. de L., & Ordieres, M. G. L. (2014). Brain Na+, K+-ATPase Activity In Aging and Disease. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, *10*(2), 85. https://doi.org/10.59566/ijbs.2014.10085

Arteni, N. S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., & Netto, C. A. (2003). Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Research*, *973*(2), 171–178. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02436-3

Augustyniak, J., Lenart, J., Gaj, P., Kolanowska, M., Jazdzewski, K., Stepien, P. P., & Buzanska, L. (2019). Bezafibrate Upregulates Mitochondrial Biogenesis and Influence Neural Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Molecular Neurobiology*, *56*(6), 4346–4363. https://doi.org/10.1007/S12035-018-1368-2/FIGURES/9

Barks, J. D. E., & Silverstein, F. S. (1992). Excitatory Amino Acids Contribute to the Pathogenesis of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Brain Pathology*, *2*(3), 235–243. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1992.tb00697.x

Blais, A., & Blachier, F. (2025). Lactoferrin in food and supplements and health benefits: state of the art and future directions. *Journal of Food, Nutrition and Diet Science*, *25*, 25–36. https://doi.org/10.55976/FNDS.32025133025-36

Blais, A., Lan, A., Boluktas, A., Grauso-Culetto, M., Chaumontet, C., Blachier, F., & Davila, A. M. (2022a). Lactoferrin Supplementation during Gestation and Lactation Is Efficient for Boosting Rat Pup Development. *Nutrients*, *14*(14), 2814. https://doi.org/10.3390/NU14142814

Blais, A., Lan, A., Boluktas, A., Grauso-Culetto, M., Chaumontet, C., Blachier, F., & Davila, A. M. (2022b). Lactoferrin Supplementation during Gestation and Lactation Is Efficient for Boosting Rat Pup Development. *Nutrients*, *14*(14). https://doi.org/10.3390/NU14142814

Bolesławska, I., Bolesławska-Król, N., Jakubowski, K., Przysławski, J., & Drzymała-Czyż, S. (2025). Lactoferrin—A Regulator of Iron Homeostasis and Its Implications in Cancer. *Molecules 2025, Vol. 30, Page 1507*, *30*(7), 1507. https://doi.org/10.3390/MOLECULES30071507

Carvalho, A. V. S., Ribeiro, R. T., Durán-Carabali, L. E., Martini, A. P. R., Hoeper, E., Sanches, E. F., Konrath, E. L., Dalmaz, C., Wajner, M., & Netto, C. A. (2022). Plinia trunciflora Extract Administration Prevents HI-Induced Oxidative Stress, Inflammatory Response, Behavioral Impairments, and Tissue Damage in Rats. *Nutrients 2022, Vol. 14, Page 395*, *14*(2), 395. https://doi.org/10.3390/NU14020395

Chakkarapani, A. A., Aly, H., Benders, M., Cotten, C. M., El-Dib, M., Gressens, P., Hagberg, H., Sabir, H., Wintermark, P., & Robertson, N. J. (2021). Therapies for neonatal encephalopathy: Targeting the latent, secondary and tertiary phases of evolving brain injury. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, *26*(5). https://doi.org/10.1016/J.SINY.2021.101256

Chen, Y., Zheng, Z., Zhu, X., Shi, Y., Tian, D., Zhao, F., Liu, N., Hüppi, P. S., Troy, F. A., & Wang, B. (2015). Lactoferrin Promotes Early Neurodevelopment and Cognition in Postnatal Piglets by Upregulating the BDNF Signaling Pathway and Polysialylation. *Molecular Neurobiology*, *52*(1), 256–269. https://doi.org/10.1007/S12035-014-8856-9

Chi, T., Wang, M., Wang, X., Yang, K., Xie, F., Liao, Z., & Wei, P. (2021). PPAR-γ Modulators as Current and Potential Cancer Treatments. *Frontiers in Oncology*, *11*, 737776. https://doi.org/10.3389/FONC.2021.737776/XML

Crockett, A. M., Vélez Colón, M. C., Kebir, H., Smith, F. M., Iascone, D. M., Ciesielski, B., Koshkin, S., Patterson, A. D., Rossano, A. J., Sehgal, A., Anderson, S. A., & Alvarez, J. I. (2025). Bezafibrate improves mitochondrial function, blood-brain barrier integrity, and social deficits in models of 22q11.2 deletion syndrome. *Science Translational Medicine*, *17*(812). https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ADS2116/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ADS2116_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF

Cutone, A., Rosa, L., Ianiro, G., Lepanto, M. S., Di Patti, M. C. B., Valenti, P., & Musci, G. (2020). Lactoferrin's Anti-Cancer Properties: Safety, Selectivity, and Wide Range of Action. *Biomolecules 2020, Vol. 10, Page 456*, *10*(3), 456. https://doi.org/10.3390/BIOM10030456

da Costa, M. G., dos Santos, A. S., de Almeida, W., Lothhammer Bohn, A. L., da Rosa, B. K. V., de Castro Saturnino, B. C., Faustino, A. M., Danilevicz, C. K., Muterle Varela, A. P., Teixeira, T. F., Roehe, P. M., Ramires Júnior, O. V., de Souza Wyse, A. T., & Pereira, L. O. (2025). Gestational inoculation by the Zika virus causes cognitive impairment and Na+K+-ATPase activity imbalance in frontal cortex of adult male and female Wistar rat's offspring. *Brain Research*, *1866*. https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2025.149928

Davidson, J. O., Wassink, G., van den Heuij, L. G., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2015). Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy - Where to from here? In *Frontiers in Neurology* (Vol. 6, Issue SEP). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198

De Haan, M., Wyatt, J. S., Roth, S., Vargha-Khadem, F., Gadian, D., & Mishkin, M. (2006). Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth.

Developmental Science, *9*(4), 350–358. https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00499.x

Ding, Y., Kang, J., Liu, S., Xu, Y., & Shao, B. (2020). The Protective Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Neurology*, *11*, 588516. https://doi.org/10.3389/FNEUR.2020.588516/XML

Dixon, B. J., Reis, C., Ho, W. M., Tang, J., & Zhang, J. H. (2015). Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 22368. https://doi.org/10.3390/IJMS160922368

Douglas-Escobar, M., & Weiss, M. D. (2015). Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatrics*, *169*(4), 397–403. https://doi.org/10.1001/JAMAPEDIATRICS.2014.3269

Edwards, A. D., & Tan, S. (2006). Perinatal infections, prematurity and brain injury. *Current Opinion in Pediatrics*, *18*(2), 119–124. https://doi.org/10.1097/01.MOP.0000193290.02270.30

Ek, C. J., D'angelo, B., Baburamani, A. A., Lehner, C., Leverin, A. L., Smith, P. L. P., Nilsson, H., Svedin, P., Hagberg, H., & Mallard, C. (2015). Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *35*(5), 818–827. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2014.255/SUPPL_FILE/JCBFM2014255X2.JPG

Fabres, R. B., Carvalho, A. V. S., da Silva Alós, D. K., Machado, D. N., Spies, F. F., Cardoso, D. S., Vido, M. F. C., Martini, A. P. R., de Mattos, M. de M., Antunes, B. P., Hoeper, E., Venturin, G. T., Greggio, S., Takada, S. H., Drobyshevsky, A., de Fraga, L. S., & Netto, C. A. (2025). Combined effects of β-hydroxybutyrate and therapeutic hypothermia in a neonatal hypoxia-ischemia model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. https://doi.org/10.1177/0271678X251352694

Fabres, R. B., Nunes, R. R., de Medeiros de Mattos, M., Andrade, M. K. G., Martini, A. P. R., Tassinari, I. D., Sanches, E. F., de Fraga, L. S., & Netto, C. A. (2022). Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia-ischemia: sex-dependent modulation of reactive astrogliosis. *Metabolic Brain Disease*, *37*(7), 2315–2329. https://doi.org/10.1007/S11011-022-01030-4/TABLES/1

Fang, M., Yu, Q., Ou, J., Lou, J., Zhu, J., & Lin, Z. (2024a). The Neuroprotective Mechanisms of PPAR-γ: Inhibition of Microglia-Mediated Neuroinflammation and Oxidative Stress in a Neonatal Mouse Model of Hypoxic-Ischemic White Matter Injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *30*(11). https://doi.org/10.1111/CNS.70081

Fang, M., Yu, Q., Ou, J., Lou, J., Zhu, J., & Lin, Z. (2024b). The Neuroprotective Mechanisms of PPAR-γ: Inhibition of Microglia-Mediated Neuroinflammation and Oxidative Stress in a Neonatal Mouse Model of Hypoxic-Ischemic White Matter Injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *30*(11), e70081. https://doi.org/10.1111/CNS.70081

Fathali, N., Ostrowski, R. P., Hasegawa, Y., Lekic, T., Tang, J., & Zhang, J. H. (2013). Splenic Immune Cells in Experimental Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Translational Stroke Research*, *4*(2), 208–219. https://doi.org/10.1007/s12975-012-0239-9

Ferriero, D. M. (2001). Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Developmental Neuroscience*, *23*(3), 198–202. https://doi.org/10.1159/000046143

Gai, S., Yan, Q., Li, S., Zhong, X., Qin, Y., & Jiang, M. (2025). Lactoferrin Nanoparticle-Vanadium Complex: A Promising High-Efficiency Agent against Glioblastoma by Triggering Autophagy and Ferroptosis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *68*(4), 4650–4662. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.4C02696

Gamdzyk, M., Doycheva, D. M., Kang, R., Tang, H., Travis, Z. D., Tang, J., & Zhang, J. H. (2020). GW0742 activates miR-17-5p and inhibits TXNIP/NLRP3-mediated inflammation after hypoxic-ischaemic injury in rats and in PC12 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *24*(21), 12318–12330. https://doi.org/10.1111/JCMM.15698

Gamdzyk, M., Doycheva, D. M., Malaguit, J., Enkhjargal, B., Tang, J., & Zhang, J. H. (2018). Role of PPAR-β/δ/miR-17/TXNIP pathway in neuronal apoptosis after neonatal hypoxic-ischemic injury in rats. *Neuropharmacology*, *140*, 150–161. https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2018.08.003

Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 482, Issue 3, pp. 419–425). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086

Ghannam, I. A. Y., Hassan, R. M., & Abdel-Maksoud, M. S. (2025). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) agonists as promising neurotherapeutics. *Bioorganic Chemistry*, *156*, 108226. https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2025.108226

Ginet, V., van de Looij, Y., Petrenko, V., Toulotte, A., Kiss, J., Hüppi, P. S., & Sizonenko, S. V. (2016). Lactoferrin during lactation reduces lipopolysaccharide-induced brain injury. *BioFactors (Oxford, England)*, *42*(3), 323–336. https://doi.org/10.1002/BIOF.1278

Glänzel, N. M., Parmeggiani, B., Grings, M., Seminotti, B., Brondani, M., Bobermin, L. D., Ribeiro, C. A. J., Quincozes-Santos, A., Vockley, J., & Leipnitz, G. (2023). Myelin Disruption, Neuroinflammation, and Oxidative Stress Induced by Sulfite in the Striatum of Rats Are Mitigated by the pan-PPAR agonist Bezafibrate. *Cells*, *12*(12), 1557. https://doi.org/10.3390/CELLS12121557/S1

Hagberg, H., Mallard, C., Rousset, C. I., & Thornton, C. (2014). *Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain* (Vol. 13). www.thelancet.com/neurology

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). Free Radicals in Biology and Medicine. *Free Radicals in Biology and Medicine*. https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780198717478.001.0001

Hasegawa, A., Otsuki, K., Sasaki, Y., Sawada, M., Mitsukawa, K., Chiba, H., Nagatsuka, M., Okai, T., & Kato, A. (2005). Preventive effect of recombinant human lactoferrin in a rabbit preterm delivery model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *192*(4), 1038–1043. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.01.013

Honda, A., Kamata, S., Akahane, M., Machida, Y., Uchii, K., Shiiyama, Y., Habu, Y., Miyawaki, S., Kaneko, C., Oyama, T., & Ishii, I. (2022). Functional and Structural Insights into Human PPARα/δ/Subtype Selectivity of Bezafibrate, Fenofibric Acid,

and Pemafibrate. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4726. https://doi.org/10.3390/IJMS23094726/S1

Järlestedt, K., Rousset, C. I., Faiz, M., Wilhelmsson, U., Stahlberg, A., Sourkova, H., Pekna, M., Mallard, C., Hagberg, H., & Pekny, M. (2010). Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PloS One*, *5*(4). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010397

Jin, Y., Silverman, A. J., & Vannucci, S. J. (2009). Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, *40*(9), 3107–3112. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.549691

Johnston, M. V., Trescher, W. H., Ishida, A., Nakajima, W., & Zipursky, A. (2001). Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatric Research*, *49*(6), 735–741. https://doi.org/10.1203/00006450-200106000-00003

Kliewer, S. A., Forman, B. M., Blumberg, B., Ong, E. S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., & Evans, R. M. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(15), 7355–7359. https://doi.org/10.1073/PNAS.91.15.7355

Korbecki, J., Bobiński, R., & Dutka, M. (2019). Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors. *Inflammation Research 2019 68:6*, *68*(6), 443–458. https://doi.org/10.1007/S00011-019-01231-1

Kumar, R., Singh, A., Tripathi, S., Salahuddin, & Abdullah, M. M. (2025). Targeting the NLRP3 inflammasome with natural products for ischemia-reperfusion injury across organs: mechanisms, structure-activity relationships, and delivery innovations. *Inflammopharmacology*, *33*(11). https://doi.org/10.1007/S10787-025-02007-2

Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Human Development*, *86*(6), 329–338. https://doi.org/10.1016/J.EARLHUMDEV.2010.05.010

Lai, M.-C., & Yang, S.-N. (2011). Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2011*, 609813. https://doi.org/10.1155/2011/609813

Lawn, J. E., Cousens, S., & Zupan, J. (2005). 4 Million neonatal deaths: When? Where? Why? In *Lancet* (Vol. 365, Issue 9462, pp. 891–900). Elsevier Limited. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71048-5

Lei, G., Zhuang, L., & Gan, B. (2022). Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer. *Nature Reviews Cancer 2022 22:7*, *22*(7), 381–396. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00459-0

Li, Y., Li, J., Dong, Y., Wang, · Can, & Cai, Z. (123 C.E.). Bovine lactoferrin inhibits inflammatory response and apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting the PPAR-γ pathway. *Molecular Biology Reports*, *51*, 492. https://doi.org/10.1007/s11033-024-09436-2

Lin, L. F., Jhao, Y. T., Chiu, C. H., Sun, L. H., Chou, T. K., Shiue, C. Y., Cheng, C. Y., & Ma, K. H. (2022). Bezafibrate Exerts Neuroprotective Effects in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*, *15*(2), 109. https://doi.org/10.3390/PH15020109

Liu, D., Liu, Z., Hu, Y., Xiong, W., Wang, D., & Zeng, Z. (2025). MOMP: A critical event in cell death regulation and anticancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1880*(2), 189280. https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2025.189280

Lu, Y., Fujioka, H., Wang, W., & Zhu, X. (2023). Bezafibrate confers neuroprotection in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, *1869*(8), 166841. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2023.166841

Lundgren, C., Brudin, L., Wanby, A. S., & Blomberg, M. (2018). Ante- and intrapartum risk factors for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, *31*(12), 1595–1601. https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1321628

Lv, S., Wang, W., Wang, H., Zhu, Y., & Lei, C. (2019). PPARγ activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway. *BMC Cancer*, *19*(1). https://doi.org/10.1186/S12885-019-5426-6

Lv, Y., Sun, B., Lu, X. xing, Liu, Y. lin, Li, M., Xu, L. X., Feng, C. X., Ding, X., & Feng, X. (2020). The role of microglia mediated pyroptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *521*(4), 933–938. https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.11.003

Mannan, A., Garg, N., Singh, T. G., & Kang, H. K. (2021). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma (PPAR-ɣ): Molecular Effects and Its Importance as a Novel Therapeutic Target for Cerebral Ischemic Injury. *Neurochemical Research 2021 46:11*, *46*(11), 2800–2831. https://doi.org/10.1007/S11064-021-03402-1

Mashhadi Kholerdi, A., Moradian, F., & Mehralitabar, H. (2024). In vitro study of the expression of autophagy genes ATG101, mTOR and AMPK in breast cancer with treatment of lactoferrin and in silico study of their communication networks and protein interactions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *190*, 19–27. https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2024.05.003

Mavelli, I., Rigo, A., Federico, R., Ciriolo, M. R., & Rotilio, G. (1982). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in developing rat brain. *Biochemical Journal*, *204*(2), 535–540. https://doi.org/10.1042/bj2040535

Meng, Q. Q., Feng, Z. C., Zhang, X. L., Hu, L. Q., Wang, M., Zhang, H. F., & Li, S. M. (2019). PPAR-γ Activation Exerts an Anti-inflammatory Effect by Suppressing the NLRP3 Inflammasome in Spinal Cord-Derived Neurons. *Mediators of Inflammation*, *2019*, 6386729. https://doi.org/10.1155/2019/6386729

Mu, Y., Luo, L. B., Wu, S. juan, Gao, Y., Qin, X. lin, Zhao, J., Liu, Q., & Yang, J. (2024). Bezafibrate alleviates diabetes-induced spermatogenesis dysfunction by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Heliyon*, *10*(6). https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2024.E28284

Muzio, G., Barrera, G., & Pizzimenti, S. (2021). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Oxidative Stress in Physiological Conditions and in Cancer. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 1734*, *10*(11), 1734. https://doi.org/10.3390/ANTIOX10111734

Nair, S., Leverin, A. L., Rocha-Ferreira, E., Sobotka, K. S., Thornton, C., Mallard, C., & Hagberg, H. (2022). Induction of Mitochondrial Fragmentation and Mitophagy after Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Cells*, *11*(7). https://doi.org/10.3390/CELLS11071193

Namusoke, H., Nannyonga, M. M., Ssebunya, R., Nakibuuka, V. K., & Mworozi, E. (2018). Incidence and short term outcomes of neonates with hypoxic ischemic encephalopathy in a Peri Urban teaching hospital, Uganda: a prospective cohort study. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology*, *4*(1). https://doi.org/10.1186/S40748-018-0074-4

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry, 7th ed*.

Netto, C. A., Sanches, E., Odorcyk, F. K., Duran-Carabali, L. E., & Weis, S. N. (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *Journal of Neuroscience Research*, *95*(1–2), 409–421. https://doi.org/10.1002/jnr.23828

Noe, N., Dillon, L., Lellek, V., Diaz, F., Hida, A., Moraes, C. T., & Wenz, T. (2012). Bezafibrate improves mitochondrial function in the CNS of a mouse model of mitochondrial encephalopathy. *Mitochondrion*, *13*(5), 417. https://doi.org/10.1016/J.MITO.2012.12.003

Ochoa, T. J., & Sizonenko, S. V. (2017). Lactoferrin and prematurity: a promising milk protein? *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *95*(1), 22–30. https://doi.org/10.1139/BCB-2016-0066

Odorcyk, F. K., Ribeiro, R. T., Roginski, A. C., Duran-Carabali, L. E., Couto-Pereira, N. S., Dalmaz, C., Wajner, M., & Netto, C. A. (2021). Differential Age-Dependent Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Apoptosis Induced by Neonatal Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain. *Molecular Neurobiology*, *58*(5), 2297–2308. https://doi.org/10.1007/s12035-020-02261-1

Oidor-Chan, V. H., Sánchez-López, A., Cano-Martinez, A., García-Niño, W. R., Soria-Castro, E., del Valle-Mondragón, L., Zarco-Olvera, G., Patlán, M., Guarner-Lans, V., Rodríguez-Maldonado, E., Flores-Estrada, J., Castrejón-Téllez, V., & Ibarra-Lara, L. (2024). Pharmacological Preconditioning with Fenofibrate in Cardiomyocyte Cultures of Neonatal Rats Subjected to Hypoxia/Reoxygenation, High Glucose, and Their Combination. *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 11391*, *25*(21), 11391. https://doi.org/10.3390/IJMS252111391

Onishi, S., Tajika, M., Bando, H., Matsubara, Y., Hosoda, W., Muro, K., & Niwa, Y. (2020). Ursodeoxycholic acid and bezafibrate were useful for steroid-refractory, immune-related hepatitis: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, *14*(1), 230-. https://doi.org/10.1186/S13256-020-02541-3/FIGURES/3

Ouk, T., Gautier, S., Pétrault, M., Montaigne, D., Maréchal, X., Masse, I., Devedjian, J. C., Deplanque, D., Bastide, M., Nevière, R., Duriez, P., Staels, B., Pasquier, F., Leys, D., & Bordet, R. (2014). Effects of the PPAR-α agonist fenofibrate on acute and short-term consequences of brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *34*(3), 542–551. https://doi.org/10.1038/JCBFM.2013.233

Park, J., Park, S. H., Kim, C., Yoon, S. J., Lim, J. H., Han, J. H., Shin, J. E., Eun, H. S., Park, M. S., & Lee, S. M. (2023). Growth and developmental outcomes of infants

with hypoxic ischemic encephalopathy. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-023-50187-0

Patel, S. D., Pierce, L., Ciardiello, A., Hutton, A., Paskewitz, S., Aronowitz, E., Voss, H. U., Moore, H., & Vannucci, S. J. (2015). Therapeutic hypothermia and hypoxia–ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. *Pediatric Research 2015 78:3*, *78*(3), 264–271. https://doi.org/10.1038/pr.2015.100

Peterson, R., Crawford, R. B., Blevins, L. K., Kaminski, N. E., Clark, A. J., & Malinczak, C. A. (2025). Four-Week GLP Immunotoxicity Assessment of Lactoferrin Alpha Produced by Komagataella phaffii in Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Toxicology*, *44*(2), 125–140. https://doi.org/10.1177/10915818241299344

Picca, A., Faitg, J., Auwerx, J., Ferrucci, L., & D'Amico, D. (2023). Mitophagy in human health, ageing and disease. *Nature Metabolism*, *5*(12), 2047. https://doi.org/10.1038/S42255-023-00930-8

Portera-Cailliau, C., Price, D. L., & Martin, L. J. (1997). Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *The Journal of Comparative Neurology*, *378*(1), 10–87. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970203)378:1<10::AID-CNE4>3.0.CO;2-N

Procianoy, R. S., De, R., & Silveira, C. (2001). ARTIGO DE REVISÃO S63 Jornal de Pediatria Síndrome hipóxico-isquêmica Hypoxic-ischemic syndrome. In *Jornal de Pediatria* (Vol. 77, Issue 1).

Ranjan, A. K., & Gulati, A. (2023). Advances in Therapies to Treat Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Journal of Clinical Medicine 2023, Vol. 12, Page 6653*, *12*(20), 6653. https://doi.org/10.3390/JCM12206653

Rascón-Cruz, Q., Siqueiros-Cendón, T. S., Siañez-Estrada, L. I., Villaseñor-Rivera, C. M., Ángel-Lerma, L. E., Olivas-Espino, J. A., León-Flores, D. B., Espinoza-Sánchez, E. A., Arévalo-Gallegos, S., & Iglesias-Figueroa, B. F. (2024). Antioxidant Potential of Lactoferrin and Its Protective Effect on Health: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences 2025, Vol. 26, Page 125*, *26*(1), 125. https://doi.org/10.3390/IJMS26010125

Ribeiro, R. T., Marcuzzo, M. B., Carvalho, A. V. S., Palavro, R., Castro, E. T., Pinheiro, C. V., Bobermin, L. D., Amaral, A. U., Leipnitz, G., Netto, C. A., & Wajner, M. (2024). Protective effects of the PPAR agonist bezafibrate against disruption of redox and energy homeostasis, neuronal death, astroglial reactivity, and neuroinflammation induced in vivo by D-2-hydroxyglutaric acid in rat brain. *European Journal of Pharmacology*, *987*, 177186. https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2024.177186

Rizzi, M., Manzoni, P., Germano, C., Quevedo, M. F., & Sainaghi, P. P. (2025). Lactoferrin, a Natural Protein with Multiple Functions in Health and Disease. *Nutrients 2025, Vol. 17, Page 3403*, *17*(21), 3403. https://doi.org/10.3390/NU17213403

Ronayne de Ferrer, P. A., Baroni, A., Sambucetti, M. E., López, N. E., & Ceriani Cernadas, J. M. (2000). Lactoferrin levels in term and preterm milk. *Journal of the American College of Nutrition*, *19*(3), 370–373. https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718933

Sanches, E. F., Arteni, N. S., Spindler, C., Moysés, F., Siqueira, I. R., Perry, M. L., & Netto, C. A. (2012). Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Research*, *1438*, 85–92. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.024

Sanches, E., van de Looij, Y., Ho, D., Modernell, L., da Silva, A., & Sizonenko, S. (2023). Early Neuroprotective Effects of Bovine Lactoferrin Associated with Hypothermia after Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(21), 15583. https://doi.org/10.3390/IJMS242115583/S1

Sanches, E., van de Looij, Y., Sow, S., Toulotte, A., da Silva, A., Modernell, L., & Sizonenko, S. (2021). Dose-Dependent Neuroprotective Effects of Bovine Lactoferrin Following Neonatal Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain. *Nutrients*, *13*(11). https://doi.org/10.3390/NU13113880

Sasaki, Y., Otsuki, K., Hasegawa, A., Sawada, M., Chiba, H., Negishi, M., Nagatsuka, M., & Okai, T. (2004). Preventive effect of recombinant human lactoferrin on lipopolysaccharide- induced preterm delivery in mice. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, *83*(11), 1035–1038. https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2004.00587.x

Schirmbeck, G. H., Sizonenko, S., & Sanches, E. F. (2022). Neuroprotective Role of Lactoferrin during Early Brain Development and Injury through Lifespan. *Nutrients*, *14*(14). https://doi.org/10.3390/NU14142923

Scholar, E. (2007). Bezafibrate. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–4. https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61310-8

Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *106–107*, 1–16. https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2013.04.001

Shankaran, S., Pappas, A., McDonald, S. A., Vohr, B. R., Hintz, S. R., Yolton, K., Gustafson, K. E., Leach, T. M., Green, C., Bara, R., Huitema, C. M. P., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., Das, A., Hammond, J., Peralta-Carcelen, M., Evans, P. W., Heyne, R. J., Wilson-Costello, D. E., … Higgins, R. D. (2012). Childhood Outcomes after Hypothermia for Neonatal Encephalopathy. *New England Journal of Medicine*, *366*(22), 2085–2092. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1112066

Sokolov, A. V., Dubrovskaya, N. M., Kostevich, V. A., Vasilev, D. S., Voynova, I. V., Zakharova, E. T., Runova, O. L., Semak, I. V., Budevich, A. I., Nalivaeva, N. N., & Vasilyev, V. B. (2022). Lactoferrin Induces Erythropoietin Synthesis and Rescues Cognitive Functions in the Offspring of Rats Subjected to Prenatal Hypoxia. *Nutrients*, *14*(7). https://doi.org/10.3390/NU14071399

Somm, E., Larvaron, P., Van De Looij, Y., Toulotte, A., Chatagner, A., Faure, M., Métairon, S., Mansourian, R., Raymond, F., Gruetter, R., Wang, B., Sizonenko, S. V., & Hüppi, P. S. (2014). Protective effects of maternal nutritional supplementation with lactoferrin on growth and brain metabolism. *Pediatric Research*, *75*(1–1), 51–61. https://doi.org/10.1038/PR.2013.199

Spies, F. F., Nunes, R. R., Tassinari, I. D., Carvalho, A. V. S., Machado, D. N., Fabres, R. B., Netto, C. A., & de Fraga, L. S. (2025). Differential effects of hypothermia and

memantine in neonatal hypoxia-ischemia. *Metabolic Brain Disease*, *40*(7), 280-. https://doi.org/10.1007/S11011-025-01679-7/FIGURES/5

Tain, Y. L., Hou, C. Y., Chen, W. L., Liao, W. T., & Hsu, C. N. (2024). Lactoferrin Supplementation during Pregnancy and Lactation Protects Adult Male Rat Offspring from Hypertension Induced by Maternal Adenine Diet. *Nutrients 2024, Vol. 16, Page 2607*, *16*(16), 2607. https://doi.org/10.3390/NU16162607

Takeuchi, T., Kitagawa, H., & Harada, E. (2004). Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Experimental Physiology*, *89*(3), 263–270. https://doi.org/10.1113/EXPPHYSIOL.2003.026633

Thoresen, M. (2018). Combining two good treatments makes it worse. *Brain, Behavior, and Immunity*, *71*, 7–8. https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.04.008

Thornton, C., Baburamani, A. A., Kichev, A., & Hagberg, H. (2017). Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 45, Issue 5, pp. 1067–1076). Portland Press Ltd. https://doi.org/10.1042/BST20170017

Thornton, C., & Hagberg, H. (2015). Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica Chimica Acta*, *451*, 35–38. https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.026

Thornton, C., Jones, A., Nair, S., Aabdien, A., Mallard, C., & Hagberg, H. (2018). Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. In *FEBS Letters* (Vol. 592, Issue 5, pp. 812–830). Wiley Blackwell. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12943

van de Looij, Y., Ginet, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Somm, E., Hüppi, P. S., & Sizonenko, S. V. (2014a). Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *1*(12), 955–967. https://doi.org/10.1002/ACN3.138

van de Looij, Y., Ginet, V., Chatagner, A., Toulotte, A., Somm, E., Hüppi, P. S., & Sizonenko, S. V. (2014b). Lactoferrin during lactation protects the immature hypoxic-ischemic rat brain. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *1*(12), 955–967. https://doi.org/10.1002/ACN3.138

Vannucci, R. C., & Perlman, J. M. (1997). Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, *100*(6), 1004–1014. https://doi.org/10.1542/peds.100.6.1004

Vannucci, S. J., & Hagberg, H. (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*, *207*(Pt 18), 3149–3154. https://doi.org/10.1242/JEB.01064

Victor, S., Rocha-Ferreira, E., Rahim, A., Hagberg, H., & Edwards, D. (2021). New possibilities for neuroprotection in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *European Journal of Pediatrics 2021 181:3*, *181*(3), 875–887. https://doi.org/10.1007/S00431-021-04320-8

Volpe, J. J. (2009a). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. In *The Lancet Neurology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 110–124). https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70294-1

Volpe, J. J. (2009b). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. In *The Lancet Neurology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 110–124). https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70294-1

Wang, W., An, Q., Zou, Y., Dai, Y., Meng, Q., & Zhang, Y. (2025). Lactoferrin alleviates the adverse effects of early-life inflammation on depression in adults by regulating the activation of microglia. *Molecular Medicine*, *31*(1), 50-. https://doi.org/10.1186/S10020-025-01094-9/FIGURES/6

Wassink, G., Davidson, J. O., Lear, C. A., Juul, S. E., Northington, F., Bennet, L., & Gunn, A. J. (2018). A working model for hypothermic neuroprotection. *Journal of Physiology*, *596*(23), 5641–5654. https://doi.org/10.1113/JP274928

Weis, S. N., Pettenuzzo, L. F., Krolow, R., Valentim, L. M., Mota, C. S., Dalmaz, C., Wyse, A. T. S., & Netto, C. A. (2012). Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, *12*(2), 271–279. https://doi.org/10.1016/J.MITO.2011.10.002

Xia, B., Liang, J., Lu, Y., Ding, J., Peng, J., Li, F., Dai, J., Liu, Y., Wang, J., Wan, C., & Luo, P. (2025). Lactoferrin influences atherosclerotic progression by modulating macrophagic AMPK/mTOR signaling-dependent autophagy. *Scientific Reports*, *15*(1). https://doi.org/10.1038/S41598-025-95181-W

Xiao, Z., Shen, D., Lan, T., Wei, C., Wu, W., Sun, Q., Luo, Z., Chen, W., Zhang, Y., Hu, L., Zhang, C., Wang, Y., Lu, Y., Wang, P., Yang, F., & Li, Q. (2022). Reduction of lactoferrin aggravates neuronal ferroptosis after intracerebral hemorrhagic stroke in hyperglycemic mice. *Redox Biology*, *50*, 102256. https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2022.102256

Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, *337*(6098), 1062–1065. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1219855

Yu, G. L., Zhang, Y., & Ning, B. (2021). Reactive Astrocytes in Central Nervous System Injury: Subgroup and Potential Therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 792764. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2021.792764/XML

Zakharova, E. T., Kostevich, V. A., Sokolov, A. V., & Vasilyev, V. B. (2012). Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, *25*(6), 1247–1259. https://doi.org/10.1007/S10534-012-9586-Y

Zeiss, C. J. (2021). Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicologic Pathology*, *49*(8), 1368–1373. https://doi.org/10.1177/01926233211046933/ASSET/CAE90B27-54A4-4A77-803A-7CC72E6A7435/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_01926233211046933-FIG1.JPG

Zhang, J. J., Li, Y., Chen, S., Yang, X. F., & Min, J. W. (2021). Biphalin, a dimeric opioid peptide, reduces neonatal hypoxia-ischemia brain injury in mice by the activation of PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *115*, 101967. https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2021.101967

Zhang, W., Li, C., Bi, R., Lu, Y., Zhang, Y., Shi, C., Qiao, Z., Sun, Y., Chen, J., Wang, P., Wang, R., Ren, F., & Li, Y. (2025). Lactoferrin and Osteopontin Cooperatively

Promote Intestinal Epithelial Maturation in Neonatal Mice by Activating the Brg1/Notch1/Hes1 Pathway. *Nutrients*, *17*(19), 3176. https://doi.org/10.3390/NU17193176/S1

Zhao, J., Chen, Y., Xu, Y., & Pi, G. (2013). Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci*, *31*(7), 543–549. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.06.008