

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CEREBRAL DE GLICOSE *IN VIVO* E DA  
MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A HIPÓXIA-  
ISQUEMIA NEONATAL**

Gabriela de Oliveira Laguna Silva

Porto Alegre, 2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CEREBRAL DE GLICOSE *IN VIVO* E DA  
MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A HIPÓXIA-  
ISQUEMIA NEONATAL**

Gabriela de Oliveira Laguna Silva

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Samuel Greggio

Porto Alegre

2017

Gabriela de Oliveira Laguna Silva

**AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CEREBRAL DE GLICOSE *IN VIVO* E DA  
MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A HIPÓXIA-  
ISQUEMIA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito à conclusão do curso de Mestrado em Pediatria e Saúde da Criança na Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Samuel Greggio

Porto Alegre

2017

## Ficha Catalográfica

S586a Silva, Gabriela de Oliveira Laguna

Avaliação do metabolismo cerebral de glicose in vivo e da memória espacial de ratos adultos submetidos a hipóxia- isquemia neonatal / Gabriela de Oliveira Laguna Silva. – 2017. 075.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Samuel Greggio.

1. Hipóxico-isquêmico. 2. Lesão cerebral. 3. Asfixia. 4. Modelos Animais. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Greggio, Samuel. III. , . IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Loiva Duarte Novak CRB-10/2079

## AGRADECIMENTOS

Os últimos dois anos, que se resume em doação e dedicação, gostaria de agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais. Pois não fiz nada sozinha e estive cercada de pessoas igualmente envolvidas e dedicadas para realização desse trabalho. Através de sinceras palavras, expresso aqui um pouco da importância de cada um e meus sinceros agradecimentos pela paciência e incentivo de todos que me acompanharam.

Gostaria de agradecer à PUCRS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, e à CAPES pela bolsa de mestrado, a qual me possibilitou realizar este curso.

Às secretárias do Instituto de Pesquisas Biomédicas e do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Elisangela Mello e Carla Rothmann, por toda dedicação, carinho e ajuda dispensada.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, pelos seus ensinamentos.

Aos meus queridos colegas do Neurolab, por todos esses anos de companheirismo e amizade. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para a conclusão desse trabalho. Agradeço aos funcionários Daniela Abreu, Ricardo Breda e Simone Salamoni pela disposição em ajudar. Obrigada, também, à secretária do InsCer, Nelcy Arndt, por todo apoio e empenho. A Gabriele Zanirati, minha amiga, obrigada pelos conselhos, pelas conversas e por dividir comigo o dia-a-dia, tornando-o muito mais agradável e divertido.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica da UFRGS, Felipe Kawa Odorczyk, Luz Elena Duran-Caribali e ao Eduardo Rigon Zimmer pela disponibilidade de sempre e pelos ensinamentos e, também, ao Professor Carlos Alexandre Netto coordenador do Laboratório de Bioquímica onde foram realizados os experimentos.

À minha querida amiga Pamella Azevedo, pela amizade desde o colégio, pelo apoio e incentivo, pela disponibilidade e dedicação durante a realização desse curso, e ainda mais durante esse final de mestrado. Meu agradecimento mais que especial por toda ajuda, cuidados, empenho e carinho.

Ao Luiz Marrone pelo incentivo, ensinamentos e amizade de sempre.

À Gianina Venturin por todo auxílio e dedicação com a realização do exames de micro-PET, mas principalmente pela amizade e por sempre estar disponível para conversar e pelos auxílios científicos.

Aos meus orientadores, Dr. Jaderson Costa da Costa e Dr Samuel Greggio, pelo suporte científico e pela oportunidade de aprendizado e a realização desse estudo.

Ao meu amor e melhor amigo, Thayron, por todo apoio ao longo desse ano. Obrigada por ser meu conselheiro e meu maior incentivador.

Aos meus filhos Davi e Augusto, por todo amor e por serem meus maiores fatores motivacionais, minha razão e meu tudo.

Aos meus pais João Moysés Laguna e Marcia Laguna pelo amor e apoio incondicionais. Por me ensinarem que o estudo é um dos bens mais preciosos que podemos adquirir e por possibilitar que eu me dedicasse a ele. Mas principalmente por terem me ensinado tudo e me transformado na pessoa que sou hoje. Ao meu irmão Daniel Laguna, meu maior companheiro, meu grande amigo e meu exemplo, obrigado por todo o incentivo, amizade, companheirismo e amor que sempre dedicaste a mim.

## RESUMO

A HI neonatal é uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade infantil. Estudos estatísticos sugerem que a taxa de mortalidade de recém-nascidos asfisiados no período neonatal é de 20 a 50%, sendo que mais de 25% dos sobreviventes apresentam incapacidades neuropsicológicas permanentes, tais como retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldade de aprendizagem. O modelo experimental de HI neonatal, proposto por Rice e colaboradores, é o mais aceito na comunidade científica, mimetizando diversos aspectos da fisiopatologia na condição humana. Neste modelo animal, o dano cerebral é obtido através da associação da oclusão permanente da artéria carótida comum direita e subsequente exposição a um ambiente hipóxico (8% O<sub>2</sub>). A lesão limita-se ao hemisfério cerebral ipsilateral à oclusão e, semelhante à realidade clínica, há grande variabilidade da lesão cerebral. Tais observações estimulam pesquisas experimentais que objetivam entender o desenvolvimento da lesão cerebral e, *a posteriori*, manter a integridade do SNC a partir de intervenções terapêuticas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a lesão cerebral de ratos adultos previamente submetidos à HI neonatal, através da análise *in vivo* do metabolismo cerebral de glicose, e correlacionar estes achados com o desempenho cognitivo destes animais. Para este estudo foram utilizados um total de 22 ratos Wistar machos com 7 dias de vida. Aos 7 dias de vida, ratos Wistar foram submetidos ao modelo de HI neonatal. Aos 60 dias de vida, 53 dias após a indução da HI, estes animais foram submetidos a exames de imagem por microPET (microtomografia por emissão de pósitrons) e do radiofármaco <sup>18</sup>F-FDG (<sup>18</sup>F-fluordesoxiglicose), para análise do metabolismo cerebral de glicose. Posteriormente, os animais foram avaliados quanto à memória espacial através do teste do Labirinto Aquático de Morris. Através do escaneamento de microPET-FDG, observamos um hipometabolismo cerebral significativo no hemisfério ipsilateral à oclusão carotídea nos animais adultos hipóxico-isquêmicos que apresentavam área supostamente lesional detectável na imagem funcional. Além disso, demonstramos que existe uma correlação inversamente proporcional entre a alteração do metabolismo cerebral e o déficit na memória espacial de ratos adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.

**Palavras Chaves:** Hipóxico-isquêmico; Lesão cerebral; Asfixia; Modelos Animais; MicroPET

## ABSTRACT

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is one of the most common causes of infant mortality and morbidity. Statistical studies suggest that the mortality rate of newborns asphyxiated in the neonatal period is 20 to 50%, and more than 25% of the survivors present permanent neuropsychological disabilities, such as mental retardation, cerebral palsy, epilepsy and learning disabilities. The experimental model of neonatal HI, proposed by Rice et al., is the most accepted in the scientific community, mimicking several aspects of pathophysiology in the human condition. In this animal model, brain damage is achieved through the association of permanent occlusion of the right common carotid artery and subsequent exposure to a hypoxic environment (8% O<sub>2</sub>). The lesion is limited to the cerebral hemisphere ipsilateral to the occlusion and, similar to the clinical reality, there is great variability of the cerebral lesion. These observations stimulate experimental research aimed at understanding the development of brain injury and, a posteriori, maintaining the integrity of the CNS from therapeutic interventions. Thus, the objective of this study was to evaluate the brain injury of adult rats previously submitted to neonatal HI, through the *in vivo* analysis of cerebral glucose metabolism, and to correlate these findings with the cognitive performance of these animals. For this study, a total of 22 male Wistar rats with 7 days of life were used. At 7 days of life, Wistar rats were submitted to the neonatal HI model. At 60 days of life, 53 days after the induction of HI, these animals were submitted to imaging examinations by microPET (positron emission microtomography) and the <sup>18</sup>F-FDG radiopharmaceutical (<sup>18</sup>F-fluorodesoxyglucose) for analysis of cerebral glucose metabolism. Subsequently, the animals were evaluated for spatial memory through the Morris Water Maze test. Through microPET-FDG scanning, we observed a significant hemispheric cerebral hypometabolism ipsilateral to carotid occlusion in hypoxic-ischemic adult animals with possible detectable lesional area in the functional image. In addition, we have shown that there is an inversely proportional correlation between altered brain metabolism and spatial memory deficit of adult rats previously submitted to the neonatal HI model.

**Keywords:** Hypoxic-ischemic; Brain Injury; Asphyxia; Animal Models; MicroPET



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

18F-FDG	18F-fluordesoxiglicose
ATP	Adenosina trifosfato
BBB	Barreira hematoencefálica
DPN3	Dia pós-natal 3
DPN7	Dia pós-natal 7
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FDG	18F-Fluordesoxiglicose
Frutose-6P	Frutose-6-fosfato
GA3P	Gliceraldeído-3-fosfato
Glicose-6P	Glicose-6-fosfato
GLUT	Facilitador do transporte de glicose
HI	Hipóxia isquemia
HKII	Hexoquinase
LDH	Lactato desidrogenase
MCTs	Transportadores de monocarboxilato
microPET	Microtomografia por emissão de pósitrons
OH	2-hidroxila
PMADs	Padrões moleculares associados ao dano
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PPP	Via pentose fosfato

SNC	Sistema nervoso central
SUV	<i>Standardized uptake value</i>
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do modelo hipóxia – isquemia .....	20
Figura 2. Vias metabólicas. ....	22
Figura 3. Representação esquemática para o princípio do microPET. ....	25
Figura 4. Imagens obtidas com o Triumph™ MicroPET no InsCer PUCRS.....	27
Figura 5. Delineamento Experimental:.....	32
Figura 6. Representação gráfica do protocolo de indução do modelo experimental de HI neonatal.....	33
Figura 7. MicroPET do Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro (InsCer) - PUCRS .....	34
Figura 8. Teste para avaliação de memória espacial. ....	36

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Encefalopatia Hipóxica - Isquêmica.....	15
2.2 Modelo Animal de Hipóxia Isquemia neonatal .....	19
2.3 Metabolismo cerebral de glicose .....	21
2.4 Microtomografia por emissão de pósitrons (MicroPET).....	24
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
<b>4. HIPÓTESES .....</b>	<b>29</b>
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
5.1 Animais.....	30
5.1.2 Aspectos Éticos e de Biossegurança.....	30
5.1.3 Delineamento experimental.....	31
5.1.4 Modelo experimental.....	32
5.2 Escaneamento cerebral com FDG por MicroPET .....	33
5.3 Labirinto Aquático de Morris .....	35
5.4 Análise Estatística .....	36
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>45</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>46</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

A HI neonatal é uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade infantil, ela pode levar a óbito ou acarretar em variados graus de dano cerebral e sequelas (1). Estudos estatísticos sugerem que a taxa de mortalidade de recém-nascidos asfíxiados no período neonatal é de 20 a 50%, sendo que mais de 25% dos sobreviventes apresentam incapacidades neuropsicológicas permanentes, tais como retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldade de aprendizagem (2). Infelizmente, o manejo de crianças com asfíxia neonatal tem sido limitado a medidas de suporte, não dirigem-se diretamente à interrupção ou prevenção do processo de lesão cerebral (3). Tais observações estimulam pesquisas experimentais que objetivam entender o desenvolvimento da lesão cerebral e, *a posteriori*, manter a integridade do SNC a partir de intervenções terapêuticas.

Atualmente, a proposta experimental de Rice e colaboradores (4) é o modelo animal de HI neonatal mais aceito na comunidade científica. Semelhante ao contexto clínico há grande variabilidade da lesão cerebral frente ao insulto HI (5). Isto ocorre devido às individualidades anátomo-fisiológicas e de neuroplasticidade de cada animal (1,6). Sendo assim, tal variabilidade dificulta as análises experimentais e, apesar dos esforços em compensar este obstáculo, não existe um protocolo amplamente difundido para otimizar o grau de lesão cerebral. Alguns grupos de pesquisa usam como parâmetros o coeficiente de difusão aparente (ADC) obtido por microressonância magnética (7,8) ou a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral por Doppler (6,9). Rivers e colaboradores (2011) correlacionaram a indução de convulsão tônico-clônica durante a hipóxia com a presença de infarto cerebral (10). Porém, não há um trabalho na literatura que tenha caracterizado o funcionamento metabólico cerebral *in vivo* de animais submetidos ao modelo de hipóxia - isquemia neonatal.

Recentemente, tornou-se disponível no Brasil uma gama de tecnologias de imageamento pré-clínico que permitem investigar de forma não invasiva e *in vivo* ratos e camundongos. O imageamento molecular pré-clínico refere-se à visualização molecular não invasiva e em tempo real de eventos bioquímicos complexos que ocorrem nas células, tecidos ou em organismos vivos em contexto de pesquisa básica. Sem requerer a eutanásia do roedor, permite obter quantificações dinâmicas em delineamentos longitudinais, reduzindo drasticamente o número de animais utilizados e contribuindo para a

fidedignidade dos dados investigados. Sendo assim, objetivamos utilizar este recurso na caracterização *in vivo* da lesão cerebral HI neonatal, especificamente nas alterações estruturais e no metabolismo de glicose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 Encefalopatia Hipóxica - Isquêmica

A Hipóxia Isquemia (HI) é uma das principais causas de dano cerebral durante o desenvolvimento do neonato. Podendo levar a óbito ou gerar sequelas neurológicas em variados graus que vão desde comprometimentos leves ou incapacidades neuropsicológicas permanentes(11). Por isso a HI neonatal está relacionada com a presença de algumas patologias como a epilepsia, o autismo, o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtornos de aprendizagem, causando comprometimentos cognitivos nos indivíduos acometidos. Os achados neuropatológicos da HI variam de acordo com a maturidade fetal, a natureza e a extensão da lesão e podem resultar em diferentes tipos de lesões. (11–17)

Nas últimas décadas, os estudos em HI tem despertado interesse na comunidade científica, visto que a mesma é uma condição que ocorre em 1-6 por 1000 nascidos vivos, a incidência é de até 10 vezes maior nos países em desenvolvimento em que 15-20% dos recém-nascidos afetados morrerão no período pós-natal e 25% apresentarão déficits neurológicos (18,19). Devido ao aumento da taxa de sobrevivência dessas crianças, houve um aumento na incidência de pacientes com déficits a longo-prazo resultantes da lesão. Aproximadamente 90% das crianças com diagnóstico de encefalopatia severa (Sarnat III) no período perinatal apresentam incapacidades neurofuncionais e psicológicas permanentes, o que inclui retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, dificuldades de aprendizado ou evoluem para óbito. Nos casos de encefalopatia moderada (Sarnat II), 30-50% dos recém-nascidos desenvolvem sérios déficits neurológicos a longo prazo. Já neonatos com encefalopatia HI leve geralmente apresentam sequelas mínimas ou nenhuma (20).

A oferta adequada de oxigênio aos tecidos é fundamental para que as células mantenham o metabolismo e suas funções vitais. Assim, se há uma hipoperfusão tecidual significativa e diminuição da oferta de oxigênio, o que interfere na transferência de substrato e leva à asfixia fetal, pode ocorrer um dano encefálico. Frente a isso, e decorrente de alterações circulatórias e/ou complicações obstétricas, como a perfusão

placentária inadequada do lado materno (ex.: hipotensão materna), feto comprometido que não tolera o estresse do trabalho de parto (ex.: retardo do crescimento intra-uterino), falha ao inflar os pulmões após o nascimento, diminuição do fluxo sanguíneo pelo cordão umbilical (ex.: compressão do cordão), insuficiente troca de gases pela placenta (ex.: descolamento de placenta), também são causas da HI neonatal (3,11,13,14,21).

Nos seres humanos, a fase de maturação cerebral começa no primeiro trimestre gestacional e se estende até os primeiros anos de vida (22), o que sugere que o cérebro imaturo é particularmente mais suscetível a lesões e responde de formas distintas em relação ao adulto (23). No estado não patogênico, o sistema nervoso central neonatal possui uma regulação do fluxo sanguíneo independente, devido ao mecanismo de auto regulação (24), e possui uma atividade relativamente elevada com altas exigências de oxigênio e glicose que é metabolizada principalmente pela fosforilação oxidativa (25,26). Embora as consequências da HI neonatal possam ser observadas clinicamente, os processos patológicos precedentes ao início do dano ainda não estão totalmente elucidados. Estudos sugerem que não é apenas uma reação, mas uma complexa sequência de eventos que depende tanto da idade gestacional quanto da intensidade e da duração da HI, em que as lesões cerebrais resultantes são a consequência da isquemia sobreposta à hipóxia (27).

O processo de HI inicia imediatamente após o processo de asfixia neonatal, afetando a atividade neuronal devido a uma diminuição da oferta de oxigênio e glicose aos tecidos. Conforme o dano isquêmico avança, o Sistema Nervoso Central (SNC) é diretamente atingido e a atividade metabólica necessária para a manutenção da integridade funcional das células nervosas diminui (28). Este processo leva a uma lesão encefálica por meio da ativação de mecanismos excitotóxicos e apoptóticos, causadores de dano e morte celular, que permanecem ativos por horas ou dias (29,30). A morte celular após a HI tem seu auge 24 horas após a lesão e mantém-se em níveis elevados até 72 horas, onde neurônios e a linhagem de oligodendrócitos são os mais atingidos (5).

A carência energética decorrente da HI leva a uma alteração no metabolismo celular, com excessiva liberação de neurotransmissores excitatórios (ocasionando excitotoxicidade glutamatérgica) e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio. Este é um estado de energia ineficiente que resulta na rápida depleção de reservas de fosfato de alta energia, incluindo a molécula de adenosina trifosfato (ATP)



com neurotoxicidade subsequente (25,32,33). A redução da disponibilidade de ATP faz com que bombas dependentes de energia não consigam exercer suas funções, altera o equilíbrio iônico através da membrana celular e a célula neuronal fica impossibilitada de desencadear um potencial de ação. Em seguida, há um distúrbio na bomba de sódio e potássio, causando acúmulo de  $\text{Na}^+$  intracelular, difusão de  $\text{K}^+$  para fora da célula e aumento do influxo de cálcio. O acúmulo do cálcio citosólico é o principal fator desencadeante que causa a morte celular induzida pela HI e reperfusão (34–36). O ganho de soluto é acompanhado de ganho isosmótico de água e consequentemente edema celular. O aumento desses compostos promove uma agressão intensa às células, com inibição total das mitocôndrias, falência completa das bombas iônicas, edema e lise celular, ruptura das organelas, extravasamento do citoplasma no meio extracelular e presença de resposta inflamatória intensa com fagocitose e peroxidação lipídica de membrana induzindo à necrose (34).

A morte de células nervosas pode desenvolver-se de duas formas: a necrose e apoptose. Na necrose há edema, fratura das membranas celulares e reação inflamatória intensa, determinada por insulto intenso e de curta duração. A apoptose decorre da agressão lenta à célula, com inibição parcial da fosforilação oxidativa, redução do tamanho da célula e ruptura do DNA. Frente a isso, a lesão HI produz cistos necróticos dentro do parênquima cerebral, tratando-se de um processo passivo de morte celular. Após este processo, dá-se início a uma fase tardia de dano tecidual caracterizada pela morte celular apoptótica (18,37–39).

A resposta imune no SNC é mediada principalmente por células gliais, como astrócitos e microglia. Esses atuam como sensores intrínsecos na detecção de padrões moleculares associados ao dano (PMADs), reagindo a insultos de forma rápida e efetiva, principalmente na liberação de citocinas próinflamatórias (40). O conjunto de reações das células gliais frente a um insulto é chamado de gliose reativa (31,41). As células microgliais são o componente imunitário do sistema nervoso, com uma importante função, mesmo na ausência de lesões. Estas, ao detectarem PMADs, tornam-se reativas, passando a liberar citocinas e adquirindo uma função fagocítica (31,42). Os astrócitos, por sua vez, são protagonistas nos eventos relacionados com a progressão da lesão HI. Essas células dão suporte metabólico para os neurônios, fator que é de especial importância em eventos isquêmicos, pois neles o suprimento de glicose é reduzido.

Astrócitos também fazem a recaptação de neurotransmissores, que, durante insultos como a HI, são liberados em excesso e geram excitotoxicidade. Por fim, eles participam do combate às produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) que também são liberadas em excesso após a lesão (31,41,42).

Infelizmente, o tratamento de crianças com asfixia neonatal tem sido limitado a medidas de suporte, as quais não se dirigem diretamente à interrupção ou prevenção do processo de lesão cerebral (3). Dessa forma, o diagnóstico destas crianças dependerá de observações de um clínico experiente, investigações por imagem e laboratoriais. Segundo os critérios da Academia Americana de Pediatria, para se estabelecer o diagnóstico de asfixia perinatal, é necessário haver manifestações neurológicas e de disfunção multissistêmica. Os recém-nascidos com asfixia têm baixos índices de Apgar aos primeiros 5 minutos, exibem exame neurológico anormal, acidose metabólica e muitas vezes têm convulsões, podendo haver a necessidade de suporte respiratório nas primeiras horas de vida pós-natal (39,43). A presença - ou ausência - de edema cerebral pode ser um achado precoce da HI, identificando áreas de necrose/apoptose cerebral. Clinicamente, o aumento da pressão intracraniana do recém-nascido manifesta-se muito tardiamente na evolução do edema cerebral, observando-se fontanela abaulada e tensa, hipertermia de origem central, convulsões e demais manifestações neurológicas observadas em HI neonatal. Nestes casos, já existe necrose cerebral extensa e irreversível (44).

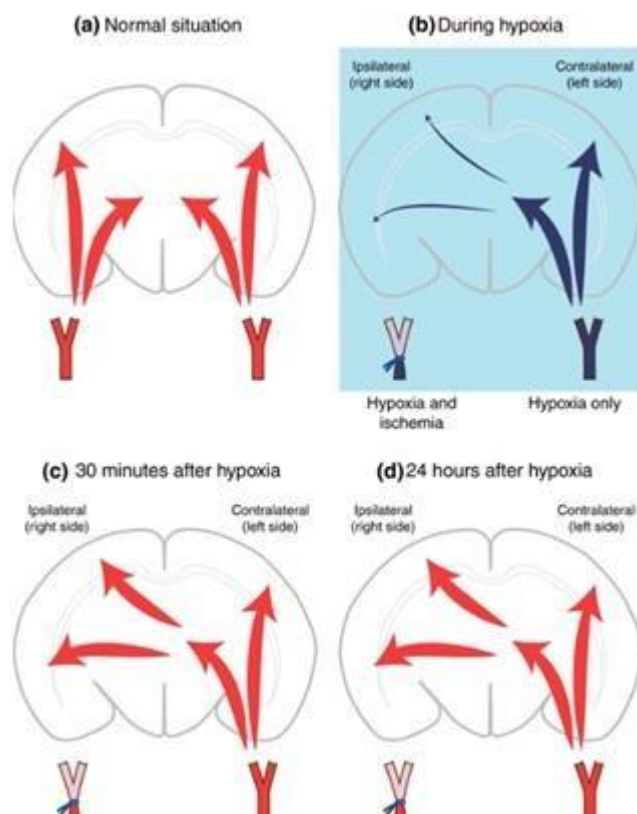
Tais evidências estimulam pesquisas experimentais que objetivam elucidar ainda mais o desenvolvimento da lesão cerebral e, *a posteriori*, manter a integridade do SNC a partir de intervenções terapêuticas. Para tal, a utilização de um modelo animal apropriado é parte fundamental deste processo de pesquisa translacional.

## 2.2 Modelo Animal de Hipóxia Isquemia neonatal

Frente às dificuldades de diagnóstico e a procura por intervenções terapêuticas inovadoras, foram desenvolvidos modelos animais de HI neonatal. Tais modelos servem para o estudo dos mecanismos fisiológicos e patológicos, a compreensão sobre a evolução da lesão e os seus desfechos, bem como o desenvolvimento de terapias. Muito do nosso conhecimento atual a respeito da fisiologia neonatal em humanos, assim como a utilização de intervenções e desdobramentos dos mecanismos envolvidos, deriva de estudos pré-clínicos. Tais avanços são possíveis em virtude dos modelos animais permitirem investigações controladas e prospectivas (45).

Esses modelos são adequados quando conseguem mimetizar o fenômeno em questão e, também, quando possibilitam desenvolver complicações agudas semelhantes à clínica. Embora a correlação do desenvolvimento humano e de roedores seja ainda foco de discussão, observações sobre o crescimento cerebral e processos de mielinização na substância branca sugerem que as primeiras duas semanas de desenvolvimento de roedores sejam compatíveis com o período de desenvolvimento cerebral de fetos com 32-34 semanas de idade gestacional (46).

O modelo experimental descrito por Levine (1960), em ratos adultos, e posteriormente adaptado para ratos neonatos, por Rice e colaboradores (1981), é amplamente utilizado para o estudo da lesão HI no período neonatal (47,48). O respectivo modelo combina a ligação unilateral da artéria carótida comum à posterior exposição dos animais a um período variável de hipóxia, visando mimetizar a combinação de hipoxemia e isquemia encontrada em neonatos humanos após um quadro de asfixia (4) (Figura 1). Esse modelo é amplamente utilizado e mimetiza diversos danos observados na clínica como alterações no desenvolvimento e morte de oligodendrócitos, cistos necróticos na substância branca e córtex, dano axonal, ativação microglial, morte neuronal e ventriculomegalia (49).



**Figura 1. Representação esquemática do modelo hipóxia – isquemia.** (a) demonstra o fluxo cerebral em uma situação normal. Em (b), a artéria carótida comum direita foi ligada permanentemente. No entanto, a ligação sozinha não causa danos cerebrais. Quando o animal é sujeito a hipóxia sistêmica, a combinação de ligação e hipóxia leva a uma redistribuição do fluxo sanguíneo cerebral. O fluxo sanguíneo no hemisfério cerebral contralateral à oclusão não apresenta alterações significativas. Já o córtex parietal e frontal, bem como a substância branca subcortical ipsilateral à oclusão, recebem apenas 15-20% do fluxo sanguíneo prévio. Quando a hipóxia sistêmica é interrompida, o fluxo sanguíneo é restabelecido e, 30 minutos após a hipóxia (c), o hemisfério ipsilateral à ligação tem fluxo sanguíneo igual ao do hemisfério contralateral à ligação, ou seja, é reperfundido. Este fluxo sanguíneo é mantido pelo menos até 24 h após a hipóxia (d) (50).

Para mimetizar a HI em nascidos prematuros, utiliza-se o modelo no dia pós-natal 3 (DPN3) em roedores (17,51,52). Essa idade é utilizada porque a maturação de oligodendrócitos, o desenvolvimento do sistema imunitário e a formação da barreira hematoencefálica são equivalentes ao encontrado em fetos entre a 23<sup>a</sup> e 32<sup>a</sup> semana de gestação. O modelo que simula a HI em recém-nascidos a termo, no entanto, é realizada em ratos no dia pós-natal 7(DPN7), pois com essa idade há o pico de crescimento encefálico e gliogênese, aumento da densidade axonal e dendrítica, maior maturação de

oligodendrócitos, e a consolidação do sistema imunitário, que são equivalentes ao encontrado em humanos entre a 36<sup>a</sup> e 40<sup>a</sup> semana de gestação (53).

A soma da isquemia unilateral com a hipóxia sistêmica causa danos localizados predominantemente no hemisfério ipsilateral à carótida ocluída, sendo o hemisfério contralateral afetado em menor grau ou mesmo não afetado morfológicamente (4,54,55). O modelo de HI perinatal realizado no DPN7 causa lesões no córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base). No entanto, a estrutura mais afetada é o hipocampo (16,56). Além disso, este modelo apresenta alta reprodutividade, baixo custo, baixa mortalidade e cerca de 90% dos animais apresentam danos cerebrais (57).

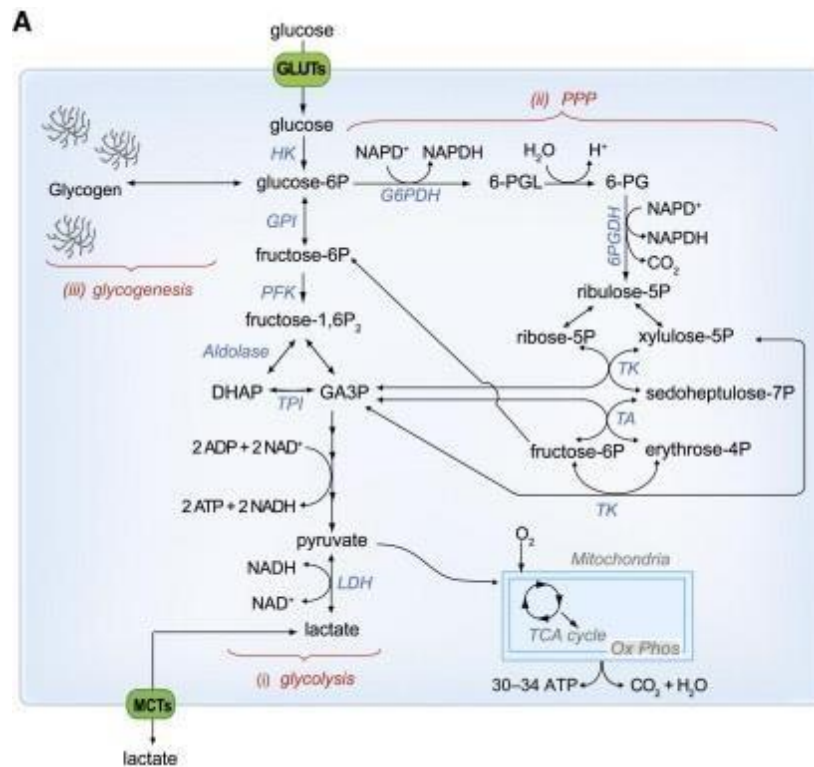
Todas as alterações referentes a esse modelo de lesão HI neonatal são condizentes com os achados observados em recém-nascidos após o insulto HI, o que torna esse modelo um importante aliado para os estudos fisiopatológicos.

### **2.3 Metabolismo cerebral de glicose**

O metabolismo da glicose tem sido estudado minuciosamente no cérebro adulto. Contudo, pouco se sabe sobre o metabolismo de glicose neonatal, embora alguns aspectos já tenham sido publicados, tais como a ontogênese dos transportadores (58) os níveis enzimáticos e as atividades enzimáticas (59,60). Apesar dos níveis circulantes de glicose não apresentarem grandes variações durante o desenvolvimento, o seu consumo no encéfalo varia muito (50).

O consumo de glicose encefálico no neonato é de aproximadamente 50% do consumo adulto, além disso todas as enzimas da via glicolítica e do ciclo do ácido tricarboxílico aumentam entre o período neonatal e o adulto (50). O aumento no consumo de glicose no encéfalo está diretamente relacionado com a presença de transportadores de glicose (GLUT), entre os principais estão o GLUT1 e o GLUT3. GLUT1 é o transportador responsável pelo transporte de glicose sobre a barreira hemato-encefálica (BBB), mas também está presente na glia, enquanto que GLUT3 GLUT3 é o transportador

predominantemente expresso em neurônios (50,58–61). A glicose dentro da célula é então fosforilada pela hexoquinase (HK) para produzir glicose-6-fosfato. A glicose 6-fosfato pode ser processado através de diferentes vias metabólicas, sendo as principais: a glicólise, a via pentose fosfato (PPP) e a glicogênese (em astrócitos) (figura 2) (62).



**Figura 2. Vias metabólicas.** A glicose entra nas células através de transportadores de glicose (GLUTs) e é fosforilada por HK para produzir glicose-6-fosfato (glicose-6P). A glicose-6P pode ser metabolizada em três principais vias. Em primeiro lugar, pode ser metabolizada através da glicólise (i), dando origem a duas moléculas de piruvato e produzindo ATP (2 ATP) e NADH. O piruvato pode então entrar mitocôndrias, onde é metabolizado através do ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa produzindo ATP (30 a 34) e CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, enquanto consome oxigênio. O piruvato também pode ser reduzido a lactato pela lactato desidrogenase (LDH). O lactato é libertado no espaço extracelular através de transportadores de monocarboxilato (MCTs). Alternativamente, a glicose-6P pode ser processada através da via pentose fosfato (PPP) (ii), que leva a produção de ribose-5-fosfato, CO<sub>2</sub> e o NADPH. A PPP e a glicólise estão ligados ao nível de gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e frutose-6-fosfato (frutose-6P). Em astrócitos, a glicose-6P também pode ser utilizada para armazenar glicogênio pela glicogênese (iii) (62).

O cérebro é o órgão que mais necessita de energia por peso corporal. Cerca de 20% do oxigênio e 25% da glicose consumida pelo corpo humano são dedicados a

funções cerebrais (63). No cérebro adulto, a glicose é a principal fonte energética, já para o cérebro neonatal é possível utilizar corpos cetônicos e lactato além de glicose (62–65). Os corpos cetônicos e o lactato são capturados sobre o BBB através dos transportadores de monocarboxilato (MCTs). Enquanto MCT1 é encontrado tanto na glia como nos neurônios em um cérebro imaturo, a expressão do MCT2 é primariamente neuronal (73–74). Os níveis de GLUT1 e GLUT3 são baixos no nascimento em relação ao cérebro adulto, e aumentam gradualmente para atingir os níveis de adultos em 30 dias no caso de GLUT1 e em 21–30 dias no caso de GLUT3. Isto significa que o metabolismo cerebral da glicose pode ser limitado pela capacidade de transporte nesta fase de desenvolvimento (66).

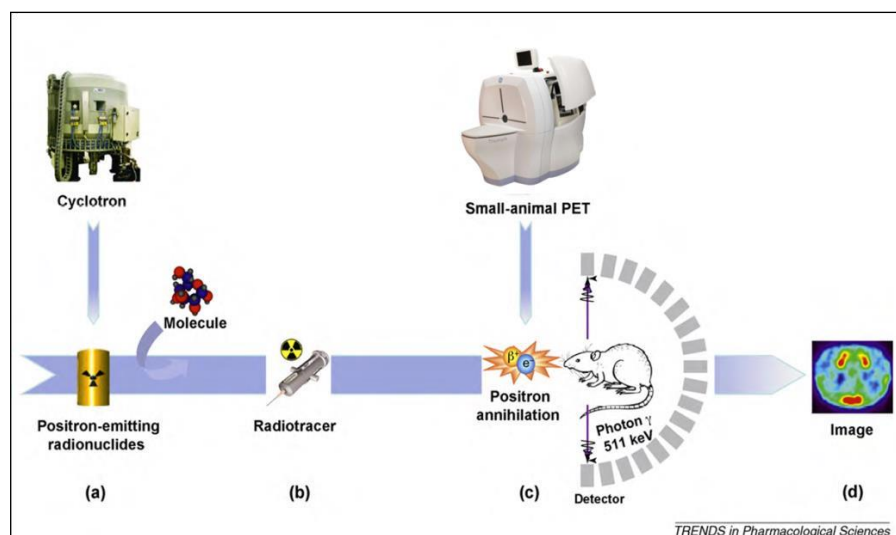
Na HI, a falta de oxigênio reduz a fosforilação oxidativa e a atividade do ciclo TCA nas mitocôndrias. Assim, a glicólise anaeróbia torna-se a principal fonte de ATP. A demanda de energia é suprida pela degradação do glicogênio nos astrócitos e por uma regulação positiva da glicólise anaeróbia. A utilização de glicose para a glicólise anaeróbia é altamente ineficiente e, em conjunto com o armazenamento limitado de glicogênio, provoca uma rápida depleção da glicose cerebral (64). Os astrócitos são os principais defensores do metabolismo neuronal através da geração de intermediários do ciclo TCA pela carboxilação do piruvato e transferência de glutamina para os neurônios (1,62–67). Mas mesmo que a demanda de energia no cérebro neonatal possa ser suprida em grande parte pelo fornecimento de corpos cetônicos, a glicose é essencial devido à sua participação em uma via funcional da PPP e atividade de piruvato carboxilase. Semelhante ao observado no cérebro adulto, os neurônios metabolizam a maior parte da glicose ao nível do piruvato. Durante a elevada produção de neurotransmissores, a atividade de piruvato carboxilase é priorizada, pois existe transferência substancial de glutamina dos astrócitos para neurônios e uma baixa transferência de glutamato dos neurônios para os astrócitos (50). Por fim, o metabolismo neonatal é longe de ser idêntico ao dos adultos e por isso há uma grande necessidade de novas pesquisas de metabolismo cerebral em modelos neonatais.

## 2.4 Microtomografia por emissão de pósitrons (MicroPET)

A utilização de animais de pequeno porte tem um papel fundamental na experimentação científica. Recentemente, tornou-se disponível no Brasil uma gama de tecnologias de imageamento pré-clínico que permitem investigar de forma não invasiva e *in vivo* ratos e camundongos. Com isso, a visualização anatômica e molecular, sem requerer a eutanásia do roedor, permite aos pesquisadores a oportunidade de obter quantificações dinâmicas em delineamentos longitudinais. Além disso, pode-se acompanhar a origem e progressão de doenças, reduzindo drasticamente o número de animais utilizados e contribuindo para a fidedignidade dos dados investigados. Ao contrário das análises que utilizam células, órgãos e amostras teciduais isoladas, os dados obtidos através da imagem molecular, de maneira não-invasiva e em tempo real, são adquiridos em condições fisiológicas reais e sem alteração do microambiente natural celular. Pode-se destacar uma destas tecnologias: a microtomografia por emissão de pósitrons (microPET), derivada do equipamento clínico de tomografia por emissão de pósitrons (PET) (68).

Desenvolvido pelo Dr. Simon Cherry e seus colaboradores (69), o sistema de microPET, assim como o seu equivalente clínico, possui a capacidade de determinar a distribuição espacial e temporal *in vivo* de compostos marcados com um dado radionuclídeo. A técnica consiste no princípio de que um isótopo, produzido em um ciclotron e ligado ao um radiofármaco, decai com a emissão de pósitrons. Após uma série de colisões com elétrons atômicos do tecido, este pósitron se aniquila com um elétron, produzindo dois fótons de alta energia que são emitidos em direções opostas. A detecção coincidente destes fótons é a base para a geração de uma imagem por microPET (70). O microPET é uma modalidade de imagem funcional para investigação de processos bioquímicos, fisiológicos, patológicos ou farmacológicos *in vivo* (Figura 3) (71,72).



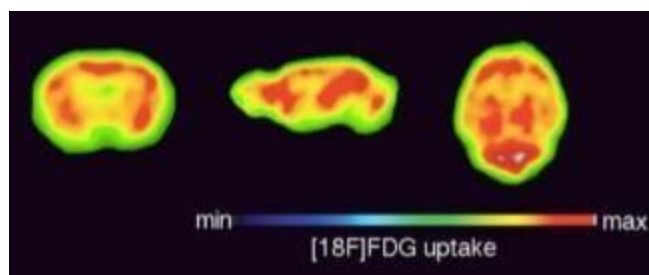


**Figura 3. Representação esquemática para o princípio do microPET.** (a) O ciclotron gera radionuclídeos emissores de pósitrons. Estes compostos são geralmente isótopos tais como oxigênio-15 ( $^{15}\text{O}$ ), nitrogênio-13 ( $^{13}\text{N}$ ), carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ) e flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ) com tempo de meia-vida de 2, 10, 20 e 110 minutos, respectivamente. (b) Estes radionuclídeos são incorporados em moléculas durante uma etapa de radiosíntese, gerando um “radiotraçador” específico ( $^{18}\text{F}$ -FDG). (c) Exames de microPET são obtidos após a administração intravenosa ou intraperitoneal deste radiotraçador. O marcador acumula-se no tecido em estudo e o seu radionuclídeo decai através da emissão de um pósitron. Após percorrer alguns poucos milímetros, o pósitron colide com um elétron e libera, simultaneamente, dois raios gama (fótons) com energia de 511 KeV em direções opostas. Estes fótons são detectados por uma câmara PET e simultaneamente localizados dentro de um período fixo de tempo por uma série de detectores opostos, que corresponde a múltiplos anéis constituídos por cristais de cintilação. (d) Através de um número significativo de eventos radioativos, algoritmos matemáticos reconstróem tridimensionalmente uma imagem que demonstrará a distribuição de moléculas emissoras de pósitron em determinado tecido corpora (71).

Para que um escaneamento de microPET possa ser realizado, sempre haverá a necessidade de administrar no animal um radiotraçador, muitas vezes referido como radiofármaco. As imagens de PET obtidas são quantitativas e por isso são importantes para estudo da pesquisa básica e clínica. A unidade quantitativa utilizada é o *standardized uptake value* (SUV) (73) que define a razão entre a concentração do radiofármaco em determinada região para a concentração média no corpo (59).

Existem vários radiofármacos disponíveis para exames de microPET. Atualmente, o mais usado na medicina nuclear e, possivelmente, na pesquisa básica é a 18F-Fluordesoxiglicose (18F-FDG) (74). Este é um análogo da glicose e possui um átomo de 18F na posição 2 da molécula em substituição ao grupo hidróxi. Uma vez injetado no organismo, é rapidamente captado por células que utilizam grandes quantidades de glicose e por isso é excelente para o estudo de tecidos com alta atividade metabólica (74,75).

O 18F-FDG é transportado para o interior das células através do facilitador do transporte de glicose (GLUT) sendo absorvido por células que possuem alta atividade metabólica de glicose. No citoplasma, sofre fosforilação através das HK, impedindo que seja novamente liberada. O grupo 2-hidroxila (OH) da glicose é necessário para promover a glicólise. No caso do FDG, este grupo hidroxila está ausente, impedindo que a molécula seja metabolizada e permanecendo retida no interior da célula. Como resultado, o acúmulo de 18F-FDG é um indicativo preciso da metabolização celular de glicose (Figura5) (75,76). Assim, a utilização desta refinada técnica computacional oferece uma oportunidade única para análises metabólicas, visto que fornecem dados globais e regionais sobre o consumo de glicose no cérebro. Permitindo definir padrões do metabolismo cerebral que podem ser utilizadas para comparação com exames de seguimento realizados no mesmo indivíduo, possibilitando avaliar a evolução de possíveis alterações cerebrais.



**Figura 4. Imagens obtidas com o Triumph™ MicroPET no InsCer PUCRS.** As imagens acima indicam o metabolismo de glicose in vivo, através do  $^{18}\text{F}$ -FDG, no cérebro de um rato Wistar controle em três cortes anatômicos (coronal, sagital e transversal) (Centro de Pesquisa Pré-Clinica do InsCer PUCRS).

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o metabolismo cerebral de glicose *in vivo* e a memória espacial de ratos adultos previamente submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

#### 3.2 Objetivos específicos

– Quantificar *in vivo* o metabolismo cerebral de glicose em ratos adultos controle e daqueles submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, através do escaneamento por microPET e do emprego do radiofármaco  $^{18}\text{F}$ -FDG;

– Avaliar a capacidade de aprendizagem e memória espacial de ratos adultos controle e daqueles submetidos à hipóxia-isquemia neonatal, através da versão espacial do teste do Labirinto Aquático de Morris;

– Correlacionar os achados do metabolismo cerebral de glicose e do desempenho cognitivos de ratos adultos controle e daqueles submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

#### **4. HIPÓTESES**

---

O metabolismo cerebral de glicose está alterado em ratos adultos previamente submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal, sendo este parâmetro correlacionado ao desempenho cognitivo destes animais.

## 5. METODOLOGIA

---

### 5.1 Animais

#### 5.1.2 Aspectos Éticos e de Biossegurança

Os protocolos experimentais utilizados foram submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, sob o número de protocolo 31939 e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório.

Os procedimentos realizados no presente projeto foram feitos por experimentadores treinados no manejo dos animais, respeitando a lei no 11,794 de 8 de outubro de 2008, diretrizes do CONCEA e os Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences [CIOMS] NIH publication 85-23, 1985).

Foram utilizadas 06 ratas fêmeas Wistar prenhas, com idade superior a 90 dias, obtidas no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. As fêmeas foram mantidas em caixas isoladas (a partir do 19º dia gestacional) até o momento do nascimento. Após o nascimento, as ninhadas foram padronizadas em até 10 ratos machos neonatos (a adequação ao número de animais é realizada no DPN1). A padronização e distribuição dos animais nos grupos experimentais ocorreram de forma randomizada (70–74). Os animais foram mantidos em condições controladas de luz – ciclo 12/12h de claro-escuro – e temperatura –  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  – e água e ração *ad libitum*. Após o desmame, os animais foram mantidos em um máximo de quatro animais por caixa-moradia.

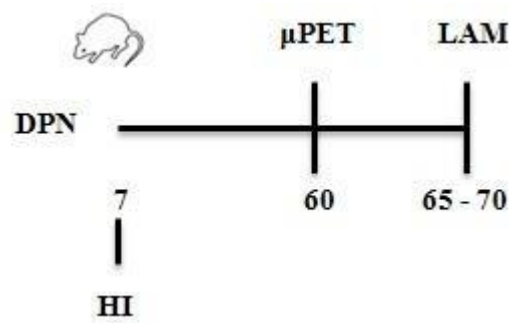
Os procedimentos com material radioativo foram acompanhados pelo supervisor de proteção radiológica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) e realizados por profissionais qualificados e treinados para utilizar o microPET.

### 5.1.3 Delineamento experimental

Aos 7 dias de vida (DPN 7), os animais foram submetidos ao modelo de HI no instituto de Bioquímica da UFRGS e randomizados em dois grupos experimentais: Sham (n= 11) e grupo HI (n= 11). O grupo Sham foi constituído de animais controles que foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria carótida e da exposição a ambiente hipóxico.

Para os exames de imagem por microPET os animais foram transportados até o biotério do Centro de Pesquisa Pré-Clínica do InsCer 48 h antes do dia do scan e após retornaram para o instituto de Bioquímica da UFRGS para o teste comportamental do labirinto aquático de Morris.

Após as análises das imagens de microPET, os animais do grupo HI foram subdivididos em dois grupos: HI com lesão detectável no microPET (HI L, n = 5), constituído daqueles animais que apresentaram área cística e de hipometabolismo evidente na imagem, e HI sem lesão aparente no microPET (HI SL, n= 6).



**Figura 5. Delineamento Experimental:** Os animais aos 7 dias de vida (DPN7) foram submetidos ao procedimento cirúrgico de Hipóxia isquemia (HI). O teste de imageamento foi realizado aos 60 dias de vida do animal. Com 65 dias de vida os animais realizaram do Labirinto aquático de Morris.

#### 5.1.4 Modelo experimental

No presente estudo, foi utilizado o modelo experimental descrito por Levine e, posteriormente, modificado por Rice e colaboradores (1981) para ratos neonatais (4,48). Na primeira fase do estudo, os animais aos 7 dias de vida (DPN7), com peso variando de 12 a 15g, foram anestesiados com halotano através de uma máscara facial. A artéria carótida comum direita foi identificada através de uma incisão transversal na linha média da face anterior do pescoço, isolando o nervo vago, e ocluindo permanentemente em dois locais com linha cirúrgica de seda 7.0, utilizando-se do microscópio cirúrgico durante os procedimentos. O procedimento cirúrgico ao todo foi concluído dentro de 15 min. Depois de suturados, os animais ficaram em observação sob luz aquecida até a recuperação da anestesia, quando então foram devolvidos para recuperação em suas caixas moradias juntamente com suas mães.

Após o período de recuperação e de alimentação (2-4 horas após procedimento cirúrgico), os filhotes foram colocados dentro de uma câmara feita de acrílico transparente (1500 mL) e expostos a ambiente a 8 % de oxigênio - 92 % nitrogênio (White Martins®) liberado a 5 l/min por 1 hora. A câmara permaneceu imersa parcialmente em água morna (36-37°C) para manter a temperatura constante dentro dos limites fisiológicos. Foi



colocado um medidor de oxigênio do ar conectado à câmara para monitorar as concentrações no interior do recipiente (39,40,70–74).

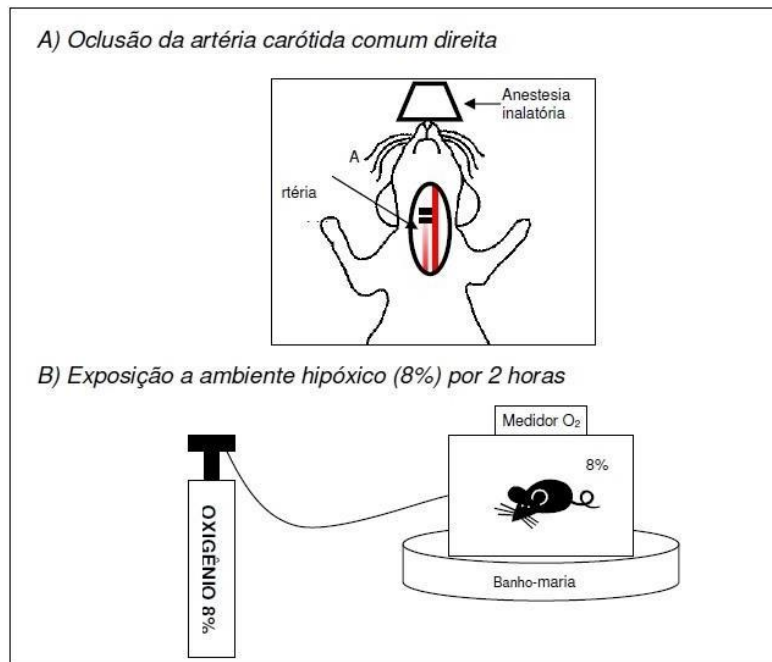


Figura 6. Representação gráfica do protocolo de indução do modelo experimental de HI neonatal (82)

## 5.2 Escaneamento cerebral com FDG por MicroPET

Os animais foram submetidos a exames de imagem por microPET, Triumph™ microPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA), no Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, 53 dias após a indução da HI (DPN 60) (Figura 8). Os animais foram transportados até o CPPC do InsCer 48 h antes do dia do scan e permaneceram em jejum pré-scan de 12 a 24 horas a fim de intensificar a captação cerebral de  $^{18}\text{F}$ -FDG. No dia do scan, os animais foram individualmente anestesiados com uma mistura isoflurano e oxigênio (3-4% para indução e 2-3% de manutenção) e 1 mCi de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi administrado por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram devolvidos à gaiola e permaneceram conscientes durante um período de 40 minutos para captação do radiofármaco. Os animais permaneceram sobre uma placa aquecida para manter a temperatura fisiológica corporal (36°C). Após o período de captação, os ratos foram, individualmente, posicionados sobre a cama apropriada na

câmara de imageamento para a aquisição da imagem, que foi aquecida a fim de manter a temperatura do animal, e permaneceram anestesiados durante todo o procedimento. Foram realizadas aquisições estáticas por 10 minutos com um campo de visão (FOV: 3,75 cm) centrado na cabeça do rato. Ao término dos escaneamentos, o rato foi retirado do aparelho e permaneceu dentro de sua caixa, sobre uma placa de aquecimento, até completa recuperação. O algoritmo de reconstrução para o processamento das imagens de microPET foi MLEM-3D e a captação de FDG cerebral foi quantificada através do software PMOD v3.5 e Fusion Toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Suíça) (86).

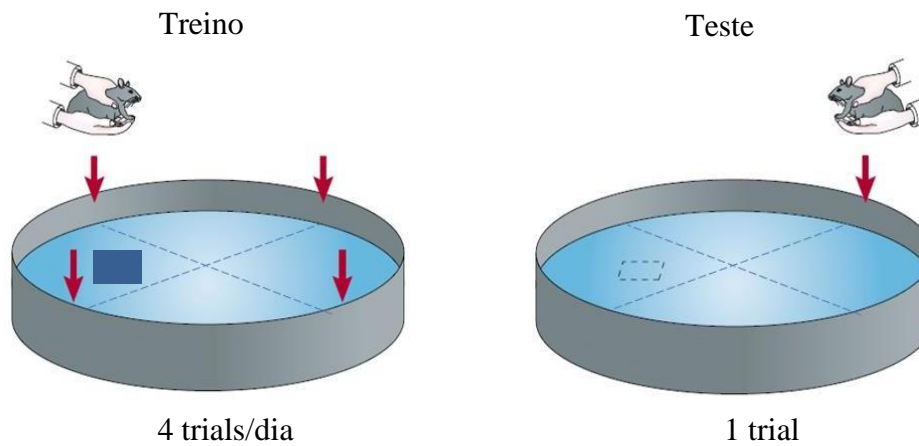


**Figura 7. MicroPET do Centro de Pesquisa Pré-Clinica do Instituto do Cérebro (InsCer) - PUCRS.**

### 5.3 Labirinto Aquático de Morris

Para avaliar a memória espacial dos animais, foi utilizado a versão espacial do labirinto aquático de Morris (LAM), que consiste de um tanque circular, de 200 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade, virtualmente dividido em 4 quadrantes, com água a uma altura de 25 cm mantida a temperatura de  $\pm 23^{\circ}\text{C}$ . O tanque fica situado em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Em um dos quadrantes uma plataforma de 10 cm de diâmetro fica posicionada submersa a 2 cm abaixo da superfície da água, invisível ao animal. Nos 4 quadrantes existe um ponto de partida designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). O LAM é dividido em duas fases: treino e teste.

Na fase de treino, durante 5 dias consecutivos os animais são treinados a achar a plataforma. Cada rato é solto no tanque uma vez a partir de cada um dos 4 pontos de partida situado nos quadrantes. Deixa-se o animal nadar livremente até achar a plataforma por no máximo 60 segundos, para cada *trial* o tempo de latência até o animal encontrar a plataforma é cronometrado. A plataforma permanece no mesmo local durante todo o período de treino. Vinte e quatro horas após o último dia de treino, na fase de teste, foi realizado o teste de retenção de memória. A plataforma é retirada e os animais são deixados para nadar livremente por 60 segundos partindo de um único ponto (Oeste), mais uma vez o tempo até o animal encontrar a plataforma é cronometrado. Os animais foram filmados e os dados registrados pelo software ANY-MAZE. A curva de aprendizado ao longo dos dias de treinamento e o tempo de latência para encontrar a plataforma no dia do teste foram os parâmetros avaliados (83).



**Figura 8. Teste para avaliação de memória espacial.** Representação gráfica do protocolo para a avaliação de memória espacial no Labirinto aquático de Morris (85).

#### 5.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software PrismGraph 6.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Os dados foram expressos em média e erro padrão para variáveis de distribuição normal, e para todas as variáveis foi considerado um nível de significância  $p < 0,05$ .

A ANOVA de uma via ou teste t de Student foram aplicados para análise dos resultados obtidos nos exames de imageamento por microPET. Para análise da curva de aprendizagem do LAM foi utilizado ANOVA de duas vias seguidas do post-hoc de Bonferroni e para a latência ANOVA de uma via. Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson (r).

## 6. CONCLUSÕES

---

O presente estudo demonstrou que há uma alteração no metabolismo de glicose em ratos adultos previamente submetidos à HI neonatal, apresentando área hipometabólica detectável no exame de microPET-FDG. Foi demonstrado também uma correlação entre o hipometabolismo cerebral e déficits na memória espacial de ratos adultos hipóxico-isquêmicos.

No entanto, alguns animais hipóxico-isquêmicos não desenvolveram área “lesional” de hipometabolismo evidente e alteração deste parâmetro na imagem funcional o que demonstra a neuroplasticidade do encéfalo imaturo.

## 7. REFERÊNCIAS

---

1. Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. Glycolysis and perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Dev Neurosci*. 2005;27(2–4):185–90.
2. Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol*. 2012;39(4):919–29.
3. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*. 2000;17(3):113–20.
4. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981;9(2):131–41.
5. Procianoy RS, Silveira RC. Hypoxic-ischemic syndrome. *J Pediatr (Rio J)*. 2001;77 Suppl 1:S63-70.
6. Ohshima M, Tsuji M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T. Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Exp Neurol [Internet]*. 2012;233(1):481–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.025>
7. Ghosh N, Recker R, Shah A, Bhanu B, Ashwal S, Obenaus A. Automated ischemic lesion detection in a neonatal model of hypoxic ischemic injury. *J Magn Reson Imaging*. 2011;33(4):772–81.
8. Recker R, Adami A, Tone B, Tian HR, Lalas S, Hartman RE, et al. Rodent Neonatal Bilateral Carotid Artery Occlusion with Hypoxia Mimics Human Hypoxic-Ischemic Injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(7):1305–16.
9. Bonnin P, Leger P-L, Deroide N, Fau S, Baud O, Pocard M, et al. Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J Neurosci Methods*. 2011;198(1):103–9.
10. Rivers JR, Sutherland BA, Ashton JC. Characterization of a rat hypoxia-ischemia model where duration of hypoxia is determined by seizure activity. *J Neurosci Methods*. 2011;197(1):92–6.
11. Volpe JJ. Neonatal Neurology—My Personal Journey and Some Lessons Learned. *Pediatr Neurol*. 2014;51(6):753–7.
12. Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res*. 2003;973(2):171–8.

13. Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;30(2):107–34.
14. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci.* 2001;23(3):198–202.
15. Huang Z, Liu J, Cheung P-Y, Chen C. Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res.* 2009;1301:100–9.
16. Pereira LO, Nabinger PM, Strapasson ACP, Nardin P, Gonçalves CAS, Siqueira IR, et al. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia–ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Res.* 2009;1247:188–95.
17. Sanches EF, Arteni N, Nicola F, Aristimunha D, Netto CA. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia–ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience.* 2015;290:581–93.
18. Shankaran S. Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009;26(3):437–43.
19. Souza FM de S, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira. Departamento de Ensino. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher. Rio de Janeiro, RJ B. Fatores associados à asfixia perinatal no Brasil: estudo populacional com base no sistema de informações de nascidos vivos. 2003;
20. Dilenge ME, Majnemer A, Shevell MI. Long-term developmental outcome of asphyxiated term neonates. *J Child Neurol.* 2001;16(11):781–92.
21. Ranzan J, Rotta NT. Ischemic stroke in children: a study of the associated alterations. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62(3A):618–25.
22. Caram LHA, Funayama CAR, Spina CI, Giuliani L de R, de Pina Neto JM. [Investigation of neurodevelopment delay etiology: resources and challenges]. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(2B):466–72.
23. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol.* 2004;11(1):31–46.
24. Castillo J. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev Neurol.* 2000;30(5):459–64.
25. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.* 2006;28(9):1353–65.
26. Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short-

- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci.* 2006;9(4):338–49.
27. Greggio S, Costa J, Costa D. Crises convulsivas associadas à hipóxia neonatal e o potencial uso terapêutico do neuropeptídeo NAP Hypoxia-associated neonatal seizures and potential therapeutic use of neuropeptide NAP. 2008;18(1):45–53.
  28. Hossmann K-A. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology.* 2008;55(3):257–70.
  29. Barks JDE, Silverstein FS. Excitatory Amino Acids Contribute to the Pathogenesis of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Brain Pathol.* 1992;2(3):235–43.
  30. Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J Comp Neurol.* 1997;378(1):70–87.
  31. Liu F, McCullough LD. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(9):1121–30.
  32. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391–7.
  33. Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, Ma D, Edwards AD, Hagberg H, et al. Preconditioning and Postinsult Therapies for Perinatal Hypoxic–Ischemic Injury at Term. *Anesthesiology.* 2010;113(1):233–49.
  34. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(1):G15–26.
  35. Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr.* 1998;132(3 Pt 2):S30-4.
  36. du Plessis AJ, Johnston M V. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol.* 1997;24(3):627–54.
  37. Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1beta in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(8):833–9.
  38. Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, et al. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke.* 1998;29(12):2622–30.
  39. Liao Y, Cotten M, Tan S, Kurtzberg J, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant.*



2013;48(7):890–900.

40. Zhao J, Chen Y, Xu Y, Pi G. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci*. 2013;31(7):543–9.
41. Burda JE, Sofroniew M V. Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron*. 2014;81(2):229–48.
42. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F, et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol*. 2005;31(1–3):105–16.
43. American Academy of Pediatrics.; American College of Obstetricians and Gynecologists. Guidelines for perinatal care. 4th ed. Elk Grove Village, Ill. : American Academy of Pediatrics ; Washington D: AC of O and G, organizador. 1997. 93-125 p.
44. Lupton BA, Hill A, Roland EH, Whitfield MF, Flodmark O. Brain swelling in the asphyxiated term newborn: pathogenesis and outcome. *Pediatrics*. 1988;82(2):139–46.
45. Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev*. 1997;47(2):115–46.
46. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55(2):158–63.
47. Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;835:234–49.
48. LEVINE S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol*. 1960;36:1–17.
49. Silbereis JC, Huang EJ, Back SA, Rowitch DH. Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Dis Model Mech*. 2010;3(11–12):678–88.
50. Brekke E, Morken TS, Sonnewald U. Glucose metabolism and astrocyte–neuron interactions in the neonatal brain. *Neurochem Int*. 2015;82:33–41.
51. Alexander M, Garbus H, Smith AL, Rosenkrantz TS, Fitch RH. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav Brain Res*. 2014;259:85–96.
52. Sizonenko S V., Kiss JZ, Inder T, Gluckman PD, Williams CE. Distinctive neuropathologic alterations in the deep layers of the parietal cortex after moderate ischemic-hypoxic injury in the P3 immature rat brain. *Pediatr Res*. 2005;57(6):865–72.
53. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain

development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013;106–107:1–16.

54. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res.* 1996;78(2):189–94.

55. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav.* 2005;7(2):204–13.

56. Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL, Lavinsky D, Achaval ME, Netto CA. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res.* 2010;210(1):92–8.

57. Walton M, Connor B, Lawlor P, Young D, Sirimanne E, Gluckman P, et al. Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;29(2–3):137–68.

58. Vannucci SJ, Simpson IA. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(5):E1127–34.

59. Baquer NZ, Hothersall JS, McLean P, Greenbaum AL. Aspects of carbohydrate metabolism in developing brain. *Dev Med Child Neurol.* 1977;19(1):81–104.

60. Booth RF, Patel TB, Clark JB. The development of enzymes of energy metabolism in the brain of a precocial (guinea pig) and non-precocial (rat) species. *J Neurochem.* 1980;34(1):17–25.

61. Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, et al. Alterations in GLUT1 and GLUT3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998;107(2):255–64.

62. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab.* 2011;14(6):724–38.

63. George J Siegel, Bernard W Agranoff, R Wayne Albers, Stephen K Fisher MDU. *Basic Neurochemistry.* Philadelphia; 1999.

64. Brekke E, Berger HR, Widerøe M, Sonnewald U, Morken TS. Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte–Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rat. *Neurochem Res [Internet].* 26 de janeiro de 2017 [citado 13 de março de 2017];42(1):115–32. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-016-2149-9>

65. McKenna MC, Scafidi S, Robertson CL. Metabolic Alterations in Developing

- Brain After Injury: Knowns and Unknowns. *Neurochem Res.* 2015;40(12):2527–43.
66. Vannucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, Vannucci RC. Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Mol Cell Biochem.* 1994;140(2):177–84.
67. Koehler-Stec EM, Simpson IA, Vannucci SJ, Landschulz KT, Landschulz WH. Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *Am J Physiol.* 1998;275(3 Pt 1):E516-24.
68. Studwell AJ, Kotton DN. A Shift From Cell Cultures to Creatures: In Vivo Imaging of Small Animals in Experimental Regenerative Medicine. *Mol Ther.* 2011;19(11):1933–41.
69. Cherry SR. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. *J Clin Pharmacol.* 2001;41(5):482–91.
70. Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(9):411–7.
71. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16):9226–33.
72. Xi W, Tian M, Zhang H. Molecular imaging in neuroscience research with small-animal PET in rodents. *Neurosci Res.* 2011;70(2):133–43.
73. Ferrando O, Foppiano F, Scolaro T, Gaeta C, Ciarmiello A. PET/CT images quantification for diagnostics and radiotherapy applications. *J Diagnostic Imaging Ther.* 2015;2(1):18–29.
74. Robilotta CC. [Positron emission tomography: a new modality in Brazilian nuclear medicine]. *Rev Panam Salud Publica.* 20(2–3):134–42.
75. Singhal T. Positron Emission Tomography Applications in Clinical Neurology. *Semin Neurol.* 2013;32(4):421–31.
76. Joseph J . Volpe. *Neurology of the Newborn* -Joseph J . Volpe - Google Livros. 4 th ed Philadelphia WB Saunders. 2001;
77. Paula S De, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(6):451–64.
78. Greggio S, Paula S De, Nunes P. Author's personal copy Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxic – ischemic rats.
79. Greggio S, de Paula S, de Oliveira IM, Trindade C, Rosa RM, Henriques JAP, et al. NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain

injury and cognitive impairment in a model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis.* 2011;44(1):152–9.

80. de Paula S, Vitola a S, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res.* 2009;65(6):631–5.

81. de Paula S, Greggio S, Marinowic DR, Machado DC, DaCosta JC. The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience.* 2012;210:431–41.

82. Medicina FDE. CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM RATOS Simone de Paula. Dados. 2007;

83. Sanches EF, Arteni NS, Nicola F, Boisserand L, Willborn S, Netto CA. Early hypoxia–ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience.* maio de 2013;237:208–15.



84. Durán-Carabali LE, Sanches EF, Marques MR, Aristimunha D, Pagnussat A, Netto CA. Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience.* janeiro de 2017;340:291–8.

85. Eichenbaum, H. A cortical–hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1, 41–50 (2000). <https://doi.org/10.1038/35036213>.

86. Papash a. I, Alenitsky YG. Commercial cyclotrons. Part I: Commercial cyclotrons in the energy range 10–30 MeV for isotope production. *Phys Part Nucl.* 2008;39(4):597–631.

87. Pós-graduação PDEPE, Em PDEP, Saúde PE, Criança DA, Paula S De. AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO EM MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM RATOS. 2011;

## 8. ANEXOS

	<b>U F R G S</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 31939  
**Título:** CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO CEREBRAL HIPÓXICO – ISQUEMICO PELO MÉTODO NÃO INVASIVO DE MICROPET/CT

**Vigência:** 15/09/2016 à 01/08/2018

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

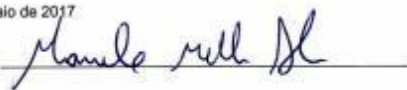
DIOGO ONOFRE GOMES DE SOUZA - coordenador desde 15/09/2016  
Eduardo Rigon Zimmer - pesquisador desde 15/09/2016

**Equipe Externa:**

GABRIELA DE OLIVEIRA LAGUNA SILVA - pesquisador desde 15/09/2016

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 08/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA,110 BAIRRO FARROUPILHA -, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 64 ratos wistar machos com 7 dias de vida obtidos do Departamento de Bioquímica, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 19 de Maio de 2017



MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética

## 9. APÊNDICES

---

### ARTIGO ORIGINAL

#### **AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CEREBRAL DE GLICOSE *IN VIVO* E DA MEMÓRIA ESPACIAL DE RATOS ADULTOS SUBMETIDOS A HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL**

*Authors:*

Gabriela Laguna<sup>1</sup>, Pamella Nunes Azevedo<sup>1</sup>, Felipe Kawa Odorcyk<sup>2</sup>, Luz Elena Duran-Carabali<sup>2</sup>, Gianina Teribele Venturin<sup>3</sup>, Samuel Greggio<sup>3</sup>, Carlos Alexandre Netto Jaderson Costa da Costa<sup>4</sup>.

1 Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul - Brain Institute (BraIns), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

2 Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3 Centro de Pesquisa Pré-Clínica, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul - Brain Institute (BraIns), Porto Alegre, RS, Brazil; Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul - Brain Institute (BraIns), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

4 Centro de Pesquisa Pré-Clínica, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul - Brain Institute (BraIns), Porto Alegre, RS, Brazil; Laboratório de Neurociências, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul - Brain Institute (BraIns), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil. Electronic address: [jcc@puers.br](mailto:jcc@puers.br).

Key-words: hypoxic-ischemic, brain injury, asphyxia, animal models, microPET.

**Resumo:**

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é uma causa importante de mortalidade e morbidade na infância, causa severas sequelas e faz parte da etiologia de diversas doenças neurológicas. Em decorrência da significância clínica e do impacto socioeconômico gerado por esta patologia, novas estratégias vêm sendo estudadas. Os fatores que culminam na diferença de resposta à lesão hipóxico-isquêmica ainda não foram elucidadas. No entanto, as diferenças no metabolismo encefálico de glicose parecem estar entre os fatores que mais contribuem para a diferença de severidade da lesão. Por isso os sistemas de imagem não-invasivo, em conjunto com testes cognitivos podem contribuir com a elucidação dessas lesões. O PET é uma importante ferramenta para o monitoramento *in vivo* por imagem molecular. Este estudo propõe a aplicação dessa tecnologia para verificar *in vivo* a detectabilidade da lesão cerebral em ratos adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal, através do escaneamento de microPET e correlacionar os desfechos de imagem funcional com os parâmetros de memória espacial. Foram utilizados um total de 22 ratos Wistar machos com 7 dias de vida. No DPN60 os animais foram submetidos ao escaneamento por microPET-FDG posteriormente foram avaliados quanto à memória espacial através do teste do Labirinto Aquático de Morris. Após o escaneamento por microPET – FDG os animais do grupo HI foram separados entre animais com lesão e sem lesão. Os animais com lesão apresentaram um hipometabolismo cerebral de glicose em relação ao grupo controle. O hipometabolismo cerebral ficou restrito ao hemisfério direito do grupo HI com lesão quando comparado aos hemisférios cerebrais dos animais dos grupos Sham. Observamos um hipometabolismo cerebral significativo no hemisfério ipsilateral à oclusão carotídea nos animais adultos HI que apresentavam área supostamente lesional detectável na imagem funcional. Por fim, foi analisado se o metabolismo de glicose cerebral teve influência em relação à capacidade de aprendizado, através do teste de correlação de Pearson. Além disso, observamos que existe uma correlação inversamente proporcional entre a alteração do metabolismo cerebral e o déficit na memória espacial de ratos adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.

**Palavras-chave:** hipóxia-isquemia neonatal (HI); neurodesenvolvimento; metabolismo encefálico; microPET-FDG

**Abstract:**

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is an important cause of mortality and morbidity in childhood, it causes severe sequelae and is part of the etiology of several neurological diseases. Due to the clinical significance and socioeconomic impact generated by this pathology, new strategies have been studied. The factors that culminate in the difference in response to hypoxic-ischemic injury have not yet been elucidated. However, differences in brain glucose metabolism seem to be among the factors that most contribute to the difference in injury severity. Therefore, non-invasive imaging systems, together with cognitive tests can contribute to the elucidation of these lesions. PET is an important tool for in vivo monitoring by molecular imaging. This study proposes the application of this technology to verify in vivo the detectability of brain damage in adult rats previously submitted to the neonatal HI model, through microPET scanning and to correlate the functional image outcomes with the parameters of spatial memory. A total of 22 7-day-old male Wistar rats were used. At DPN60, the animals were scanned by microPET-FDG and subsequently evaluated for spatial memory using the Morris Aquatic Maze test. After scanning by microPET – FDG, the animals in the HI group were separated into animals with and without injury. The injured animals showed a cerebral hypometabolism of glucose in relation to the control group. Cerebral hypometabolism was restricted to the right hemisphere of the injured HI group when compared to the cerebral hemispheres of the animals in the Sham groups. We observed a significant cerebral hypometabolism in the hemisphere ipsilateral to the carotid occlusion in adult HI animals that presented a supposedly lesional area detectable in the functional image. Finally, it was analyzed whether the cerebral glucose metabolism had an influence in relation to the learning capacity, through the Pearson correlation test. Furthermore, we observed that there is an inversely proportional correlation between the alteration in brain metabolism and the deficit in spatial memory in adult rats previously submitted to the neonatal HI model.

**Keywords:** neonatal-hypoxia ischemia (HI); neurodevelopment; brain metabolism; mitochondrial function.



## Introdução

A hipóxia isquemia neonatal (HI) é um evento nocivo ao sistema nervoso central (SNC) normalmente provocado por asfixia intra-uterina grave após uma redução aguda no fluxo uterino ou umbilical. (1). Esta condição pode levar a óbito ou a variados graus de lesão cerebral que vão desde comprometimentos leves (perda de tônus muscular) a danos cognitivos severos, tais como paralisia cerebral, epilepsia e retardo mental (2). Estima-se que esta condição ocorra em 1-6/1000 nascidos vivos, e incidência até 10 vezes maior nos países em desenvolvimento, onde 15 a 20% dos recém-nascidos afetados morrem no período pós-natal e 25% apresentarão déficits neurológicos (3,4).

Tendo em vista a grande variabilidade de graus da lesão hipóxico-isquêmica neonatal, a neurplasticidade parece atuar na recuperação espontânea parcial e, muitas vezes, quase total do cérebro do recém-nascido (5–7). No entanto, para as lesões mais graves, ainda não existe uma alternativa terapêutica capaz de impedir efetivamente a progressão da lesão hipóxico isquêmica e amenizar as sequelas em longo prazo. Apesar de amplamente utilizado na investigação de alternativas de tratamento, o modelo de HI em ratos neonatos ainda mostra desfechos variados quanto aos déficits motores e cognitivos (8–12), que estão associados à variação da lesão cerebral inerente ao modelo, semelhante ao contexto clínico. Assim, estudos que busquem ferramentas que aperfeiçoem metodologias e intervenções são vistos com muito interesse.

No cérebro adulto, a glicose é a principal fonte energética, já para o cérebro neonatal é possível utilizar corpos cetônicos e lactato além de glicose (13–16). Os corpos cetônicos e o lactato são capturados sobre o BBB através dos transportadores de monocarboxilato (MCTs). Enquanto MCT1 é encontrado tanto na glia como nos neurônios em um cérebro imaturo, a expressão do MCT2 é primariamente neuronal (73–74). Os níveis de GLUT1 e GLUT3 são baixos no nascimento em relação ao cérebro adulto, e aumentam gradualmente para atingir os níveis de adultos em 30 dias no caso de GLUT1 e em 21-30 dias no caso de GLUT3. Isto significa que o metabolismo cerebral da glicose pode ser limitado pela capacidade de transporte nesta fase de desenvolvimento (17). Assim, o SNC neonatal possui uma regulação do fluxo sanguíneo independente, devido ao mecanismo de auto regulação (18), e uma atividade relativamente elevada com altas exigências de oxigênio e glicose que é metabolizado principalmente pela fosforilação oxidativa (19,20)

O microPET, microtomografia por emissão de pósitrons, assim como o seu equivalente clínico, é uma modalidade de imagem funcional para investigação de processos bioquímicos, fisiológicos, patológicos ou farmacológicos *in vivo* (21,22). O sistema possui a capacidade de determinar a distribuição espacial e temporal *in vivo* de compostos marcados com um dado radionucleotídeo, de forma não invasiva. (23). O  $^{18}\text{F}$ -Fluordesoxiglicose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) é um análogo da glicose e o rádiofarmaco mais utilizado na medicina nuclear atualmente (24). Quando injetado no organismo, é rapidamente captado por células que utilizam grandes quantidades de glicose e por isso é excelente para investigação de tecidos com alta atividade metabólica (24,25).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar funcionalmente a lesão cerebral de ratos adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal, através da análise *in vivo* do metabolismo cerebral de glicose por microPET-FDG, e correlacionar estes achados com parâmetros de memória espacial.

### *Materiais e Métodos*

#### *Aspectos éticos*

Os protocolos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (31939) e seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório.

## **Animais**

Um total de 22 ratos Wistar machos foi utilizado para este estudo. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz ciclo 12/12h de claro-escuro e temperatura –  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  – e água e ração *ad libitum*. Após o desmame aos 21 dias de vida, os animais foram mantidos em um máximo de quatro animais por caixa-moradia.

## **Modelo experimental em Hipóxia Isquemia Neonatal**

Para a indução do modelo de hipóxia-isquemia utilizamos o modelo de Levine e colaboradores, adaptado para ratos neonatos. Ratos Wistar machos com 7 dias de vida (DPN7), foram profundamente anestesiados com mistura de halotano e oxigênio (30x70) através de uma máscara facial. A artéria carótida comum direita foi identificada através de uma incisão transversal na linha média da face anterior do pescoço e ocluída permanentemente em dois locais com linha cirúrgica de seda 7.0. Após a recuperação total da cirurgia, os neonatos foram colocados dentro de uma câmara de acrílico transparente (1500 mL) e expostos a ambiente a 8% de oxigênio e de 92% nitrogênio (White Martins®) liberado a 5 l/min, monitorado por um oxímetro. A câmara permaneceu parcialmente imersa em água morna ( $36\text{-}37^{\circ}\text{C}$ ) para manter a temperatura constante dentro dos limites fisiológicos, e os animais foram mantidos no ambiente hipóxico por 1 hora. (23,24,26,27). Após, retornaram para suas mães para recuperação total. Animais do grupo Sham foram anestesiados e a carótida foi exposta, mas não foram submetidos à oclusão da artéria nem expostos ao ambiente hipóxico.

## **Escaneamento cerebral com FDG por MicroPET**

No DPN60, 53 dias após a indução de HI neonatal, os animais foram submetidos a exames de imagem por microPET, Triumph™ microPET (LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA), no Centro de Pesquisa Pré-Clínica do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul, 53 dias após a indução da HI (DPN 60) (Figura 8). Os animais foram transportados até o CPPC do InsCer 48 h antes do dia do scan e permaneceram em jejum pré-scan de 12 a 24 horas a fim de intensificar a captação cerebral de  $^{18}\text{F}$ -FDG. No dia do scan, os animais foram individualmente anestesiados com uma mistura isoflurano e oxigênio (3-4% para indução e 2-3% de manutenção) e 1 mCi de  $^{18}\text{F}$ -FDG foi administrado por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram devolvidos à gaiola e permaneceram conscientes durante um período de 40 minutos para captação do radiofármaco. Os animais permaneceram sobre uma placa aquecida para manter a temperatura fisiológica corporal (36°C). Após o período de captação, os ratos foram, individualmente, posicionados sobre a cama apropriada na câmara de imageamento para a aquisição da imagem, que foi aquecida a fim de manter a temperatura do animal, e permaneceram anestesiados durante todo o procedimento. Foram realizadas aquisições estáticas por 10 minutos com um campo de visão (FOV: 3,75 cm) centrado na cabeça do rato. Ao término dos escaneamentos, o rato foi retirado do aparelho e permaneceu dentro de sua caixa, sobre uma placa de aquecimento, até completa recuperação. O algoritmo de reconstrução para o processamento das imagens de microPET foi MLEM-3D e a captação de FDG cerebral foi quantificada através do software PMOD v3.5 e Fusion Toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Suíça) (28).

## **Labirinto Aquático de Morris**

A versão espacial do labirinto aquático de Morris consiste de um tanque circular (200 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade), virtualmente dividido em 4 quadrantes, com água a uma altura de 25 cm e temperatura de  $\pm 23^{\circ}\text{C}$ . O tanque fica situado em uma sala com pistas visuais nas paredes, e em um dos quadrantes encontra-se uma plataforma de 10 cm de diâmetro submersa a 2 cm abaixo. Durante 5 dias consecutivos os animais foram treinados a achar a plataforma saindo de 4 pontos de partida diferente situado em cada um dos quadrantes, com duração máxima de 60 segundos ou até o animal achar a plataforma. A plataforma permanece no mesmo local durante todo o período de treino. Vinte e quatro horas após o último dia de treino foi realizado o teste de retenção de memória, a plataforma foi retirada e os animais foram deixados para nadar livremente por 60 segundos partindo de um único ponto. A curva de aprendizado ao longo dos dias de treinamento e o tempo de latência para encontrar a plataforma no dia do teste foram os parâmetros avaliados (29,30).

## **Análise Estatística**

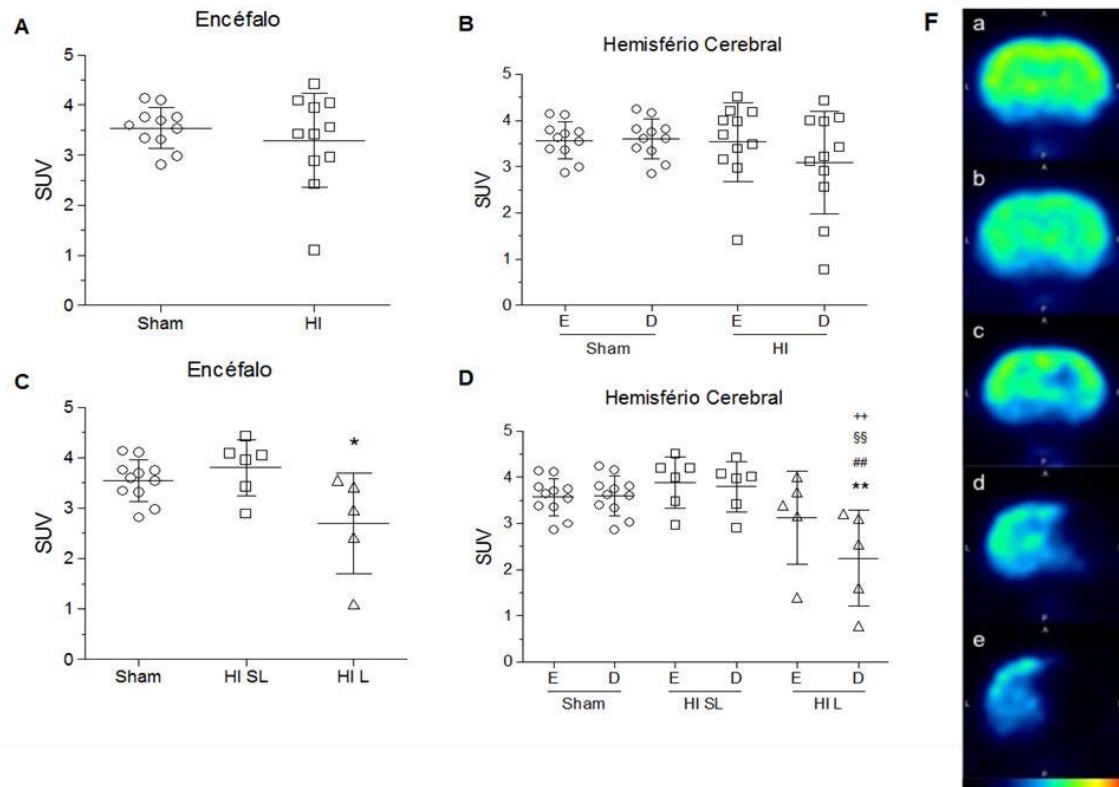
As análises estatísticas foram realizadas através do software PrismGraph 6.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Os dados foram expressos em média e erro padrão para variáveis de distribuição normal, e para todas as variáveis foi considerado um nível de significância  $p < 0,05$ . A ANOVA de uma via seguida do post-hoc de Bonferroni ou teste t de Student foram aplicados para análise dos resultados obtidos nos exames de imageamento por microPET. Para análise da curva de aprendizagem do LAM foi utilizado ANOVA de duas vias e para a latência ANOVA de uma via ambas seguidas do post-hoc de Bonferroni. Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Pearson (r).

## Resultados

*Metabolismo cerebral de glicose está alterado em ratos adultos hipóxico-isquêmicos que apresentaram área hipometabólica supostamente lesional no exame de imagem molecular*

Os animais foram submetidos ao exame de imagem por microPET no DPN60, 53 dias após a indução do modelo de hipóxia-isquemia. Neste período não houve diferenças significativas no metabolismo cerebral de glicose entre os animais do grupo Sham e do HI (Fig. 1A e B). No entanto, quando os animais do grupo HI foram separados entre os animais com área hipometabólica supostamente lesional no hemisfério cerebral direito (HI L, n= 5) e animais sem área hipometabólica supostamente lesional (HI SL, n= 6), o grupo HI L apresentou um hipometabolismo cerebral estatisticamente significativo em relação ao grupo HI SL (\* $p < 0,05$ ; Fig. 1C). Optou-se por utilizar o termo “área hipometabólica supostamente lesional”, uma vez que não há confirmação definitiva da presença de lesão cerebral ou cisto porencefálico através de técnicas histológicas (contagem de neurônios e/ou volumetria hemisférica cerebral). Quando os hemisférios cerebrais foram analisados separadamente, o hipometabolismo cerebral ficou restrito ao hemisfério direito do grupo HI L quando comparado aos hemisférios cerebrais dos animais dos grupos Sham (\*\* $p < 0,01$  vs. Sham<sub>HE</sub>; ### $p < 0,01$  vs. Sham<sub>HD</sub>; Fig. D) e HI SL (§§ $p < 0,01$  vs. HI SL<sub>HD</sub>; ++ $p < 0,01$  vs. HI SL<sub>HE</sub>; Fig D). Apesar de não significativo, o metabolismo cerebral do hemisfério esquerdo dos animais HI L, contralateral à oclusão da carótida, apresentou uma tendência para hipometabolismo. Não houve diferenças de metabolismo cerebral entre os hemisférios direito e esquerdo do grupo HI L. A Figura 1F apresenta cortes coronais do encéfalo de animais representantes dos grupos experimentais, onde observam-se os diferentes graus de alteração metabólica por imagem funcional: (a) corte coronal do cérebro de rato do grupo Sham mostrando um metabolismo cerebral normal; (b) animal do grupo HI SL, apesar de ter sido submetido ao modelo de HI neonatal, não desenvolveu uma lesão aparente no microPET; (c) animal do grupo HI L, desenvolveu uma lesão de grau leve; (d) animal do grupo HI L, desenvolveu uma lesão

de grau moderado-severo e (e) animal do grupo HI L que desenvolveu uma lesão de grau muito severo.



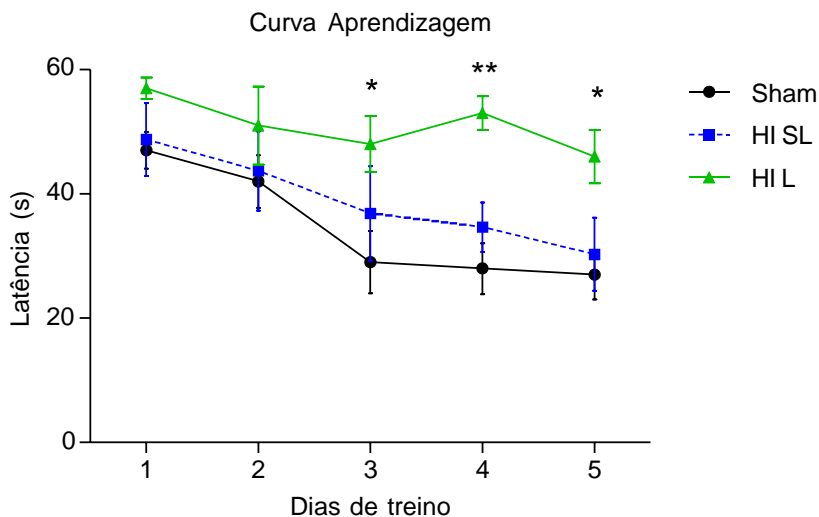
**Figura 1. Metabolismo cerebral de glicose no modelo de HI.** A) Gráfico referente à comparação do metabolismo cerebral dos grupos Sham e HI, não houve diferença; B) Gráfico referente à comparação do metabolismo dos hemisférios cerebrais dos grupos Sham e HI, não houve diferença; C) Gráfico referente à comparação do metabolismo cerebral entre os grupos Sham, HI SL e HI L, grupo HI L apresenta um metabolismo cerebral diminuído em relação ao HI SL, \*p<0,05; D) Gráfico referente à comparação do metabolismo dos hemisférios cerebrais dos grupos Sham, HI SL e HI L. Grupo HI L apresenta um metabolismo diminuído no hemisfério cerebral direito em comparação aos grupos Sham (\*\*p<0,01 vs. Sham<sub>HD</sub>; ##p<0,01 vs. Sham<sub>HE</sub>); Fig. D) e HI SL (§§p<0,01 vs. HI SL<sub>HD</sub>; ++p<0,01 vs. HI SL<sub>HE</sub>); e F) cortes coronais do cérebro de rato (a) do grupo Sham, mostrando um metabolismo cerebral normal; (b) animal do grupo HI SL, apesar de ter sido submetido ao modelo de HI neonatal, não desenvolveu uma área hipometabólica supostamente lesional no microPET; (c) animal do grupo HI L, desenvolveu uma área hipometabólica supostamente lesional de grau leve; (d) animal do grupo HI L, desenvolveu uma área hipometabólica supostamente lesional de grau moderado-severo e (e) animal do grupo HI L que desenvolveu uma área hipometabólica supostamente lesional de grau muito severo.

Além disso, o metabolismo cerebral de glicose foi quantificado em 31 regiões cerebrais separadamente, divididas em hemisfério esquerdo (HE) e direito (HD). Quando avaliamos o grupo HI vs. Grupo Sham, o grupo HI apresentou um hipometabolismo cerebral no hemisfério direito nas seguintes regiões: córtex entorrinal (\* $p < 0,05$  Sham<sub>HD</sub> vs. HI<sub>HD</sub>), córtex parietal (\* $p < 0,05$  Sham<sub>HD</sub> vs. HI<sub>HD</sub> e #  $p < 0,05$  Sham<sub>HE</sub> vs. HI<sub>HD</sub>) e córtex visual (\* $p < 0,05$  Sham<sub>HD</sub> vs. HI<sub>HD</sub> e #  $p < 0,05$  Sham<sub>HE</sub> vs. HI<sub>HD</sub>) (Fig. complementar 1). Quando a captação de glicose é avaliada nos grupos HI SL e HI L separadamente, esta diferença fica mais uma vez restrita ao hemisfério direito dos animais com lesão para a grande maioria das regiões avaliadas, tais como amígdala, córtex entorrinal, córtex parietal, córtex somatosensorial, córtex visual, tálamo, hipocampo, entre outras. Em contrapartida, regiões como hipotálamo não tiveram seu metabolismo cerebral comprometido (Fig. complementar 2).

*Ratos adultos submetidos ao modelo de HI neonatal, mas que não desenvolveram área hipometabólica supostamente lesional, tiveram a capacidade de aprendizado preservada*

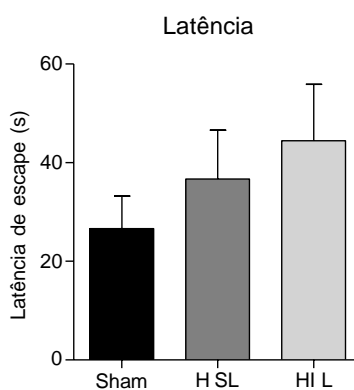
No DPN 65, os animais do foram testados quando a capacidade de memória e aprendizado na versão espacial do labirinto aquático de Morris (LAM). Durante 5 dias consecutivos, os animais foram treinados nesta tarefa e, na análise da curva de aprendizagem, pode-se observar que os animais do grupo Sham e HI SL apresentaram um melhor desempenho do que o grupo HI L (dia 3, \* $p < 0,05$ ; dia 4, \*\* $p < 0,01$ ; dia 5, \* $p < 0,05$ ; Fig. 2). Não foram identificadas diferenças significativas entre os animais Sham e HI. Tal evidência sugere que o desenvolvimento de uma área hipometabólica supostamente lesional no hemisfério ipsilateral à oclusão carotídea contribui para um déficit de aprendizagem no LAM.





**Figura 2. Curva de aprendizado LAM.** Gráfico referente à curva de aprendizagem ao longo dos dias de treino no LAM. Valores em segundos representados em média  $\pm$  erro padrão. Dia 3 \* $p < 0,05$ , dia 4 \*\* $p < 0,01$  e dia 5 \* $p < 0,05$  Sham vs. HI L. Não houve diferenças entre os grupos Sham vs. HI SL e HI SL vs. HI L.

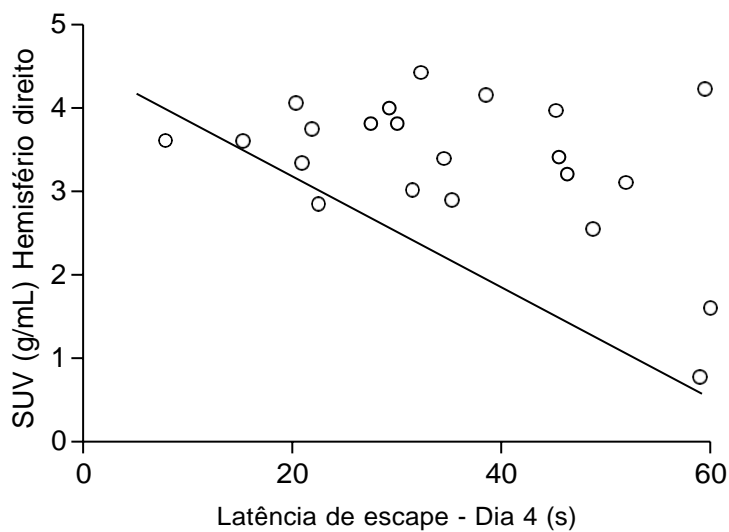
Quando à retenção da memória espacial, os animais foram testados 24 horas após o último dia de treino. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais (Fig. 3).



**Figura 3. Latência de escape.** Gráfico referente à latência de escape até o local da plataforma testada 24h após o treino. Não houve diferenças entre os grupos avaliados.

*Correlação entre o metabolismo de glicose cerebral e na capacidade de aprendizado no LAM*

Para avaliar se as alterações no metabolismo de glicose cerebral estão relacionadas à capacidade prejudicada de aprendizado dos animais no LAM, foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Ao se testar a correlação entre a latência de escape do dia 4 do LAM – dia em que houve maior diferença entre o grupo Sham e o HI L – e o índice de metabolismo de glicose no hemisfério cerebral direito, verificou-se uma correlação negativa significativa (Pearson  $r = -0,4596$  e  $p = 0,0314$ ). Assim, quanto menor a captação de FDG pelo hemisfério cerebral direito, maior é a latência de escape até a plataforma o LAM (Figura 4).



**Figura 4. Correlação entre o metabolismo de glicose no hemisfério cerebral direito e a latência de escape do LAM.** Representação gráfica do teste do coeficiente de correlação de Pearson entre o metabolismo de glicose do hemisfério cerebral direito dos grupos experimentais e a latência de escape do dia 4 do treino no LAM. Existe uma correlação negativa entre as variáveis onde  $r = -0,4596$  e  $*p < 0,05$ .

## Discussão

Este é o primeiro estudo que faz uma correlação entre déficit cognitivo e o metabolismo de glicose cerebral *in vivo* na HI neonatal, através do imageamento por microPET e o radiofármaco FDG. A grande demanda metabólica cerebral de glicose faz com que a utilização do radiofármaco FDG, na imagem molecular para o rastreamento de neuropatologias, seja uma ferramenta muito interessante.

Neste estudo, 45% dos ratos que foram submetidos ao modelo de HI neonatal apresentaram uma “área hipometabólica supostamente lesional” detectável no exame de imagem por microPET-FDG. Os animais do grupo HI L demonstraram um hipometabolismo cerebral de glicose estatisticamente significativo quando comparado aos outros grupos experimentais. Os outros 55% dos animais HI (HI SL, n = 6), não tiveram um comprometimento do metabolismo cerebral, ou seja não apresentaram “área hipometabólica supostamente lesional”. Optou-se por utilizar o termo “área hipometabólica supostamente lesional”, uma vez que não há confirmação definitiva da presença de lesão cerebral ou cisto porencefálico através de técnicas histológicas (contagem de neurônios e/ou volumetria hemisférica cerebral). Se analisarmos mais cuidadosamente, ao separarmos o metabolismo de glicose entre os hemisférios cerebrais, o hipometabolismo do grupo HI L fica restrito ao hemisfério direito, ou seja, limita-se ao hemisfério que recebeu o insulto hipóxico-isquêmico. Em contrapartida, o hemisfério contralateral à oclusão carotídea dos animais HI L também apresentou uma tendência ao hipometabolismo. Demonstrando assim que ratos adultos submetidos ao modelo de HI neonatal, mas que não desenvolveram área hipometabólica supostamente lesional, tiveram a capacidade de aprendizado preservada.

Neste estudo, demonstramos também que os animais do grupo HI L têm sua capacidade de aprendizado prejudicada quanto à memória espacial. Assim, como em estudos prévios, o déficit de memória espacial e aversiva, por exemplo, persistem até a vida adulta de ratos submetidos ao modelo de HI neonatal, o que também é visto na clínica dependente do grau de lesão cerebral (8–10,31,32). Já o grupo HI SL não apresentou déficits cognitivos, possivelmente devido ao tamanho amostral ser baixo frente à variabilidade do modelo.

Na HI neonatal, a falta de oxigênio reduz a fosforilação oxidativa e a atividade do ciclo TCA nas mitocôndrias. Assim, a glicólise anaeróbia torna-se a principal fonte de energia. A demanda energética é suprida pela degradação do glicogênio nos astrócitos e

por uma regulação positiva da glicólise anaeróbia. A utilização de glicose para a glicólise anaeróbia é altamente ineficiente e, em conjunto com o armazenamento limitado de glicogênio, provoca uma rápida depleção da glicose cerebral (14). O SNC neonatal possui uma regulação do fluxo sanguíneo independente, devido ao mecanismo de auto regulação (18), e uma atividade relativamente elevada com altas exigências de oxigênio e glicose que é metabolizado principalmente pela fosforilação oxidativa (19,20).

A plasticidade cerebral é uma propriedade intrínseca do SNC, sendo uma resposta adaptativa frente aos insultos ambientais. A sua dinâmica é inversamente proporcional à idade do indivíduo, onde quanto mais jovem maior é a neuroplasticidade observada (5–7,44,45). Jung e colaboradores demonstraram, por ressonância magnética funcional, que a plasticidade do cérebro em desenvolvimento pós-HI neonatal faz com que as funções antes executadas pelo hemisfério lesionado sejam transferidas para o hemisfério contralateral através de reorganização de redes neurais, promovendo a recuperação espontânea dos animais acometidos (44). Possivelmente, o fato dos animais submetidos ao modelo de HI neonatal, que não apresentam lesões cerebrais graves, não sofrerem alterações do metabolismo cerebral esteja relacionado a um processo de compensação executado pela plasticidade do hemisfério contralateral.

Na clínica, a presença, severidade e distribuição das lesões neuropatológicas resultantes da hipóxia isquemia dependem de diversos fatores, incluindo a natureza e a duração do insulto, a idade gestacional do feto ou do recém-nascido, entre outros (33–40). Da mesma forma, a variabilidade dos graus de lesões cerebrais também é reproduzida no modelo experimental de HI, o que acarreta em discrepâncias entre os estudos pré-clínicos, tais como presença ou ausência de déficit motor e cognitivo (8,41,42). Em estudos clínicos já foi demonstrado que o exame de imagem por PET poderia fornecer dados fisiopatológicos de eventos hipóxico-isquêmicos em recém-nascidos mais precocemente do que técnicas de imagem morfológicas convencionais (33,35,36,38,39,43). Assim, ferramentas como microPET poderiam fornecer o rastreamento *in vivo* da lesão hipóxico-isquêmica, em contexto pré-clínicos, a fim de separar os diferentes graus de lesão cerebral e otimizar a utilização do modelo para o melhor entendimento da fisiopatologia ou à busca de alternativas terapêuticas.

Em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, demonstramos uma correlação entre a perda de tecido cerebral e déficits de aprendizagem e memória espacial no modelo de HI neonatal (11,12,31). Da mesma forma, no presente estudo encontramos uma correlação entre déficit de aprendizagem e a diminuição do metabolismo cerebral. Esses

estudos corroboram com nossos achados da importância da integridade do metabolismo cerebral de glicose para a manutenção da memória e cognição após o insulto cerebral no período neonatal.

Desta forma, demonstramos um possível biomarcador para o prognóstico de comprometimento cognitivo na HI neonatal, a partir dos dados de correlação entre o índice de metabolismo cerebral de FDG e déficits de memória espacial observados na fase adulta. No entanto, estudos adicionais são necessários a fim de aumentar o tamanho amostral dos grupos HI estratificados e elucidar se estas alterações podem ser identificadas nas fases iniciais do neurodesenvolvimento. Além disso, é primordial uma avaliação histológica dos encéfalos destes animais a fim de caracterizar anatomicamente as lesões cerebrais e correlacioná-las com os dados funcionais. Sabe-se que um hipometabolismo cerebral não corresponde necessariamente à lesão tecidual, podendo limitar-se apenas a uma disfunção com repercussão cognitiva. Somente assim, poderemos afirmar que as “áreas de hipometabolismo supostamente lesional/disfuncional” do hemisfério direito correspondem às lesões histológicas do cérebro de ratos adultos hipóxico-isquêmicos.

## Referencias

1. Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999;30(2):107–34.
2. Volpe JJ. Neonatal Neurology—My Personal Journey and Some Lessons Learned. *Pediatr Neurol.* 2014;51(6):753–7.
3. Shankaran S. Neonatal encephalopathy: treatment with hypothermia. *J Neurotrauma.* 2009;26(3):437–43.
4. Souza FM de S, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira. Departamento de Ensino. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e da Mulher. Rio de Janeiro, RJ B. Fatores associados à asfixia perinatal no Brasil: estudo populacional com base no sistema de informações de nascidos vivos. 2003;
5. Chen H, Epstein J, Stern E. Neural Plasticity After Acquired Brain Injury: Evidence from Functional Neuroimaging. *PM&R.* dezembro de 2010;2(12):S306–12.
6. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 16 de dezembro de 2009;10(12):861–72.
7. Johnston M V., Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol [Internet].* 2011;10(4):372–82. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70016-3)
8. Greggio S, Paula S De, Nunes P. Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxic – ischemic rats.
9. Greggio S, de Paula S, de Oliveira IM, Trindade C, Rosa RM, Henriques JAP, et al. NAP prevents acute cerebral oxidative stress and protects against long-term brain injury and cognitive impairment in a model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis.* 2011;44(1):152–9.
10. Durán-Carabali LE, Sanches EF, Marques MR, Aristimunha D, Pagnussat A, Netto CA. Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience.* janeiro de 2017;340:291–8.
11. de Paula S, Greggio S, Marinowic DR, Machado DC, DaCosta JC. The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia. *Neuroscience.* 2012;210:431–41.

12. de Paula S, Vitola a S, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res*. 2009;65(6):631–5.
13. George J Siegel, Bernard W Agranoff, R Wayne Albers, Stephen K Fisher MDU. *Basic Neurochemistry*. Philadelphia; 1999.
14. Brekke E, Berger HR, Widerøe M, Sonnewald U, Morken TS. Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte–Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia–Ischemia in Rat. *Neurochem Res* [Internet]. 26 de janeiro de 2017 [citado 13 de março de 2017];42(1):115–32. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-016-2149-9>
15. Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metab*. 2011;14(6):724–38.
16. McKenna MC, Scafidi S, Robertson CL. Metabolic Alterations in Developing Brain After Injury: Knowns and Unknowns. *Neurochem Res*. 2015;40(12):2527–43.
17. Vannucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, Vannucci RC. Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Mol Cell Biochem*. 1994;140(2):177–84.
18. Castillo J. [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev Neurol*. 2000;30(5):459–64.
19. Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci*. 2006;9(4):338–49.
20. Perlman JM. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther*. 2006;28(9):1353–65.
21. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(16):9226–33.
22. Xi W, Tian M, Zhang H. Molecular imaging in neuroscience research with small-animal PET in rodents. *Neurosci Res*. 2011;70(2):133–43.
23. Lancelot S, Zimmer L. Small-animal positron emission tomography as a tool for neuropharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(9):411–7.
24. Robilotta CC. [Positron emission tomography: a new modality in Brazilian nuclear medicine]. *Rev Panam Salud Publica*. 20(2–3):134–42.

25. Singhal T. Positron Emission Tomography Applications in Clinical Neurology. *Semin Neurol.* 2013;32(4):421–31.
26. Zhao J, Chen Y, Xu Y, Pi G. Effect of intrauterine infection on brain development and injury. *Int J Dev Neurosci.* 2013;31(7):543–9.
27. Liao Y, Cotten M, Tan S, Kurtzberg J, Cairo MS. Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(7):890–900.
28. Papash a. I, Alenitsky YG. Commercial cyclotrons. Part I: Commercial cyclotrons in the energy range 10–30 MeV for isotope production. *Phys Part Nucl.* 2008;39(4):597–631.
29. Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(1):41–50.
30. Sanches EF, Arteni NS, Nicola F, Boisserand L, Willborn S, Netto CA. Early hypoxia–ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience.* maio de 2013;237:208–15.
31. Paula S De, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(6):451–64.
32. Sanches EF, Arteni N, Nicola F, Aristimunha D, Netto CA. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia–ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience.* 2015;290:581–93.
33. Thorngren-jerneck K, Ohlsson T, Sandell A, Erlandsson K, Strand S, Ryding E, et al. Cerebral Glucose Metabolism Measured by Positron Emission Tomography in Term Newborn Infants with Hypoxic Ischemic Encephalopathy. 2001;49(4):495–501.
34. Thorngren-Jerneck K, Hellström-Westas L, Ryding E, Rosén I. Cerebral Glucose Metabolism and Early EEG/aEEG in Term Newborn Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Pediatr Res.* 2003;54(6):854–60.
35. Suhonen-Polvi H, Kero P, Korvenranta H, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Bergman J, et al. Repeated fluorodeoxyglucose positron emission tomography of the brain in infants with suspected hypoxic-ischaemic brain injury. *Eur J Nucl Med.* 1993;20(9):759–65.
36. Shi Y, Zhao JN, Liu L, Hu ZX, Tang SF, Chen L, et al. Changes of positron emission tomography in newborn infants at different gestational ages, and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Neurol [Internet].* 2012;46(2):116–23.

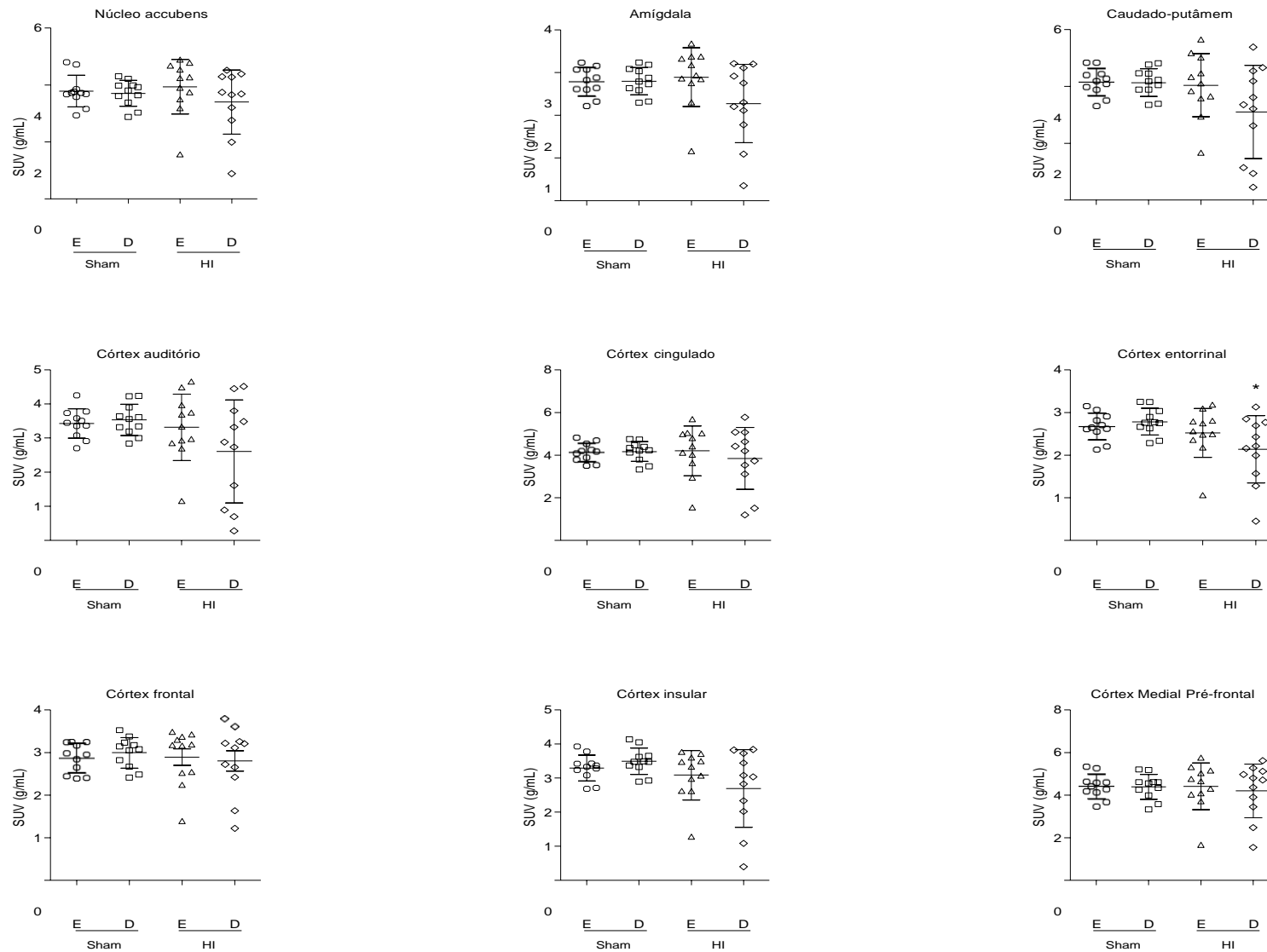


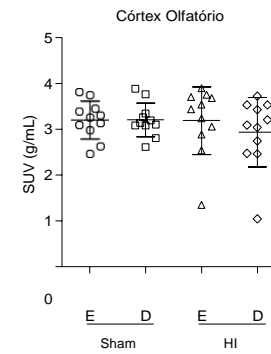
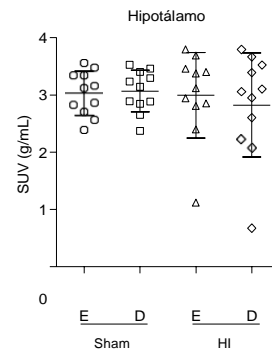
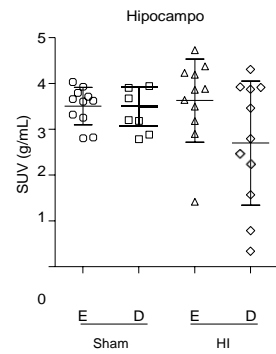
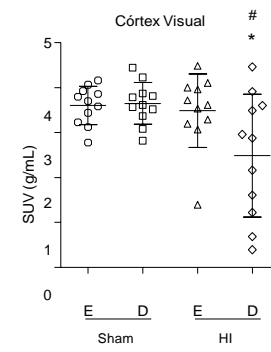
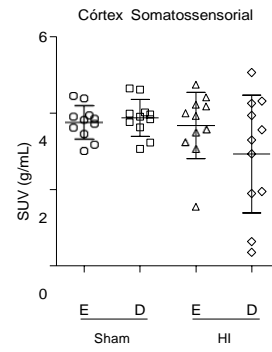
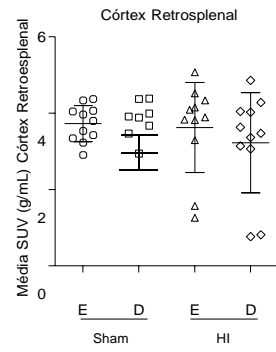
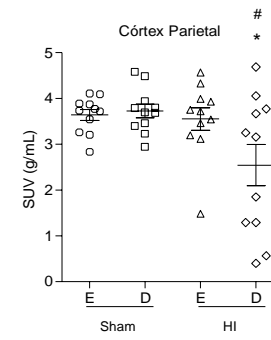
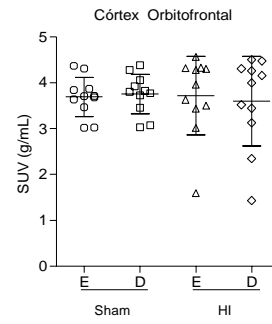
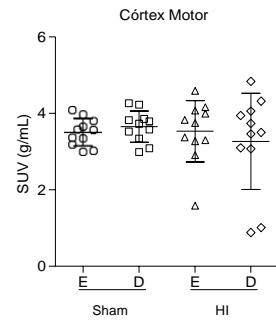
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.11.005>

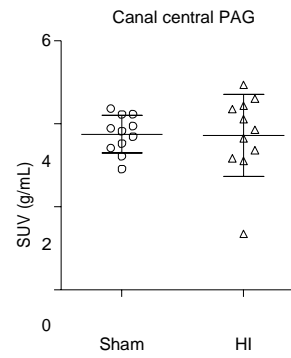
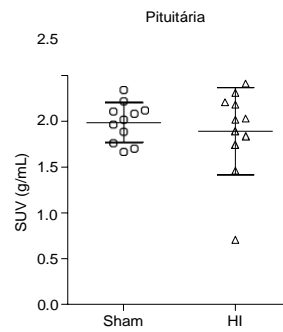
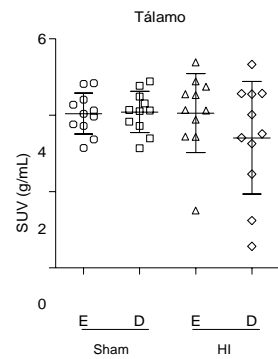
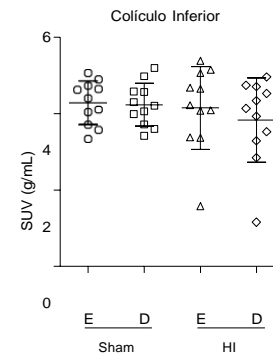
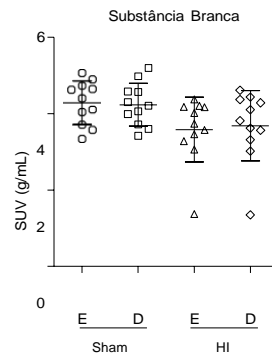
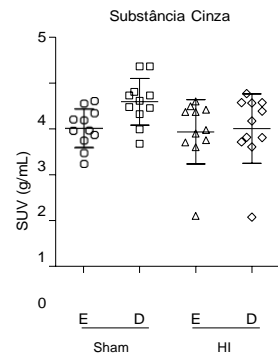
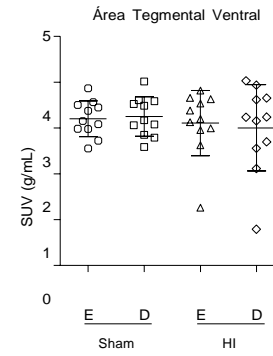
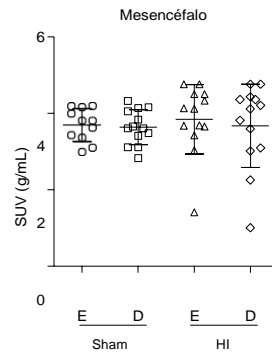
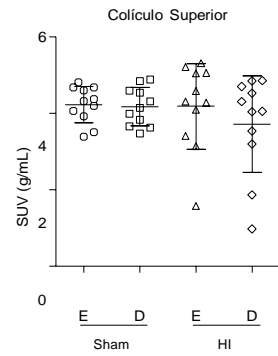
37. LEVINE S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960;36:1–17.
38. Doyle LW, Nahmias C, Firnau G, Kenyon DB, Garnett ES, Sinclair JC. Regional cerebral glucose metabolism of newborn infants measured by positron emission tomography. *Dev Med Child Neurol.* 1983;25(2):143–51.
39. Blennow M, Ingvar M, Lagercrantz H, Stone-Elander S, Eriksson L, Forssberg H, et al. Early [18F]FDG positron emission tomography in infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy shows hypermetabolism during the postasphyctic period. *Acta Pædiatrica.* 1995;84(11):1289–95.
40. Batista CEA, Chugani HT, Juhász C, Behen ME, Shankaran S. Transient Hypermetabolism of the Basal Ganglia Following Perinatal Hypoxia. *Pediatr Neurol.* 2007;36(5):330–3.
41. Wagner BP, Nedelcu J, Martin E. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res.* março de 2002;51(3):354–60.
42. Smith AL, Alexander M, Rosenkrantz TS, Sadek ML, Fitch RH. Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: Insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. *Exp Neurol.* abril de 2014;254:54–67.
43. Goffin K, Paesschen W Van, Dupont P, Laere K Van. Longitudinal microPET imaging of brain glucose metabolism in rat lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Exp Neurol.* 2009;217(1):205–9.
44. Jung W-B, Im GH, Chung JJ, Ahn S-Y, Jeon TY, Chang YS, et al. Neuroplasticity for spontaneous functional recovery after neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats observed by functional MRI and diffusion tensor imaging. *Neuroimage.* 1 de fevereiro de 2016;126:140–50.
45. Johnston M V, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res [Internet].* 2001;49(6):735–41.
46. Thorngren-Jerneck K, Ley D, Hellström-Westas L, Hernandez-Andrade E, Lingman G, Ohlsson T, et al. Reduced postnatal cerebral glucose metabolism measured by PET after asphyxia in near term fetal lambs. *J Neurosci Res.* 2001;66(5):844–50.
47. Guo Y, Gao F, Wang S, Ding Y, Zhang H, Wang J, et al. In vivo mapping of temporospatial changes in glucose utilization in rat brain during epileptogenesis:

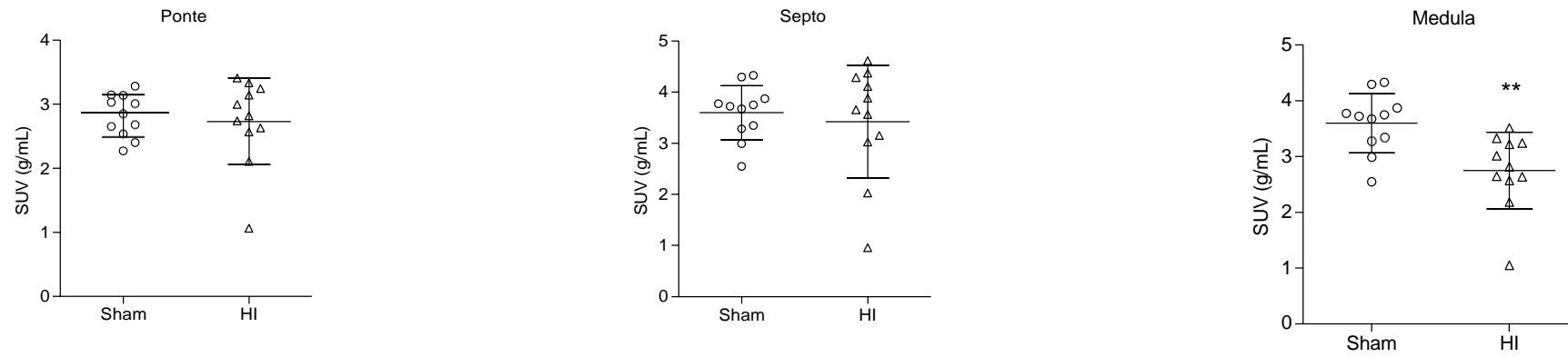
- an 18F-fluorodeoxyglucose-small animal positron emission tomography study. *Neuroscience* [Internet]. 2009;162(4):972–9.
48. De Lange C, Malinen E, Qu H, Johnsrud K, Skretting A, Saugstad OD, et al. Dynamic FDG PET for assessing early effects of cerebral hypoxia and resuscitation in new-born pigs. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2012;39(5):792–9.

**Figura complementar 1.** Análise do metabolismo de glicose nas diferentes regiões cerebrais analisadas por microPET. O grupo HI apresentou um hipometabolismo cerebral no hemisfério direito nas seguintes regiões: córtex entorrinal (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD), córtex parietal (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD e #  $p < 0,05$  Sham - HE vs. HI - HD) e córtex visual (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD e #  $p < 0,05$  Sham - HE vs. HI - HD).

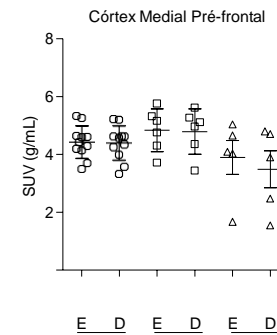
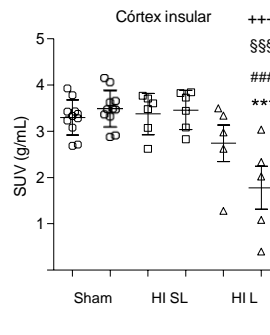
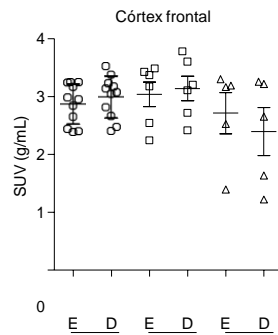
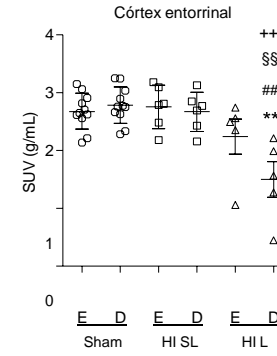
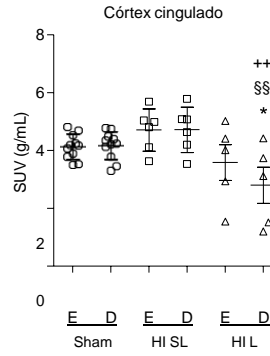
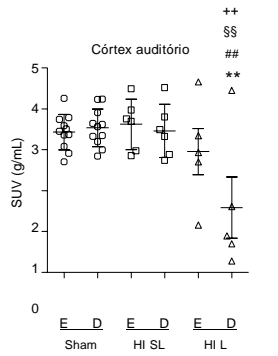
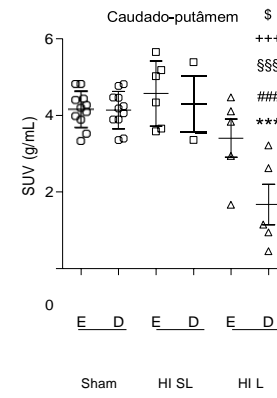
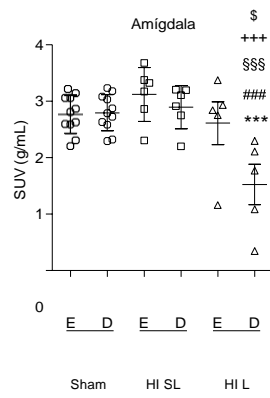
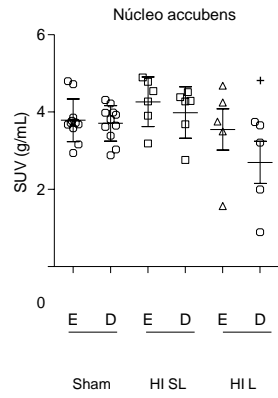








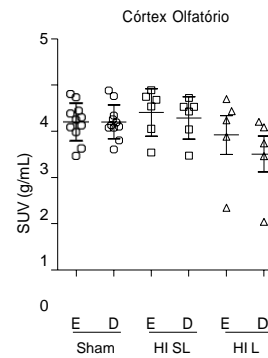
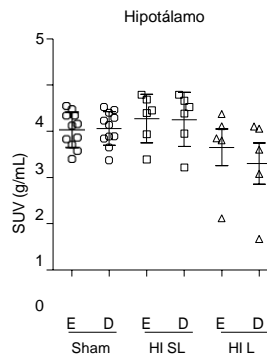
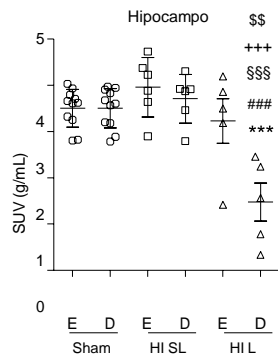
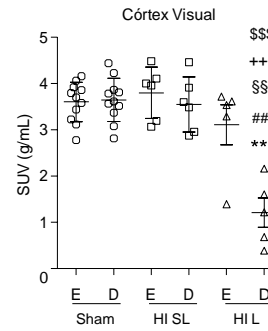
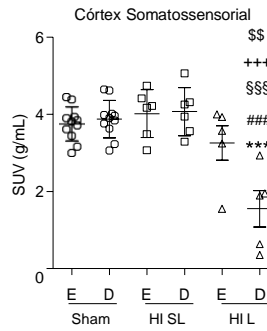
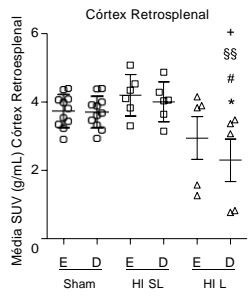
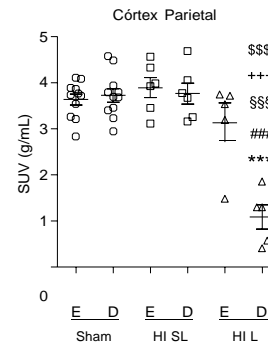
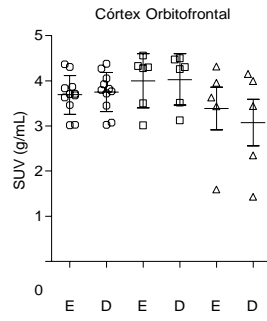
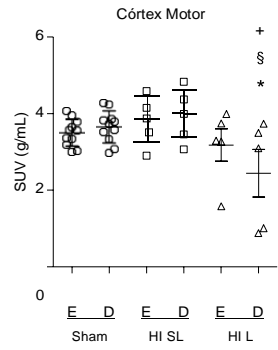
**Figura complementar 1.** Análise do metabolismo de glicose nas diferentes regiões cerebrais analisadas por microPET. O grupo HI apresentou um hipometabolismo cerebral no hemisfério direito nas seguintes regiões: córtex entorrinal (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD), córtex parietal (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD e #  $p < 0,05$  Sham - HE vs. HI - HD) e córtex visual (\* $p < 0,05$  Sham - HD vs. HI - HD e #  $p < 0,05$  Sham - HE vs. HI - HD).

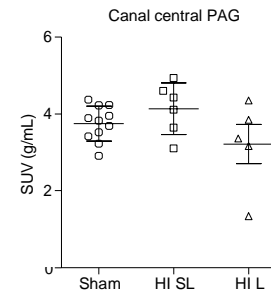
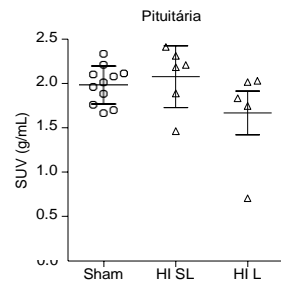
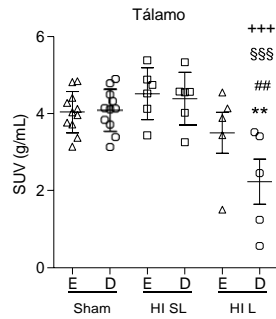
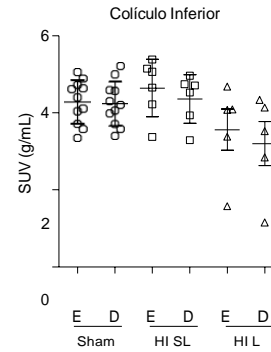
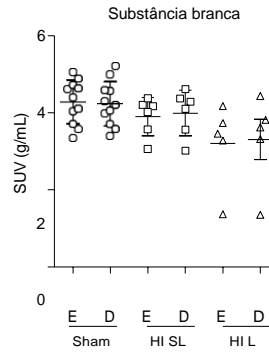
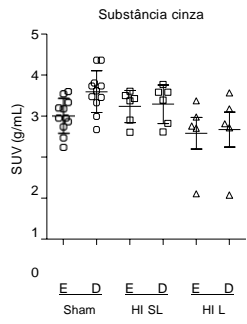
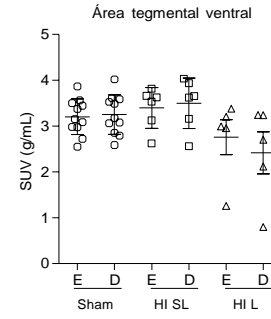
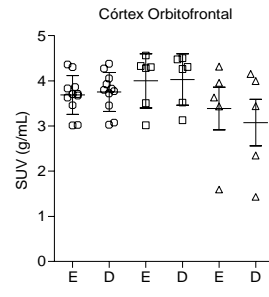
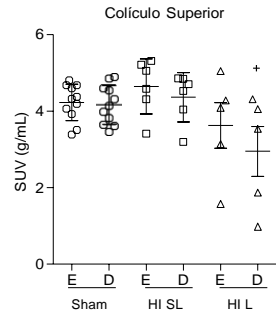


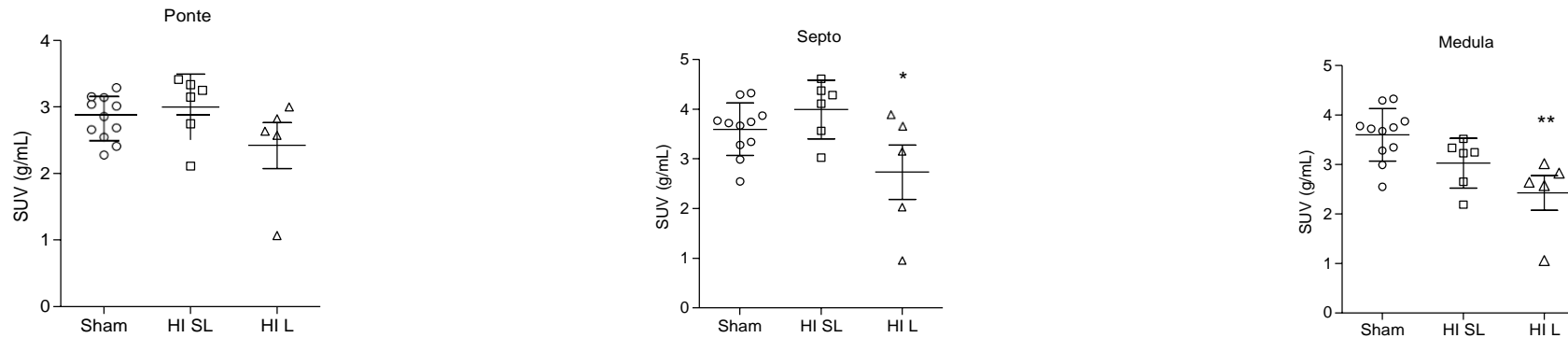
Sham    HI SL    HI L

0  
    E    D        E    D    E    D  
Sham    HI SL    HI L









**Figura complementar 2.** . Análise do metabolismo de glicose nas diferentes regiões cerebrais por microPET entre os grupos Sham, HI SL e HI L. O grupo HI L apresentou um hipometabolismo cerebral no hemisfério direito na maioria das regiões cerebrais analisadas: núcleo accubens (HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +p< 0,05), amígdala (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001; HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001; HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$p< 0,05), caudado putamem (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001; HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001 e HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$p< 0,05), córtex auditório (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*p< 0,01; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ##p< 0,01; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ++p< 0,01 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§p< 0,01), córtex cingulado (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*p< 0,05; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ++p< 0,01 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§p< 0,01), córtex entorrinal (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001), córtex insular (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001), córtex motor (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*p< 0,05; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +p< 0,05 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$p< 0,05), córtex parietal (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001, HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001 e HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$\$\$p< 0,05), córtex retrosplenial (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*p< 0,05; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, #p< 0,05; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +p< 0,05 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§p< 0,01), córtex somatosensorial (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001, HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001 e HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$\$\$p< 0,01), córtex visual (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001, HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001 e HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$\$\$p< 0,001), hipocampo (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*\*p< 0,001; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ###p< 0,001; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001, HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001 e HI L<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, \$\$\$p< 0,01), colículo superior (HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +p< 0,05), tálamo (Sham<sub>HD</sub> vs HI L<sub>HD</sub>, \*\*p< 0,01; Sham<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, ##p< 0,01; HI SL<sub>HD</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, +++p< 0,001 e HI SL<sub>HE</sub> vs. HI L<sub>HD</sub>, §§§p< 0,001), septo (Sham vs. HI L, \*p< 0,05) e medula (Sham vs. HI L, \*\*p< 0,01).