

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Dissertação de Mestrado:

EFEITOS METABÓLICOS DA ASFIXIA PERINATAL EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS

Aluno: Samir Khal de Souza

Orientação: Marcos Emilio dos Santos Frizzo

Co-orientação: Roselis Silveira Martins da Silva

Porto Alegre, 2014

Dissertação de Mestrado:

EFEITOS METABÓLICOS DA ASFIXIA PERINATAL EM DIFERENTES ESTRUTURAS CEREBRAIS

Aluno: Samir Khal de Souza

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Dr. Marcos Emilio dos Santos Frizzo, como requisito parcial para obtenção de grau de mestre.

## RESUMO

A asfixia perinatal está entre as principais causas diretas de óbito neonatal, sendo um grande determinante de morbidade e comprometimento neurológicos. Sua origem é associada à inadequada perfusão e oxigenação tecidual. Assim, o tipo de dano causado pela asfixia tem relação com o tempo de duração e com a fase do desenvolvimento fetal. Respostas fisiológicas adaptativas, tais como o direcionamento do fluxo sanguíneo para órgãos vitais e o aumento do metabolismo anaeróbico, nem sempre são suficientes para evitar a ocorrência de alterações significativas nas reservas energéticas, na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e na concentração de glutamato extracelular. Fêmeas de ratos Wistar, no 22º dia de prenhes foram submetidas à cesariana para a remoção dos dois cornos uterinos. Naquele com menor número de fetos foi realizada a incisão imediata para obtenção dos animais controles. O outro corno uterino foi isolado e mantido em solução salina a 37°C por 15 min para ocasionar a asfixia intra-uterina. Alguns controles foram decapitados imediatamente (controle agudo) enquanto outros foram estimulados a respirar e mantidos a 34°C, por 60 min, em normóxia (controle com recuperação). Ao término da asfixia, alguns neonatos foram imediatamente decapitados (asfixiado agudo) e os restantes foram mantidos a 34°C, por 60 min, em normóxia (asfixiado com recuperação). No presente estudo, foram determinados os níveis de lactato plasmático, de glicemia, a quantidade de glicogênio no fígado, no músculo esquelético, no córtex cerebral e no hipocampo. Também foram avaliados os níveis de ATP no córtex cerebral e a captação de glutamato no córtex cerebral. A avaliação da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi realizada somente no córtex cerebral, nos sinaptossomas obtidos deste tecido e no hipocampo dos grupos agudo. Os resultados indicam que a asfixia perinatal causou aumento significativo na lactacidemia e na glicemia dos animais asfixiados do grupo agudo e do grupo asfixiado com recuperação. Houve redução significativa na quantidade de glicogênio do fígado e do músculo esquelético dos demais grupos em relação ao grupo controle agudo. No córtex cerebral, foi identificada redução significativa de glicogênio no grupo asfixiado agudo e no grupo asfixiado com recuperação em relação aos respectivos grupos controle. Não foi encontrada redução significativa nos níveis de glicogênio do hipocampo nos grupos asfixiado agudo e com recuperação, em relação

aos grupos controle. A concentração de ATP diminuiu significativamente no grupo asfisiado e no grupo asfisiado com recuperação em relação ao controle agudo. Não houve diferença significativa na captação de glutamato, no córtex cerebral dos asfisiados agudo e com recuperação. A atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não foi alterada significativamente nos grupos asfisiado agudo. Conclui-se que a asfisia perinatal causou alterações no metabolismo dos animais, as quais perduraram após 60 min de recuperação. Os resultados sugerem que o córtex cerebral possui uma grande capacidade adaptativa frente à asfisia, o que poderia explicar a manutenção do transporte de glutamato mesmo com uma redução significativa nos níveis de ATP neste tecido. Estudos adicionais serão necessários para identificar estes mecanismos adaptativos que parecem causar diferentes efeitos após a asfisia no córtex cerebral e no hipocampo.

## ABSTRACT

Perinatal asphyxia is among the major direct causes of neonatal death, being a great determinant of morbidity and neurological impairment. Its origin is associated with inadequate tissue oxygenation and perfusion. Thus, the type of damage caused by asphyxia is related to its duration and stage of fetal development. Physiological responses promote adaptation across the perinatal asphyxia, such as the blood flow's shunting to vital organs and anaerobic metabolism increasing. However, sometimes adaptive responses are not enough to compensate effects of asphyxia, causing significant changes in energy reserves,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase enzyme activity and glutamate extracellular concentration. Female Wistar rats on day 22<sup>o</sup> of pregnant were subjected to cesarean section and both uterine horns were removed. Control animals fetuses were obtained through immediate incision of one uterine horn. The other one was isolated and maintained in 0.9 % saline solution at 37°C, for 15 min, to obtain asphyxiated neonates. Some controls were immediately decapitated (acute control), while others were stimulated to breathe and kept at 34°C, for 60 min, in normoxia (control with recovery). At the end of asphyxia, some neonates were immediately decapitated (acute asphyxia) and the remaining were kept at 34°C, for 60 min, in normoxia (asphyxia with recovery). In this study, the levels of lactate, glucose, the amount of glycogen in the liver, skeletal muscle, cerebral cortex and hippocampus were determined. ATP levels so as glutamate uptake in the cerebral cortex were also evaluated. Then, the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity assay from acute groups was performed in hippocampal tissue, cerebral cortex and synaptosomes obtained from cerebral cortex. These results indicate that perinatal asphyxia caused in acute asphyxia group and asphyxia with recovery group significant increases plasmatic lactate and glucose. In cerebral cortex, acute asphyxia and asphyxia with recovery group showed significant glycogen reduction compared to respective control groups. Differently, it was not observed in hippocampus. ATP concentrations decreased in acute asphyxia and asphyxia with recovery group compared to acute control. There was no significant difference in glutamate uptake of cerebral cortex in acute asphyxia and asphyxia with recovery.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase enzyme activity was not altered in acute asphyxia related to acute control group. In conclusion, perinatal asphyxia caused changes in animal

metabolism, which persisted after 60 min of recovery. Moreover, cerebral cortex after asphyxia, even with a significant reduction in ATP levels, is more capable to maintain glutamate transport compared to hippocampus. More studies are necessary to identify mechanisms that cause different effects in cerebral cortex and hippocampus.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis plasmáticos de lactato.	25
<b>Figura 2</b> Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis plasmáticos de glicose.	26
<b>Figura 3</b> Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis de glicogênio no tecido muscular, hepático e cerebral	28
<b>Figura 4</b> Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis de glicogênio hipocampal.	29
<b>Figura 5</b> Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis de ATP.	30
<b>Figura 6</b> Efeito da asfixia perinatal sobre o transporte de glutamato no córtex cerebral.	31
<b>Figura 7</b> Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral.	32
<b>Figura 8</b> Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	33
<b>Figura 9</b> Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo.	34
<b>Figura 10</b> Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade redutora em sinaptosomas do córtex cerebral	35
<b>Figura 11:</b> Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade redutora em sinaptosomas do hipocampo.	36

## LISTA DE PALAVRAS

ATP - Trifosfato de Adenosina

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

g - Medida de Força Centrifuga

GLUT - Transportador de Glicose

min - Minuto

MTT - (3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio brometo)

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SNC - Sistema Nervoso Central

UABs - Unidades de Absorbância



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
	2.1 Objetivos específicos	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
	3.1 Obtenção de neonatos por cesariana	17
	3.2 Grupos experimentais	18
	3.3 Obtenção dos grupos amostrais e o processo de asfixia	18
	3.4 Coleta do sangue	19
	3.5 Determinação da lactacidemia	19
	3.6 Dissecção do córtex cerebral e do hipocampo	19
	3.7 Determinação do glicogênio	20
	3.8 Quantificação do ATP	20
	3.9 Obtenção dos sinaptossomas	20
	3.10 Avaliação da atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo	21
	3.11 Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	22
	3.12 Análise estatística	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
	4.1 Lactacidemia	25
	4.2 Glicose plasmática	26

<b>4.3 Glicogênio muscular, hepático e cerebral.</b>	27
<b>4.4 Glicogênio hipocampal</b>	29
<b>4.5 ATP no córtex cerebral</b>	30
<b>4.6 Captação de glutamato</b>	31
<b>4.7 Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase no córtex cerebral</b>	32
<b>4.8 Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase em sinaptossomas do córtex</b>	33
<b>4.9 Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase no hipocampo</b>	34
<b>4.10 Atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral</b>	35
<b>4.11 Atividade redutora em sinaptossomas do hipocampo</b>	36
<b>5 DISCUSSÃO</b>	37
<b>6 CONCLUSÃO</b>	48
<b>REFERÊNCIAS</b>	49
<b>APÊNDICE A - Metabólic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex</b>	60

## 1 INTRODUÇÃO

A asfixia perinatal pode comprometer a integridade do tecido cerebral, bem como de outros órgãos como o coração e os rins (ALONSO-SPILSBURY et al., 2005). Segundo Parer (1998) e Low (2004) este evento pode ocorrer antes do parto (*antepartum*), durante este processo (*intrapartum*) ou após o nascimento (*postpartum*). Este episódio pode decorrer de uma inadequada perfusão da placenta, de uma interrupção do fluxo sanguíneo umbilical e de contrações uterinas alteradas. A asfixia também pode ocorrer imediatamente após o parto devido a falhas na expansão ou na circulação pulmonar do recém-nascido (ALONSO-SPILSBURY et al., 2005). Cada um destes eventos é capaz de causar danos ao sistema nervoso central (SNC), porém o tipo de lesão tecidual e as áreas afetadas estão diretamente relacionados com a extensão temporal da asfixia e com a fase do desenvolvimento fetal no qual ela ocorre (PARER, 1998).

A asfixia perinatal está entre as principais causas diretas de óbito neonatal constituindo um dos maiores determinantes de morbidade e comprometimento neurológicos na população pediátrica (LAW et al., 2005; WEITZDOERFER et al., 2004; SARACENO et al., 2010). Evidências clínicas demonstram que neonatos acometidos de asfixia perinatal podem sofrer sequelas severas, incluindo paralisia cerebral, encefalopatias, epilepsia, alterações motoras e/ou cognitivas com grande amplitude de gravidade, tais como déficit de atenção, hiperatividade, retardo mental e/ou síndromes neuropsiquiátricas e neurodegenerativas com diagnóstico clínico tardio (HILL e VOLPE, 1989; WAKUDA et al., 2008; MORALES et al., 2011).

Diferentes parâmetros clínicos podem ser utilizados para estabelecer o diagnóstico de asfixia perinatal e estimar a extensão dos danos, tais como padrão de frequência cardíaca fetal, presença de líquido amniótico tinto de mecônio e índice de Apgar. Indicadores bioquímicos, também podem auxiliar na identificação de alterações relacionadas à asfixia perinatal, entre estes, medidas de pH, pressões parciais de CO<sub>2</sub> e de O<sub>2</sub>, lactacidemia e glicemia (BASU, et al., 2009; HILL e VOLPE, 1989; HERMANSEN, 2003; HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011; SUIDAN e YOUNG, 1984; VANNUCCI e HAGBERG, 2003 ).

Experimentalmente, utiliza-se um modelo de asfixia intrauterina graduada que reproduz muitas das características observadas na situação clínica (acidose, hipercapnia e hipóxia) da asfixia perinatal (WEITZDOERFER et al., 2004; BJELKE et al., 1991). Em ratos, esta condição induz hiperatividade, diminuição da memória de trabalho e ansiedade (DELL'ANNA et al., 1991; VENEROSI et al., 2004). Trabalhos onde foi empregado este paradigma também descrevem a ocorrência tardia de alterações comportamentais permanentes em animais adultos tais como déficit de memória não espacial e comprometimento da coordenação motora (HOEGER et al., 2000; BALDUINI et al., 2000; VAN DE BERG et al., 2003; SIMOLA et al., 2008; MORALES, P. et al., 2010).

Descreve-se uma maior tolerância dos fetos à asfixia em relação a animais adultos devido a uma combinação de mecanismos de compensação que visam proteger órgãos vitais (PARER, 1998). Entre estes mecanismos, está a possibilidade de direcionar o fluxo sanguíneo para o cérebro, o coração e as glândulas adrenais, enquanto o fluxo sanguíneo é diminuído para órgãos como os rins, os músculos esqueléticos, o trato gastrointestinal e a pele (PARER, 1998). No SNC também é descrita uma redistribuição do fluxo sanguíneo para o tronco cerebral em detrimento de áreas corticais (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011; LOU et al., 1985). Juntamente com esses processos, ocorre uma redução da atividade metabólica antes que as reservas de oxigênio sejam completamente extintas, além de um incremento do metabolismo anaeróbico e de uma mudança no perfil dos substratos energéticos utilizados (BENNET et al., 1998; JENSEN et al., 1999; LUST, et al., 2003; SINGER, 1999). Neste último caso, estudos recentes sugerem que após um episódio de asfixia intrauterina, algumas estruturas do SNC poderiam ser potencialmente beneficiadas pela utilização de substratos energéticos alternativos (SOUZA et al., 2013).

Apesar do metabolismo energético no cérebro de animais submetidos à asfixia perinatal já ter sido estudado por alguns autores, questões importantes permanecem pouco esclarecidas. Uma delas refere-se ao papel do lactato no cérebro neonatal. O ácido láctico é acumulado em decorrência de um aumento da glicólise anaeróbica no organismo; situação presente em diferentes modelos de asfixia perinatal. Existe uma relação direta, já descrita na literatura científica, entre o aumento da concentração plasmática de lactato e a severidade do dano causado pela asfixia infringida aos

neonatos (SUIDAN e YOUNG, 1984; HILL e VOLPE, 1989; BORRUTO et al., 2006; HERMANSEN, 2003; LUST et al., 2003; VANNUCCI e HAGBERG, 2004; HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011). Assim, por meio da análise quantitativa da lactacidemia é possível confirmar que a metodologia proposta é capaz de reproduzir dados condizentes com os encontrados em situações de asfixia perinatal. Entretanto, se por um lado suas concentrações são consideradas na clínica como um indicador de acidose fetal, inclusive mais confiável que medidas de pH, por outro, este também pode ser um importante substrato energético (MAGISTRETTI e PELLERIN, 1999; VAILLANCOURT, et al., 1999; BORRUTO et al., 2006). A capacidade de reduzir o uso não essencial de oxigênio durante a hipóxia moderada, de aumentar a contribuição anaeróbica para produção de ATP durante asfixia severa e de utilizar metabólitos diferentes pode constituir o principal mecanismo responsável pela pronunciada tolerância fetal à hipóxia. Experimentalmente foi demonstrado o efeito protetor de uma fraca ou moderada acidemia láctica para o cérebro, onde bebês asfixiados poderiam se beneficiar da vasodilatação cerebral causada pela acidemia, utilizando adicionalmente o lactato como nutriente (HERMANSEN, 2003).

Resultados obtidos com o modelo de asfixia perinatal descrevem um elevado consumo de ATP e de fosfocreatina no tecido cerebral, no miocárdio e no tecido renal (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011; SEIDL et al., 2000). Com base em publicações anteriores é indicada uma redução na produção de ATP em decorrência de maior funcionalidade do metabolismo anaeróbico (VANNUCCI et al., 2004). A diminuição no conteúdo de ATP implica em uma menor funcionalidade de transportadores iônicos, mudanças no padrão de neurotransmissão, acúmulo de cálcio intracelular e, no caso de uma diminuição prolongada, a ocorrência de danos ao DNA (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011).

De forma análoga ao ATP, o glicogênio é descrito com sendo uma importante reserva energética. Ele é composto por unidades glicosil unidas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e com ramificações  $\alpha$ -1,6, que originam um polímero de elevado peso molecular. O processo de síntese e de degradação do glicogênio depende da dinâmica estabelecida entre a atividade das enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, respectivamente (SHULMAN e ROTHMAN, 2000). O fígado e o músculo

esquelético são descritos como os principais tecidos onde o glicogênio é armazenado (RYU et al., 2009). No cérebro, o glicogênio também é descrito como uma importante fonte de energia (LUST et al. 2003). Para o glicogênio hepático é atribuída a função de manutenção dos níveis glicêmicos nos períodos que não ocorre ingestão alimentar. Embora exista grande quantidade de glicogênio no músculo esquelético, sua função é voltada, principalmente, à disponibilização de ATP para a contração muscular (SHULMAN e ROTHMAN, 2000). Recentemente, foi atribuído ao glicogênio um papel de destaque ao ser capaz de sustentar a atividade elétrica de neurônios e por estar associado no transporte de glutamato em astrócitos corticais (DINUZZO et al. 2011; SCHOUSBOE et al 2010; SUH et al. 2007).

Outra importante questão, diretamente afetada por alterações do metabolismo energético em neonatos asfíxiados, refere-se à perda da capacidade do tecido cerebral de manter a homeostase do glutamato extracelular. De fato, estudos recentes mostraram que o sistema glutamatérgico é afetado pela incidência de episódios de asfíxia intrauterina (KHASHABA et al., 2006; FRIZZO et al., 2010). A perda desta função pode estar diretamente relacionada a uma alteração metabólica que comprometa os níveis energéticos necessários para a remoção do glutamato do meio extracelular (DANBOLT, 2001).

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, atuando sobre diversos tipos de receptores, ionotrópicos e metabotrópicos (DANBOLT, 2001; FONNUM, 1984). Apesar da sua ação fisiológica, a permanência do glutamato no microambiente sináptico pode estimular excessivamente receptores glutamatérgicos e desencadear um tipo de morte neuronal conhecida como excitotóxica, condição observada em várias doenças neurodegenerativas crônicas e agudas (OLNEY, 1989; CHOI, 1992; MELDRUM, 2000). A remoção do glutamato da fenda sináptica é essencial para evitar a excitotoxicidade e ocorre através de transportadores de alta afinidade dependentes de sódio, os quais mantêm as concentrações extracelulares deste neurotransmissor abaixo de níveis neurotóxicos (ANDERSON e SWANSON, 2000; DANBOLT, 2001). Em humanos, foram clonados cinco diferentes transportadores de glutamato, chamados transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT1-5). Os homólogos em ratos são designados como

transportador de glutamato GLAST (EAAT1), transportador de glutamato GLT1 (EAAT2) e carreador de aminoácido excitatório 1, EAAC1 (EAAT3). EAAT4 e EAAT5 mantêm a mesma nomenclatura. A atividade de captação do glutamato no cérebro não é constante, mas sujeita a uma significativa regulação, não somente durante o desenvolvimento, mas também no cérebro adulto (DANBOLT, 2001; TIAN et al., 2007).

De acordo com Gross et al., (2005) e Wakuda et al., (2008) o sistema dopaminérgico tem sido o alvo principal de estudo no modelo animal de asfixia perinatal. Poucos trabalhos têm descrito alterações em outros sistemas de neurotransmissão tais como o glutamatérgico (FRIZZO et al., 2010; PAPAZISIS et al., 2008). Entretanto, cabe salientar que estudos com cérebros de ratos submetidos à asfixia perinatal descrevem que minutos após o episódio os níveis extracelulares de glutamato aumentam significativamente, podendo permanecer elevados mesmo após três meses do evento (ENGIDAWORK et al., 1997; KOHLHAUSER et al., 1999). Nestes casos, a inexistência de um metabolismo extracelular de glutamato sugere a possibilidade de uma ação duradoura deste neurotransmissor excitatório (DANBOLT, 2001).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é conhecida por seu papel chave no transporte ativo de íons através da membrana plasmática. Ela é uma proteína integral de membrana, altamente conservada, expressa em todas as células animais e pertencente à família das ATPases do tipo P. Sua organização estrutural consiste de uma subunidade alfa ( $\alpha$ ) e de uma beta ( $\beta$ ). Em humanos, identificou-se 4 isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 4$ ) e três isoformas da subunidade  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ). Frequentemente, encontram-se associadas à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, proteínas de membrana FXYP, também referidas como subunidade gama ( $\gamma$ ) as quais influenciam na atividade deste complexo enzimático (REINHARD et al., 2012). Ainda em humanos, as subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  e  $\alpha 4$  são inibidas de forma específica pela ouabaína. As três isoformas da subunidade  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ) também foram identificadas no cérebro, mesencéfalo, tronco cerebral e cerebelo de ratos Wistar. Esses animais foram avaliados no 18º e 21º dias de desenvolvimento fetal, no 2º dia após o nascimento e em adultos (URAYAMA et al., 1989). Foi descrito um aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durante o desenvolvimento cerebral, e que este seria devido a uma maior expressão e função das três isoenzimas, principalmente

da isoforma  $\alpha 2$ . A subunidade  $\alpha$  possui dez domínios transmembrana, os quais abrigam os sítios para a ligação dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , hidrólise do ATP e fosforilação. Já a subunidade  $\beta$  possui um domínio transmembrana, o qual está relacionado com o íon  $\text{K}^+$ . Participa também, da função de transferência do complexo  $\alpha$ - $\beta$  da enzima para a membrana plasmática e, também, com a adesão intercelular (ROSE, E.M et al., 2009).

O ciclo de transporte da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é impulsionado pela quebra do ATP permitindo que três íons  $\text{Na}^+$  sejam exportados da célula, contra seu gradiente químico e potencial elétrico. Simultaneamente dois íons  $\text{K}^+$  são lançados para o interior da célula. O processo de transporte dos íons pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é realizado por múltiplas mudanças na conformação da enzima, o chamado ciclo de Post-Albers (HABECH et al., 2009). O funcionamento adequado da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase está associado com a excitabilidade elétrica, captação de nutrientes e de neurotransmissores, regulação do volume e pH intracelular (LI e STYS, 2001; REINHARD et al., 2012).

A enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é inibida com alta especificidade pelo glicosídeo cardíaco ouabaína que se liga ao sítio extracelular do potássio na subunidade catalítica fosforilada. Em elevadas concentrações a ouabaína torna-se altamente tóxica aos neurônios e as células da glia (BRINES et al., 1995). A maioria das isoformas desta bomba possui elevada afinidade para ouabaína ( $10^{-9}$  a  $10^{-8}$ M). Porém, algumas isoformas encontradas em ratos, como a  $\alpha$ -1, possuem baixa afinidade para este glicosídeo ( $10^{-4}$  a  $10^{-3}$ M) resultando em uma maior resistência à inibição (ATTERWILL e COLLINS, 1987; BRINES et al., 1995; MATSUDA et al., 1984). Sendo assim, o uso de ouabaína como inibidor da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é amplamente utilizado em estudos de patofisiologia e de doenças neurodegenerativas (BRINES et al., 1995).

A relação entre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e os transportadores de glutamato pode ser melhor estabelecida após a constatação de que secções da medula espinhal de ratos, tratadas com ouabaína, apresentam uma diminuição no transporte de glutamato (LI e STYS, 2001). Nos sinaptossomas de córtex cerebral e de cerebelo de ratos adultos é descrita uma redução no transporte de glutamato associada com uma diminuição na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (ROSE et al., 2009). Dessa forma, é possível que os elevados níveis de glutamato presentes nas sinapses de fetos submetidos à



asfixia perinatal estejam relacionados com alterações na atividade desta enzima. Apesar da remoção do glutamato da fenda sináptica ser dependente do gradiente eletroquímico de  $\text{Na}^+$  estabelecido pela atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, não foram realizadas avaliações que descrevam a atividade desta enzima após a ocorrência de asfixia intrauterina. Além disso, existem evidências de que a diminuição na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase esteja relacionada com alterações nas sinalizações e com a morte de neurônios após eventos hipóxico-isquêmicos (ROSENKRANTZ et al., 1996).

## **2 OBJETIVO**

Considerando as evidências de que o sistema glutamatérgico é afetado pela asfixia perinatal e que esta condição provoca efeitos diferentes em estruturas cerebrais distintas, nosso objetivo é avaliar a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e os níveis de ATP do córtex cerebral e hipocampo de animais que sofreram asfixia perinatal, imediatamente após a asfixia ou depois de 60 min de recuperação em normóxia. A determinação dos níveis de glicogênio nestes tecidos cerebrais também poderá contribuir para o entendimento do cenário presente neste modelo de asfixia.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Avaliar a lactacidemia e glicemia na condição aguda ou após a recuperação.
- Quantificar o glicogênio do córtex cerebral e hipocampo (na condição aguda ou após a recuperação).
- Determinar o ATP total do córtex cerebral e hipocampo (na condição aguda ou após a recuperação).
- Estudar a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral, no hipocampo e nos sinaptossomas destes tecidos (na condição aguda ou após a recuperação).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar de 90 dias, provenientes do Centro de Reprodução Animal do Campus do Vale e alojados no Biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após trinta dias de ambientação, as fêmeas foram submetidas a exames colpocitológicos para detectar a fase do ciclo estral, sempre no período da tarde. Identificada a fase de pró-estro, as fêmeas foram alojadas em caixas individuais, com um macho, durante uma noite. No dia seguinte, foi realizada uma análise para confirmar a presença de espermatozóides e, em caso positivo, a fêmea foi mantida em caixa individual até o 22º dia de prenhes. Todos os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*.

O estudo foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Ciências Morfológicas, em associação com o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, do Departamento de Fisiologia, ambos do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A Comissão De Ética No Uso De Animais da UFRGS aprovou o presente trabalho em seus aspectos éticos e metodológicos (nº 23779 – CEUA/UFRGS).

#### 3.1 Obtenção de neonatos por cesariana

O parto cesáreo foi realizado no 22º dia de prenhes e permitiu a obtenção de animais controles e asfixiados em um mesmo experimento. Todas as etapas foram realizadas com a participação de três pesquisadores treinados. Dois pesquisadores ficaram responsáveis pelos procedimentos cirúrgicos e pela manipulação dos animais e o terceiro pelo controle das condições experimentais (instrumentação cirúrgica, acompanhamento da temperatura do banho de incubação e registro do tempo). Imediatamente após a decapitação da fêmea matriz, era realizada a cesariana e a histerectomia. O corno uterino que apresentasse o maior número de filhotes tinha as extremidades clipadas com pinças hemostáticas, sendo removido e transferido para

uma solução salina à temperatura de 37°C por 15 min. Simultaneamente, foi realizada a incisão do outro corno uterino para a obtenção dos animais controles. Na cesariana, a categoria de severidade para a fêmea matriz foi definida como sem recuperação.

### **3.2 Grupos experimentais**

O efeito da asfixia intrauterina foi estudado sobre diferentes parâmetros, avaliados imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de normóxia a 34°C (condição de recuperação). Desta forma foram estabelecidos quatro grupos experimentais:

- Controles agudos: animais obtidos imediatamente após a histerectomia.
- Asfixiados agudos: animais obtidos imediatamente após a histerectomia do corno uterino asfixiado.
- Controles com recuperação: animais mantidos por 60 min em normóxia após a histerectomia.
- Asfixiados com recuperação: animais mantidos por 60 min em normóxia após a histerectomia do corno uterino asfixiado.

### **3.3 Obtenção dos grupos amostrais e o processo de asfixia**

A histerectomia dos dois cornos uterinos foi realizada imediatamente após a cesariana. Naquele que apresentou menor número de fetos, foi realizada a incisão imediata para obtenção dos animais controles. Neste caso, os líquidos e tecidos amnióticos foram removidos, assim como o excesso de líquido das vias aéreas superiores. Estes neonatos foram imediatamente decapitados para coleta dos tecidos (grupo controle agudo) enquanto os demais animais foram mantidos a 34°C por 60 min, em normóxia (grupo controle com recuperação). Ao término do período de recuperação, estes animais foram decapitados para remoção dos tecidos. A condição de asfixia intrauterina consistiu na manutenção do útero isolado à temperatura de 37°C pelo período de 15 min (BJELKE et al., 1991; WEITZDOERFER et al., 2004). Durante este procedimento, a temperatura da solução salina foi rigorosamente controlada. O grau de severidade do procedimento de asfixia para 15 min foi leve e para esta

condição a sobrevivência foi maior que 90% (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011). Após o período de asfixia, no grupo agudo os fetos foram retirados do útero para remoção dos tecidos amnióticos e foram imediatamente decapitados para a coleta dos tecidos. Nos outros animais asfixiados, foi retirado o excesso de líquido amniótico das vias aéreas superiores e estes foram estimulados a respirar por meio de uma leve compressão no tórax, sendo mantidos a 34°C, por 60 min, em normóxia (grupo asfixiado com recuperação). Ao final deste período, os neonatos foram decapitados para a coleta dos tecidos. Nessa etapa, a categoria de severidade é definida como sem recuperação. Para a determinação da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e para a obtenção dos sinaptossomas, foi utilizado *pool* de fetos submetidos ou não a asfixia perinatal, nos respectivos tempos experimentais.

### **3.4 Coleta do sangue**

Logo após a retirada do útero (agudo) ou após 60 min em normóxia (recuperação), os animais foram decapitados e o sangue coletado para dosagem do lactato. O sangue foi coletado em minitubos tratados com fluoreto de sódio (0,1 M) e imediatamente centrifugados por 10 min (2500 x g) para obtenção da amostra de plasma.

### **3.5 Determinação da lactacidemia**

O nível de lactato no plasma foi quantificado a partir de uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  por meio do método enzimático colorimétrico (Kit Katal), com leitura realizada em 540 nm.

### **3.6 Dissecções do córtex cerebral e do hipocampo**

O procedimento de dissecção foi realizado com o auxílio de uma lupa cirúrgica e os encéfalos foram manipulados sobre superfície gelada, em meio de isolamento (sacarose - 0,32 M / EDTA- 1 mM / Tris-HCl - 10 mM / pH: 7,4/ a 4°C). O córtex cerebral e o hipocampo foram isolados, transferidos para tubos e congelados por imersão em nitrogênio líquido. Após, foram mantidos a -80°C até o momento da utilização. Para a avaliação da atividade enzimática da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e obtenção dos sinaptossomas, os

tecidos removidos eram imediatamente submetidos às etapas de extração das membranas.

### **3.7 Determinação do glicogênio**

A extração do glicogênio do tecido cerebral (córtex ou hipocampo) foi realizada segundo van Handel (1965). As amostras de tecido eram transferidas para tubos contendo 250  $\mu$ L de KOH 30% e, em seguida, submetidas à fervura por 60 min. Logo após, adicionava-se 50  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e em seguida 0,5 mL de álcool PA. A mistura era centrifugada a 740 x g por 10 min. O sobrenadante era então desprezado, e o *pellet* ressuspendido com 250  $\mu$ L água destilada aquecida para formar uma mistura homogênea, a qual se adicionava 250  $\mu$ L de HCl (4N). A mistura era fervida por mais 60 min. Após essa etapa era adicionado 250  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para neutralizar a mistura, na qual se determinou a concentração de glicose. A concentração da glicose foi avaliada utilizando-se Kit Glicose-Laborclin (Biolíquid) e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 505 nm.

### **3.8 Quantificação do ATP**

O ATP total foi determinado apenas no córtex cerebral, com o Kit Invitrogen (A22066) o qual faz uso da detecção bioluminescente dos níveis de ATP através da reação luciferina-luciferase. O tecido era transferido do nitrogênio líquido para uma superfície a 4°C, homogeneizado em tampão de lise e centrifugado em rotor de ângulo fixo (SM-24) a 10.000 x g, por 3 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um minitubo estéril e o pH ajustado para 7,8 com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2M). As trocas térmicas eram evitadas, mantendo-se os homogenatos e reagentes sempre sobre gelo. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do sobrenadante era retirada e adicionada a 100  $\mu$ L do tampão de reação do Kit. A leitura foi realizada em luminômetro, Expectra-Max M5, a 560 nm, em 28°C, utilizando-se placas brancas de 96 poços.

### **3.9 Captação de glutamato**

Para o estudo da captação de glutamato, os córtices cerebrais foram imediatamente removidos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) a 4°C. Após, o tecido foi pesado e transferido para o meio HBSS a 36,5°C, por 15 min. A captação foi

iniciada com a adição de  $0,2 \mu\text{Ci}\cdot\text{mL}^{-1}$  L-[2,3- $^3\text{H}$ ] glutamato (PerkinElmer  $49.6\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) e com  $100 \mu\text{M}$  de glutamato não marcado. A incubação foi interrompida após 7 min, por meio de três lavagens com 1 mL de HBSS gelado sobre placa arrefecida com gelo. Em seguida, o tecido foi rompido com 0,5 M de NaOH e o lisado total foi utilizado para determinar o conteúdo intracelular de L-[ $^3\text{H}$ ] glutamato por meio de contagem em líquido de cintilação em contador Rack Beta. Para determinar a captação efetiva de glutamato foram realizados experimentos paralelos, em superfície gelada, com a substituição equimolar do cloreto de sódio por cloreto de colina no meio de incubação. Os valores obtidos nestas condições foram subtraídos da absorção a  $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$  na presença de sódio.

### **3.10 Obtenção dos sinaptossomas**

A dissecação do córtex cerebral e do hipocampo era realizada em meio de isolamento (sacarose -  $0,32 \text{ M}$  / EDTA-  $1 \text{ mM}$  / Tris-HCl -  $10 \text{ mM}$  / pH: 7,4). Após, eram homogeneizados com Potter-Elvehjen, em tampão sacarose, na proporção de 1:10 (w/v). Em seguida, o homogenato era centrifugado em rotor de ângulo fixo (SM -24) a  $1000 \times g$ , por 10 min, a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi removido e submetido à centrifugação em rotor de ângulo (SM-24) a  $10.000 \times g$ , por 10 min, a  $4^\circ\text{C}$ . O precipitado formado era suspenso em  $900 \mu\text{l}$  do meio de isolamento e mantido sobre gelo. O gradiente de centrifugação era composto de 1,8 mL de Ficoll/sacarose a 14%, 1,8 mL de Ficoll/sacarose 7,5% e organizado em tubos de 5 mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em rotor SW AH-650, a  $100.000 \times g$ , por 40 min,  $4^\circ\text{C}$  (BOOTH e CLARK, 1978). Duas bandas suspensas formaram-se após a ultracentrifugação, a superior descrita como rica em mielina e a inferior, rica em sinaptossomas. A banda rica em mielina era removida, já a fração rica em sinaptossomas era cuidadosamente pipetada e transferida para tubos onde se adicionava 5 mL de meio de isolamento para remover o ficoll da amostra (CUPELLO et al., 2001). Após, as amostras ricas em sinaptossomas eram centrifugadas em rotor (SM -24) a  $5500 \times g$ , por 10 min,  $4^\circ\text{C}$ . Por fim, o precipitado formado era homogeneizado a um volume final de 1 mL, para a amostra proveniente do córtex e em  $200 \mu\text{L}$  para a do hipocampo. Ambas as amostras foram homogeneizadas no meio de isolamento.

### **3.11 Avaliação da atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo**

Para estimarmos a viabilidade das amostras de sinaptossomas, foi realizada a incubação desses em placas de 96 poços, a 37°C, por 4 horas. Nos poços eram dispostos 60 µL de sinaptossomas, 70 µL do meio de isolamento e 20 µL de MTT (5 mg/mL). O branco era composto de 130 µL do meio de isolamento e 20 µL de MTT. Ao término do período de incubação adicionou-se 150 µL de DMSO nos poços. Após, as placas eram imediatamente lidas a 570 nm. Os valores de absorbância encontrados foram relacionados com a quantidade de proteína encontrada na amostra.

### **3.12 Determinação da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

Para o estudos da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase no córtex cerebral e no hipocampo, os tecidos foram homogeneizados com Potter-Elvehjen em meio de isolamento na proporção de 1:10 (w/v). Em seguida, o homogenato foi centrifugado em rotor de ângulo fixo (SM -24) a 1000 x g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante formado era removido e submetido às sucessivas etapas de centrifugação para a obtenção dos sinaptossomas. Já, o precipitado obtido era suspenso no meio de isolamento na metade do volume inicial de homogeneização. Após, a obtenção das amostras ricas em membranas e dos sinaptossomas, esses eram transferidos para tubos de ensaio contendo 100 µL de meio de incubação. Esse era composto por Tris-HCl 40 mM, NaCl 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, KCl 20 mM, EDTA 1mM, SDS 3mM pH 7,4 adaptado de Pontes et al. (1999) e Forbush (1983). Os tubos eram pré-incubados por 2 min, a 37°C e somente após este período, a reação era iniciada com a adição de 20 µL de ATP a uma concentração final de 30 mM. O período de incubação foi de 10 min em banho metabólico, 37°C. Os controles foram analisados sob condições semelhantes, mas com a adição de 20 µL ouabaína na concentração final de 30 mM para inibir a atividade enzimática. O volume final no interior dos tubos de ensaio foi de 200 µL, o qual era atingido com a adição de um volume variado de água MilliQ (40 µL nos tubos

controle com ouabaína e 60  $\mu\text{L}$  nos tubos sem ouabaína). Ao término do período de incubação adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de TCA 10% para cessar a reação. A atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ /ATPase foi calculada com base na diferença encontrada entre as amostras incubadas com ouabaína em relação as amostras incubadas sem ouabaína (PONTES et al., 1999). O fosfato inorgânico ( $\text{Pi}$ ) oriundo do consumo do ATP pela enzima, foi determinado pelo método descrito por Chan et al., (1986) utilizando-se fosfato de potássio monobásico como padrão. Avaliou-se a quantidade de proteína com base no método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão (1mg/mL). Dessa forma, a atividade específica da enzima foi expressa em nmol de  $\text{Pi}$  por miligrama de proteína por minuto.

Não foi possível realizar os experimentos de atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ /ATPase nos grupos com recuperação devido à morte de algumas matrizes e ocorrência de muitos abortos. Esses eventos prejudicaram a realização destes experimentos no período proposto.

### **3.13 Análise estatística**

A normalidade das amostras foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk e a análise estatística foi realizada com o programa SPSS17. Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para a análise dos resultados referentes à atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi utilizado o teste *t*. Nos demais dados, utilizou-se ANOVA de duas vias para multiplas comparações, com posterior uso do teste de Duncan. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

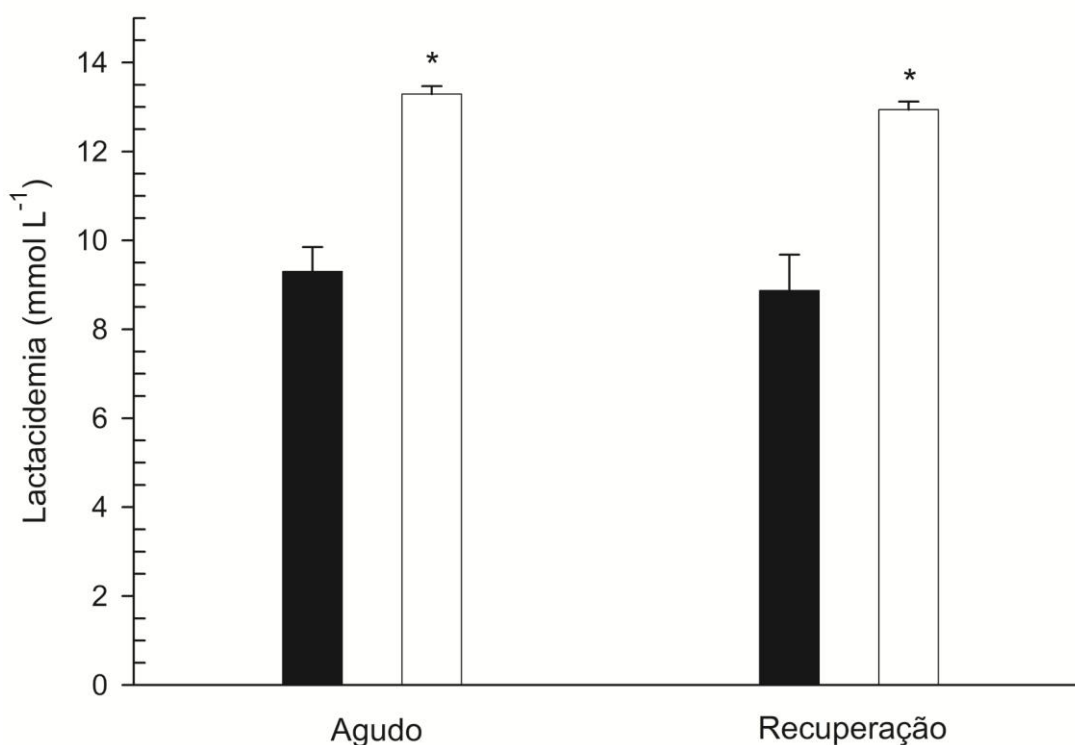


#### 4 RESULTADOS

No presente trabalho, foram analisados os níveis de lactato plasmático e glicemia. A concentração de glicogênio foi determinada no córtex cerebral, hipocampo, fígado e no músculo gastrocnêmio. Os níveis de ATP total foram analisados no córtex cerebral, assim como a captação de glutamato. Para a avaliação da atividade da enzima  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{ATPase}$  foram utilizados o córtex cerebral, o hipocampo e os sinaptossomas dos respectivos tecidos encefálicos. Também, foi realizada avaliação sobre a atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo. Esses parâmetros foram avaliados em filhotes obtidos imediatamente após a histerectomia (agudo) ou após 60 min de recuperação em normóxia (recuperação). No grupo controle agudo, obteve-se 100% de sobrevivência, enquanto que nos animais submetidos à asfixia perinatal foi obtido uma taxa de sobrevivência de 95%. Após a recuperação de 60 min, em normóxia, os valores de mortalidade foram de 2% para os animais controle e de 10% para os animais asfixiados. Imediatamente após a remoção dos filhotes asfixiados, do útero, estes apresentavam pele cianótica, hipotonia, hipocinesia, frequência ventilatória diminuída e laboriosa. Com aproximadamente 30 min de recuperação após a asfixia, os animais demonstraram pele com coloração normal, melhora dos movimentos e da capacidade ventilatória. Porém, desenvolveram um pronunciado aumento no tônus muscular da região dorsal inferior, seguida por extensão dos membros posteriores. Ao término dos 60 min de recuperação os animais tratados apresentavam uma reversão no quadro de hipertonia e movimentação semelhante à observada nos animais controle.

#### 4.1 Lactacidemia

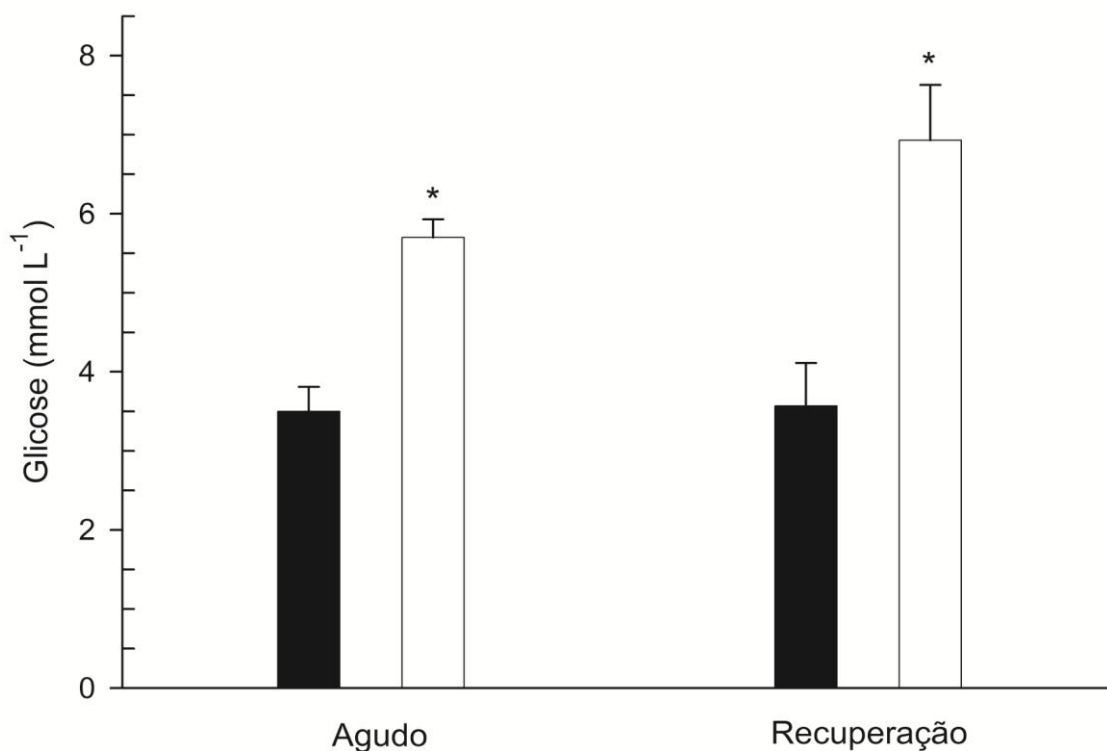
A asfixia perinatal aumentou a lactacidemia em relação ao grupo controle de ambas as condições. Na condição aguda, o nível de lactato plasmático elevou-se significativamente de  $9,30 \pm 0,55 \text{ mmol.L}^{-1}$  para  $13,30 \pm 0,18 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os níveis de lactato permaneceram significativamente elevados após o período de recuperação, tendo aumentado de  $8,87 \pm 0,81$  para  $12,94 \pm 0,18 \text{ mmol.L}^{-1}$  (figura 1).



**Figura 1:** Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis plasmáticos de lactato. A concentração de lactato foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min (condição de recuperação). Controles representados por barras pretas e asfixiados representados por barras brancas. \* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle. Dados representados por média e erro padrão da média,  $n = 7$ .

## 4.2 Glicose plasmática

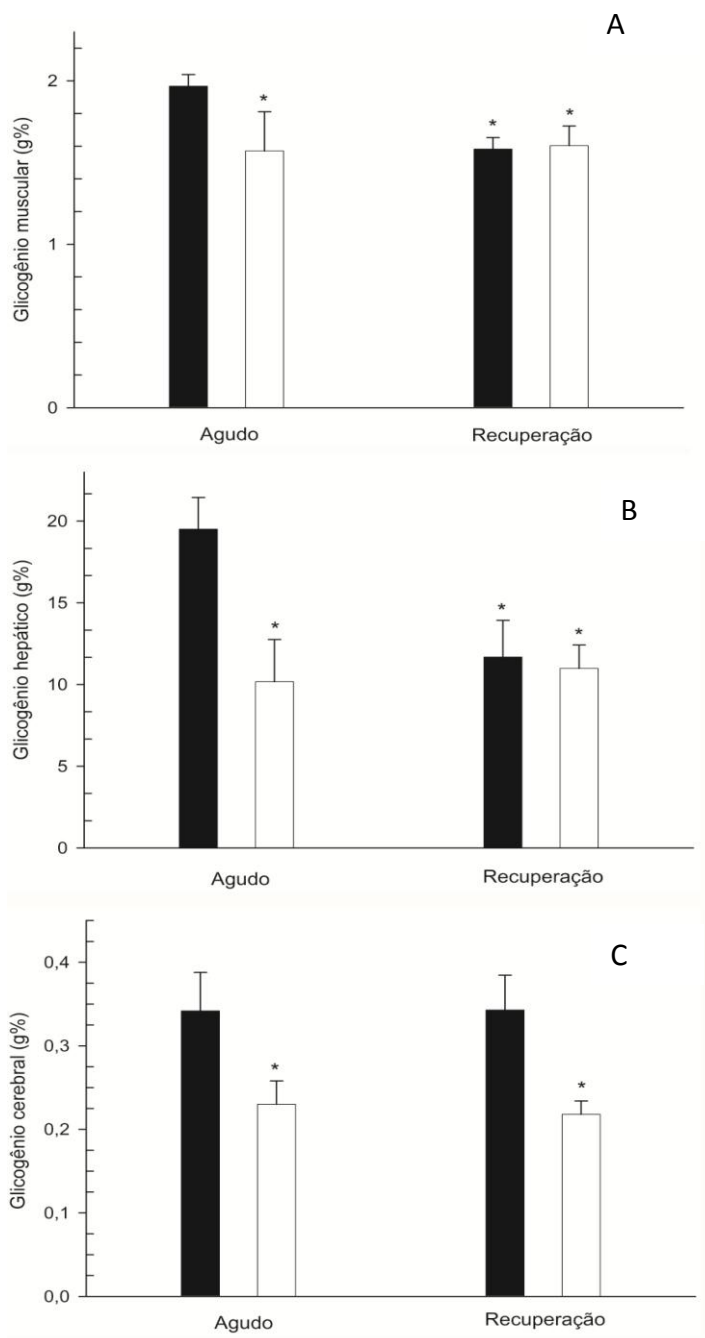
A asfixia perinatal aumentou significativamente a glicemia nas condições aguda e de recuperação em relação aos respectivos grupos controle. Na condição aguda, a glicemia aumentou de  $3,50 \pm 0,31$  para  $5,68 \pm 0,23$   $\text{mmol.L}^{-1}$ , em quanto que na condição de recuperação aumentou de  $3,56 \pm 0,54$  para  $6,94 \pm 0,70$   $\text{mmol.L}^{-1}$  (figura 2).



**Figura 2:** Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis plasmáticos de glicose. A glicemia foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min (condição de recuperação). Controles representados por barras pretas e asfixiados representados por barras brancas. \* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle. \* diferença ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Dados representados por média e erro padrão da média,  $n = 6$ .

### 4.3 Glicogênio muscular, hepático e cerebral

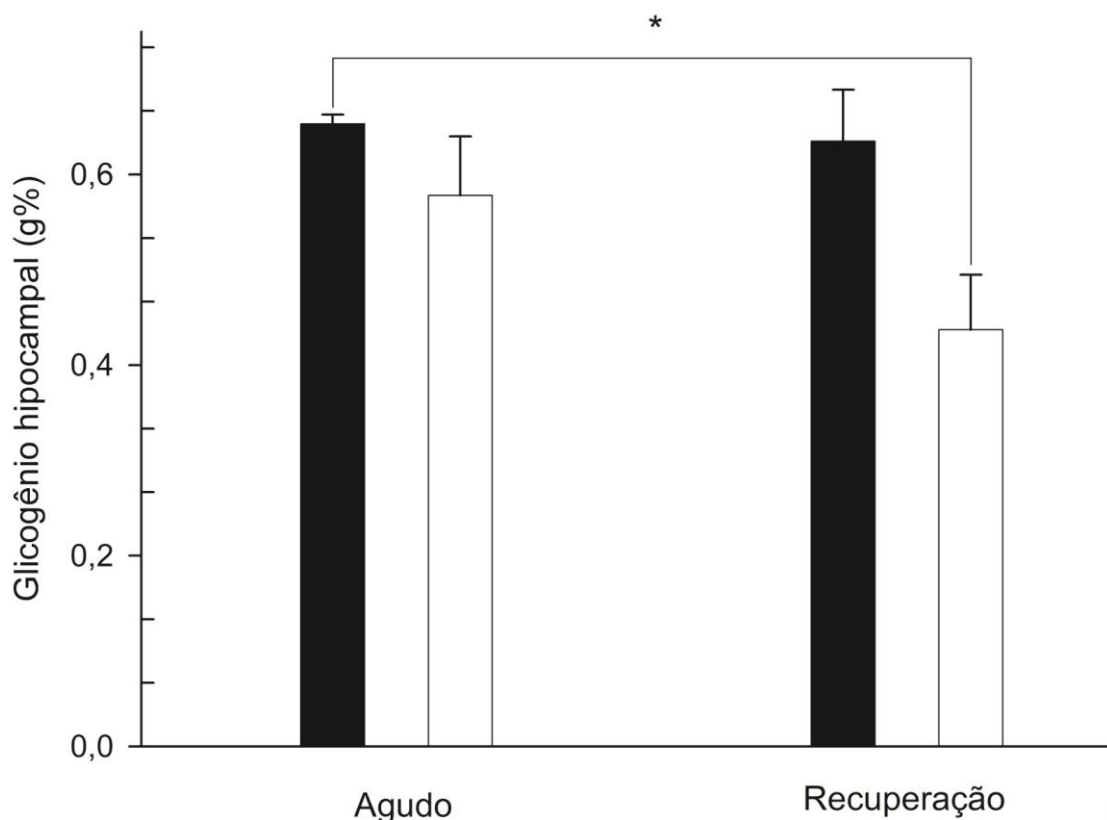
O glicogênio muscular do grupo controle agudo ( $1,96 \pm 0,07$  g%) foi significativamente maior em relação aos demais grupos, asfixiado agudo ( $1,57 \pm 0,24$  g%), controle ( $1,58 \pm 0,07$  g%) e asfixiado ( $1,60 \pm 0,12$  g%) da condição de recuperação (figura 3A). Uma situação semelhante foi observada com o glicogênio hepático, onde os valores do grupo controle agudo ( $19,50 \pm 1,94$  g%) foram significativamente maiores que os valores dos demais grupos, asfixiado agudo ( $10,17 \pm 2,58$  g%), controle ( $11,69 \pm 2,24$  g%) e asfixiado ( $10,98 \pm 1,43$  g%) da condição de recuperação (figura 3B). No córtex cerebral, o efeito da asfixia apresentou um padrão diferente do observado no músculo e no fígado. Após a asfixia perinatal o glicogênio do córtex cerebral sofreu redução significativa na condição aguda ( $0,34 \pm 0,04$  para  $0,23 \pm 0,02$  g%) assim como na condição de recuperação ( $0,34 \pm 0,04$  para  $0,21 \pm 0,01$  g%), figura 3C.



**Figura 3:** Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis de glicogênio no tecido muscular, hepático e no córtex cerebral. O glicogênio foi determinado imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfixiados (barras brancas). O glicogênio foi quantificado no músculo (figura 3A), no fígado (figura 3B) e no córtex cerebral (figura 3C). Na figura 3A e 3B, \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle da condição aguda. Na figura 3C, \* representa diferença significativa em relação aos grupos controle,  $n = 6$ .

#### 4.4 Glicogênio hipocampal

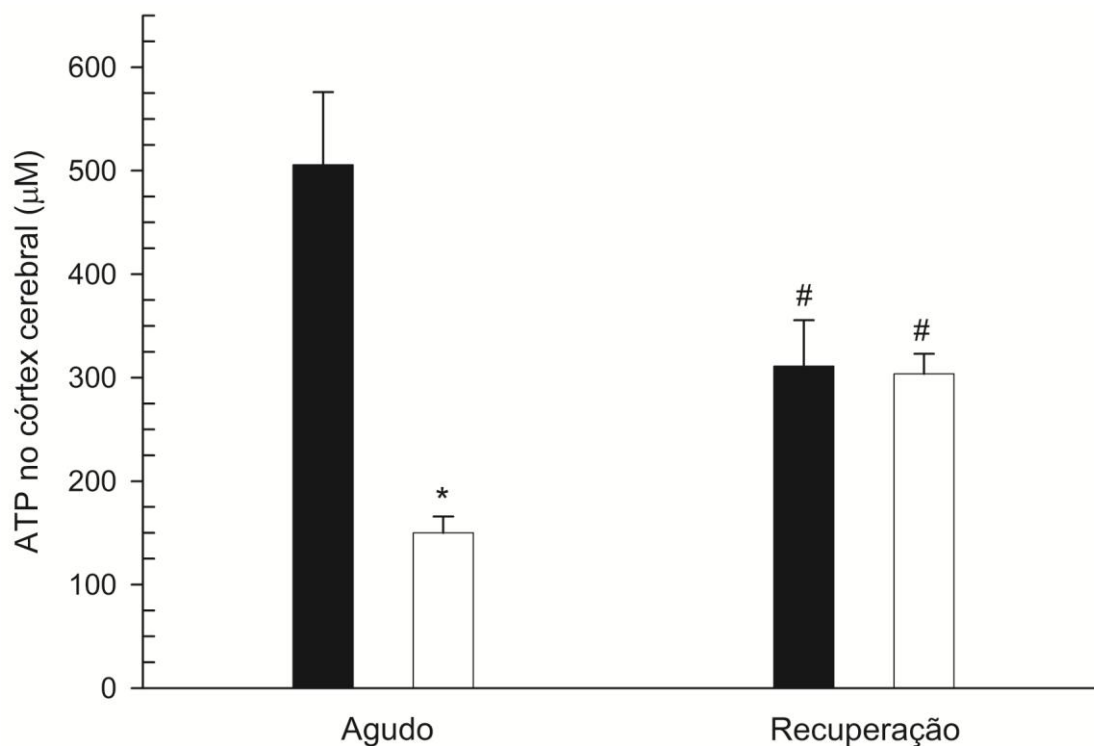
De forma geral, os valores de glicogênio no hipocampo foram mais altos que os quantificados no córtex cerebral. Entretanto, ao contrário do observado no córtex, o efeito da asfixia foi significativo apenas entre o controle agudo ( $0,65 \pm 0,10$  g%) e o asfisiado na condição de recuperação ( $0,43 \pm 0,05$  g%). O grupo asfisiado agudo apresentou um valor de  $0,57 \pm 0,06$  g%, enquanto o grupo controle com recuperação um valor de  $0,63 \pm 0,54$  g% (figura 4).



**Figura 4:** Efeito da asfixia perinatal sobre os níveis de glicogênio hipocampal. O glicogênio foi determinado imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo asfisiado com recuperação e grupo controle da condição aguda. Os dados são representados por média e erro padrão da média,  $n = 4$ .

#### 4.5 ATP no córtex cerebral

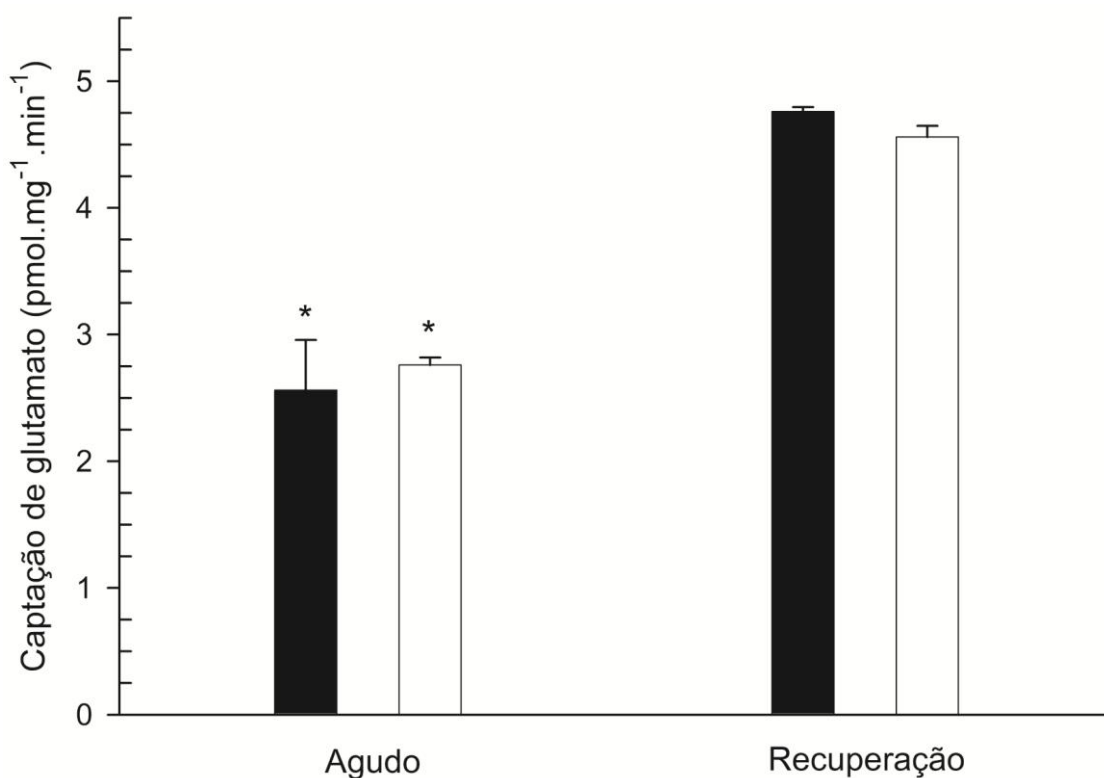
Na determinação do ATP total do córtex cerebral, as avaliações foram realizadas imediatamente após cada experimento para minimizar a hidrólise do mesmo. Na condição aguda, os níveis de ATP obtidos no grupo controle e no grupo asfisiado foram de  $505,6 \pm 70,4$  e  $149,9 \pm 15,8$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. Transcorrido o período de recuperação dos animais, os valores de ATP encontrados não diferiram significativamente entre controle ( $311,2 \pm 44,4$   $\mu\text{M}$ ) e asfisiado ( $303,7 \pm 19,3$   $\mu\text{M}$ ). Entretanto, observamos um aumento significativo na quantidade de ATP do córtex cerebral de asfisiados em recuperação em relação ao grupo asfisiado da condição aguda (figura 5).



**Figura 5:** Efeito da asfisia perinatal sobre os níveis de ATP. O ATP total foi determinado imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os demais grupos, # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle da condição aguda. Os dados são representados por média e erro padrão da média,  $n = 3$ .

#### 4.6 Captação de glutamato

Na condição aguda, a captação de glutamato nos grupos controle e asfisiado foi de  $2,56 \pm 0,40$  e  $2,76 \pm 0,06$   $\text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente. Após o período de recuperação, a captação de glutamato nos grupos controle e asfisiado foi significativamente maior em relação aos grupos da condição aguda. Contudo, não houve diferença significativa entre os valores do controle ( $4,76 \pm 0,03$   $\text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e do asfisiado ( $4,56 \pm 0,09$   $\text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) após o período de recuperação (figura 6).

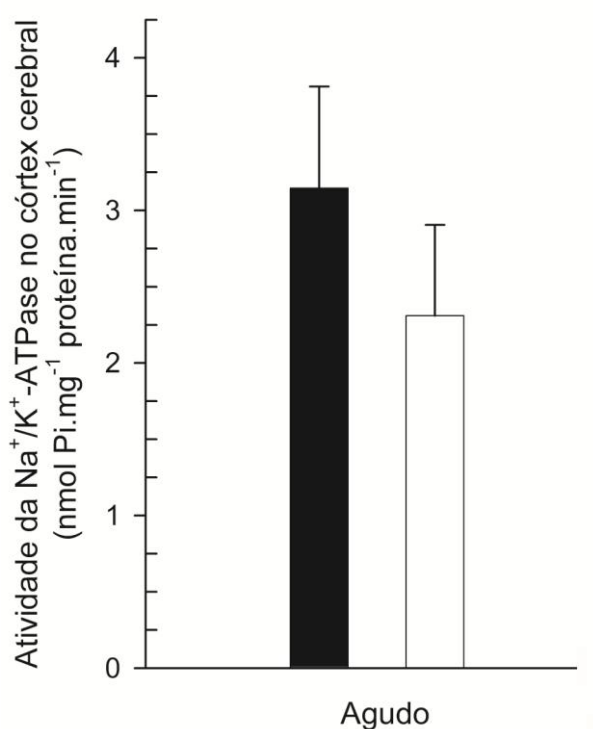


**Figura 6:** Efeito da asfisia perinatal sobre o transporte de glutamato no córtex cerebral. A captação de L-[<sup>3</sup>H] glutamato foi realizada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos agudo e com recuperação. Os dados são representados por média e erro padrão da média,  $n = 3$ .



#### 4.7 Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral

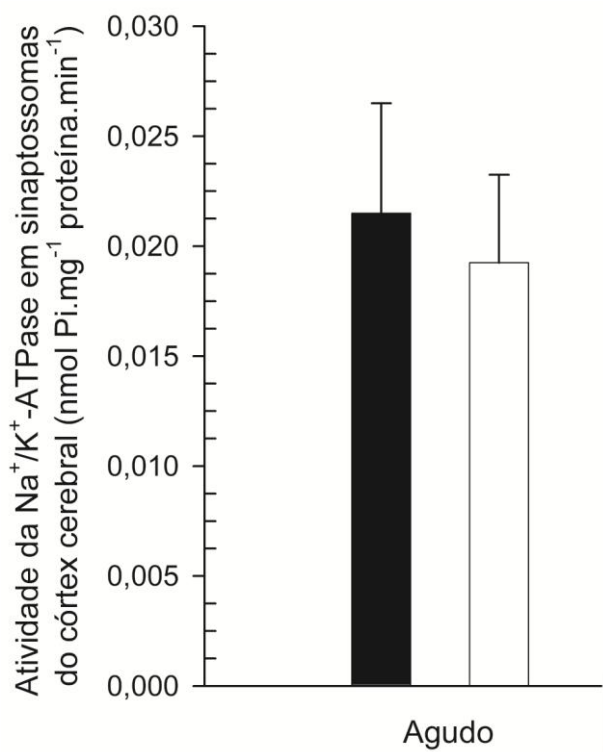
O estudo da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase após a ocorrência de asfixia foi realizado no córtex cerebral total (figura 7) e nos sinaptossomas obtidos deste tecido. Para isso, foram utilizados apenas filhotes obtidos imediatamente após a histerectomia, condição aguda. Estes parâmetros não foram avaliados em animais com recuperação. Os valores referentes à atividade da enzima no córtex cerebral para o grupo controle e asfisiado foram de  $3,1 \pm 0,66$  e  $2,3 \pm 0,59$   $\text{nmolPi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  respectivamente, não havendo diferença significativa entre os grupos.



**Figura 7:** Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral. A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase cortical foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Valores representados por média e erro padrão da média,  $n = 5$ .

#### 4.8 Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em sinaptossomas do córtex cerebral

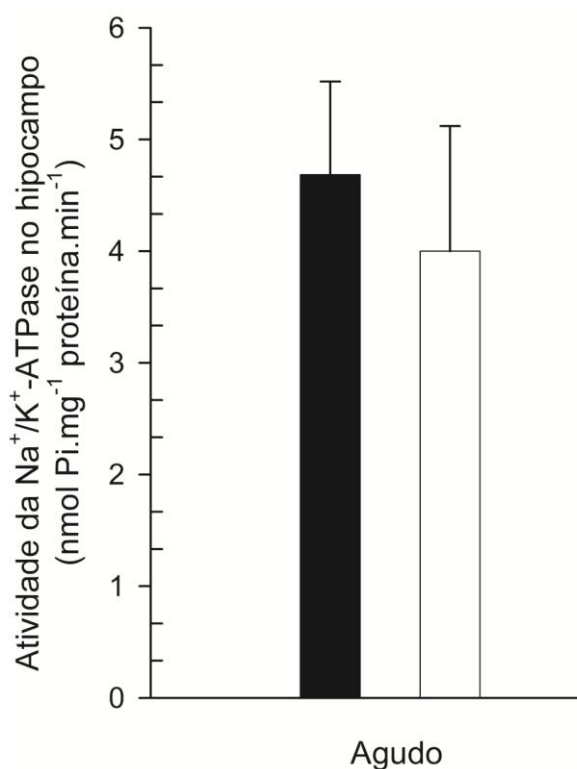
De forma semelhante, não encontramos diferença significativa na atividade da enzima em sinaptossomas do córtex cerebral do grupo controle ( $0,022 \pm 0,005$  nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e do asfisiado ( $0,019 \pm 0,004$  nmolPi.mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), figura 8.



**Figura 8:** Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em sinaptossomas do córtex cerebral. Atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de sinaptossomas corticais foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Valores representados por média e erro padrão da média,  $n = 5$ .

#### 4.9 Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo

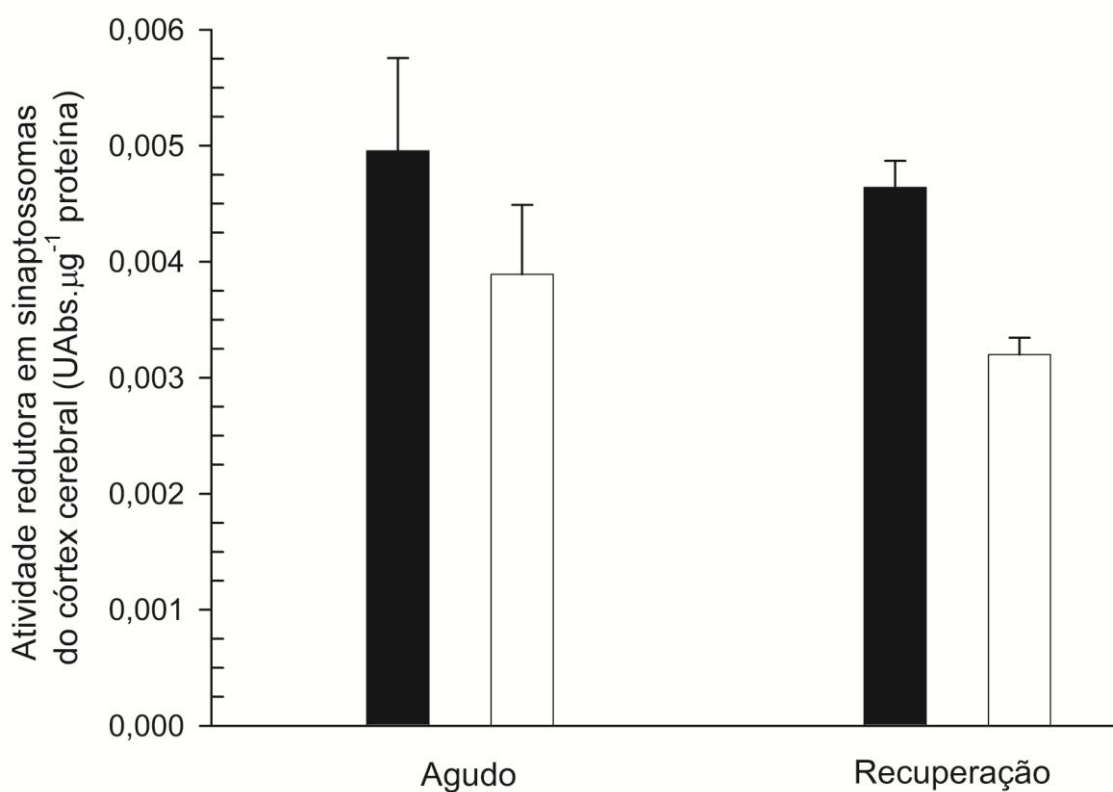
Para avaliar o efeito da asfixia sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo, foram utilizados filhotes obtidos imediatamente após a histerectomia. Os valores do grupo controle ( $4,6 \pm 0,83 \text{ nmolPi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e do asfixiado ( $4,0 \pm 1,1 \text{ nmolPi.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) não foram diferentes significativamente entre si. Devido a dificuldades metodológicas relacionadas com a quantidade de tecido necessário para determinar a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, não foi possível realizar a avaliação da mesma em sinaptossomas de hipocampo (figura 9).



**Figura 9:** Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo. A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hipocampal foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfixiados (barras brancas). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Valores representados por média e erro padrão da média,  $n = 5$ .

#### 4.10 Atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral

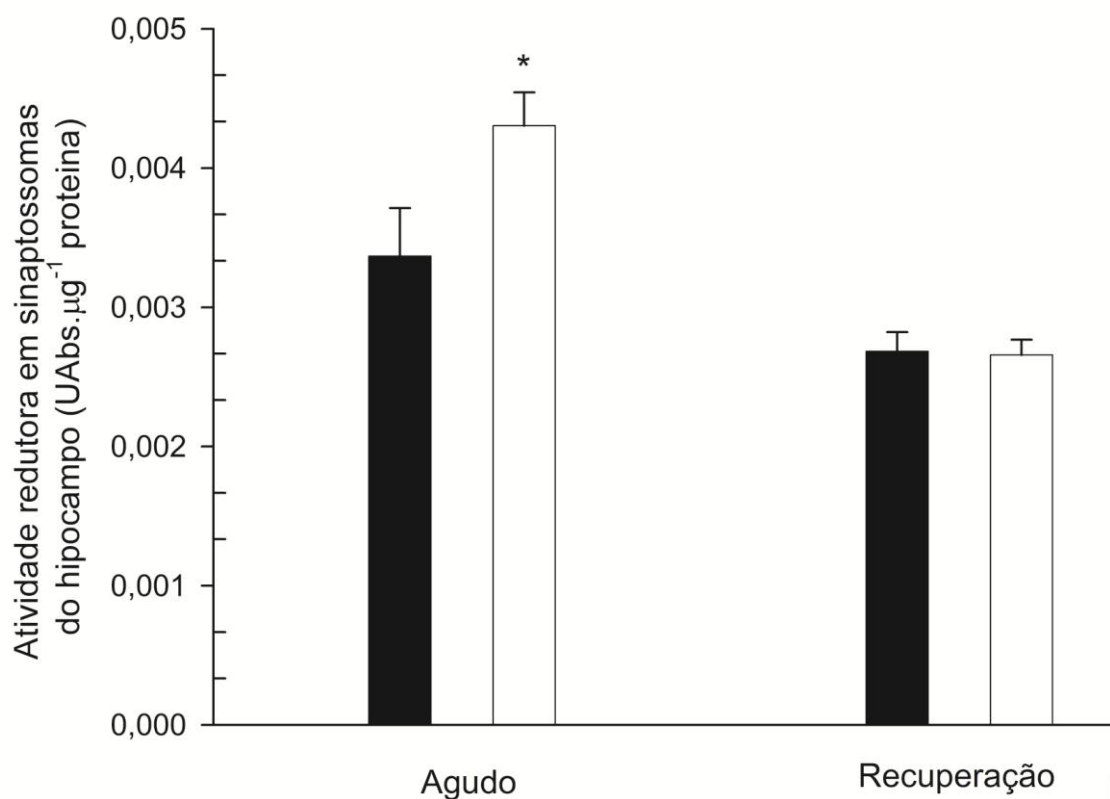
Com o objetivo de identificar atividade biológica nos sinaptossomas, devido ao extenso período necessário para obtê-los, foi realizado um controle de atividade redutora dos mesmos com o uso do MTT. Nos sinaptossomas corticais de animais obtidos imediatamente após a histerectomia o grupo controle apresentou atividade redutora de  $0,0049 \pm 0,0008$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ , enquanto no grupo asfisiado foi de  $0,0039 \pm 0,00006$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ . Ao término da condição de recuperação, os valores de atividade redutora no grupo controle foram de  $0,0046 \pm 0,0023$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ , enquanto no grupo asfisiado foi  $0,0032 \pm 0,0016$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ . No córtex cerebral não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (figura 10).



**Figura 10:** Efeito da asfisia perinatal sobre a atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral. A atividade redutora em sinaptossomas corticais foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfisiados (barras brancas). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Valores representados por média e erro padrão da média,  $n = 3$ .

#### 4.11 Atividade redutora em sinaptossomas do hipocampo

Ao contrário do observado nos sinaptossomas corticais, observamos diferenças significativas entre sinaptossomas hipocampais de animais controle ( $0,0031 \pm 0,0003$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ ) e asfixiado ( $0,0043 \pm 0,0002$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ ), na condição aguda. Após o período de recuperação não houve diferença significativa entre o grupo controle ( $0,0026 \pm 0,0015$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ ) e asfixiado ( $0,0026 \pm 0,0015$  UAbs. $\mu\text{g}^{-1}$ ), figura 11. Entretanto, o reduzido tamanho do hipocampo em animais no 22<sup>o</sup> de gestação acarretou um baixo rendimento na obtenção de sinaptossomas hipocampais e uma insuficiente quantidade de proteína, inviabilizando a avaliação da atividade enzimática nesta estrutura.



**Figura 11:** Efeito da asfixia perinatal sobre a atividade redutora em sinaptossomas do hipocampo. A atividade redutora em sinaptossomas hipocampais foi determinada imediatamente após a histerectomia (condição aguda) ou após 60 min de recuperação (condição de recuperação) em controles (barras pretas) e asfixiados (barras brancas). \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os demais grupos. Os dados são representados por média e erro padrão da média,  $n = 3$ .

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram identificadas alterações significativas na glicemia, na lactacidemia e nas reservas energéticas do córtex cerebral, hipocampo, fígado e músculo esquelético. Não foram identificadas mudanças na capacidade de transporte do glutamato no córtex cerebral, bem como na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase do hipocampo, do córtex cerebral e em sinaptossomas. Todos esses parâmetros foram avaliados em um modelo animal de asfixia perinatal que reproduz eventos de interesse fisiológico e de relevância patológica relacionados com esta condição. O modelo de asfixia intrauterina, em ratos, é utilizado para mimetizar os danos causados pela asfixia no cérebro humano imaturo (BOKSA et al., 1995; BJELKE et al., 1991; CHEN et al., 1997). Esta correlação é estabelecida, pois o padrão de maturação do cérebro de ratos, ao nascer, é comparável ao do cérebro de fetos humanos, no último trimestre de gestação (DOBBING e SANDS 1979).

Imediatamente, após os 15 min de asfixia intrauterina, foi observada a presença de cianose nos filhotes, fato que está diretamente relacionado com a diminuição da oxigenação dos tecidos periféricos e da perfusão sanguínea, indicando a existência de uma alteração na função cardiovascular. Nos trabalhos de Low (2004) e de Jensen e Lang (1992) foi descrito que fetos expostos a um processo de asfixia desenvolveram inicialmente aumento na pressão arterial devido à crescente resistência vascular periférica. Junto a estes eventos, também ocorre uma redistribuição do débito cardíaco com diminuição do fluxo sanguíneo para os pulmões, os rins, o intestino e o músculo esquelético. Um maior direcionamento do fluxo é destinado para o cérebro e o coração com a finalidade de preservar o suprimento de oxigênio para esses órgãos vitais. Essas mudanças, na resposta cardiovascular, mostram-se importantes para manter a integridade do SNC durante um período inicial da asfixia, mas com a progressão da mesma, esse mecanismo torna-se insuficiente para compensar os danos. Outras mudanças foram identificadas nos filhotes obtidos após a asfixia, tais como menor vocalização, hipotonia e hipocinesia. Um aumento no tônus muscular dos membros posteriores e da região lombar foi observado após 30 min de recuperação. Estas alterações também foram descritas por

outros pesquisadores que utilizam um modelo semelhante de asfixia (ENGIDAWORK et al. 2001; FRIZZO et al. 2010; MORALES et al. 2010). Como descrito por Frizzo et al. (2010) observou-se que estas manifestações foram transitórias e que os filhotes asfixiados recuperaram-se gradualmente, assemelhando-se aos controles aproximadamente 30 min após a asfixia; exibindo maior atividade, pele rosada e melhora do padrão ventilatório.

Em condições anormais do útero, tais como redução do fluxo sanguíneo na artéria uterina, é descrita a existência de alterações no desenvolvimento do feto, principalmente no SNC. Foram reportadas mudanças no padrão histológico e eletrofisiológico do tecido cerebral, dano neuronal no cortex parassagital, estriado, áreas do hipocampo e nos núcleos da base. Por esse motivo, muitas doenças neurológicas são correlacionadas com o estresse metabólico intra-uterino (de HAAN et al., 2006, PARER, 1998). Embora a lesão cerebral resultante da asfixia seja multifatorial e dependente da maturidade dos fetos, a resposta do cérebro ao estresse metabólico é determinada, em grande parte, pela sua capacidade de utilizar diferentes substratos como fontes de energia, a fim de manter a homeostase celular no tecido durante a lesão (LUST et al., 2003).

O cérebro perinatal parece ser menos vulnerável à hipóxia e isquemia em relação ao cérebro adulto (PARER, 1998). Um dos motivos pode ser a capacidade do tecido cerebral neonatal utilizar substratos energéticos alternativos para o metabolismo intermediário, estratégia que parece ser perdida com o desenvolvimento ontogenético (LUST et al., 2003). Além disso, é descrita uma baixa atividade metabólica no cérebro perinatal em relação ao tecido cerebral adulto (DUFFY et al., 1975). Logo, o contraste de uma maior atividade metabólica associada com a capacidade de utilizar uma menor variedade de substratos pode agravar o dano celular no cérebro adulto submetido à asfixia (Lust et al. 2003; Parer, 1998). No entanto, durante o desenvolvimento cerebral, muitos processos dependentes de energia estão ocorrendo e podem ser comprometidos por um evento que afete o estado energético. De fato, perturbações na maturação do cérebro e disfunção neurológica podem ocorrer após um episódio de asfixia perinatal (MORALES et al., 2003 ; SCHEEPENS et al., 2003; KLAWITTER et al., 2005; MORALES et al., 2005). Em nosso modelo de asfixia

perinatal foi estudada a utilização de substratos energéticos no córtex cerebral e no hipocampo de filhotes no 22º dia de desenvolvimento intra-uterino. Neste período a capacidade para utilizar diferentes fontes de energia é maior em relação ao cérebro adulto (Lust et al., 2003). A asfixia perinatal implica em uma diminuição da disponibilidade de oxigênio, podendo ser seguida de interrupção do fornecimento do oxigênio para as células causando, assim, alterações metabólicas e ativação de processos moleculares que estão diretamente relacionados com danos a longo prazo em neonatos (WEITZDOERFER et al., 2004).

Durante o nascimento, o feto é exposto a uma combinação de eventos como contrações uterinas aumentadas e compressão do cordão umbilical, que promovem diminuição do fluxo sanguíneo (ALONSO-SPILSBURY et al., 2005). Estes eventos geram adaptações no metabolismo fetal, ocasionando maior consumo de glicose e aumento na concentração de ácido láctico, Hay (1995). Na asfixia perinatal, ocorre redução do metabolismo aeróbico com concomitante aumento da via anaeróbica, resultando em grande diminuição dos níveis de ATP e acúmulo de ácido láctico (CHEN et al., 1997; LUBEC et al., 2000; HAY, 1995; SEIDL et al., 2000). O lactato é produzido como consequência de eventos hipóxicos ou por inadequada perfusão tecidual, sendo por isso um importante parâmetro avaliado na asfixia perinatal. No trabalho realizado por da Silva et al. (2000) foi identificado uma maior lactacidemia em neonatos que possuíam um maior comprometimento neurológico. Em trabalhos prévios, onde foram avaliados os níveis teciduais de lactato foi descrito um aumento significativo deste no tecido cerebral, após a asfixia perinatal (ENGIDAWORK et al., 1997; SEIDL et al., 2000).

Como esperado, os níveis plasmáticos de lactato foram significativamente maiores imediatamente após o período de asfixia, tendo permanecido significativamente elevados mesmo após o período de recuperação. No presente trabalho, os valores de lactato plasmático obtidos no grupo asfisiado, imediatamente após a histerectomia, são semelhantes aqueles descritos por outros investigadores que utilizaram um modelo semelhante de asfixia perinatal (SEIDL et al., 2000; MARX et al., 2001; FRIZZO et al., 2010). Os elevados níveis plasmáticos de lactato encontrados no grupo asfisiado com recuperação sugerem que o período de recuperação de 60 min não foi suficiente para a metabolização deste produto final ou, ainda, que a via



glicolítica anaeróbia não foi inibida com a reoxigenação. No futuro, a determinação da atividade da enzima piruvato cinase (PK) nos tecidos será esclarecedora. Essa condição torna-se mais evidente quando é estabelecida uma comparação com os resultados obtidos por Souza (2011) sobre a lactacidemia em filhotes de ratos Wistar, paridos naturalmente. Os filhotes possuíam elevados níveis de lactato imediatamente após a parturição, semelhante aos controles obtidos por cesariana, porém após 60 min de recuperação em normóxia apresentaram redução significativa na lactacidemia. Foi descrito por Herrera-Marchitz (2011) que a reoxigenação após a ocorrência de asfixia perinatal poderia conduzir a uma recuperação parcial devido ao aumento da expressão de vias metabólicas alternativas, as quais prolongariam o déficit energético e favoreceriam o estresse oxidativo.

A manutenção dos elevados níveis de lactato após o período de recuperação em normóxia requer uma investigação mais detalhada, pois ele é considerado um importante substrato energético, podendo ser utilizado pelas células musculares esqueléticas e cardíacas, pelos hepatócitos e pelos neurônios (PHILP et al., 2005). O lactato é transferido para as células via proteínas transportadoras de monocarboxilatos (MCT), as quais possuem isoformas específicas para os diferentes tecidos. Evidências *in vitro*, segundo Magistretti e Pellerin (1999) reforçam a hipótese do uso de lactato como fonte energética pelos neurônios tais como, a presença transportadores MCT-1 em astrócitos, MCT-2 em neurônios e de isoformas da enzima lactato desidrogenase em populações de astrócitos. Além disso, o lactato é considerado um importante precursor gliconeogênico e um importante coordenador do fluxo sanguíneo cerebral através de uma ação vasodilatadora (BERGERSEN e GJEDDE, 2012; GORDON et al., 2008; PHILP et al., 2005).

A glicose é uma fonte energética importante para a maioria dos tecidos, assim como para o encéfalo em desenvolvimento, o qual direciona a maior parte da glicose captada para o metabolismo oxidativo (BASU et al. 2009; HAY, 1995; PALMER et al. 1990). Em um estudo recente sobre os níveis plasmáticos de glicose após a asfixia perinatal em humanos, foi identificada uma forte correlação entre o aumento de danos encefálicos e o nível de hipoglicemia. A combinação de hipóxia e de isquemia, decorrentes do processo de asfixia, juntamente com o desenvolvimento de

hipoglicemia favorece a falência de todos os mecanismos compensatórios do cérebro neonatal (BASU et al. 2009). Segundo Basu et al. (2009), o fornecimento de oxigênio e de glicose são necessários para reverter os danos iniciais desencadeados pela asfixia.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a glicemia, imediatamente após a asfixia aumentou 62% e permaneceu nestes níveis elevados, mesmo após 60 min de recuperação. No trabalho realizado por Marx et al. (2001), também é descrito um aumento significativo na glicemia de ratos imediatamente após a asfixia perinatal. Alguns fatores podem contribuir para o aumento da glicemia nos animais asfixiados, tais como maior mobilização de glicogênio hepático e a reduzida capacidade de transporte da glicose do sangue para o córtex cerebral neonatal. No entanto, em modelos que utilizam ratos para estudar os eventos hipóxicos-isquêmicos a função de elevados níveis de glicose plasmática não são conclusivos. Foi descrito por Hattari e Wasterlain (1990) que o aumento da glicemia, após a oclusão bilateral das carótidas, estaria associado com uma redução do dano cerebral. Porém, no trabalho de Sheldon et al. (1992) foi descrito um aumento da glicemia e do dano cerebral após oclusão das carótidas.

O cérebro de ratos recém-nascidos, ao contrário de neonatos humanos, possui menor capacidade para o transporte da glicose e maior facilidade para transportar  $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato e lactato. Fato reforçado pela elevada concentração de transportadores para monocarboxilatos na barreira hematoencefálica (PARK et al., 2001; VANNUCCI e HAGBERG, 2004). O transporte da glicose, através da barreira hematoencefálica, é realizado por transportador específico (GLUT-1), o qual também é expresso em todas as células da glia e nas células endoteliais. Já nos neurônios, o transportador de glicose expresso é o GLUT-3 (VANNUCCI et al., 1997). No período fetal existe menor quantidade de GLUTs no tecido encefálico de ratos, ocorrendo aumento da expressão e concentração desses transportadores com a maturação tecidual (VANNUCCI e HAGBERG, 2004).

O número reduzido de transportadores de glicose na barreira hematoencefálica neonatal impõe uma limitação significativa na utilização de glicose pelo cérebro durante a injúria porém, os níveis de glicose no cérebro aumentam significativamente

após um dano hipóxico-isquêmico (VANNUCCI e HAGBERG, 2004). Logo, a manutenção de elevados níveis de glicose plasmática pode contribuir para a recuperação do estado energético dos animais que sofreram asfixia perinatal. Porém, utilizar os elevados níveis glicêmicos de animais asfixiados para estabelecer uma correlação com danos neurológicos, como realizado por Basu et al. (2009) em neonatos humanos, tornar-se pouco plausível.

Imediatamente após o nascimento, o recém-nascido depende das reservas de glicogênio tecidual para fornecer glicose, apesar do lactato também poder ser metabolizado durante este período (HELLMANN et al. 1982; MEDINA, 1985). Assim, o aumento dos níveis de glicose plasmática justifica a redução do glicogênio hepático do grupo controle com 60 min de recuperação em normóxia. A diminuição de 48% no glicogênio hepático, imediatamente após a asfixia, poderia explicar a elevada glicemia após a asfixia perinatal, assim como a manutenção da elevada glicemia após o período de recuperação de 60 min. A redução de 20% no glicogênio muscular, imediatamente após a asfixia, pode ser atribuída ao consumo deste substrato em decorrência do mecanismo de adaptação do sistema cardiovascular que eleva a resistência periférica e diminuiu o fluxo sanguíneo para os músculos, obrigando o tecido a consumir suas reservas de glicogênio mesmo sem existir elevada atividade motora. A diminuição do nível de glicogênio no grupo controle com recuperação, em relação ao grupo controle agudo, provavelmente possa ser atribuída a maior atividade motora dos filhotes durante os 60 min. O aumento da glicemia, após a asfixia perinatal, provavelmente, tenha colaborado para estabilizar o nível de glicogênio muscular do grupo asfixiado com recuperação, em relação ao grupo controle com recuperação. É importante ressaltar que, durante o período de recuperação, o grupo controle exibiu maior atividade motora em relação ao grupo asfixiado e somente após 30 min de recuperação, os filhotes asfixiados apresentaram uma maior atividade. A diferença temporal no padrão motor pode explicar os baixos níveis glicêmicos do controle após recuperação, apesar da redução nas reservas de glicogênio hepático.

Ao contrário do observado no fígado e no músculo, no córtex cerebral não houve diminuição do nível de glicogênio no grupo controle com recuperação. O glicogênio está associado à atividade de transportadores iônicos como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPase e na captação de glutamato (SWANSON, 1992; SCHOUSBOE et al., 2010). Em situações de grande atividade elétrica na célula ou de redução dos níveis de ATP, o glicogênio é convertido à glicose 1-fosfato e desviado para a via glicolítica, onde o ATP é gerado e, sendo ele formado pela degradação do glicogênio, contribui diretamente para manter a captação e o transporte de glutamato nos astrócitos do córtex cerebral (SCHOUSBOE et al. 2010). Logo, a manutenção dessas atividades no tecido cerebral em desenvolvimento torna-se importante para garantir uma adequada excitabilidade tecidual, assim como para evitar danos neurais relacionados à toxicidade do glutamato (SCHOUSBOE et al., 2010). Sendo assim, a redução do glicogênio cortical nos grupos asfixiados pode ter contribuído para a manutenção do transporte de glutamato no córtex cerebral desses grupos, mesmo após redução significativa nos níveis de ATP total do córtex cerebral de animais obtidos imediatamente após a asfixia e de asfixiados após o período de recuperação.

Foi descrito por Shu et al. (2007) que ratos Sprague-Dawley machos, tratados com o inibidor da glicogênio fosforilase (CP-316,819) apresentaram aumento de 88% no glicogênio do córtex cerebral, em condições normoglicêmicas. Porém, quando induzida a hipoglicemia nesses animais, a atividade elétrica do cérebro foi mantida por aproximadamente 90 min a mais em relação aos ratos com níveis normais de glicogênio. Além disso, foi identificada uma redução significativa na morte dos neurônios corticais. O papel do glicogênio no córtex cerebral, especialmente sob condições de asfixia, requer um estudo mais detalhado, uma vez que o conceito do glicogênio ser apenas um substrato de reserva, mostra-se contrário aos dados publicados por SUH et al. (2007) e por DiNuzzo et al. (2011).

Evidências experimentais confirmam a vulnerabilidade do hipocampo à asfixia perinatal tais como, morte neural tardia nas áreas CA1, CA3 e no girodentado (MORALES et al., 2008). Foi descrito por Saraceno et al. (2012) que a asfixia perinatal estaria relacionada com modificações nas espinhas dendríticas pós-sinápticas da área CA1 em ratos, após quatro meses. Dados referentes à captação de glutamato no hipocampo, em animais submetidos à asfixia perinatal, indicam haver redução significativa desta atividade (FRIZZO et al., 2010). Porém, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de glicogênio do hipocampo em animais obtidos imediatamente

após a histerectomia ou após 60 min de recuperação. Um dado que despertou atenção, foi a elevada quantidade de glicogênio encontrada no hipocampo em relação ao córtex cerebral dos animais. No hipocampo é descrita uma grande quantidade de sinapses glutamatérgicas (MORALES et al., 2011) e, segundo DiNuzzo et al. (2011), haveria uma relação com os elevados níveis de glicogênio encontrados nas células. Embora tenha sido encontrada uma grande quantidade de glicogênio nas células do hipocampo, não foi identificada diferença significativa na quantidade de glicogênio após a asfixia perinatal. Assim, é provável que a atribuição descrita para o glicogênio de astrócitos do córtex, de fornecer ATP para manter o transporte elétrico e a captação de glutamato, seja distinta das existentes nas células hipocampais.

Em um estudo anterior foi relatada uma diminuição significativa (60%) nos níveis de ATP após 20 min de asfixia perinatal, com retorno aos valores normais após 30 min de reperfusão (KUNIEVSKY et al., 1994). No trabalho de Brand et al. (1998) o metabolismo energético do cérebro foi estudado após 15 min de asfixia. Porém, os níveis de ATP foram reduzidos em 90%, imediatamente após a asfixia, com recuperação de 80% do valor, em relação ao controle, após 45 min de reperfusão.

No presente trabalho, ao ser avaliada a quantidade de ATP total no córtex cerebral de filhotes obtidos, imediatamente após a histerectomia, foi identificada redução significativa nos níveis de ATP (70%). O rápido consumo desse substrato energético no tecido cerebral, após 15 min de asfixia, também foi observado por outros investigadores (SEIDL et al., 2000). A redução dos níveis de ATP no cérebro, após a asfixia, foi relacionada com o fornecimento de energia para manter a atividade elétrica do tecido e pela menor contribuição do metabolismo aeróbico para geração do ATP (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2011). Porém, os resultados obtidos por Kunievsky et al. (1994) e Brand et al. (1998), bem como os deste trabalho, indicam que os níveis de ATP no córtex cerebral de animais do grupo asfixiado com recuperação foram semelhantes aos obtidos no grupo controle com recuperação. No córtex cerebral de filhotes imaturos, o período de recuperação após hipóxia e isquemia é caracterizado por um restabelecimento parcial dos valores de ATP e de fosfocreatina (GILLAND et al., 1998). Por isso, um aumento significativo dos níveis de ATP foi identificado no tecido cortical, obtido de animais asfixiados com recuperação, em relação ao grupo asfixiado

da condição aguda. Nos grupos controle, imediatamente após histerectomia ou ao término de 60 min de recuperação, observou-se uma redução significativa no nível de ATP (38%). Esse decréscimo pode ser atribuído à intensa atividade dos neonatos controles durante o período de recuperação.

Recentemente, em um modelo de hipóxico-isquêmico, foi demonstrado que a concentração de ATP aumenta significativamente após a reperfusão cerebral e que este evento seria uma estratégia protetora (Almeida et al. 2012). A identificação do substrato utilizado como fonte para reestabelecer os níveis de ATP torna-se importante, uma vez que o lactato plasmático, a glicose e o glicogênio do córtex parecem não ter sido utilizados neste processo. Uma possível fonte de energia poderia ser o metabolismo oxidativo do aminoácido glutamato, o qual possui elevados níveis extracelulares após a asfixia perinatal (KHASHABA et al., 2006; PAPAZISIS et al., 2008). Uma vez captado pelos astrócitos, o glutamato pode ser convertido à glutamina e posteriormente ser transferido aos neurônios, ou direcionado para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) contribuindo para a formação de  $\alpha$ -cetogluturato, tornando-se um substrato alternativo para o metabolismo energético dos astrócitos (YU et al., 1982; DANBOLT, 2001; SCHOUSBOE et al., 2011; SWANSON et al., 1990). Dessa forma, foi sugerido que um maior direcionamento de glutamato para ciclo do TCA poderia proporcionar um aumento dos níveis de ATP (LOWRY e PASSONNEAU, 1966).

Devido às consequências deletérias atribuídas ao excesso de glutamato extracelular, após um evento hipóxico-isquêmico, foi avaliado o efeito da asfixia perinatal sobre a captação de glutamato no córtex cerebral. O processo de captação do glutamato é dependente do gradiente eletroquímico de sódio e de potássio, o qual é utilizado como força eletromotriz, gerado principalmente pela atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (DANBOLT, 2001). Sendo assim, a atividade de captação do glutamato é indiretamente dependente do ATP disponível na célula. Porém, apesar da diminuição significativa no nível de ATP, a captação de glutamato não foi afetada no tecido cortical após a asfixia perinatal. Este resultado mostra-se oposto ao encontrado no hipocampo de animais asfixiados, onde o transporte de glutamato foi significativamente afetado pela asfixia intrauterina (FRIZZO et al., 2010). Os resultados obtidos no córtex cerebral sugerem que, mesmo após uma grande redução dos níveis de ATP, o processo de

transporte sódio-dependente do glutamato foi mantido. Apesar de o resultado sugerir que há ATP suficiente no córtex cerebral para manter este processo de transporte, a origem do substrato energético utilizado para manter estes níveis permanece obscura.

Além disso, é possível que a oxidação de corpos cetônicos, os quais poderiam ser utilizados para produzir ATP em filhotes asfixiados durante o período de recuperação, esteja envolvida na manutenção do transporte de glutamato. Foi descrito que em animais submetidos a 15 min de asfixia perinatal, houve um aumento significativo nos níveis de  $\beta$ -hidroxibutirato após 10 min de recuperação (Marx et al. 2001). Para reforçar essa hipótese, em ratos com isquemia global, a infusão intravenosa de  $\beta$ -hidroxibutirato reduziu o edema e promoveu aumento dos níveis de ATP no tecido cerebral (Suzuki et al. 2002).

Danos ao tecido cerebral, após a ocorrência de eventos como a asfixia perinatal, estão relacionados com alterações na homeostase iônica (HERRERA-MARSCHITS et al., 2011). Em estudos sobre hipóxia e isquemia, no tecido cerebral, são descritos que muitos mecanismos de transporte celular podem ser alterados, bem como a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (BALESTRINO et al., 1998; BARI et al., 2002). Essa enzima é responsável por consumir aproximadamente 40% do ATP gerado no tecido cerebral e sua atividade mantém a excitabilidade neural e o volume celular (BARI et al., 2002). Muitos estudos indicam que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase está relacionada com transporte de glutamato no córtex cerebral, porém esta ligação foi confirmada no trabalho realizado por Rose et al. (2009), ao utilizar técnicas como a coimunoprecipitação, captação de  $[^3\text{H}]$  L-glutamato,  $[^3\text{H}]$  D-aspartato e rubídio-86 em sinaptossomas do córtex cerebral e do cerebelo de ratos adultos. Nesses sinaptossomas a ouabaína reduziu de forma dose-dependente a captação de glutamato e a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Em cultura primária de astrócitos do córtex cerebral, obtidos de ratos com dois dias de vida, é descrito que a ouabaína reduziu a captação de glutamato e de D-aspartato, quando utilizadas na concentração de milimolar (ROSE et al., 2009). Uma diferença significativa na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, foi encontrada em sinaptossomas obtidos do córtex cerebral de ratos com sete dias de vida, submetidos à hipóxia e à isquemia (PIMENTEL et al., 2013). Porém, não foi identificada diferença significativa na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex

cerebral, nos sinaptossomas do córtex cerebral e no hipocampo de filhotes, imediatamente após asfixia perinatal.

No trabalho realizado por Matsuda et al. (1989) tanto a expressão quanto a concentração das diferentes isoformas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cérebral de ratos, aumentaram com a idade. Durante o período fetal, predominou a isoforma  $\alpha$ -1 no cérebro em relação as isoformas  $\alpha$ -2 e  $\alpha$ -3, porém, com o desenvolvimento do feto, aumentou a concentração da isoforma  $\alpha$ -2. Esses dados estão de acordo com os resultados descritos sobre a inibição da ouabaína durante o desenvolvimento cerebral de ratos, os quais indicam que a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi pouco sensível no 14º dia fetal, moderadamente sensível no 18º e muito sensível após o nascimento (MATSUDA et al., 1984). Mas, foi descrito que a inibição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral imaturo pode ser obtida, após o uso de ouabaína na concentração milimolar (ATTERWILL et al., 1987; MATSUDA et al., 1984). O fato de não haver diferença na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no córtex cerebral e nos sinaptossomas obtidos deste tecido, imediatamente após a asfixia perinatal, provavelmente esteja relacionado com a manutenção do transporte de glutamato no córtex cerebral no mesmo período.

Matsuda et al. (1989) relata que a expressão e a concentração das diferentes isoformas da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase também varia de acordo com a região do encéfalo. Entretanto, a relação entre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e o transporte de glutamato foi estabelecida apenas para o córtex cerebral. São necessários estudos adicionais para compreender se esta relação também estaria presente no hipocampo. Desta forma, o comprometimento do transporte de glutamato após um episódio de asfixia descrito por Frizzo et al. (2010) não pode ser relacionado a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, já que nossos resultados demonstram que os mesmos permanecem inalterados no córtex cerebral imediatamente após a asfixia.

Com o intuito de obter amostras de sinaptossomas para realizar estudos sobre a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o MTT foi utilizado como um marcador de viabilidade dos sinaptossomas obtidos. A conversão do MTT à formazan está associada com processos de redução existentes na membrana das mitocôndrias.



Porém, é descrito haver também atividade redutora em outros componentes celulares, tais como nas membranas de endossomos, lisossomos e na membrana plasmática (BERRIDGE et al. 2005). Os resultados obtidos sobre a redução do MTT em sinaptossomas do córtex cerebral e do hipocampo indicam que, mesmo após o longo tempo necessário para obtê-los, as membranas ainda possuem capacidade redutora. Logo, é possível afirmar que determinadas características biológicas das membranas estão preservadas. Dessa forma, o uso dos sinaptossomas para estudar a atividade enzimática  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase não se torna inadequado, devido a limitações no método para a obtenção dos mesmos. O processo utilizado para a obtenção de frações específicas de membrana é capaz de gerar sinaptossomas metabolicamente ativos, nos quais foram identificadas respiração celular e atividade da enzima lactato desidrogenase (BOOTH e CLARK, 1978).

A asfixia perinata, imediatamente após a histerectomia ou após 60 min de recuperação, não alterou a atividade redutora em sinaptossomas do córtex cerebral. Porém, houve um aumento significativo na atividade redutora de sinaptossomas hipocampais de animais obtidos imediatamente após a histerectomia.

Esse resultado pode estar associado com alterações nas reações de oxirredução, sendo necessários estudos complementares para identificar as prováveis enzimas e coenzimas que estariam alteradas. Esta diferença na atividade redutora de sinaptossomas hipocampais e corticais reforçaria o comportamento distinto destas estruturas cerebrais frente ao dano isquêmico.

## **6 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados experimentais é possível afirmar que o córtex cerebral possui habilidade em utilizar diferentes recursos energéticos, tais como o glicogênio e o ATP. Esta característica pode fornecer estratégias metabólicas para manter a homeostase cerebral sob condições de asfixia. Logo, afirmar que o córtex cerebral de neonatos utiliza diferentes recursos como uma estratégia para resistir ao processo asfixia, parece ser adequado.

Porém, não foi possível identificar uma relação entre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase com os danos gerados pela asfixia perinatal no córtex cerebral e no

hipocampo, imediatamente após a histerectomia. Por esta razão, estudos adicionais são essenciais para compreender os mecanismos envolvidos na resposta do córtex cerebral e do hipocampo, em neonatos, durante o período de recuperação após a asfixia.

O presente trabalho sugere que o córtex cerebral possui uma grande capacidade para utilizar diferentes recursos energéticos. Esta situação parece não ocorrer no hipocampo, pois não houve redução significativa na concentração de glicogênio após a asfixia. Esse dado reforça as diferenças existentes entre o córtex cerebral e o hipocampo, principalmente nas respostas a asfixia perinatal.

Os resultados não permitem estabelecer uma relação conclusiva entre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e as alterações metabólicas decorrentes da asfixia perinatal. Desta forma, deverão ser realizados estudos futuros que permitam a determinação dos valores de ATP, da atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, além da utilização de corpos cetônicos nestas diferentes estruturas cerebrais. Adicionalmente, a avaliação da atividade da enzima piruvato cinase, no córtex cerebral e no hipocampo, também poderia contribuir para o entendimento das adaptações metabólicas decorrentes da asfixia perinatal.

## REFERÊNCIAS

ALONSO-SPILSBURY, M. ; MOTA-ROJAS, D. ; VILLANUEVA-GARCÍA, D. ; MARTÍNEZ-BURNES, J. ; OROZCO, H. ; RAMÍREZ-NECOECHEA, R. ; MAYAGOITIA, A. L. ; TRUJILLO, M. E. Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. *Animal Reproduction Science*. v.90, p. 1-30, 2005.

ANDERSON, C. M. ; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*. v.32, p. 1-14, 2000.

ATTERWILL, C. K. ; and COLLINS, P. Studies of the ontogenesis of the different isoenzymes of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in rat brain *in vivo* and *in vitro* in relation to their regulation and cellular localization. *Biochemical Pharmacology*. v.36, n.16, p. 2679-2683, 1987.

BALDUINI, W. ; DE ANGELIS, V. ; MAZZONI, E. ; CIMINO, M. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research*. v.859, p. 318-325, 2000.

BARI, F. ; LAZICS, K. ; DOMOKI, F. ; AGÁRDI, S. ; PELIKÁN, S. ; VÁSÁRHELYI, B. ; TEMESVÁRI, P. Unaltered cerebral Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after hypoxic/ischemic injury in piglets. *Neuroscience Letters*, v.329, p.189-192, 2002.

BASU, P. ; SOM, S. ; CHOUDHURI, N. ; DAS, H. Contribution of the blood glucose level in perinatal asphyxia. *European Journal of Pediatrics*. v.168, n.7, p. 833-838, 2009.

BENNET, L. ; PEEBLES, D. M. ; EDWARDS, A. D. ; RIOS, A. ; HANSON, M. A. The cerebral hemodynamic response to asphyxia and hypoxia in the near-term fetal sheep as measured by near infrared spectroscopy. *Pediatric Research*. v.44, p. 951-957, 1998.

BERRIDGE, M. V. ; HERST, P. M. ; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. v. 11, p. 127-152, 2005.

BJELKE, B. ; ANDERSSON, K. ; ÖGREN, S. ; BOLME, P. Asphyctic lesion: Proliferation of tyrosine hydroxylase immunoreactivity nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Research*. v. 543, n. 1, p. 1-9, 1991.

BOKSA, P. ; KRISHNAMURTHY, A. ; BROOKS, W. Effects of a period of asphyxia during birth on spatial learning in the rat. *Pediatric Research*. v.37, n. 4, p. 489-496, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRINES, L. M. ; DARE, A. O. ; de LANEROLLE, N. C. The cardiac glycoside ouabain potentiates excitotoxic injury of adult neurons in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*. v.191, p. 145-148, 1995.

BOOTH, R. F. G. and CLARK, J. B. A rapid method for the preparation of relatively pure metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochemistry Journal*. v.176, p. 365-370, 1978.

BORRUTO, F. ; COMPARETTO, C. ; WEGHER, E. ; TREISSER, A. Screening of fetal distress by assessment of umbilical cord lactate. *Clinical Experimental Obstetrics Gynecology*. v. 33, n. 4, p. 219-222, 2006.

CHAN, K. M; DELFERT, D and JUNGER, K. T. A direct colorimetric assay for  $Ca^{2+}$ -stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. v.157, p.375-380, 1986.

CHEN, Y. ; ENGIDAWORK, E. ; LOIDL, F. ; DELL'ANNA, E. ; GOINY, M. ; LUBEC, G. ; ANDERSSON, K. ; HERRERA-MARSCHITZ, M. Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat. *Developmental Brain Research*. v.104, p. 19-30, 1997.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology*. v.23, p. 1261-1276, 1992.

CUPELLO, A. ; SEITUN, A. ; SCARRONE, S. Subfractionation of ficoll gradient purified synaptosomes: GABA uptake by the subfractions. *International Journal of Neuroscience*. v.109, p.11-21, 2001.

Da SILVA, S. ; HENNEBERT, N. ; DENIS, R. ; WAYENBERG, J.L. Clinical value of a single postnatal lactate measurement after intrapartum asphyxia. *Acta Paediatrica*. v.89, p.320-323, 2000.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. v.65, n. 1, p. 1-105, 2001.

de HAAN, E. H. ; NYS, G. M. ; van ZANDVOORT, M. J. Cognitive function following stroke and vascular cognitive impairment. *Current Opinion in Neurology*. v.19, n. 6, p. 559-564.

DELL'ANNA, M. E. ; CALZOLARI, S. ; MOLINARI, M. ; IUVONE, L. ; CALIMICI, R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Brain Research*. v.45, n. 2, p. 125-134, 1991.

DINUZZO, M. ; MARAVIGLIA, B. ; GIOVE, F. Why does the brain (not) have glycogen?. Bioessays. n.33, p. 319-326, 2011.

DOBBING, J. ; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. Early Human Development. v. 3, p. 79-83, 1979.

DUFFY, T. E. ; KOHLE, S. J. ; VANNUCCI, R. C. Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: Relation to survival in anoxia. Journal of Neurochemistry. v. 24, p. 271-276, 1975.

ENGIDAWORK, E. ; CHEN, Y. ; DELL'ANNA, E. ; GOINY, M. ; LUBEC, G. ; UNGERSTEDT, U. ; ANDERSSON, K. ; HERRERA-MARSCHITZ, M. Effect of Perinatal Asphyxia on Systemic and Intracerebral pH and Glycolysis Metabolism in the Rat. Experimental Neurology. v.145, p. 390-396, 1997.

FRIZZO, J. K. ; CARDOSO, M. P. ; DE ASSIS, A. M. ; PERRY, M. L. ; VOLONTÉ, C. ; FRIZZO, M. E. Effects of acute perinatal asphyxia in the rat hippocampus. Cellular and Molecular Neurobiology. v.30, p. 683-692, 2010.

FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. Journal of Neurochemistry. v.42, p. 1-11, 1984.

FORBUSH, B. III. Assay of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in plasma membrane preparations: increasing the permeability of membrane vesicles using sodium dodecyl sulfate buffered with bovine serum albumin. Analytical Biochemistry. v.128, p.159-163, 1983.

GILLAND, E. ; PUKA-SUNDEVALL, M. ; HILLERED, L. ; HAGBERG, H. Mitochondrial Function and Energy Metabolism After Hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. v.18, p.297-304, 1998.

GROSS, J. ; ANDERSSON, K. ; CHEN, Y. ; MOLLER, I. ; ANDREEVA, N. ; HERRERA-MARSCHITZ, M. Effect of perinatal asphyxia on tyrosine hydroxylase and D2 and D1 dopamine receptor mRNA levels expressed during early postnatal development in rat brain. Molecular Brain Research. v.134, p. 275-281, 2005.

HABECK, M. ; CIRRI, E. ; KATZ, A. ; KARLISH, S. J. ; APELL, H. J. Investigation of electrogenic partial reactions in detergent-solubilized Na,K-ATPase. *Biochemistry*. v.48, n.38, p. 9147-9155, 2009.

HAY, W. W. Current topic: metabolic interrelationships of placenta and fetus. *Placenta*. v.16, p. 19-30, 1995.

HERMANSEN, M. C. The acidosis paradox: asphyxial brain injury without coincident acidemia. *Developmental Medicine and Child Neurology*. v. 45, n. 5, p. 353-356, 2003.

HERRERA-MARCHITZ, M. ; MORALES, P. ; LEYTON, L. ; BUSTAMANTE, D. ; KLAWITTER, V. ; ESPINA-MARCHANT, P. ; ALLENDE, C. ; LISBOA, F. ; CUNICH, G. ; JARA-CAVIERES, A. ; NEIRA, T. ; GUTIERREZ-HERNANDEZ, M. A. ; GONZALEZ-LIRA, V. ; SIMOLA, N. ; SCHMITT, A. ; MORELLI, M. ; ANDREW TASKER, R. ; GEBICKE-HAERTER, P. J. Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotoxicity Research*. v.19, n. 4, p. 603-627, 2011.

HILL, A. ; VOLPE, J. Perinatal asphyxia: Clinical aspects. *Clinics Perinatology*. v.16, p.435-457, 1989.

HOEGER, H. ; ENGELMANN, M. ; BERNERT, G. ; SEIDL, R. ; BUBNA-LITTITZ, H. MOSGOELLER, W. ; LUBEC, B. ; LUBEC, G. Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. *Life Science*. v.66, p. 947-962, 2000.

JENSEN, A. ; LANG, U. Foetal circulatory responses to arrest of uterine blood flow in sheep: effects of chemical sympathectomy. *Journal of Developmental Physiology*. v.17, p. 75-86, 1992.

JENSEN, A. ; GARNIER, Y. ; BERGER, R. Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *European Journal of Obstetrics Gynecology Reproductive Biology*. v.84, p. 155-172, 1999.

KHASHABA, M. T. ; SHOUMAN, B. O. ; SHALTOUT, A. A. ; AL-MARSAFAWY, H. M. ; ABDEL-AZIZ, M. M. ; PATEL, K. ; ALY, H. Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Developmental*. v.28, p. 375-379, 2006.

KOHLHAUSER, C. ; KAEHLER, S. ; MOSGOELLER, W. ; SINGEWALD, N. ; KOUVELAS, D. ; PRAST, H. ; HOEGER, H. ; LUBEC, B. Histological changes and neurotransmitter levels three months following perinatal asphyxia in the rat. *Life Science*. v.64, p. 2109-2124, 1999.

LI, S. and STYS, P. K.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase Inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse  $\text{Na}^+$ -dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience*. v.107, n.4, p.675-683, 2001.

LOU, H. C. ; TWEED, W. A. ; DAVES, J. M. Preferential blood flow increase to the brain stem in moderate neonatal hypoxia: reversal by naloxone. *European Journal of Pediatrics*. v.144, n. 3, p.225-227, 1985.

LOW, J. A. Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate. *Journal of Obstetrics and Gynecology Research*. v.30, n.4, p. 276-286, 2004.

LUST, W. D. ; PUNDIK, S. ; ZECHEL, J. ; ZHOU, Y. ; BUCZEK, M. ; SELMAN, W. R. Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal and adult rat Brain. *Metabolic Brain Disease*. v.18, n.3, p. 195-206, 2003.

MAGISTRETTI, P. J. and PELLERIN, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. v.354, n. 1387, p.1155- 1156, 1999.

MATSUDA, T. ; IWATA, H. ; and COOPER, J. R. Specific inactivation of  $\alpha(+)$  molecular form of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$  by pyridoxamine. *The Journal of Biological Chemistry*. v.259, n.6, p. 3858-3863, 1984.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*. v.130, p. 1007S-15S, 2000.

MORALES, P. ; BUSTAMANTE, D. ; ESPINA-MARCHANT, P. ; NEIRA-PEÑA, T. ; GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, M. A. ; ALLEDE-CASTRO, C. ; ROJAS-MANCILLA, E. Pathophysiology of perinatal asphyxia: can we predict and improve individual outcomes?. *EPMA Journal*. v.2, p. 211-230, 2011.

MORALES, P. ; SIMOLA, N. ; BUSTAMANTE, D. ; LISBOA, F. ; FIEDLER, J. ; GEBICKE-HAERTER, P. J. ; MORELLI, M. ; TASKER, R. A. ; HERRERA-MARSCHITZ, M. Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. *Experimental Brain Research*. v. 202, p. 1-14, 2010.

OLNEY, J. W. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biological Psychiatry*; v.26, p. 505-525, 1989.

PALMER, C. ; BRUCKLACHER, R. M. ; CHRISTENSEN, M. A. ; VANNUCCI, R. C. Carbohydrate and energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. v.10, p.227-235, 1990.

PAPAZISIS, G. ; POURZITAKI, C. ; SARDELI, C. ; LALLAS, A. ; AMANITI, E. ; KOUVELAS, D. Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia–ischemia. *Pharmacology Research*. v.57, n. 1, p. 73-78, 2008.

PARER, J.T. Effect of fetal asphyxia on brain cell structure and function: limits of tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology*. v.119A, n.3, p.711-716, 1998.

PARK, W. S. ; CHANG, Y. S. ; LEE, M. Effects of hyperglycemia or hypoglycemia on brain cell membrane function and energy metabolism during the immediate reoxygenation – reperfusion period after acute transient global hypoxia-ischemia in the newborn piglet. *Brain Research*. v.901, p. 102-108, 2001.

PHILIP, A. ; MACDONALD, A. L. and WATT, P. W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. *The Journal of Experimental Biology*. v.208, p. 4561-4575, 2005.

PIMENTEL, V. C. ; ZANINI, D. ; CARDOSO, A. M. ; SCHMATZ, R. ; BAGATINI, M. D. ; GUTIERRES, J. M. ; CARVALHO, F. ; GOMES, J. L. ; RUBIN, M. ; MORSCH, V. M. ; MORETTO, M. B. ; COLINO-OLIVEIRA, M. ; SEBASTIÃO, A. M. ; SCHETINGER, M. R. Hypoxia-ischemia alters nucleotide and nucleoside catabolism and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the cerebral cortex of newborn rats. *Neurochemical Research*. v.38, n.4, p. 886-894, 2013.



PONTES, Z. E. ; OLIVEIRA, L. S. ; BAVERESCO, C. S. ; STRECK, E. L. ; DUTRA-FILHO, C. S. ; WAJNER, M. ; WANNMACHER, C. M. ; WYSE, A. T. Proline administration decreases Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. *Metabolic Brain Disease*. v.14, n. 4, p. 265-272, 1999.

REINHARD, L.; TIDOW, H.; CLAUSEN, M. J. ; NISSEN, P. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase as a docking station: protein-protein complexes of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v.70, n. 2, p.205-222, 2012.

RYU, J. H. ; DRAINB, J. ; KIMA, J. H. ; MCGEEC, S. ; GRAY-WEALED, A. ; WADDINGTON, L. ; PARKERF, G. J. ; HARGREAVESG, M. ; YOOA, S. H. ; STAPLETONH, D. Comparative structural analyses of purified glycogen particles from rat liver, human skeletal muscle and commercial preparations. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 45, p. 478-482, 2009.

ROSE, E. M. ; KOO, J. C. P. ; ANTFlick, J. E. ; AHMED, S. M. ; ANGERS, S. and HAMPSON, D. R. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *The Journal of Neuroscience*. v.29, n.25, p. 8143-8155, 2009.

ROSENKRANTZ, T. S. ; KUBIN, J. ; MISHRA, O. P. ; SMITH, D. ; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Brain cell membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity following severe hypoxic injury in the newborn piglet. *Brain Research*. v.730, p. 52-57, 1996.

SARACENO, G. E.; CASILLA, R. ; BARRETO, G. E. ; GONZALEZ, J. ; KÖLLIKER-FRERS, R. A. and CAPANI, F. Hippocampal dendritic spines modifications induced by perinatal asphyxia. *Neural Plasticity*. v.2012, p.1-10, 2012.

Seidl, R. ; Stckler-Ipsiroglu, S. ; Rolinski, B. ; Kohlhauser, C. ; Herkner, K. R. ; Lubec, B. ; Lubec, G. Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life Sciences*. v.67, p. 421-435, 2000.

SCHOUSBOE, A. ; SICKMANN, H. M. ; WALLS, A. B. ; BACK, L. K. ; WAAGEPETERSEN, H. S. Functional importance of the astrocytic glycogen-shunt and glycolysis for maintenance of an intact intra/extracellular glutamate gradient. *Neurotoxicity Research*. v.18, p. 94-99, 2010.

SCHOUSBOE, A. ; SICKMANN, H. M. ; BAK, L. K. ; SCHOUSBOE, I. ; JAJO, F. S. ; FAEK, S. A. A. ; WAAGEPETERSEN, H. S. Neuron-glia interactions in glutamatergic neurotransmission: roles of oxidative and glycolytic adenosine triphosphate as energy source. *Journal of Neuroscience Research*. v.89, p.1926-1934, 2011.

SHULMAN, R. G. ; HOTHMANT, D. L. "glycogen shunt" in exercising muscle: A role for glycogen in muscle energetics and fatigue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.98, n. 2, p. 457-461, 2001.

SIMOLA, N. ; BUSTAMANTE, D. ; PINNA, A. ; PONTIS, S. ; MORALES, P. ; MORELLI, M. ; HERRERA-MARSCHITZ, M. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Experimental Brain Research*. v.185, p. 595-601, 2008.

Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia: A comparative physiological approach. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*. v.123, n. 3, p. 221-234, 1999.

SOUZA, S. K. Estudo comparativo dos níveis de lactato materno, placentário e fetal em ratos no parto normal e cesáreo com e sem asfixia intrauterina. 2011. <http://hdl.handle.net/10183/35941>.

SOUZA, S. K. ; MARTINS, T. L. ; FERREIRA, G. D. ; VINAGRE, A. S. ; da SILVA, R. S. M. ; FRIZZO, M. E. Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex. *Metabolism Brain Disease*. v.28, p. 25-32, 2013.

SUH, S. W. ; BERGHER, J. P. ; ANDERSON, C. M. ; TREADWAY, J. L. ; FOSGERAU, K. ; SWANSON, R. A. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316, 819 ([ R-R\*,S\*]-5-cloro-N-[2-hydroxy-3 (methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.321, p. 45-50, 2007.

SUIDAN, J. S. ; YOUNG, B. K. Outcome of fetuses with lactic acidemia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. v.150, p. 33-37, 1984.

TIAN, G. ; LAI, L. ; GUO, H. ; LIN, Y. ; BUTCHBACH, M. E. ; CHANG, Y. ; LIN, C. L. Translational Control of Glial Glutamate Transporter EAAT2 Expression. *Journal of Biological Chemistry*. v. 282, n. 3, p. 1727-1737, 2007.

URAYAMA, O. ; SHUTT, H. ; SWEADNER, K. J. Identification of three isozyme proteins of the catalytic subunit of the Na,K-ATPase in rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. v.264, n.14, p. 8271-8280, 1989.

VANNUCCI R. C.; YAGER, J. Y. and VANNUCCI. S. J. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. v.14, p.279-288, 1994.

VANNUCCI, S. J. ; MAHER, F. and SIMPSON, I. A. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. v.21, p.2-21, 1997.

VANNUCCI, S. J. and HAGBERG, H. Hypoxia and ischemia in the immature brain. *The Journal of Experimental Biology*. v.207, p.3149-3157, 2004.

VAN DE BERG, W. D. J. ; KWAIJTAAL, M. ; DE LOUW, A. J. A. ; LISSONE, N. P. A. ; SCHMITZ, C. ; FAULL, R. L. M. ; BLOKLAND, A. ; BLANCO, C. E. ; STEINBUSCH, H. W. M. Impact of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience*. v.117, p. 83-96, 2003.

Van HANDEL E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*. v.11, n. 2, p. 256-265, 1965.

VENEROSI, A. ; VALANZANO, A. ; CIRULLI, F. ; ALLEVA, E. ; CALAMANDREI, G. Acute global anoxia during C-section birth affects dopamine mediated behavioural responses and reactivity to stress. *Behavioural Brain Research*. v.154, p. 155-164, 2004.

VAILLANCOURT, C. ; BERGER, N. ; BOKSA, P. Effect of vaginal birth versus caesarean section birth with general anesthesia on blood gases and brain energy metabolism in neonatal rats. *Experimental Neurology*. v.160, p. 142-150, 1999.

WAKUDA, T. ; MATSUZAKI, H. ; SUZUKI, K. ; IWATA, Y. ; SHINMURA, C. ; SUDA, S. ; IWATA, K. ; YAMAMOTO, S. ; SUGIHARA, G. ; TSUCHIYA, K. J. ; UEKI, T. ; NAKAMURA, K. ; NAKAHARA, D. ; TAKEI, N. ; MORI, N. Perinatal Asphyxia reduces dentate granule cells and exacerbates methamphetamine-induced hyperlocomotion in adulthood. PLOS ONE. v.3, n. 11, e. 3648, 2008.

WEITZDOERFER, R. ; POLLAK, A. ; LUBEC, B. Perinatal Asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. Seminars in Perinatology. v.28, n. 4, p. 249-256, 2004.

## Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex

Samir Khal Souza · Tiago Leal Martins ·  
Gustavo Dias Ferreira · Anapaula Sommer Vinagre ·  
Roselis Silveira Martins da Silva · Marcos Emilio Frizzo

Received: 27 September 2012 / Accepted: 22 November 2012 / Published online: 30 November 2012  
© Springer Science+Business Media New York 2012

**Abstract** We reported previously that intrauterine asphyxia acutely affects the rat hippocampus. For this reason, the early effects of this injury were studied in the cerebral cortex, immediately after hysterectomy (acute condition) or following a recovery period at normoxia (recovery condition). Lactacidemia and glycemia were determined, as well as glycogen levels in the muscle, liver and cortex. Cortical tissue was also used to assay the ATP levels and glutamate uptake. Asphyxiated pups exhibited bluish coloring, loss of movement, sporadic gasping and hypertonia. However, the appearance of the controls and asphyxiated pups was similar at the end of the recovery period. Lactacidemia and glycemia were significantly increased by asphyxia in both the acute and recovery conditions. Concerning muscle and hepatic glycogen, the control group showed significantly higher levels than the asphyxic group in the acute condition and when compared with groups of the recovery period. In the recovery condition, the control and asphyxic groups showed similar glycogen levels. However, in the cortex, the control groups showed significantly higher glycogen levels than the asphyxic group, in both the acute and recovery conditions. In the cortical tissue, asphyxia reduced ATP levels by 70 % in the acute condition, but these levels increased significantly in asphyxic pups after the recovery period. Asphyxia did not affect glutamate transport in the cortex of both groups. Our results suggest that the cortex uses different energy resources to restore ATP after an asphyxia episode followed by a reperfusion period. This strategy could sustain the activity of essential energy-dependent mechanisms.

**Keywords** Hypoxia · Lactate · Glucose · Glycogen · ATP · Glutamate uptake

S. K. Souza · T. L. Martins · G. D. Ferreira · A. S. Vinagre ·  
R. S. M. da Silva · M. E. Frizzo (✉)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, RS, Brazil  
e-mail: frizzo@ufrgs.br

### Introduction

Hypoxia-related neonatal neurological disorders are usually associated with an episode of asphyxia at birth, or early postnatal cardiopulmonary failure. Asphyxia refers to impairment in the exchange of the respiratory gases oxygen and carbon dioxide, and is the most common clinical insult in the perinatal period that may result in brain damage (Volpe 1995). Perinatal asphyxia (PA) can occur in infants around the time of birth for several reasons (de Haan et al. 2006), and can induce severe long-term impaired neurodevelopment, resulting in spasticity, epilepsy, and mental retardation; or attention-deficit hyperactivity syndrome and minimal brain disorder, when the insult is mild (Boksa and El-Khodori 2003). In asphyxiated infants, the concentration of glutamate in the cerebrospinal fluid (CSF) increases significantly after PA (Hagberg et al. 1993), with a significant correlation between its presence in the CSF and the severity of the subsequent encephalopathy (Khashaba et al. 2006). Several studies of infants asphyxiated at term have reported injury to the hippocampus, with implications for different long-term outcomes, such as cognitive memory impairment and the psychiatric disorder schizophrenia (de Haan et al. 2006; Wakuda et al. 2008). The vulnerability of the hippocampus has been linked to its dense and highly active glutamatergic neurons, which contribute to an excitotoxic cascade (Vannucci 1990) in the presence of high levels of extracellular glutamate. In the rat, graded intrauterine asphyxia has been successfully used to mimic PA occurrence in the premature human brain (Boksa et al. 1995; Bjelke et al. 1991; Chen et al. 1997), since the level of brain maturation in the rat at birth is comparable to that of the human fetus in the last trimester of gestation (Dobbing and Sands 1979). Using this paradigm, we previously observed a significant decrease in hippocampal glutamate uptake following PA (Frizzo et al. 2010). Another PA study in vivo showed that hypoxic-ischemic (HI) insult

evoked the release of glutamate from hippocampal tissue, and that these levels remained enhanced even 7 days after the asphyctic insult (Papazisis et al. 2008). Given that different brain regions show different degrees of susceptibility to HI injury, and the sparse information on the role of excitatory amino acids in PA (Bernert et al. 2003), especially with respect to the cerebral cortex, we decided to study the acute effect of this early insult on cortical metabolism and glutamate uptake. An additional aim of the study was to determine the energy resources in the brain, liver and muscle in this model, which is suitable for studying the early phase of PA, representing all of its characteristics, such as the presence of hypoxemia, acidosis and hypercapnia.

## Methods

Pregnant female Wistar rats were housed individually ( $21 \pm 1$  °C, humidity  $60 \pm 10$  %, 12 h light–dark cycle) with water and food available ad libitum. On the last day of gestation (embryonic day 22 or E22) they were euthanized by cervical dislocation and the uterus horns were isolated through an abdominal incision (Bjelke et al. 1991; Yang et al. 2011). One horn still containing the fetuses was transferred to a saline bath at 37 °C for 15 min to mimic the asphyxia condition, while the other was immediately hysterectomized, providing caesarean-delivered controls. In this study, we used two conditions: acute, where the pups (control or asphyxiated) were immediately decapitated after hysterectomy; and the recovery group, where after hysterectomy, fetuses (control or asphyxiated) were removed, cleaned, and the umbilical cord was clamped, allowing the animal to recover in a hood with normal atmospheric conditions ( $30 \pm 1$  °C) for 60 min. In both the acute and recovery groups, after decapitation the organs (brain, liver and *gastrocnemius* muscle) used for biochemical studies were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80$  °C until the experiments were performed. The organs were removed in the same order. After decapitation, one person removed the brain, and another person removed the liver and muscle. In order to study the early effects of intrauterine asphyxia, the period considered in our study was no longer than 60 min following the caesarean-delivery procedure. All animal procedures were approved by the Institutional Ethical Committee (Ethical Committee, UFRGS).

### Lactate determination

Pups were decapitated and all the blood was immediately drained into an eppendorf vial coated with sodium fluoride (0.1 M), and centrifuged ( $2,500 \times g$  to 10 min). Plasma lactate was determined by an enzymatic colorimetric assay (LOD-PAP, Katal, Brazil). In detail, 10  $\mu$ L of plasma was incubated for 5 min at 37 °C with 1 mL of reagent solution

containing lactate oxidase, peroxidase, 4-aminoantipyrine and N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-m-toluidine. Absorbance was read at 540 nm. Total fetus used: acute condition, 24 control and 25 asphyxiated; recovery condition, 21 control and 23 asphyxiated. Number of independent experiments: 7 ( $n=7$ ).

### Glucose determination

Plasmatic levels of glucose levels were determined with a glucose-oxidase kit (LabTest, Brazil). Blood samples were centrifuged at  $2,500 \times g$  (10 min) to collect the plasma, and an aliquot (10  $\mu$ L) was incubated with the enzyme reagent for 15 min in a water bath at 37 °C. Absorbance was read at 505 nm. Total fetuses used: acute condition, 24 control and 25 asphyxiated; recovery condition, 25 control and 23 asphyxiated. Number of independent experiments: 6 ( $n=6$ ).

### Collection of tissues

ATP and glutamate uptake were studied in samples from the cerebral cortices. In this case, brains from animals of the acute or recovery period were quickly removed, immediately after decapitation. Brains were submerged in a container with Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 4.6 mM glucose (glucose-HBSS) at 4 °C, placed on an ice-cooled plate, and rapidly dissected with the help of a stereomicroscope. Cortices used to study glutamate uptake were transferred to glucose-HBSS (4 °C), and others, used for the ATP assay, were frozen in liquid nitrogen.

### Glycogen determination

Muscle glycogen was extracted essentially according to Van Handel (1965), and determined as glucose after acid hydrolysis (Geary et al. 1981). The quantity of glycogen was expressed in grams per cent (g%) of tissue. Total fetuses used: acute condition, 24 control and 26 asphyxiated; recovery condition, 21 control and 23 asphyxiated. Number of independent experiments: 6 ( $n=6$ ).

### ATP assay

After each experiment, cerebral cortices were homogenized with lysis buffer (TCA 6 %, NaF 20 mM, gelatin 0.4 g.L<sup>-1</sup>). The concentration of ATP was determined through the bioluminescent luciferin technique using the Invitrogen kit (A22066). Results were expressed as  $\mu$ mol of ATP mg<sup>-1</sup> of tissue. Initially, cerebral cortices were obtained, frozen in liquid nitrogen, and maintained at  $-80$  °C until the ATP determination. However, we observed that ATP levels were affected by the storage period. In order to confirm the hydrolyses, we compared samples that were assayed for

ATP levels on the same day that they were obtained, with others that were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 1 or 2 months prior to assay. In the latter case, ATP levels fell 33 % and 67 % after 1 and 2 months, respectively. For this reason, our ATP determination was done immediately after the tissue extraction. Total fetuses used: acute condition, 9 control and 9 asphyxiated; recovery condition, 9 control and 9 asphyxiated. Number of independent experiments: 3 ( $n=3$ ).

#### Glutamate uptake

The cerebral cortices were individually weighed, and then the cortical tissue was placed in glucose-HBSS at  $36.5^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Next, the uptake assay was initiated with introduction of  $0.2\ \mu\text{Ci mL}^{-1}$  L-[2,3- $^3\text{H}$ ] of glutamate ( $49.6\ \text{Ci mmol}^{-1}$ , PerkinElmer) with  $100\ \mu\text{M}$  unlabeled glutamate. To evaluate the optimal time for assaying L-[ $^3\text{H}$ ] glutamate uptake, we carried out incubation time courses using cerebral-cortex tissue (data not shown), and the time chosen was 7 min for glutamate. Incubation was stopped by three ice-cold washes with 1 mL of HBSS on an ice-cooled plate, immediately followed by addition of  $0.5\ \text{N}$  NaOH. Aliquots of lysates were taken in order to determine the intracellular content of L-[ $^3\text{H}$ ] glutamate through scintillation counting. To determine the actual uptake, parallel experiments were done on ice, replacing sodium chloride with equimolar choline chloride in the incubation medium. Values obtained in these conditions were subtracted from the uptake at  $36.5^{\circ}\text{C}$  in the presence of sodium. Total fetuses used: acute condition, 10 control and 9 asphyxiated; recovery condition, 9 control and 9 asphyxiated. Number of independent experiments: 3 ( $n=3$ ).

#### Statistical Analysis

Data were analyzed using ANOVA for multiple group comparison. Post-hoc analysis was carried out using the Duncan multiple range test. Values of  $p<0.05$  were considered statistically significant.

#### Results

In this study, we analyzed the effects of 15 min of intrauterine asphyxia, immediately after hysterectomy (acute condition), or following 60 min of recovery (recovery condition). In the controls for the acute condition, we observed 100 % animal survival, while in the group exposed to PA, the survival rate was  $95\pm 5\%$ . After 60 min of recovery, the mortality rates of controls and asphyxiated animals were  $98\pm 2$  and  $90\pm 7\%$ , respectively. Immediately after being removed from the uterus, the asphyxiated pups exhibited bluish coloring, loss of movement, and sporadic gasping. Around 30 min following asphyxia, the original pink

coloring returned, and the breathing became regular; however, the hypertonic appearance was observed from 30 min until 60 min after asphyxia.

As expected, the asphyxia period significantly increased lactacidemia, compared with the control group (Fig. 1). In acute condition, the lactate levels increased from  $9.30\pm 0.55$  in the control group to  $13.30\pm 0.18\ \text{mmol.L}^{-1}$  in the asphyxiated group ( $p<0.05$ ). This significant rise in lactate level was also observed in asphyxiated pups after the recovery period, increasing from  $8.87\pm 0.81$  to  $12.94\pm 0.18\ \text{mmol.L}^{-1}$  ( $p<0.05$ ).

In relation to glycemia, PA significantly increased glucose levels in the plasma of both acute and recovery groups (Fig. 2). Immediately after hysterectomy, plasmatic glucose rose from  $3.50\pm 0.31$  to  $5.68\pm 0.23\ \text{mmol.L}^{-1}$  ( $p<0.05$ ), while in the recovery group, glucose levels rose from  $3.56\pm 0.54$  to  $6.94\pm 0.70\ \text{mmol.L}^{-1}$  ( $p<0.05$ ).

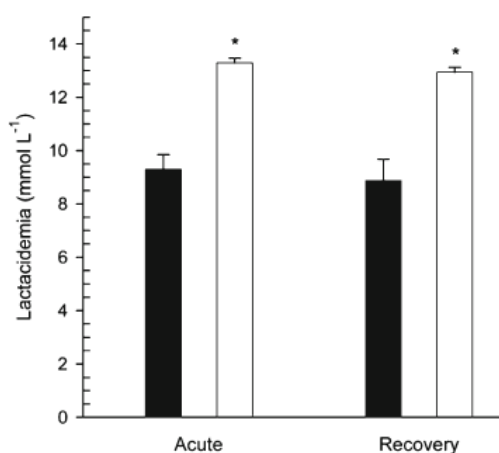
Concerning muscular glycogen, the control group showed significantly higher levels than the asphyxic group in the acute period, and when compared with groups of the recovery period,  $p<0.05$  (Fig. 3a). After 1 h, the glycogen level in the control group was similar to that in the asphyxic group. The same situation was observed in relation to the hepatic glycogen level,  $p<0.05$  (Fig. 3b). However, in the cerebral cortex, the control group showed significantly higher levels of glycogen than the asphyxiated group in both the acute and recovery periods,  $p<0.05$  (Fig. 3c).

In order to prevent hydrolysis, ATP was assayed immediately after each experiment. In the acute condition, ATP levels obtained for the control and asphyxic groups were  $505.6\pm 70.4$  and  $149.9\pm 15.8\ \mu\text{M}$ , respectively,  $p<0.05$  (Fig. 4). After the recovery period, ATP values were similar in the controls ( $311.2\pm 44.4\ \mu\text{M}$ ) and asphyxiated animals ( $303.7\pm 19.3\ \mu\text{M}$ ). Notably, ATP in the cortical tissue from the recovery asphyxic condition showed a significant increase compared with the acute asphyxic group,  $p<0.05$  (Fig. 4).

Glutamate transport activity in the cerebral cortex was evaluated immediately after hysterectomy or following a recovery period. Acutely, glutamate uptake in the control and asphyxic groups was  $2.56\pm 0.40$  and  $2.76\pm 0.06\ \text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectively (Fig. 5). Following the recovery period, the basal glutamate uptake of both groups was significantly higher ( $p<0.05$ ), however, similar to the acute condition; PA did not affect glutamate transport in the cerebral cortex, being  $4.76\pm 0.03$  for the controls and  $4.56\pm 0.09\ \text{pmol.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  for the asphyxiated animals.

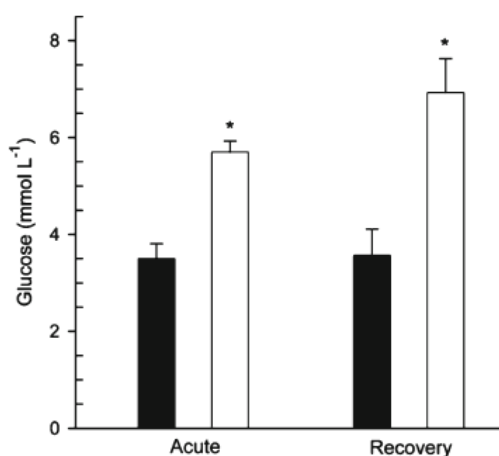
#### Discussion

Here, early changes of systemic lactate and glucose and energy resources in the tissues of the cerebral cortex, liver,

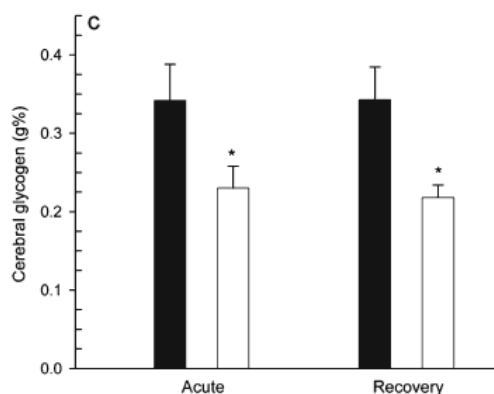
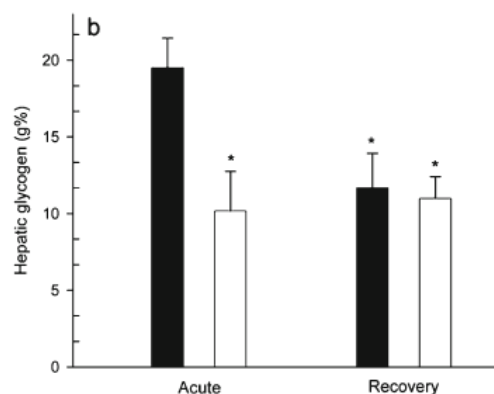
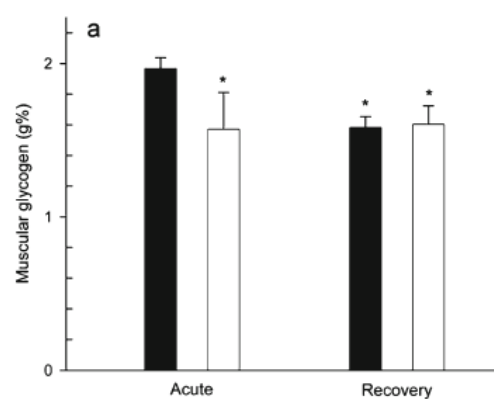


**Fig. 1** Effect of PA on measured lactate concentration. Lactate levels were determined in the plasma of neonates immediately after hysterectomy (*acute condition*), or following 60 min of recovery (*recovery condition*) in control (*black bar*) and asphyxiated (*white bar*). \*  $p < 0.05$  different from control groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM

and muscle were studied in an animal model of graded asphyxia immediately following injury or after 60 min of normoxia. Immediately after the asphyxia period, cardiovascular function was compromised, since cyanotic-colored skin was observed, indicating decreases in both blood perfusion and oxygenation of peripheral tissue. Asphyxic pups



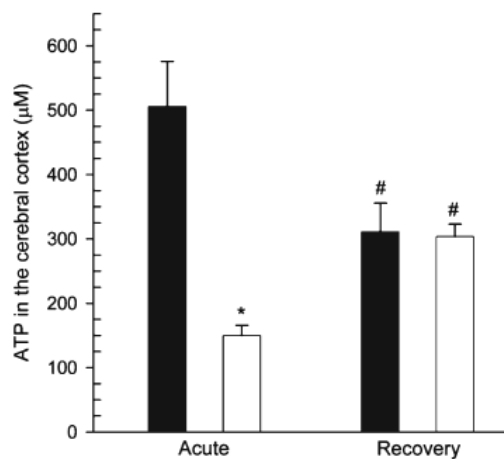
**Fig. 2** Plasmatic levels of glucose assayed after caesarean delivery. Glycemia was determined immediately after hysterectomy (*acute condition*) or following 60 min of recovery (*recovery condition*). Glycemia of both control groups (*black bars*) was similar, but asphyxic insult (*white bars*) significantly increased glucose levels in the plasma. \*  $p < 0.05$  different from control groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM



**Fig. 3** Glycogen levels in tissues of neonatal rats after caesarean delivery. Glycogen levels were determined immediately after hysterectomy (*acute condition*) or following 60 min of recovery (*recovery condition*) in control (*black bar*) and asphyxiated (*white bar*). Glycogen level determined in muscle (panel a), liver (panel b) and cerebral cortex (panel c). Panel a and b \*  $p < 0.05$  different from acute control; panel c \*  $p < 0.05$  different from control groups. Data are represented as mean  $\pm$  SEM

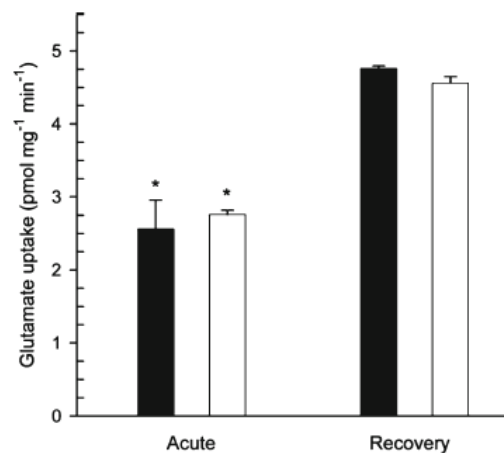
were also noiseless, akinetic, and showed hypertonia, clearly differing from the control animals, which is in agreement





**Fig. 4** Total ATP determined in the cerebral cortex from animals obtained by caesarean delivery. ATP levels were determined immediately after hysterectomy (*acute condition*) or following 60 min of recovery (*recovery condition*) in control (*black bar*) and asphyxiated (*white bar*). \*  $p < 0.05$  different from acute control and recovery group; #  $p < 0.05$  different from acute group. Data are mean  $\pm$  SEM

with previous reports (Engidawork et al. 2001; Frizzo et al. 2010; Morales et al. 2010). As previously described (Frizzo et al. 2010) we observed that these alterations were transitory, and the asphyxiated pups gradually came to resemble the controls around 30 min after asphyxia, displaying greater activity, pink skin, and rhythmic and sustained breathing. It is well known that abnormal conditions in the uterus may trigger some developmental disorders, and that many



**Fig. 5** Glutamate transport activity in the cerebral cortex. L-[<sup>3</sup>H] glutamate uptake was performed in different conditions, immediately after hysterectomy (*acute condition*), or following 60 min of recovery (*recovery condition*) in control (*black bar*) and asphyxiated (*white bar*). \*  $p < 0.05$  different from recovery group. Data are mean  $\pm$  SEM

neurological illnesses are associated with intrauterine metabolic stress (Nelson 1989; Squire and Keeling 1991). Although the brain damage resulting from an asphyxial event is multifactorial and age-dependent, the brain response to this metabolic insult is determined, largely, by its ability to utilize different substrates as energy sources in order to maintain cellular homeostasis in the tissue during the injury (Lust et al. 2003). The perinatal brain seems to be less vulnerable to hypoxia/ischemia than the adult brain (Yager et al. 1996). One reason might be the differences in the capacity of the brain tissue at different stages of development, to use alternative substrates for intermediary metabolism, which changes markedly with ontogenetic development (Lust et al. 2003), besides the relatively low metabolic rate in the perinatal brain (Duffy et al. 1975). In contrast, the higher metabolic rate combined with limited substrate reserves in the adult brain may exacerbate the damage (Lowry et al. 1964). However, during brain development, many energy-dependent processes are occurring and may be compromised by an altered energy state. Perturbations in brain maturation and neurological dysfunction may occur, as previously described, following an episode of PA (Morales et al. 2003; Scheepens et al. 2003; Klawitter et al. 2005; Morales et al. 2005). In our model of PA, we studied the utilization of metabolic substrates in cerebral cortices at E22, when the capacity to use different energy resources is greater than in the adult brain (Lust et al. 2003). This condition causes a temporal interruption of oxygen availability and may constitute a long-lasting metabolic insult (Weitzdoerfer et al. 2004). At birth, the hypoxic state leads to a shift from an aerobic to a less-efficient anaerobic metabolism, resulting in decreased ATP levels (Lubec et al. 2000; Seidl et al. 2000) and accumulated lactate (Chen et al. 1997). Re-oxygenation following PA can exacerbate the damage and lead to disruption in homeostasis, with partial recovery and sustained over-expression of alternative metabolic pathways (Herrera-Marschitz et al. 2011).

Given that lactate is invariably produced in consequence of an event of hypoxia and poor tissue perfusion, we also evaluated this parameter in our model of *intrapartum* asphyxia. As expected, the plasma levels of lactate were significantly enhanced acutely after the asphyxia period. Likewise, following a recovery period in normoxia, lactacidemia of asphyxiated animals was significantly higher than in the controls, demonstrating that the recovery period was not enough to reduce lactate levels to those of the controls. The values obtained here, immediately after hysterectomy, are in agreement with the findings of other investigators who used the same paradigm of PA (Seidl et al. 2000; Marx et al. 2001). Here, we studied the lactacidemia; however, other investigators also reported a significant increase of lactate in the cerebral tissue, using the same model of PA (Engidawork et al. 1997; Seidl et al. 2000). The

maintenance of elevated levels of lactate after the recovery period in normoxia requires an additional investigation considering its possible use as an energy resource, in addition to its effect on cerebral blood flow (Gordon et al. 2008; Bergersen and Gjedde 2012).

A recent study of the contribution of the blood-glucose level in PA showed that the severity of encephalopathy and damage varies with the hypoglycemic status (Basu et al. 2009). In that case, the degree of asphyxia (represented by the Apgar scores) was directly proportional to the degree of hypoglycemia, and directly related to the stages of hypoxic ischemic encephalopathy. Basu et al. (2009) commented on the importance of the development of hypoglycemia concomitantly with asphyxia, a condition that leads to the failure of all compensatory mechanisms in the hypoxic neonatal brain. Consequently, not only an oxygen supply but also a simultaneous glucose supply is required to rectify the problem early (Basu et al. 2009). In contrast to reports for humans, our results showed that glycemia was significantly increased (62 %) after PA in both groups, acute and recovery. This rise in glycemia of asphyxic pups is in agreement with findings from another study where glucose was quantified in rats immediately after the PA (Marx et al. 2001). Several factors might have contributed to the increase of glucose level in the asphyxiated animals, such as the mobilization of hepatic glycogen, as well as a reduced consumption of glucose from the blood, by the cerebral cortex, due to use of its own sources of glycogen. Importantly, during the recovery period, the controls showed greater activity than in the asphyxiated animals, which were akinetic for about 30 min after hysterectomy. This difference in activity could explain the lower levels of glycemia seen in the controls after the recovery period, despite the reduction in the hepatic glycogen sources.

Immediately after birth, the newborn depends on its own glycogen stores to provide glucose, even though lactate also can be metabolized during this period (Hellmann et al. 1982; Medina 1985). Hence, the glucose demand following 60 min in normoxia may explain the reduction of glycogen in the liver of the controls. However, in the cerebral cortex, there was no fall in the glycogen level of the controls, since glycogen was mobilized only after asphyxia. The role of cortical glycogen, especially under asphyxia conditions, requires additional investigation, since the concept that this carbohydrate is only an emergency depository appears to be contradictory to recent data (DiNuzzo et al. 2011).

A previous study reported a significant decrease in the ATP levels (60 %) following 20 min of PA, and a return to normal values after 30 min of reperfusion (Kunievsky et al. 1994). In another study of PA, the energy metabolism of the brain was studied after an episode of 15 min of occlusion. In this case, ATP levels were reduced by 90 % immediately after occlusion. Following 45 min reperfusion, ATP

recovered to 80 % of the control value (Brand et al. 1998). In our model, when comparing total ATP in the cerebral cortex from controls, immediately after hysterectomy or 60 min later, we observed a significant fall in total ATP (38 %). This decrease can be explained by the intense activity of the control neonates during the recovery period. However, our results also showed that ATP levels were significantly reduced by PA in the acute period (70 %). A rapid depletion of ATP in the cerebral tissue after 15 min of asphyxia has also been observed by other investigators (Seidl et al. 2000). However, in agreement with the findings of Kunievsky et al. (1994) and Brand et al. (1998), our results showed that in the cerebral cortex of asphyxiated animals, ATP levels were similar to those of the controls after a recovery period. Hence, ATP, in the cortical tissue obtained from asphyxiated animals, showed a significant increase after recovery, compared to the acute asphyxia group. Recently, it has been shown that in a model of hypoxia-ischemia, ATP concentration rises significantly after brain reperfusion, which may be a strategy to protect against this injury (Almeida et al. 2012). Thus, it would be interesting to identify the substrate used as the ATP source, since lactate, glucose, and glycogen seem not to be utilized to restore ATP levels. An alternative energy supply might be the amino acid glutamate, since endogenous levels of this neurotransmitter increase rapidly after the PA (Khashaba et al. 2006; Papazisis et al. 2008). Once transported into the astrocytes, it may alternatively enter the tricarboxylic acid (TCA) cycle, replacing glucose as the substrate for astrocytic energy metabolism (Swanson et al. 1990; Yu et al. 1982; Danbolt 2001). In fact, it has been suggested that the increased routing of glutamate into the TCA cycle may result in the rise of ATP levels (Lowry and Passonneau 1966).

Therefore, we studied glutamate uptake in the cerebral cortex after PA. This transport is dependent on the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  electrochemical gradient, which is used as a driving force (Danbolt 2001). Hence, the glutamate uptake activity is indirectly dependent on ATP, since it is necessary to maintain the functionality of the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. However, despite the significant fall in the amount of ATP, the uptake was maintained in the cortical tissue after PA. This result is in contrast with our previous findings for the hippocampus, where glutamate uptake was significantly affected by 15 min of asphyxia (Frizzo et al. 2010). This result suggests the existence of sufficient ATP to maintain a  $\text{Na}^+$ -dependent process, and is in accordance with another study that showed that significant differences in ATP decline were only observed after 15 min of asphyxia (Seidl et al. 2000).

Another possibility might be the oxidation of  $\beta$ -hydroxybutyrate ( $\beta$ -OHB), which could be used to produce ATP in asphyxiated pups during the recovery period. Indeed, it was previously reported that animals subjected to 15 min of PA showed an extremely large increase in the  $\beta$ -

OHB levels, following 10 min of recovery (Marx et al. 2001). To reinforce this argument, in a model of global ischemia in rats, the post-injury intravenous infusion of  $\beta$ -OHB decreased the edema and raised ATP levels (Suzuki et al. 2002). The importance of  $\beta$ -OHB to the asphyxiated cerebral cortex is under current investigation in our group.

In conclusion, our results suggest that the cerebral cortex seems to show a plasticity regarding the use of energy resources. This faculty could provide metabolic strategies to maintain cerebral homeostasis under asphyxia conditions. It is reasonable to assume that the neonatal brain utilizes different resources as an effort to resist the asphyxic process. For this reason, additional studies are essential to understand the mechanisms involved in the response of the neonatal cortex to prevent metabolic damage.

**Grant sponsor** This research was supported by grants from the Brazilian National Research Council (CNPq). Da Silva is CNPq fellowship.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Almeida AS, Queiroga CS, Sousa MF, Alves PM, Vieira HL (2012) Carbon Monoxide Modulates Apoptosis by Reinforcing Oxidative Metabolism in Astrocytes: Role of Bcl-2. *J Biol Chem* 287:10761–10770
- Basu P, Som S, Choudhuri N, Das H (2009) Contribution of the blood glucose level in perinatal asphyxia. *Eur J Pediatr* 168:833–838
- Bergersen LH, Gjedde A (2012) Is lactate a volume transmitter of metabolic states of the brain? *Front Neuroenergetics* 4:5
- Bernert G, Hoeger H, Mosgoeller W, Stolzlechner D, Lubec B (2003) Neurodegeneration, neuronal loss, and neurotransmitter changes in the adult guinea pig with perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 54:523–528
- Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P (1991) Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res* 543:1–9
- Boksa P, El-Khodori BF (2003) Birth insult interacts with stress at adulthood to alter dopaminergic function in animal models: possible implications for schizophrenia and other disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 27:91–101
- Boksa P, Krishnamurthy A, Brooks W (1995) Effects of a period of asphyxia during birth on spatial learning in the rat. *Pediatr Res* 37:489–496
- Brand A, Gil S, Leibfritz D, Yavin E (1998) Direct administration and utilization of [ $^{1-13}$ C]-glucose by fetal brain and liver tissues under normal and ischemic conditions:  $^1$ H,  $^{31}$ P, and  $^{13}$ C NMR studies. *J Neurosci Res* 54:97–108
- Chen Y, Engidawork E, Loidl F, Dell'Anna E, Goiny M, Lubec G, Andersson K, Herrera-Marschitz M (1997) Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat. *Dev Brain Res* 104:19–30
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105
- de Haan M, Wyatt JS, Roth S, Vargha-Khadem F, Gadian D, Mishkin M (2006) Brain and cognitive-behavioral development after asphyxia at term birth. *Dev Sci* 9:350–358
- DiNuzzo M, Maraviglia B, Giove F (2011) Why does the brain (not) have glycogen? *Bioessays* 33:319–326
- Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79–83
- Duffy T, Howse D, Plum F (1975) Cerebral energy metabolism during experimental status epilepticus. *J Neurochem* 24:925–934
- Engidawork E, Chen Y, Dell'Anna E, Goiny M, Lubec G, Andersson K, Herrera-Marschitz M (1997) Effects of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral glycolysis metabolism and pH in the rat. *Exp Neurol* 145:390–396
- Engidawork E, Loidl F, Chen Y, Kohlhauser C, Stoeckler S, Dell'Anna E, Lubec B, Lubec G, Goiny M, Gross J, Andersson K, Herrera-Marschitz M (2001) Comparison between hypothermia and glutamate antagonism treatments on the immediate outcome of perinatal asphyxia. *Exp Brain Res* 138:375–383
- Frizzo JK, Cardoso MP, de Assis AM, Perry ML, Volonté C, Frizzo ME (2010) Effects of acute perinatal asphyxia in the rat hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 30:683–692
- Geary N, Langhans W, Scharer E (1981) Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am J Physiol* 241(5):R330–R335
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456:745–749
- Hagberg H, Thornberg E, Blennow M, Kjellmer I, Lagercrantz H, Thiringer K, Hamberger A, Sandberg M (1993) Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 82:925–929
- Hellmann J, Vannucci RC, Nardis EE (1982) Blood-brain barrier permeability to lactic acid in the newborn dog: lactate as a cerebral metabolic fuel. *Pediatr Res* 16:40–44
- Herrera-Marschitz M, Morales P, Leyton L, Bustamante D, Klawitter V, Espina-Marchant P, Allende C, Lisboa F, Cunich G, Jara-Cavieles A, Neira T, Gutierrez-Hernandez MA, Gonzalez-Lira V, Simola N, Schmitt A, Morelli M, Tasker RA, Gebicke-Haerter PJ (2011) Perinatal asphyxia: current status and approaches towards neuroprotective strategies, with focus on sentinel proteins. *Neurotox Res* 19:603–627
- Khashaba MT, Shouman BO, Shaltout AA, Al-Marsafawy HM, Abdel-Aziz MM, Patel K, Aly H (2006) Excitatory amino acids and magnesium sulfate in neonatal asphyxia. *Brain Dev* 28:375–379
- Klawitter V, Morales P, Johansson S, Bustamante D, Goiny M, Gross J, Luthman J, Herrera-Marschitz M (2005) Effect of perinatal asphyxia on cell survival, neuronal phenotype and neurite growth evaluated with organotypic triple cultures. *Amino Acids* 28:149–155
- Kunievsky B, Pretsky J, Yavin E (1994) Transient rise of glucose uptake in the fetal rat brain after brief episodes of intrauterine ischemia. *Dev Neurosci* 16:313–320
- Lowry OH, Passonneau JV (1966) Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J Biol Chem* 241:2268–2279
- Lowry O, Passonneau JV, Hasselberger F, Schulz DW (1964) Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* 239:18–42
- Lubec B, Chiappe-Gutierrez M, Hoeger H, Kitzmueller E, Lubec G (2000) Glucose transporters, hexokinases and phosphofructokinase in brain of rats with perinatal asphyxia. *Pediatr Res* 47:84–88

- Lust WD, Pundik S, Zechel J, Zhou Y, Buczek M, Selman WR (2003) Changing metabolic and energy profiles in fetal, neonatal, and adult rat brain. *Metab Brain Dis* 18:195–206
- Marx M, Mühl A, Hoeger H, Rolinski B, Frisch H, Herkner K, Lubec G, Lubec B (2001) Brain fatty acids in perinatal asphyxia. *Life Sci* 68:2657–2664
- Medina JM (1985) The role of lactate as an energy substrate for the brain during the early neonatal period. *Biol Neonate* 48:237–244
- Morales P, Klawitter V, Johansson S, Huaiquin P, Barros VG, Avalos AM, Fiedler J, Bustamante D, Gomez-Urquijo S, Gojny M, Herrera-Marschitz M (2003) Perinatal asphyxia impairs connectivity and dopamine neurite branching in organotypic triple culture from rat substantia nigra. *Neurosci Lett* 348:175–179
- Morales P, Reyes P, Klawitter V, Huaiquin P, Bustamante D, Fiedler JL, Herrera-Marschitz M (2005) Effects of perinatal asphyxia on cell proliferation and neuronal phenotype evaluated with organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience* 135:421–431
- Morales P, Simola N, Bustamante D, Lisboa F, Fiedler J, Gebicke-Haerter PJ, Morelli M, Tasker RA, Herrera-Marschitz M (2010) Nicotinamide prevents the long-term effects of perinatal asphyxia on apoptosis, non-spatial working memory and anxiety in rats. *Exp Brain Res* 202:1–14
- Nelson K (1989) Relationship of intrapartum and delivery room events to long-term neurologic outcome. *Clin Perinatol* 16:995–1007
- Papazisis G, Pourzitaki C, Sardeli C, Lallas A, Amaniti E, Kouvelas D (2008) Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res* 57:73–78
- Scheepens A, Wassink G, Piersma MJ, Van der Berg WDJ, Blanco CE (2003) A delayed increase in hippocampal proliferation following global asphyxia in the neonatal brain rat. *Brain Res Dev Brain* 142:215–221
- Seidl R, Stöckler-Ipsiroglu S, Rolinski B, Kohlhauser C, Herkner KR, Lubec B, Lubec G (2000) Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life Sci* 67:421–435
- Squire M, Keeling J (1991) The incidence of prenatal brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:29–38
- Suzuki M, Suzuki M, Kitamura Y, Mori S, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2002) Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia. *Jpn J Pharmacol* 89:36–43
- Swanson RA, Yu AC, Chan PH, Sharp FR (1990) Glutamate increases glycogen content and reduces glucose utilization in primary astrocyte culture. *J Neurochem* 54:490–496
- Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* 11:256–265
- Vannucci RC (1990) Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27:317–326
- Volpe JJ (1995) *Neurology of the Newborn*. WB Saunders, Philadelphia
- Wakuda T, Matsuzaki H, Suzuki K, Iwata Y, Shinmura C, Suda S, Iwata K, Yamamoto S, Sugihara G, Tsuchiya KJ, Ueki T, Nakamura K, Nakahara D, Takei N, Mori N (2008) Perinatal asphyxia reduces dentate granule cells and exacerbates methamphetamine-induced hyperlocomotion in adulthood. *PLoS One* 3(11):e3648. doi:10.1371/journal.pone.0003648
- Weitzdoerfer R, Pollak A, Lubec B (2004) Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Semin Perinatol* 28:249–256
- Yager JY, Shuaib A, Thornhill J (1996) The effect of age on susceptibility to brain damage in a model of global hemispheric hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 93:143–154
- Yang T, Zhuang L, Terrando N, Wu X, Johnson MR, Maze M, Ma D (2011) A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. *Brain Res* 1383:317–323
- Yu AC, Schousboe A, Hertz L (1982) Metabolic fate of <sup>14</sup>C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem* 39:954–960