

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

Ricardo Ribeiro Nunes

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

Porto Alegre

2021

Ricardo Ribeiro Nunes

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

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

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

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

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

103 f.

Orientador: Luciano Stürmer de Fraga.

Coorientadora: Ana Helena da Rosa Paz.

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

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

Ricardo Ribeiro Nunes

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

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

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Giovenardi - UFCSPA

Profa. Dra. Sílvia Honda Takada - UFABC

Profa. Dra. Nadja Schröder - UFRGS

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC: área sob a curva

DAG: distância anogenital

DAMP: padrões moleculares associados ao dano

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

HI: hipóxia-isquemia

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

HT: hipotermia terapêutica

IAG: índice anogenital

Iba1: molécula adaptadora ligadora de cálcio ionizado-1

IL-1 β : interleucina-1 beta

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

IL-18: interleucina-18

mNSS: escore de severidade neurológica modificado

NF- κ B: fator nuclear-kappa B

NMDA: N-metil D-Aspartato

P7: 7^o dia pós-natal

PAMP: padrões moleculares associados a patógenos

SNA: sistema nervoso autônomo

SNC: sistema nervoso central

TAM: tecido adiposo marrom

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UCP-1: proteína desacopladora-1

SÚMARIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Estudos utilizando modelos animais de HI também têm demonstrado a

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1. Justificativa

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

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

1.2. Hipótese

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

1.3. Objetivo Geral

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

1.3.1. Objetivos Específicos

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

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

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

2.2. Aspectos Éticos

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

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

2.3. Desenho Experimental

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

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

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

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

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

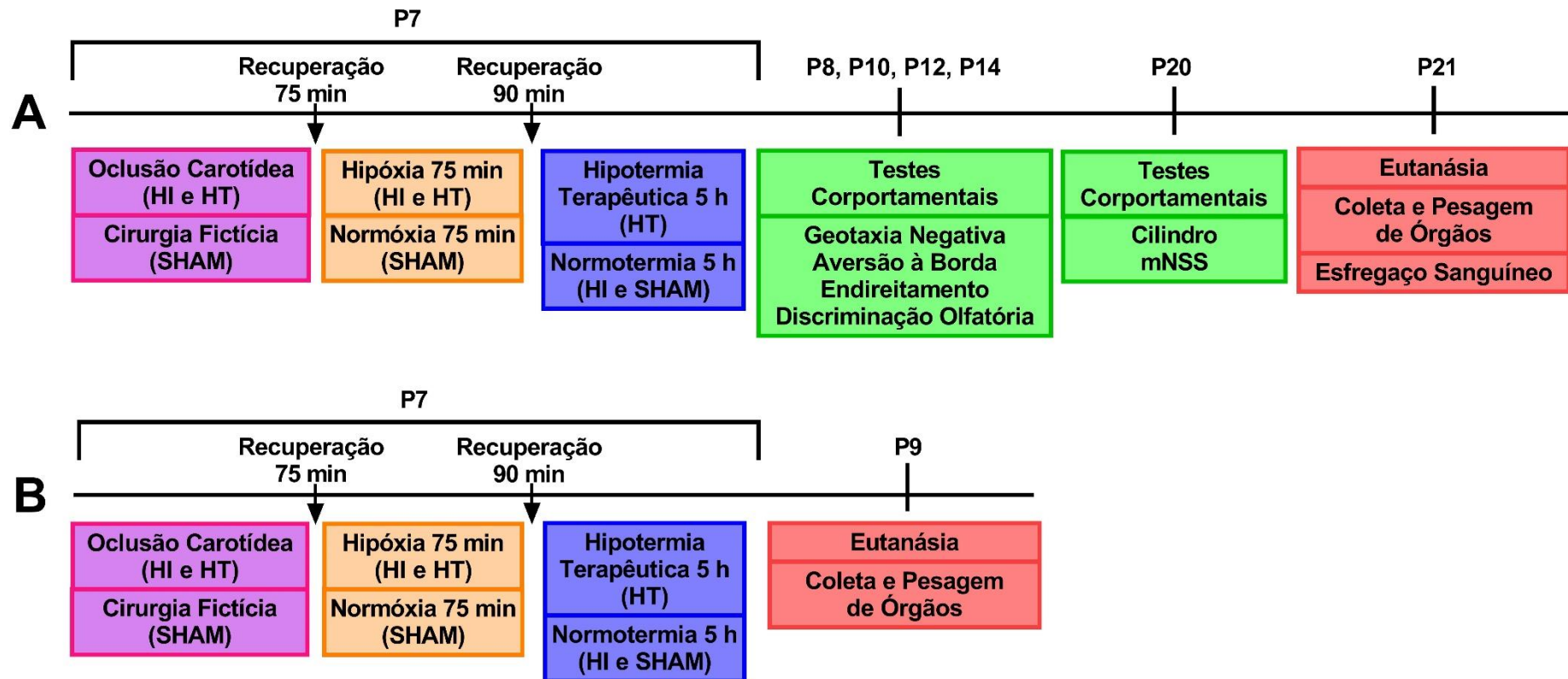


Figura 1. Desenho experimental. **(A)** No 7º dia pós-natal (P7), ratos Wistar de ambos os sexos foram submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia (HI) neonatal, que consistiu em uma cirurgia para a oclusão da carótida comum direita e posterior exposição a uma atmosfera hipóxica (8% de oxigênio) por 75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

2.4. Hipóxia-Isquemia (HI) Neonatal

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

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

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

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

2.5. Hipotermia Terapêutica (HT)

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

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

2.6. Parâmetros do Desenvolvimento

Foram avaliados 3 parâmetros do desenvolvimento, descritos a seguir.

2.6.1. Peso Corporal

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

2.6.2. Dia de Abertura dos Olhos

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

2.6.3. Índice Anogenital (IAG)

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

2.7. Testes Comportamentais

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7.5. Teste do Cilindro (P20)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.8. Eutanásia e Pesagem dos Órgãos

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

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

2.9. Esfregaço Sanguíneo e Contagem de Leucócitos

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

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

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

2.10. Análise Estatística

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

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

- 5, 2012.
- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 4, p. 397, 2015.
- DU, L. *et al.* Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38563–38570, 2004.
- DURÁN-CARABALI, L. E. *et al.* Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. **Neuroscience**, v. 340, p. 291–298, 2017.
- DURÁN-CARABALI, L. E. *et al.* Preventive and therapeutic effects of environmental enrichment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Behavioural Brain Research**, v. 359, p. 485–497, 2019.
- DURBIN, C. *et al.* Estimating leukocyte, platelet, and erythrocyte counts in rats by blood smear examination. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 157–162, 2009.
- ELALI, A.; LEBLANC, N. J. The role of monocytes in ischemic stroke pathobiology: New avenues to explore. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, n. FEB, p. 1–7, 2016.
- EMMERT, A. S. *et al.* Impaired neural differentiation and glymphatic CSF flow in the Ccdc39 rat model of neonatal hydrocephalus: genetic interaction with L1cam. **Disease Models & Mechanisms**, v. 12, n. 11, p. dmm040972, 2019.
- ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 312–325, 2021.
- ESPINOSA-GARCIA, C. *et al.* Stress primes microglial polarization after global ischemia: Therapeutic potential of progesterone. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 177–192, 2017.
- EZQUER, M. E. *et al.* Advancement of reproductive senescence and changes in the early expression of estrogen, progesterone and μ -opioid receptors induced by neonatal hypoxia in the female rat. **Brain Research**, v. 1214, p. 73–83, 2008.
- FABRES, R. B. *et al.* Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 813–821, 2018.
- FAN, L. *et al.* Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. **Behavioural Brain Research**, v. 165, n. 1, p. 80–90, 2005.
- FATHALI, N. *et al.* Splenic immune cells in experimental neonatal hypoxia-ischemia. **Translational Stroke Research**, v. 4, n. 2, p. 208–219, 2013.
- FAVERO, A. M. *et al.* Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 5, p. 607–616, 2006.
- FEATHER-SCHUSSLER, D. N.; FERGUSON, T. S. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. n. November, p. 1–12, 2016.
- FERRIERO, D. M. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. **Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 198–202, 2001.
- FESTEKJIAN, A. *et al.* The Role of Morphine in a Rat Model of Hypoxic-ischemic Injury. **Pediatric Neurology**, v. 45, n. 2, p. 77–82, 2011.
- FILOSA, J. A.; MORRISON, H. W. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 4, 2013.
- FLEISS, B. *et al.* Microglia-mediated neurodegeneration in perinatal brain injuries. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 1–22, 2021.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234-IN5, 1965.

- GALLAVAN, R. H. *et al.* Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.
- GIRALT, M. *et al.* Ontogeny and perinatal modulation of gene expression in rat brown adipose tissue. Unaltered iodothyronine 5'-deiodinase activity is necessary for the response to environmental temperature at birth. **European Journal of Biochemistry**, v. 193, n. 1, p. 297–302, 1990.
- GLUCKMAN, P. D. *et al.* Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 663–670, 2005.
- GONZÁLEZ-IBARRA, F. P. *et al.* Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. v. 2, n. February, p. 1–8, 2011.
- GOPAGONDANAHALLI, K. R. *et al.* Preterm Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, n. OCT, p. 1–10, 2016.
- GREGORY, E. H.; PFAFF, D. W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. **Physiology & Behavior**, v. 6, n. 5, p. 573–576, 1971.
- GUILLET, R. *et al.* Seven-to eight-year follow-up of the CoolCap trial of head cooling for neonatal encephalopathy. **Pediatric Research**, v. 71, n. 2, p. 205–209, 2012.
- GÜLKE, E.; GELDERBLUM, M.; MAGNUS, T. Danger signals in stroke and their role on microglia activation after ischemia. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 11, p. 175628641877425, 2018.
- HAGBERG, H. *et al.* PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 5, p. 1068–1075, 2004.
- HALE, L. P. *et al.* Hypoxia in the thymus: Role of oxygen tension in thymocyte survival. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 4 51-4, p. 1467–1477, 2002.
- HANDLEY, S. L.; SINGH, L. Neurotransmitters and shaking behaviour — more than a 'gut-bath' for the brain? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 7, n. C, p. 324–328, 1986.
- HEDTJÄRN, M. *et al.* Interleukin-18 Involvement in Hypoxic–Ischemic Brain Injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 14, p. 5910–5919, 2002.
- HENRIQUEZ, V. M.; EVINGER, C. The three-neuron corneal reflex circuit and modulation of second-order corneal responsive neurons. **Experimental Brain Research**, v. 179, n. 4, p. 691–702, 2007.
- HERRERA, T. I. *et al.* Outcomes of preterm infants treated with hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 125, n. August, p. 1–7, 2018.
- HEYSER, C. J. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2003.
- HOBBS, C. *et al.* Xenon and hypothermia combine additively, offering long-term functional and histopathologic neuroprotection after neonatal hypoxia/ischemia. **Stroke**, v. 39, n. 4, p. 1307–1313, 2008.
- HU, H. H. *et al.* MRI detection of brown adipose tissue with low fat content in newborns with hypothermia. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 32, n. 2, p. 107–117, 2014.
- HUANG, H.-M. *et al.* Hypoxic–ischemic retinal injury in rat pups. **Pediatric Research**, v. 72, n. 3, p. 224–231, 2012.
- HUANG, H.-Z.; WEN, X.-H.; LIU, H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of Neuroscience**, v. 126, n. 7, p. 647–657, 2016.
- HUANG, Z. *et al.* Hypoxia-Ischemia Upregulates TRAIL and TRAIL Receptors in the

- Immature Rat Brain. **Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 519–530, 2011.
- ILAH, B. *et al.* Prevalence and Risk Factors for Perinatal Asphyxia as Seen at a Specialist Hospital in Gusau, Nigeria. **Sub-Saharan African Journal of Medicine**, v. 2, n. 2, p. 64, 2015.
- JACOBS, S. E. *et al.* Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 474–531, 2013.
- JATANA, M. *et al.* Combination of Systemic Hypothermia and N-acetylcysteine Attenuates Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. **Pediatric Research**, v. 59, n. 5, p. 684–689, 2006.
- JESSEN, N. A. *et al.* The Glymphatic System: A Beginner's Guide. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 12, p. 2583–2599, 2015.
- JHA, R. M.; KOCHANNEK, P. M.; SIMARD, J. M. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. **Neuropharmacology**, v. 145, n. August 2018, p. 230–246, 2019.
- JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p. 779–789, 2010.
- JOHNSTON, M. V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, n. 4, p. 229–234, 2001.
- JONES, J. H. Tissue change following prolonged hypothermia in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 43, p. 257–263, 1962.
- JUN, J. C. *et al.* Adipose HIF-1 α causes obesity by suppressing brown adipose tissue thermogenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 95, n. 3, p. 287–297, 2017.
- KAIMAL, A. *et al.* Prenatal exposure to bisphenols affects pregnancy outcomes and offspring development in rats. **Chemosphere**, v. 276, p. 130118, 2021.
- KANSTRUP, I. *et al.* Blood pressure and plasma catecholamines in acute and prolonged hypoxia: effects of local hypothermia. **Journal of Applied Physiology**, v. 87, n. 6, p. 2053–2058, 1999.
- KARLSSON, M. *et al.* Dynamics of hepatic enzyme activity following birth asphyxia. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 11, p. 1405–1411, 2006.
- KARLSSON, M. *et al.* Liver enzymes cannot be used to predict liver damage after global hypoxia-ischemia in a neonatal pig model. **Neonatology**, v. 96, n. 4, p. 211–218, 2009.
- KARNATOVSKAIA, L. V.; WARTENBERG, K. E.; FREEMAN, W. D. Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection: History, Mechanisms, Risks, and Clinical Applications. **The Neurohospitalist**, v. 4, n. 3, p. 153–163, 2014.
- KAWAKAMI, M. D. *et al.* Neonatal mortality associated with perinatal asphyxia: a population-based study in a middle-income country. v. 5, p. 1–10, 2021.
- KIM, E.; CHO, S. CNS and peripheral immunity in cerebral ischemia: partition and interaction. **Experimental Neurology**, v. 335, n. September 2020, p. 113508, 2021.
- KOLLMAR, R. *et al.* Hypothermia reduces perihemorrhagic edema after intracerebral hemorrhage. **Stroke**, v. 41, n. 8, p. 1684–1689, 2010.
- KREIDER, J. C.; BLUMBERG, M. S. Geotaxis in 2-week-old Norway rats (*Rattus norvegicus*): A reevaluation. **Developmental Psychobiology**, v. 35, n. 1, p. 35–42, 1999.
- KUMAR, A. J. *et al.* Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 73, n. November 2018, p. 50–58, 2019.
- KURINCZUK, J. J.; WHITE-KONING, M.; BADAWI, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Human Development**, v. 86, n. 6, p. 329–338, 2010.

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

- Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, n. 4, p. 529–533, 2005.
- MOURA-CAMPOS, L. C.; SAVINO, W. Morphometrical Analysis of the Thymus from Mice Submitted to Low Temperature. **Cells Tissues Organs**, v. 132, n. 1, p. 9–11, 1988.
- MÜLLING, K. *et al.* Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia–ischemia. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 92, p. 234–244, 2021.
- MUNIRAMAN, H. *et al.* Biomarkers of hepatic injury and function in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy and with therapeutic hypothermia. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 10, p. 1295–1303, 2017.
- MUNTEANU, A. I. *et al.* Basic biochemical and hematological parameters in perinatal asphyxia and their correlation with hypoxic ischemic encephalopathy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 259, p. 1–6, 2021.
- NAKAGAKI, B. N. *et al.* Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. **Journal of Hepatology**, v. 69, n. 6, p. 1294–1307, 2018.
- NETTO, C. A. *et al.* Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 409–421, 2017.
- NIJBOER, C. H. A. *et al.* Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 282–292, 2007.
- ODORCYK, F. K. *et al.* Experimental neonatal hypoxia ischemia causes long lasting changes of oxidative stress parameters in the hippocampus and the spleen. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 46, n. 4, p. 433–439, 2018.
- OFFNER, H. *et al.* Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 11, p. 6523–6531, 2006.
- OGAWA, Y. *et al.* Brain damage caused by neonatal hypoxia-ischemia and the effects of hypothermia in severe combined immunodeficient (SCID) mice. **Experimental Neurology**, v. 337, n. July 2020, p. 113577, 2021.
- PALMER, C.; ROBERTS, R. L.; YOUNG, P. I. Timing of neutrophil depletion influences long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury. **Pediatric Research**, v. 55, n. 4, p. 549–556, 2004.
- PANICKAR, K. S.; NOREMBERG, M. D. Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 287–298, 2005.
- PARK, Y. *et al.* Therapeutic hypothermia reduces inflammation and oxidative stress in the liver after asphyxial cardiac arrest in rats. **Acute and Critical Care**, v. 35, n. 4, p. 286–295, 2020.
- PATEL, A. R. *et al.* Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. **International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 73–90, 2013.
- PEREIRA, L. O. *et al.* Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Research**, v. 1218, p. 257–266, 2008.
- PLOG, B. A.; NEDERGAARD, M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 13, n. 1, p. 379–394, 2018.
- PRASS, K. *et al.* Stroke-induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1–like Immunostimulation. **Journal of Experimental Medicine**, v.

- 198, n. 5, p. 725–736, 2003.
- QUEVEDO, S. *et al.* Sex-associated differences in cold-induced UCP1 synthesis in rodent brown adipose tissue. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 436, n. 5, p. 689–695, 1998.
- QUIRKE, F. A. *et al.* COHESION: core outcomes in neonatal encephalopathy (protocol). **Trials**, v. 22, n. 125, p. 1–11, 2021.
- RAINALDI, M. A.; PERLMAN, J. M. Pathophysiology of Birth Asphyxia. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 3, p. 409–422, 2016.
- RAJPUT, P.; LAMB, J.; LYDEN, P. D. Effects of Therapeutic Hypothermia on Lymphatic Clearance. **Circulation**, v. 142, n. Suppl_4, 2020.
- RAO, R. *et al.* Safety and Short-Term Outcomes of Therapeutic Hypothermia in Preterm Neonates 34-35 Weeks Gestational Age with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. **Journal of Pediatrics**, v. 183, p. 37–42, 2017.
- RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.
- RICQUIER, D. Brown Adipose Tissue: Function and Development. *In: PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF ADIPOSE TISSUE*. Paris: Springer Paris, 2013. v. 9782817803, p. 51–66. *E-book*.
- RIDDER, D. A.; SCHWANINGER, M. NF- κ B signaling in cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 995–1006, 2009.
- ROBINSON, S. *et al.* Extended Combined Neonatal Treatment With Erythropoietin Plus Melatonin Prevents Posthemorrhagic Hydrocephalus of Prematurity in Rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. September, p. 1–20, 2018.
- ROCHA-FERREIRA, E. *et al.* Systemic pro-inflammatory cytokine status following therapeutic hypothermia in a piglet hypoxia-ischemia model. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ROCHA-FERREIRA, E. *et al.* The duration of hypothermia affects short-term neuroprotection in a mouse model of neonatal hypoxic ischaemic injury. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 2018.
- ROEHR, C. C. *et al.* The 2010 Guidelines on Neonatal Resuscitation (AHA, ERC, ILCOR): Similarities and Differences – What Progress Has Been Made since 2005? **Klinische Pädiatrie**, v. 223, n. 05, p. 299–307, 2011.
- ROUMES, H. *et al.* Neuroprotective role of lactate in rat neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 342–358, 2021.
- RUHELA, R. K. *et al.* Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. **Annals of Neurosciences**, v. 26, n. 1, p. 25–31, 2019.
- RUSSELL, K. L. *et al.* Sensorimotor behavioral tests for use in a juvenile rat model of traumatic brain injury: Assessment of sex differences. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 199, n. 2, p. 214–222, 2011.
- SABIR, H. *et al.* Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. **Stroke**, v. 43, n. 12, p. 3364–3370, 2012.
- SANCHES, E. F. *et al.* Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. **Brain Research**, v. 1438, p. 85–92, 2012.
- SANCHES, E. F. *et al.* Pregnancy swimming causes short- and long-term neuroprotection against hypoxia-ischemia in very immature rats. **Pediatric Research**, v. 82, n. 3, p. 544–553, 2017.
- SANCHES, E. F. *et al.* Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats.

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

- SUZUKI, S.; TANAKA, K.; SUZUKI, N. Ambivalent Aspects of Interleukin-6 in Cerebral Ischemia: Inflammatory versus Neurotrophic Aspects. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 464–479, 2009.
- TASSINARI, I. D. Á. *et al.* Lactate Administration Reduces Brain Injury and Ameliorates Behavioral Outcomes Following Neonatal Hypoxia–Ischemia. **Neuroscience**, v. 448, p. 191–205, 2020.
- TRAYHURN, P.; ALOMAR, S. Y. Oxygen Deprivation and the Cellular Response to Hypoxia in Adipocytes - Perspectives on White and Brown Adipose Tissues in Obesity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. FEB, p. 1–9, 2015.
- TRUBIANI, O. *et al.* Thymic sensitivity to hypoxic condition in young and old rats. Age-dependent expression of NF- κ B. **Experimental Gerontology**, v. 37, n. 8–9, p. 1077–1088, 2002.
- TSUJI, M. *et al.* Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 214–220, 2012.
- VAN DER KOOIJ, M. A. *et al.* NF- κ B inhibition after neonatal cerebral hypoxia–ischemia improves long-term motor and cognitive outcome in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 38, n. 2, p. 266–272, 2010.
- VANNUCCI, R. C. *et al.* Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 55, n. 2, p. 158–163, 1999.
- VENDRAME, M. *et al.* Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 1, p. 191–200, 2006.
- VILLAPOL, S. *et al.* Early Sex Differences in the Immune-Inflammatory Responses to Neonatal Ischemic Stroke. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3809, 2019.
- VOLBERS, B. *et al.* Impact of Hypothermia Initiation and Duration on Perihemorrhagic Edema Evolution after Intracerebral Hemorrhage. **Stroke**, v. 47, n. 9, p. 2249–2255, 2016.
- WADDELL, J. *et al.* Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioral outcomes in a rat model of neonatal HI. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 285–295, 2016.
- WAGNER, B. P.; NEDELCO, J.; MARTIN, E. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 51, n. 3, p. 354–360, 2002.
- WANG, Q. *et al.* Therapeutic hypothermia promotes cerebral blood flow recovery and brain homeostasis after resuscitation from cardiac arrest in a rat model. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1961–1973, 2019.
- WOOD, T. *et al.* Rectal temperature in the first five hours after hypoxia–ischemia critically affects neuropathological outcomes in neonatal rats. **Pediatric Research**, v. 83, n. 2, p. 536–544, 2018.
- WOOD, T. *et al.* Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23430, 2016.
- WOOD, T. *et al.* Variability and sex-dependence of hypothermic neuroprotection in a rat model of neonatal hypoxic–ischaemic brain injury: a single laboratory meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- XIAO, F. *et al.* Mild Hypothermia Induced before Cardiac Arrest Reduces Brain Edema Formation in Rats. **Academic Emergency Medicine**, v. 9, n. 2, p. 105–114, 2002.
- XIONG, M. *et al.* Post-ischemic hypothermia for 24 h in P7 rats rescues hippocampal neuron: Association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine

- expression. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 351–357, 2009.
- YILDIZ, E. P.; EKICI, B.; TATLI, B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 17, n. 5, p. 449–459, 2017.
- ZHA, A. *et al.* Association Between Splenic Contraction and the Systemic Inflammatory Response After Acute Ischemic Stroke Varies with Age and Race. **Translational Stroke Research**, v. 9, n. 5, p. 484–492, 2018.
- ZHANG, B. J. *et al.* Splenectomy protects experimental rats from cerebral damage after stroke due to anti-inflammatory effects. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 12, p. 2354–2360, 2013.
- ZHOU, W. H. *et al.* Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: A multicenter randomized controlled trial in China. **Journal of Pediatrics**, v. 157, n. 3, p. 367-372.e3, 2010.
- ZHU, C. *et al.* Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. **Journal of Neurochemistry**, v. 96, n. 4, p. 1016–1027, 2006.
- ZIEMKA-NALECZ, M.; JAWORSKA, J.; ZALEWSKA, T. Insights into the neuroinflammatory responses after neonatal hypoxia-ischemia. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 76, n. 8, p. 644–654, 2017.