

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de Biomedicina**

**Yeda Junqueira**

**IC-08**

**EFEITO DA MELATONINA NO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ANÓXIA NEONATAL**

**São Paulo**

**2024**

**YEDA JUNQUEIRA**

**EFEITO DA MELATONINA NO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ANÓXIA NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Univertário São Camilo, orientado pelo Prof. Ronaldo Luis da Silva como requisito parcial para obtenção do título de Biomédico.

**São Paulo**

**2024**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus familiares, que sempre me apoiaram de forma incondicional, desde o início da minha jornada. Sem o suporte e o amor de vocês, essa conquista não seria possível.

Agradeço à Faculdade São Camilo, que me forneceu toda a base de conhecimento na minha formação em Biomedicina, e a todos os professores que, ao longo da minha trajetória, desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento dos meus conhecimentos. Em especial ao Ronaldo Luis da Silva, o orientador desse trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do ABC (UFABC), instituição que me proporcionou a oportunidade de realizar este projeto e vivenciar uma iniciação científica ímpar, que contribuiu imensamente para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Bruna Petrucelli Arruda, por sua orientação na UFABC, a sua paciência e dedicação ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço à Silva Honda Takada, por toda orientação e suporte durante o projeto, que foram essenciais para sua realização. Um agradecimento à FAPESP, cujo incentivo foi de grande importância para o sucesso dessa trajetória acadêmica.

Por fim, agradeço aos meus amigos de turma e de iniciação científica, que me apoiaram e compartilharam conhecimento durante esse período, eles tornaram essa jornada mais leve e sempre me motivaram a seguir em frente. Sem vocês, essa caminhada teria sido muito mais difícil.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	9
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
4.1	PESQUISA E CURADORIA DO CONTEÚDO .....	10
4.1.1	<b>Objetivo</b> .....	10
4.1.2	<b>Desenvolvimento</b> .....	10
4.2	FORMAÇÃO DE GRUPOS.....	11
4.2.1	<b>Objetivo</b> .....	11
4.2.2	<b>Desenvolvimento</b> .....	11
4.3	ANÓXIA NEONATAL .....	11
4.3.1	<b>Administração de melatonina</b> .....	12
4.4	PROCESSAMENTO BIOLÓGICO .....	12
4.4.1	<b>Objetivo</b> .....	12
4.4.2	<b>Desenvolvimento</b> .....	13
<b>4.5</b>	<b>IMUNO-HISTOQUÍMICA</b> .....	<b>13</b>
4.5.1	<b>Objetivo</b> .....	13
4.5.2	<b>Desenvolvimento</b> .....	13
4.6	WESTERN BLOTTING .....	14
4.6.1	<b>Objetivo</b> .....	14
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	15
4.7.1	<b>Objetivo</b> .....	15
4.7.2	<b>Desenvolvimento</b> .....	15
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>23</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>24</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A anóxia neonatal é definida como a privação total do fornecimento de oxigênio no nascimento. Clinicamente, a variabilidade de alterações fisiológicas dificulta a distinção entre anóxia e hipóxia (diminuição do fornecimento de oxigênio). Além disso, a maioria das lesões decorrentes da privação de oxigênio ocorrem em combinação com isquemia e, por isso, o termo comumente utilizado nesses casos é encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI). Este termo diagnóstico é utilizado tanto para descrever as alterações fisiológicas, celulares e moleculares, quanto para descrever a manifestação clínica dessa função cerebral desordenada após anoxia neonatal<sup>1,2</sup> que é caracterizada por um estado de consciência deprimido, anormalidade do tônus muscular, diminuição de movimentos reflexos e incapacidade de iniciar/manter a respiração<sup>3</sup>.

A incidência da EHI é de 1-8/1000 nascidos vivos em países de alta renda e chega a 26/1000 nascidos vivos em países de baixa renda<sup>1,4</sup>; quando há prematuridade associada ao baixo peso, o índice se eleva a 60%<sup>5</sup> e cerca de 25% dos sobreviventes apresenta alterações cognitivas e motoras de longa duração, incluindo disfunções metabólicas, convulsões, epilepsia, paralisia cerebral, deficiência intelectual e outros distúrbios comportamentais<sup>6,7</sup>.

Para estudar essa condição, Takada e colaboradores desenvolveu um modelo de anoxia neonatal, global e não invasivo que, ao utilizar ratos em P2 simula as condições clínicas de recém-nascidos prematuros – aproximadamente, na 28ª semana de gestação<sup>8,9</sup>. Neste modelo, foi observada morte nas populações gliais e neuronais do hipocampo, diminuição da neurogênese e volume dessa região<sup>8,10</sup>, redução da densidade celular do córtex somatossensorial primário<sup>11</sup>, alterações no metabolismo energético<sup>12</sup>, no desenvolvimento sensoriomotor<sup>11</sup>, na memória e aprendizagem<sup>13,14</sup> e nas respostas nociceptivas<sup>15</sup>.

O déficit de oxigênio e do suprimento de glicose impedem a fosforilação oxidativa e geram uma falha energética com consequente morte celular<sup>16</sup>. A primeira falha leva a despolarização neuronal e liberação de aminoácidos excitatórios na fenda sináptica. Como a recaptação do neurotransmissor dependente de glicose está prejudicada, ocorre acúmulo de glutamato extracelular em níveis tóxicos. A ativação exacerbada de receptores excitatórios aumenta o influxo de cálcio e promove níveis elevados de óxido nítrico, danificando as mitocôndrias<sup>17</sup>. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio na fase de reperfusão gera estresse oxidativo adicional às mitocôndrias que, após lesadas,

produzem mais radicais livres, que conseqüentemente alteram as funções da membrana, contribuindo com a morte celular<sup>16-18</sup>.

Um efeito importante observado em natimortos prematuros com EHI e ratos expostos à hipóxia-isquemia (HI) é a glicose da substância branca, que desvia as células-tronco gliais para diferenciação em astrócitos reativos e, por isso, reduz a população de oligodendrócitos, comprometendo a mielinização normal<sup>19,20</sup>. Os astrócitos são o tipo celular mais abundante no cérebro e estão envolvidos em várias funções importantes, incluindo a proteção contra danos induzidos por espécies reativas de oxigênio<sup>21</sup>.

Dentre as regiões mais afetadas pelo déficit de oxigênio e sua conseqüente inflamação está o hipocampo<sup>3,22</sup>, especialmente no período de desenvolvimento, quando lesões cerebrais resultam em diminuição expressiva e persistente do volume dessa região<sup>9</sup>. Até o momento, a hipotermia é único método licenciado de tratamento disponível para tentar atenuar os danos causados pelo déficit de oxigênio<sup>22</sup>. Contudo, embora ela tenha reduzido a taxa de mortalidade e deficiências neurológicas, não é suficiente para prevenir/reduzir todas as alterações desencadeadas após insulto. Por isso, diferentes pesquisadores se dedicam a estudar possibilidades de tratamento alternativas/complementares. Entre elas, a melatonina apresenta resultados promissores em diferentes modelos de injúria cerebral neonatal.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma molécula hormonal não esteroide, produzida principalmente pela glândula pineal, responsável pelo controle do ciclo circadiano. Sua síntese, por essa glândula, se inicia no período escuro, quando a noradrenalina interage com os receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos e  $\alpha$ 1-adrenérgicos presentes nos pinealócitos, levando a uma cascata de eventos intracelulares, que começa com o metabolismo do aminoácido triptofano para formar a serotonina (5-HT), seguida por N-acetilserotonina (NAS) e finalmente melatonina, que é liberada rapidamente na circulação e posteriormente metabolizada pelo fígado<sup>23</sup>.

Além da sua atuação no ritmo circadiano, a melatonina é um potente agente antioxidante direcionado às mitocôndrias; uma de suas principais funções é a proteção contra estresse oxidativo<sup>24,25</sup>. Sendo assim, exerce efeitos regulatórios sobre o sistema de defesa<sup>26</sup>, atuando tanto na neutralização das espécies reativas de oxigênio quanto na estimulação da atividade de enzimas antioxidantes<sup>27</sup>; além disso, reduz a produção de citocinas inflamatórias<sup>26</sup> e o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios<sup>28</sup>.

A administração de melatonina subsequente ao déficit de oxigênio neonatal demonstrou proteger o hipocampo após hipóxia-isquemia, reduziu a morte celular, a

desmielinização e a astrogliose reativa, além de amenizar os distúrbios comportamentais<sup>29-31</sup>. Estudos utilizando modelo de hipóxia-isquemia evidenciaram redução do dano ipsilateral, do estresse do retículo endoplasmático e dos déficits comportamentais e de aprendizagem dos animais tratados com melatonina<sup>32-34</sup>. Em experimento com camundongos expostos à hipóxia observou-se que a melatonina promoveu melhora significativa nos testes de memória e aprendizagem, redução no atraso dos reflexos sensório-motores, assim como menor índice de morte celular no hipocampo duas semanas após insulto<sup>35</sup>, demonstrando eficácia no tratamento de danos que envolvem alterações no suprimento de oxigênio.

Este tema foi escolhido com base nas experiências e interesses adquiridos ao longo da graduação em Biomedicina. A complexidade dos mecanismos e as consequências envolvidas na anóxia neonatal, combinada com o impacto clínico significativo dessa condição, foram os principais focos de interesse para construção desse trabalho. Durante a formação, as áreas de neurociência e fisiologia contribuíram para a compreensão dos eventos da privação de oxigênio no sistema nervoso.

Embora a melatonina seja um hormônio produzido no organismo, estudos em animais indicam que a ação neuroprotetora da melatonina ocorre em doses que variam de 5 a 15 mg/kg, que provocam são valores muito superiores aos valores fisiológicos. Para além disso, a secreção endógena pela glândula pineal, começa entre a sexta e oitava semana pós-natal em humanos e ao final da primeira semana pós-natal em ratos, e a concentração de melatonina plasmática em recém-nascidos prematuros é baixa, especialmente na ocorrência de insultos neurológicos<sup>35</sup>. Esse período de deficiência transitória da melatonina corresponde exatamente ao período em que o encéfalo imaturo está mais suscetível<sup>36</sup>.

Pesquisadores também observaram que a meia vida da melatonina administrada é muito maior em recém-nascidos (8-15 h), incluindo prematuros, em comparação aos adultos (45 m)<sup>33,37</sup>; dados que fortalecem a importância de estudar a ação da melatonina administrada após anóxia neonatal.

O interesse por intervenções terapêuticas inovadoras, como a utilização da melatonina, foi devido ao grupo de pesquisa do local de realização do projeto de iniciação científica, UFABC. Dessa forma, espera-se que este trabalho contribua para o avanço na compreensão de novas abordagens terapêuticas nessa área.

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora o tratamento com hipotermia esteja bem estabelecido, clinicamente, após o déficit de oxigênio, esse não pode ser empregado em recém-nascidos prematuros devido à ausência de comprovação da eficácia nessa população. Apesar dos estudos a respeito dos efeitos neuroprotetores da melatonina em modelos de hipóxia e hipóxia-isquemia, é importante esclarecer que foram utilizados animais que simulam condições clínicas de nascidos a termo. Ou seja, não mimetizam a população mais acometida pela anóxia neonatal, que corresponde a prematuros. Portanto, também não há estudos que avaliem o efeito da melatonina no estresse oxidativo neste modelo.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da melatonina no estresse oxidativo no hipocampo de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a astrogliose reativa no hipocampo por imunofluorescência para GFAP e pelos níveis proteicos de GFAP por Western blot, 72 horas após anóxia neonatal.
2. Quantificar as células nNos+ nas regiões CA1, CA3 e giro denteado por imunofluorescência 72 horas após anóxia neonatal.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 PESQUISA E CURADORIA DO CONTEÚDO**

#### **4.1.1 Objetivo**

A etapa de pesquisa e curadoria de conteúdo tem como objetivo fornecer uma base teórica sólida para o desenvolvimento do projeto. O principal foco está em selecionar materiais científicos que corroborem com as hipóteses e as metodologias escolhidas, além de promover uma discussão constante com a equipe envolvida para garantir o alinhamento do trabalho.

#### **4.1.2 Desenvolvimento**

O primeiro passo foi realizar uma busca aprofundada por artigos científicos relevantes que discutem as consequências da anóxia neonatal e sua relação com o estresse oxidativo. Como já existiam pesquisas na equipe sobre os efeitos neuroprotetores da melatonina, surgiu o interesse de investigar o efeito da melatonina no estresse oxidativo após anóxia neonatal. A literatura encontrada foi importante para fornecer uma base comparativa para os experimentos, principalmente em metodologias similares às que foram planejadas, como o Western Blotting e a imunofluorescência. A escolha dos artigos foram fundamentais para fortalecer o desenvolvimento teórico, e proporcionar percepções diferentes para a execução do estudo.

Além disso, desse passo foi essencial manter uma comunicação aberta e produtiva com a equipe do laboratório. Reuniões semanais eram feitas para alinhar expectativas e discutir detalhes como a escolha de reagentes, padronização de protocolos e organização dos experimentos. Esses diálogos permitiram que as ideias fossem compartilhadas de forma colaborativa na melhor forma de adaptar o que foi encontrado na literatura para o contexto prático, garantindo que todos os materiais necessários estejam disponíveis e que os procedimentos sejam executados com assertividade, evitando erros metodológicos e otimizando os recursos disponíveis.

## 4.2 FORMAÇÃO DE GRUPOS

### 4.2.1 Objetivo

Esta etapa teve a finalidade de organizar os grupos experimentais, envolvendo o acasalamento, sexagem e pesagem dos filhotes, para distribuir adequadamente os animais nos respectivos grupos de tratamento: controle salina, anóxia veículo e anóxia melatonina.

### 4.2.2 Desenvolvimento

Foram utilizados *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, criados no biotério da Universidade Federal do ABC – campus São Bernardo do Campo, em temperatura constante ( $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ) e ciclos de 12h claro/escuro com início do claro às 7:00h, e água e comida ad libitum. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais serão divididos em 3 grupos, de acordo com estímulo e tratamento: controle salina, anóxia veículo, anóxia melatonina.

## 4.3 ANÓXIA NEONATAL

Para a anóxia, será utilizado sistema descrito por Takada e colaboradores (2011) com modificações<sup>8</sup>. O sistema é constituído por câmara semi-hermética de policarbonato, com entrada e saída de gás, acoplada a regulador e cilindro de nitrogênio gasoso 100%. Como modificação, a temperatura da câmara será mantida entre 35 e 37°C por placa aquecedora. Os neonatos, com aproximadamente 30 h de vida e peso entre 6-8 gramas, serão colocados rapidamente dentro da câmara, que será saturada com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5L/minuto. Os animais permanecerão no interior da câmara, expostos ao gás nitrogênio, durante 25 minutos<sup>8</sup>. Após a recuperação dos animais (coloração, respiração e movimentação ativa), serão submetidos à administração de melatonina e

devolvidos à mãe. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais, sem a saturação de nitrogênio.

### **4.3.1 Administração de melatonina**

A melatonina (M5250; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) será dissolvida em DMSO 5% e salina. Os animais receberão injeção intraperitoneal em três doses de 15 mg/kg, 5 min, 24 h e 48 h após anóxia, conforme protocolo para ratos estabelecido na literatura<sup>33,38</sup>. Para chegar à dosagem escolhida, foram testadas as seguintes dosagens e tempos: uma dose única de 5 mg/kg antes do procedimento isquêmico; uma dose única de 15 mg/kg antes do procedimento isquêmico; três doses de 5 mg/kg – a primeira, 30 minutos antes do procedimento isquêmico, a segunda 5 minutos depois da hipóxia e a terceira 5 minutos após a hipóxia; e três doses de 15 mg/kg 5 minutos, 24 h e 48 h após hipóxia. Como resultado, a diminuição da lesão na dosagem de 5 mg/kg, independente se em dosagem única ou em três dosagens, não foi significativa. Em ambos time-points, 15 mg/kg de melatonina demonstrou efeito neuroprotetor, sendo que a administração em três doses após o insulto demonstrou uma redução do dano hipocampal em 79%. Portanto, essa dosagem foi adotada neste projeto<sup>39</sup>.

## **4.4 PROCESSAMENTO BIOLÓGICO**

### **4.4.1 Objetivo**

O objetivo deste processo é realizar a coleta e processamento biológico dos encéfalos para análises de imunofluorescência de GFAP e nNos, bem como para a avaliação de níveis proteicos de GFAP por western blot, a partir dos protocolos de perfusão transcardíaca e crioseção.

#### 4.4.2 Desenvolvimento

Para análise de imunofluorescência de GFAP e nNos, 72 horas após anóxia, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (70 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) e perfundidos com solução salina 0,9% para limpeza do leito vascular, seguido de formaldeído 4% (pH 7,4) para fixação do tecido. Após as perfusões transcardíacas, os encéfalos foram removidos, acondicionados em solução pós-fixadora 'overnight', em seguida em solução crioprotetora por cerca de 48 horas. Após este período, eles foram congelados e crio-seccionados em secções de 30 µm, divididas em 8 séries, montadas em lâminas.

Para análise de níveis proteicos de GFAP por western blot, os animais foram decapitados para retirada do encéfalo. O hipocampo foi dissecado e conservado em tampão RIPA® (Invitrogen, EUA).

### 4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

#### 4.5.1 Objetivo

O objetivo da imunofluorescência de GFAP é avaliar o efeito da melatonina na astrogliose reativa, enquanto a imunofluorescência de nNos visa quantificar células nNos+ nas regiões CA1, CA3 e giro denteado em cada grupo experimental.

#### 4.5.2 Desenvolvimento

Resumidamente, uma série de cortes de cada animal foi utilizada em cada imunofluorescência realizada. Para desmascaramento de epítipo, as lâminas contendo os cortes foram incubadas por 7 minutos em solução de ácido cítrico 0,2% (pH 6,0) fervendo, e em seguida mantidas na mesma solução por 20 minutos para resfriamento.

Posteriormente foram lavadas uma vez com água destilada e, então, com PBS 0,1M 3 vezes de 5 minutos. Logo após, foram incubadas em soro de burro por 40 minutos, lavadas

novamente com PBS 0,1M 3 vezes de 5 minutos, e incubadas em anticorpo primário, para a imunofluorescência de GFAP (G3893, concentração: 1:200; overnight) e de nNos (sc-648, concentração: 1:200; 48h). Após o tempo especificado, as lâminas foram lavadas com PBS 0,1M 3 vezes de 1 minuto, incubadas em anticorpo secundário por 2 horas (Alexa Fluor 488 Dk x Ms e Alexa Fluor 488 Dk x Rb, respectivamente), lavadas mais uma vez com PBS 0,1M 3 vezes de 5 minutos e fechadas com lamínulas, utilizando glicerol carbonato como meio de montagem.

## 4.6 WESTERN BLOTTING

### 4.6.1 Objetivo

A finalidade do Western blot foi quantificar os níveis proteicos de GFAP nos hipocampos, 72 horas após anóxia neonatal, em cada grupo experimental.

### 4.6.2 Desenvolvimento

Os hipocampos foram homogeneizados em tampão RIPA (Millipore, Temecula, CA, EUA), contendo mistura de inibidores de protease e 2mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo. Os lisados serão recolhidos e centrifugados a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. Em seguida, as amostras de proteína foram quantificadas utilizando um Kit BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) e 60ug de cada amostra foi submetida a eletroforese através de um gel de dodecilsulfato-poliacrilamida de sódio a 14% e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulos e de 0,45um (Millipore). As amostras foram, então, incubadas durante a noite, a 4°C, com o anticorpo primário de interesse (3670S) e, em seguida, incubadas com anticorpo secundário (NA9310V) à temperatura ambiente durante 2h. Foi utilizado sistema de detecção de quimioluminescência aumentada (Pierce Biotechnology) e a densidade óptica das bandas foi mensurada com o software ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). O anticorpo  $\beta$ actina (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) foi utilizado para normalizar a

amostra. As intensidades das bandas foram quantificadas densitometricamente usando Gel- Pro Analyzer (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

## 4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 4.7.1 Objetivo

Nessa etapa ocorreu a análise dos resultados e estatística dos experimentos realizados.

### 4.7.2 Desenvolvimento

As lâminas contendo os cortes reagidos em imunofluorescência serão analisadas em microscópio de fluorescência (5500 DM, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (DFC 365 FX, Leica Microsystems, Alemanha). Para a análise estatística, será empregado o teste two-way ANOVA com o pos hoc Tukey em caso de distribuição normal. Do contrário, serão substituídos por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis ou Wilcoxon). Será considerado significativo  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

Os experimentos realizados neste projeto tiveram como objetivo principal analisar o efeito da melatonina no estresse oxidativo no hipocampo de ratos submetidos à anóxia neonatal. Conforme indicado pela literatura, a falta de oxigênio desencadeia uma série de eventos, incluindo a falha na geração de ATP devido à interrupção na cadeia de transporte de elétrons. Durante o período de reperfusão, há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), que resultam em estresse oxidativo. Esse acúmulo de EROs provoca danos às membranas celulares, proteínas e DNA, ativando mecanismos de morte celular e neuroinflamação. Essas condições contribuem para a ativação exacerbada dos astrócitos, conhecido como astrogliose, essa situação faz com que os astrócitos sofram mudanças morfológicas e funcionais, aumentando de tamanho e expressando proteínas específicas, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

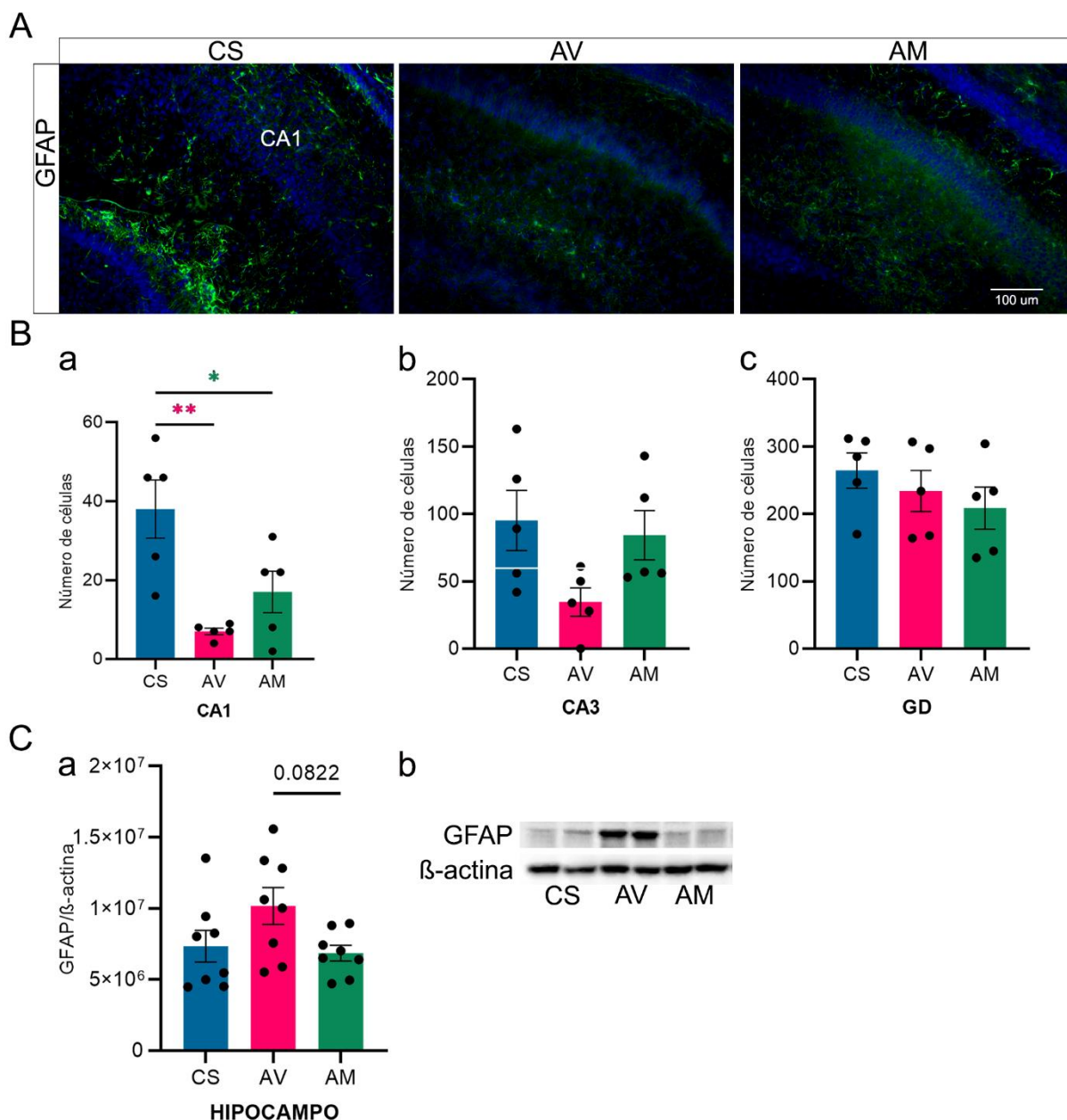
A imunofluorescência para GFAP, figura 1 (A e B), foi realizada com o objetivo de avaliar o impacto da melatonina na astrogliose reativa. A análise estatística, utilizando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey, revelou diferenças significativas na região CA1 do hipocampo ( $F=1,841_{(2,12)}$ ;  $p=0,003$ ); O grupo anóxia veículo obteve uma contagem inferior de células GFAP positivas quando comparado ao grupo de controle ( $p = 0,003$ ). O grupo anóxia melatonina também apresentou menos células GFAP positivas em comparação ao controle ( $p=0,03$ ), mas com um valor de significância menor em comparação ao anóxia veículo.

A análise nas camadas, na figura B, CA1, CA3 e giro dentado (GD) revelaram diferenças na resposta astrocítica após anóxia neonatal. A região CA1 apresentou uma redução significativa no número de células GFAP+ nos grupos anóxia veículo e anóxia melatonina. Desta forma, é possível sugerir uma vulnerabilidade da CA1 que pode estar relacionada à sua alta demanda energética e maior susceptibilidade ao estresse oxidativo, o que aumenta a astrogliose, isso foi evidenciado pela maior ativação astrocítica no grupo controle salina, em contraste com os grupos submetidos à anóxia.

Também foram analisados os níveis proteicos de GFAP por western blot, figura 1 (C) e, embora não tenha resultado em diferença estatisticamente significativa, houve tendência de maior expressão da proteína no grupo anóxia veículo, em comparação ao grupo anóxia melatonina ( $p=0,082$ ). Isso indica uma tendência, já que o p-valor está próximo ao limiar de significância, isso pode refletir a possibilidade de um aumento do tamanho da amostra, poderia revelar uma diferença estatisticamente significativa.



Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão ANOVA de uma via seguida de pós teste em Tukey; n = 5/grupo (imunofluorescência); n = 8/grupo (western blot).

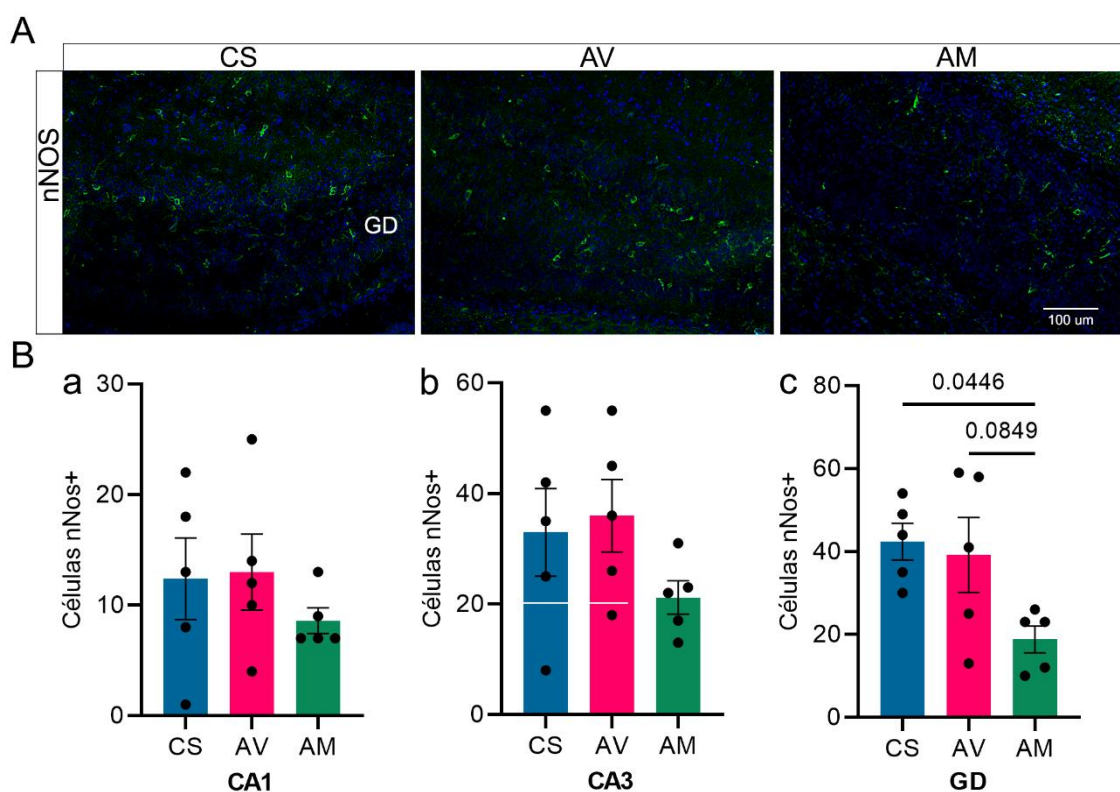


**Figura 1 - Células GFAP+ e expressão de GFAP no hipocampo, 72 h após anóxia neonatal.** (A) Imagens de cortes coronais do hipocampo após imunofluorescência, mostrando menos marcação de células GFAP+ nos grupos AV e AM. Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Quantificação de células GFAP+ nas regiões do hipocampo. (a) CA1. (b) CA3. (c) GD. (C) Padrão de expressão de GFAP após anóxia neonatal. (a) Quantificação do nível de expressão da proteína GFAP no hipocampo. (b) Imunotransferência representativa da quantificação mostrando tendência à aumento da expressão de GFAP no grupo AV.

Como dito anteriormente, uma das principais consequências da anoxia é o estresse oxidativo que causa o aumento influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  que ativa óxido nítrico sintase, mediador responsável pela produção de óxido nítrico (NO), contribuindo para liberação de EROs. A enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal (nNOS) serve como um marcador neuronal do estresse oxidativo.

O experimento visou investigar a expressão da nNos no hipocampo de ratos neonatais submetidos à anoxia, utilizando imunofluorescência para quantificar as células nNos+ em diferentes sub-regiões do hipocampo: CA1, CA3 e giro denteado (GD). Três grupos foram avaliados: controle salina (CS), anoxia veículo (AV) e anoxia melatonina (AM).

A análise de estresse oxidativo foi realizada pela técnica de imunofluorescência para a detecção de nNOS (figura 2), que possibilitaria identificar estresse oxidativo na região hipocampal e por seguinte o efeito da melatonina. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão; ANOVA de uma via seguida de pós teste em Tukey;  $n = 5/\text{grupo}$ .



**Figura 2 - Células nNos+ e expressão de nNos no hipocampo, 72 h após anoxia neonatal.** (A) Imagens representativas de cortes coronais do hipocampo após imunofluorescência, mostrando a marcação de células nNos+ (em verde) nas sub-regiões do hipocampo nos grupos CS (controle salina), AV (anoxia veículo) e AM (anoxia melatonina). A barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ . (B) Quantificação da soma de células

nNos+ nas regiões do hipocampo. (a) CA1 (b) CA3 (c) GD (giro denteado). Análises estatísticas mostram uma tendência de redução no grupo AM comparado ao grupo AV ( $p=0,0849$ ) e uma diferença significativa entre os grupos CS e AM ( $p=0,0446$ ).

Uma representação visual da distribuição e expressão das células nNOS+ nas diferentes sub-regiões do hipocampo está apresentado na figura 2 (A), onde marcadores fluorescentes permite a identificação precisa da localização de nNOS. Pode-se observar no grupo controle salina uma quantidade moderada de células nNOS+, refletindo o nível fisiológico de estresse oxidativo esperado. No grupo anóxia melatonina, um aumento visível na marcação de células nNOS+. Esta maior fluorescência pode ser associada ao aumento do estresse oxidativo decorrente da anoxia neonatal. E por fim diminuição acentuada na marcação de nNOS+ em relação ao grupo anóxia melatonina. Essa redução reforça a hipótese de que a melatonina exerce um efeito neuroprotetor.

Na figura 2 (B), ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ( $F=2,685_{(2,12)}$ ;  $p=0,0370$ ) no giro denteado. O grupo anóxia melatonina apresentou significativamente menos células nNOS+ em relação ao controle ( $p=0,0446$ ) e uma tendência a menor quantidade de células nNOS+ em relação ao grupo anóxia veículo ( $p=0,0849$ ), o que sugere que a melatonina pode ter exercido um efeito protetor mais evidente nessa sub-região, e possivelmente modulando a produção de óxido nítrico e reduzindo o estresse oxidativo.

## 6. DISCUSSÃO

Os astrócitos desempenham um papel crucial na regulação do glutamato extracelular após insultos, sendo que a falha dessas células está associada a uma piora no dano cerebral<sup>40</sup>. A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é amplamente reconhecida como um marcador confiável para astrócitos<sup>41</sup>. Utilizando GFAP como marcador, realizamos experimentos de imunofluorescência e western blot para avaliar a resposta astrocitária em condições de privação de oxigênio.

De acordo com os resultados obtidos na imunofluorescência de GFAP, foi possível identificar uma redução no número de células GFAP positivas na região CA1 do hipocampo 72 horas após a anóxia neonatal, indicando uma resposta astrocitária alterada frente ao insulto. Este achado sugere implicações importantes na regulação do ambiente cerebral e na possível contribuição para o dano cerebral resultante da anóxia neonatal.

Embora os astrócitos revelem uma habilidade prolongada de manter os níveis de ATP, uma menor presença de receptores ionotrópicos de glutamato e uma eficiência superior em termos de capacidade oxidante em comparação aos neurônios, não escapam dos efeitos da asfixia perinatal<sup>42</sup>.

Pesquisas realizadas em porcos recém-nascidos submetidos à hipóxia-isquemia também revelam uma diminuição na extensão ocupada pelos processos astrogliais marcados por GFAP na substância branca<sup>43,44</sup>. Em outro estudo abordando os efeitos da anóxia neonatal na resposta nociceptiva em ratos, comparando as diferenças sexuais, foi observada diminuição na expressão de astrócitos em machos anoxiados no período neonatal no córtex insular<sup>45</sup>.

Entretanto, também há um estudo feito em ratos neonatos que explorou os efeitos da hipóxia-isquemia no cérebro, quantificado a expressão gênica em córtex e hipocampo para os determinados genes, entre eles o marcador de astrócitos. O estudo demonstrou evidências significativas de regulação positiva do GFAP, esse efeito foi observado às 6 horas no córtex e no hipocampo. No córtex, a regulação positiva persistiu às 12 horas, com uma evidência mais fraca no hipocampo. Contudo, não houve evidência significativa de regulação às 24 horas em nenhuma das regiões analisadas<sup>46</sup>.

Visto isso, os resultados sugerem uma possível variação temporal nos efeitos observados, o que destaca a importância de considerar os diferentes times points ao interpretar os efeitos da hipóxia-isquemia nas respostas celulares.

Na padronização da imunofluorescência de nNOS foram protocolos que empregaram o mesmo anticorpo utilizado pelo laboratório (sc-648). Além disso, foram consideradas referências bibliográficas para a compreensão e as diferentes percepções de resultados. O propósito dessa técnica é identificar e visualizar a presença e a localização da enzima nNos nas amostras coletadas para a análise quantitativa nos diferentes grupos.

Em uma pesquisa foi avaliada a expressão da enzima neuronal óxido nítrico sintase (nNOS) em astrócitos do corpo caloso humano obtidas pós-morte de indivíduos que sofreram diferentes durações de hipóxia, os pesquisadores encontraram a presença de astrócitos nNOS positivos aumentados de acordo com a duração da hipóxia, enfatizando a correlação entre a duração da hipóxia e a expressão de nNOS<sup>47</sup>.

Outro estudo feito, desta vez, em ratos Wistar induzidos à asfixia perinatal (AP), possui o objetivo de apresentar o momento e a distribuição da produção de óxido nítrico (NO) após asfixia perinatal nas regiões do estriado e cerebelo, empregou a abordagem da imunohistoquímica afim determinar as distribuições de NO sintase neuronal (nNOS). Os resultados sugeriram que a asfixia perinatal resultou em um aumento temporário e regionalmente específico na produção de NO, mediado pela nNOS, especialmente no estriado durante a primeira semana pós-natal. Este aumento pode estar associado à excitotoxicidade e danos neuronais. A ausência de alterações significativas no cerebelo sugere uma vulnerabilidade diferencial entre diferentes regiões cerebrais<sup>48</sup>.

De acordo com uma pesquisa que investigou os efeitos da isquemia e reperfusão cerebral em ratos, focalizando nas alterações do sistema de óxido nítrico (NO), também foi observado aumento da expressão de nNOS em grandes interneurônios tipo I e pequenos neurônios tipo II. A imunorreatividade para nNOS aumentou inicialmente, seguida por uma queda após 6 horas de reperfusão<sup>49</sup>.

Desta maneira, considerando os resultados da imunofluorescência de Nnos e o ponto de vista teórico, o estresse oxidativo é um efeito bem pertinente na anóxia e possui forte relação com Nnos, pela produção de óxido nítrico. Visto que, o estresse oxidativo é uma resultante de espécies reativas de oxigênio, na presença da melatonina, agente antioxidante, espera o abrandamento dessa perturbação. No entanto a escolha do time point para a coleta de dados, 72 horas após a anoxia, pode ter influenciado os resultados. Esse intervalo de tempo pode ter permitido a recuperação parcial dos níveis de estresse oxidativo, diminuindo a expressão de Nnos e dificultando a observação de diferenças em alguns grupos. É relevante o estudo mais específico em relação a análise de time points

múltiplos, ou seja, coletar dados em vários intervalos de tempo após a anóxia para capturar melhor as oscilações na expressão de Nnos.

Também é observado a variabilidade regional na expressão de nNOS, no qual é possível destacar a complexidade e o impacto do estresse oxidativo para entender completamente os efeitos antioxidantes da melatonina. Pesquisas adicionais ainda são necessárias para confirmar esses achados e estabelecer as melhores práticas para o uso da melatonina como uma intervenção terapêutica contra o estresse oxidativo induzido por anóxia.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, podemos concluir que a melatonina reduziu a resposta de astrogliose reativa, com menor expressão de GFAP em comparação ao grupo anóxia veículo (AV). Também foi percebido que a melatonina diminuiu a expressão de nNOS, indicando um possível efeito antioxidante em ratos neonatos após anóxia. O estudo proporcionou uma ampla possibilidade de discussão sobre o tema, contribuindo para uma maior compreensão das respostas celulares à anóxia neonatal e dos possíveis efeitos protetores da melatonina.

## REFERÊNCIAS

1. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic–ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*. 2010 Jun 1;86(6):329–38.
2. Greco P, Nencini G, Piva I, Scioscia M, Volta CA, Spadaro S, Neri M, Bonaccorsi G, Greco F, Cocco I, Sorrentino F, D’Antonio F, Nappi L. Pathophysiology of hypoxic–ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. *Acta Neurol Belg* [Internet]. 28 fev 2020 120(2):277-88. DOI: 10.1007/s13760-020-01308-3.
3. Laptook AR, Shankaran S, Tyson JE, Munoz B, Bell EF, Goldberg RN, et al. Effect of therapeutic hypothermia initiated after 6 hours of age on death or disability among newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy a randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* [Internet]. 2017 Oct 24; 318(16):1550–60. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29067428/>.
4. Montaldo P, Pauliah SS, Lally PJ, Olson L, Thayyil S. Cooling in a low- resource environment: Lost in translation. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2015 Apr 1; 20(2):72–9
5. 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* [Internet]. 1999 Jan 15; 55(2):158–63. DOI: 10.1002 (SICI)1097-4547(19990115)55:2<158:AID-JNR3>3.0.CO;2-1.
6. Adstamongkonkul D, Hess DC. Ischemic Conditioning and neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: a literature review. *Cond Med* [Internet]. 2017 Dec;1(1):9. </pmc/articles/PMC6131706/>.
7. Shah PS, Perlman M. Time courses of intrapartum asphyxia: Neonatal characteristics and outcomes. *Am J Perinatol* [Internet]. 2009 Jan; 26(1):39– 44. <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0028- 1095185>
8. Takada SH, Sampaio CAG, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2011; 198(1):62–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21439321/>
9. 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. Vols. 106–107, *Progress in Neurobiology*. Pergamon; 2013. p. 1–16.
10. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils A V., Lee VY, Takase LF, et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes



related to cell death and spatial memory Neuroscience [Internet]. 2015 Jan 2; 284:247–59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305666/>

11. Kumar AJ, Takada SH, Motta-Teixeira LC, Lee VY, Xavier GF, Nogueira MI. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. *Behav Brain Res* [Internet]. 2017 Aug 30; 333:242–50. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28709915/>.

12. Cruz-Ochoa NA, Ochoa-Amaya JE, Pulecio SL, Xavier GF, Nogueira MI. Neonatal anoxia impairs long-term energy metabolism and somatic development of Wistar rats. *Int J Dev Neurosci*. 2019 Dec 1; 79:76–85.

13. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils A V., Lee VY, Takase LF, et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* [Internet]. 2015 Jan 2; 284:247–59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25305666/>.

14. Takada SH, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Sampaio CA, Polli RS, et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res*. 2016 Jan 1; 296:331–8.

15. Kumar AJ, Martins DO, Arruda BP, Lee VY, Chacur M, Nogueira MI. Impairment of nociceptive responses after neonatal anoxia correlates with somatosensory thalamic damage: A study in rats. *Behav Brain Res*. 2020 Jul 15; 390:112690.

16. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ. A new model of neonatal stroke: Reversible middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatr Neurol*. 1995 Apr 1;12(3):191–6.

17. Nyakas C, Buwald B, Luiten PGM. Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol*. 1996 May 1;49(1):1–51.

18. Berger R, Garnier Y. Perinatal brain injury [Internet]. Vol. 28, *Journal of Perinatal Medicine*. Walter de Gruyter and Co.; 2000. p. 261–85. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11031697/>.

19. Squier M, Keeling JW. The incidence of prenatal brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 1991 Feb 1; 17(1):29–38. DOI: 10.1111/j.1365- 2990.1991.tb00691.x.

20. Sizonenko S V., Camm EJ, Garbow JR, Maier SE, Inder TE, Williams CE, et al. Developmental Changes and Injury Induced Disruption of the Radial Organization of the Cortex in the Immature Rat Brain Revealed by In Vivo Diffusion Tensor MRI. *Cereb Cortex* [Internet]. 2007 Nov 1; 17(11):2609–17. <https://academic.oup.com/cercor/article/17/11/2609/282744>.

21. Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2004 Feb 1;72(2):111–27.
22. Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2017. p. 78. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
23. Markus RP, Fernandes PA, Kinker GS, da Silveira Cruz-Machado S, Marçola M. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br J Pharmacol*. 2017.
24. Reiter RJ, Rosales-Corral S, Tan DX, Jou MJ, Galano A, Xu B. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas. *Cell Mol Life Sci* 2017 7421 [Internet]. 2017 Sep 1; 74(21):3863–81. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-017-2609-7>
25. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev* [Internet]. 2010 Aug 1; 85(3):607–23. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2009.00118.x.
26. Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004;36(1):1–9.
27. Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* [Internet]. 2005; 39(2):99–104. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16098085/>
28. Hu Y, Wang Z, Liu Y, Pan S, Zhang H, Fang M, et al. Melatonin reduces hypoxicischaemic (HI) induced autophagy and apoptosis: An in vivo and in vitro investigation in experimental models of neonatal HI brain injury. *Neurosci Lett* [Internet]. 2017; 653:105–12. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.11.05.
29. Blanco S, Hernández R, Franchelli G, Ramos-Álvarez MM, Peinado MÁ. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxicischemic brain damage. *Nitric Oxide - Biol Chem*. 2017; 62:32–43.
30. Berger HR, Nyman AKG, Morken TS, Vettukattil R, Brubakk AM, Widerøe M. Early metabolite changes after melatonin treatment in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury studied by in-vivo <sup>1</sup>H MR spectroscopy. *PLoS One*. 2017; 12(9):1–15.
31. Olivier P, Fontaine RH, Loron G, Van Steenwinckel J, Biran V, Massonneau V, et al. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One*. 2009;4(9).

32. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. Vol. 44, *Journal of Pineal Research*. 2008. p. 157–64.
33. Carloni S, Albertini MC, Galluzzi L, Buonocore G, Proietti F, Balduini W. Melatonin reduces endoplasmic reticulum stress and preserves sirtuin 1 expression in neuronal cells of newborn rats after hypoxia-ischemia. *J Pineal Res*. 2014;57(2):192–9.
34. Wang Z, Liu D, Zhan J, Xie K, Wang X, Xian X, et al. Melatonin improves short and long-term neurobehavioral deficits and attenuates hippocampal impairments after hypoxia in neonatal mice. *Pharmacol Res* [Internet]. 2013; 76:84–97. DOI: 10.1016/j.phrs.2013.07.008
35. Weinberg U, Gasparini FJ, Weitzman ED. The developmental pattern of in vitro rat liver melatonin degrading activity. *Endocrinology* [Internet]. 1981; 108(3):1081–2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7460833/>
36. Hassell KJ, Reiter RJ, Robertson NJ. Melatonin and its role in neurodevelopment during the perinatal period: A review. *Fetal Matern Med Rev*. 2013; 24(2):76–107.
37. Solberg R, Longini M, Proietti F, Felici C, Saugstad O, Buonocore G, et al. O-057 Melatonin As A Novel Neuroprotectant In Preterm Infants – A Double Blinded Randomised Controlled Trial (mint Study). *Arch Dis Child* [Internet]. 2014 Oct 1; 99(Suppl 2): A43–A43. [https://adc.bmj.com/content/99/Suppl\\_2/A43.2](https://adc.bmj.com/content/99/Suppl_2/A43.2)
38. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res*. 2008; 44(2):157–64.
39. Carloni S, Perrone S, Buonocore G, Longini M, Proietti F, Balduini W. Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. *J Pineal Res* [Internet]. 2008 Mar 1; 44(2):157–64. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00503.x.
40. Salter MG, Fern R. The mechanisms of acute ischemic injury in the cell processes of developing white matter astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2008 Mar 3; 28(3):588–601. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.960055.
41. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty- one years (1969-2000). *Neurochem Res* [Internet]. 2000; 25(9–10):1439–51. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11059815/>.

42. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci* 2007 1011 [Internet]. 2007 Oct 26; 10(11):1377–86. <https://www.nature.com/articles/nn2004>.
43. Sullivan SM, Björkman ST, Miller SM, Colditz PB, Pow D V. Morphological changes in white matter astrocytes in response to hypoxia/ischemia in the neonatal pig. *Brain Res*. 2010 Mar 10; 1319:164–74.
44. Sullivan SM, Björkman ST, Miller SM, Colditz PB, Pow D V. Structural remodeling of gray matter astrocytes in the neonatal pig brain after hypoxia/ischemia. *Glia* [Internet]. 2010 Jan 15; 58(2):181–94. DOI: 10.1002/glia.20911.
45. Helou AY, Martins DO, Arruda BP, de Souza MC, Cruz-Ochoa NA, Nogueira MI, et al. Neonatal anoxia increases nociceptive response in rats: Sex differences and lumbar spinal cord and insula alterations. *Int J Dev Neurosci* [Internet]. 2021 Dec 1; 81(8):686–97. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34342028/>.
46. Pregnolato S, Sabir H, Luyt K, Rienecker K DA, Isles AR, Chakkarapani E. Regulation of glutamate transport and neuroinflammation in a term newborn rat model of hypoxicischaemic brain injury. *Brain Neurosci Adv* [Internet]. 2022 Jan; 6:239821282210975. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35615059/>.
47. Lorenzi T, Sagrati A, Montanari E, Senzacqua M, Morroni M, Fabri M. Hypoxia-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes of human corpus callosum. *Brain Struct Funct*. [Internet]. 2021 May; 226(4):1353-1361. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33709161/>.
48. Vlassaks, E.; Janssen, C. W. H.; Van Der Pol, S. M. A.; De Vries, H. E.; Ross, J. G. N.; Ross, J. J.; Kuper, N. M. Nitric oxide production in the striatum and cerebellum of a rat model of preterm global perinatal asphyxia. *Neurotoxicity Research* [Internet]. 2017 Jan; 31(2):236-250. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28110393/>.
49. Alonso D, Serrano J, Rodríguez I, Ruíz-Cabello J, Fernández AP, Encinas JM, CastroBlanco S, Bentura ML, Santacana M, Richart A, Fernández-Vizarra P, Uttenthal LO, Rodrigo J. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthases and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*. [Internet]. 2002 Feb; 443(2):183-200. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11793355>.