

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

LILIANE DE MELLO SANTOS BOCHENEK

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO REDOX EM MODELO ANIMAL DE
HIPÓXIA NEONATAL**

CAMPO GRANDE

2022

LILIANE DE MELLO SANTOS BOCHENEK

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTADO REDOX EM MODELO ANIMAL DE
HIPÓXIA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Modelos Animais de Doença

Orientadora: Prof^a. Dr^a Danielle Bogo.

CAMPO GRANDE

2022

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa fornecida durante esta pesquisa, e a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo apoio ao LMED (Laboratório de Modelos experimentais de Doenças) onde se desenvolveu toda a pesquisa com os animais.

À toda equipe do Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da UFMS agradecemos a disponibilidade e todo ensinamento durante as análises de estresse oxidativo, em especial Dr Eduardo Benedetti Parisotto. Obrigada pelo privilégio em poder lhe chamar de professor e aprender tanto com o Sr.

À toda equipe do Laboratorio FAMEZ, Prof^a Dr^a Alda, Stephanie e colaboradoras, pela realização dos exames todos os dias e madrugadas adentro.

À Prof^a Dr^a Iandara Schettert Silva pela caminhada percorrida e contribuições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Àos colegas veteranos e calouros, aqui representados pela minha grande amiga e exemplo de pesquisadora, Evelyn. Obrigada por enriquecerem meus dias e madrugadas, trabalhos e memes, ajuda nas análises e caronas para almoçar. Que o ETERNO abençoe vocês, eu não saberia retribuir.

À toda equipe do nosso PPGSD, programa de pós-graduação em saúde e desenvolvimento, obrigada por todo o suporte, antes, durante e pós-pandemia. Admirar e todos os demais mostraram o que é ser um programa interdisciplinar ao não medir esforços para me auxiliar. Desde documentos até material para laboratório, minha eterna gratidão a todos vocês.

À toda minha família, em especial ao meu marido Hudson e minhas filhas Ana, Alice e Joana. Nem mesmo um passo teria valor se não fosse a motivação e admiração de vocês. Somos uma equipe, e essa conquista do título de mestre é para cada um de vocês também. Sabemos que quem está ao nosso lado na trincheira importa mais do que a própria guerra.

Ao meu DEUS, o Deus de Abraão, de Isaque e Jacó, que guiou meus passos, me capacitou para entrar, me segurou para não desistir e no meio de tudo, ainda me presenteou com a nossa Joanhinha, a mais amável e deliciosa careca que nem minhas mais sinceras orações eu

saberia pedir tamanha graça. Obrigada meu Pai. Ao SENHOR TODA A HONRA E TODA A GLÓRIA PARA TODO O SEMPRE, AMÉM!

RESUMO

A asfixia perinatal que resulta em encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) afeta milhões de recém-nascidos em todo o mundo e mais da metade dos sobreviventes continua a desenvolver paralisia cerebral, epilepsia e outras formas de deficiência neurológica ao longo da vida. Estas complicações em neonatos decorrem especialmente do desequilíbrio entre a geração de substâncias oxidantes e a interação do sistema de defesa antioxidante, condição conhecida como estresse oxidativo, onde há presença demasiada de oxidantes em relação a antioxidantes. Necessário mais pesquisas para desenvolver resultados já caracterizados da encefalopatia pós hipóxica e conhecer os efeitos do estresse oxidativo na resposta à essa injúria, além de estabelecer um modelo semelhante com a fisiologia dos neonatos, uma vez que os mecanismos de dano e reparo mudam com a maturação. O leitão recém-nascido atinge um grau de maturidade ao nascimento semelhante ao dos seres humanos em relação à regulação cardiovascular sendo considerado um excelente modelo laboratorial para estudos de crianças humanas, portanto buscou-se desenvolver um modelo animal de doença com suínos neonatos para a caracterização do estado redox pós hipóxia, sem o uso de anestesia. Dez leitões recém-nascidos, Large White, saudáveis, de ambos os sexos, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, e submetidos a protocolo experimental de hipóxia pela redução da fração inspirada de oxigênio. O grupo hipóxia, composto de 6 animais, foi submetido à redução da fração inspirada de oxigênio por 180 minutos. Os animais do grupo controle (n=4) foram manipulados e avaliados simultaneamente. Houve diferença significativa na oximetria e frequência cardíaca do grupo hipóxia em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os encéfalos suínos foram analisados e os resultados encontrados apresentaram um panorama do estado redox cerebral desenvolvido em leitões como modelo animal de hipóxia neonatal. Foi realizada análise do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), e o conteúdo de peroxidação lipídica (TBARS), proteína carbonilada (PC) e mieloperoxidase (MPO) que são apresentados de forma a contribuir para outros estudos no tratamento da hipóxia neonatal. O presente estudo contribui para a utilização do leitão como modelo animal de hipóxia neonatal e dano cerebral. Houve diferença significativa na frequência cardíaca e na oximetria dos grupos comparados durante a hipóxia ($p < 0,05$) e uma tendência maior nas atividades de SOD e CAT do grupo hipóxia, mas sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Os valores da caracterização do estado redox no modelo animal de hipóxia apresentam parâmetros a partir dos quais novos estudos podem se desenvolver.

Descriptores: antioxidantes; suínos; neonatos.

ABSTRACT

Perinatal asphyxia resulting in hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) affects millions of newborns worldwide, and more than half of survivors continue to develop cerebral palsy, epilepsy, and other forms of neurological impairment throughout their lives. These complications in neonates mainly result from the imbalance between the generation of oxidant substances and the interaction of the antioxidant defense system, a condition known as oxidative stress, where there is too much presence of oxidants in relation to antioxidants. More research is needed to develop already characterized results of post-hypoxic encephalopathy and to know the effects of oxidative stress on the response to this injury, in addition to establishing a similar model with the physiology of neonates, since the damage and repair mechanisms change with age. The newborn piglet reaches a degree of maturity at birth similar to that of humans in relation to cardiovascular regulation, being considered an excellent laboratory model for studies of human children, therefore, an animal model of disease with neonatal pigs was proposed for the characterization of post-hypoxia oxidative stress, without the use of anesthesia. Ten healthy Large White newborn piglets of both sexes were randomly divided into two groups and submitted to an experimental hypoxia protocol by reducing the fraction of inspired oxygen. Hypoxia group, composed of 6 animals, was submitted to a reduction in fraction of inspired oxygen for 180 minutes. Control group animals (n=4) were manipulated and evaluated simultaneously. There was a significant difference in oximetry and heart rate in hypoxia group compared to control group ($p<0.05$). Swine brains were analyzed and the results found in this study presented an overview of brain oxidative stress developed in piglets as an animal model of neonatal hypoxia. Analysis of reduced glutathione (GSH) content, activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), and the content of lipid peroxidation (TBARS), carbonyl protein (PC) and myeloperoxidase (MPO) were performed. In order to contribute to other studies in the treatment of neonatal hypoxia. The present study contributes to the use of the piglet as an animal model of neonatal hypoxia and brain damage. There was a significant difference in heart rate and oximetry of the groups compared during hypoxia ($p<0.05$) and a greater trend in SOD and CAT activities in the hypoxia group, but no statistically significant difference ($p>0.05$). The values of the characterization of the redox state in the animal model of hypoxia present parameters from which new studies can be developed.

Descriptors: antioxidants; swine; neonates-

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
Estresse oxidativo.....	12
Hipóxia.....	13
Modelo animal.....	15
OBJETIVOS.....	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos.....	19
METODOLOGIA	20
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
Protocolo experimental para a indução da hipóxia	20
Coleta e preparação das amostras.....	21
ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO	22
Glutationa reduzida (tióis não-proteicos).....	22
Superóxido dismutase (SOD).....	22
Catalase (CAT).....	22
MARCADORES DE DANO OXIDATIVO.....	23
Peroxidação lipídica (TBARS).....	23
Proteína carbonilada (PC)	23
MARCADOR INFLAMATÓRIO	23
Mieloperoxidase (MPO).....	23
EQUIPAMENTOS E REAGENTES	24
ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS	37

CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS.....	42

INTRODUÇÃO

O desbalanço na relação entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos produtos oxidantes recebe o nome de estresse oxidativo. Em níveis fisiológicos, os oxidantes possuem um papel benéfico na produção de energia, na sinalização celular e na defesa do hospedeiro, em excesso podem levar a consequências patológicas resultando em danos oxidativos teciduais, distúrbios e doenças (PAIVA *et al.*, 2017).

Durante o metabolismo do oxigênio e do nitrogênio são produzidos diversos metabólitos tóxicos. Qualquer espécie que utilize o oxigênio durante a respiração celular está sujeita ao estresse oxidativo (VELLOSA *et al.*, 2013; CAMPOS; LEME, 2018; LI *et al.*, 2018). Essa situação pode desencadear ainda mais complicações em casos excepcionais, como por exemplo, nos recém-nascidos, principalmente em prematuros, pois existe potencialmente um desequilíbrio entre a geração de substâncias oxidantes e a interação do sistema de defesa antioxidante sendo desconhecido o estado redox destes (MAIA; PAIVA; CLEMENTE, 2016).

A asfíxia perinatal que resulta em encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) ocorre em 1-2/1000 nascidos vivos em países de alta renda e 10-20/1000 em países de baixa e média renda. Em todo o mundo, a EHI afeta 2,7 milhões de recém-nascidos, dos quais 690.000 morrem. Mais da metade dos sobreviventes continua a desenvolver paralisia cerebral, epilepsia e outras formas de deficiência neurológica ao longo da vida (GRACA; SAMPAIO; MONIZ, 2011; AUSTIN, 2018). No período neonatal, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) representa ameaças celulares que, se ultrapassarem ou contornarem os mecanismos fisiológicos de neutralização, serão responsáveis por danos neuronais significativos (TORRES-CUEVAS; CORRAL-DEBRINSKI; GRESSENS, 2019).

O leitão recém-nascido atinge um grau de maturidade ao nascimento semelhante ao dos seres humanos em relação à comparação cardiovascular, sendo considerado um excelente modelo laboratorial para estudos com crianças humanas, demonstrando alterações no sistema autonômico que a hipóxia provoca (SCHULZ *et al.*, 2011).

Modelos animais de grande porte são uma ferramenta essencial no desenvolvimento de novas terapias clínicas com base racional para prematuros. O suíno é considerado um modelo relevante para o estudo da fisiologia do prematuro humano, podendo ser utilizado para investigar novas terapias e, assim, melhorar resultados. Portanto, essa espécie tem sido considerada um excelente modelo de laboratório de subprimatas para estudos de comparação com neonatos humanos (EIBY *et al.*, 2013; NEMETH *et al.*, 2016).

Embora o leitão recém-nascido seja um modelo animal de grande porte aceito para asfixia perinatal/ EHI, não há consenso sobre a metodologia de indução de asfixia perinatal para produzir EHI clinicamente relevante, entretanto possuem boa capacidade de monitoramento hemodinâmico e fisiológico contínuo e administração intravenosa de drogas, caso haja necessidade (NEMETH *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2021).

Deste modo, torna-se importante caracterizar o estado redox durante a hipóxia no desenvolvimento de encefalopatia neonatal. Assim, este estudo caracterizou o estado redox em um modelo animal experimental compatível com as alterações fisiopatológicas que vemos em neonatos, a fim de buscar alternativas para o controle dos danos oxidativo e neurológicos. Foram analisados o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), conteúdo da peroxidação lipídica (TBARS) e proteína carbonilada (PC) e também a atividade da mieloperoxidase (MPO), um marcador inflamatório no tecido encefálico dos leitões.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é um dos mais importantes mecanismos patogênicos para doenças neurodegenerativas. Bioquimicamente é definido como o estado de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, com excesso relativo do primeiro, resultando no “rompimento da sinalização e controle redox e /ou dano molecular”. Qualquer espécie que utilize o oxigênio durante a respiração celular está sujeita à ação de EROs (VELLOSA *et al.*, 2013; CAMPOS; LEME, 2018; LI *et al.*, 2018).

Embora importante em muitas funções fisiológicas, por exemplo na mitigação de infecções e sinalização celular, em níveis elevados EROs são neurotóxicas, resultando em dano biomolecular, ou seja, oxidação de proteínas, lipídios e ácido desoxirribonucleico (DNA), resultando em um amplo espectro de disfunções celulares, culminando com a morte celular (DUMITRESCU *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

O excesso na produção de EROs tem sido implicado como principais mediadores da lesão cerebral perinatal, principalmente em prematuros, pois existe potencialmente um desequilíbrio entre a geração de substâncias oxidantes e a interação do sistema de defesa antioxidante, sendo importante conhecer o estado oxidativo para controlar a progressão do distúrbio. É bem conhecido que as EROs, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), podem reagir com o ferro ferroso para formar o radical hidroxila altamente reativo, um estimulador da peroxidação lipídica. As membranas biológicas são sensíveis à peroxidação lipídica induzida por EROs e o aumento na peroxidação lipídica levará a vários efeitos deletérios. O estresse oxidativo seguido de apoptose tem sido considerado um passo crítico na lesão cerebral neonatal (LIU *et al.*, 2010; MAIA; PAIVA; CLEMENTE, 2016; CAMPOS; LEME, 2018).

O dano cerebral hipóxico-isquêmico perinatal é uma das principais causas de mortalidade aguda e morbidade neurológica crônica em neonatos e crianças. O estresse oxidativo devido à formação de EROs e ao início de reações oxidativas anormais parece desempenhar um papel fundamental (HUUN *et al.*, 2018).

Compostos que podem ser modificados pela ação de EROs, como lipídios e proteínas também são usados como marcadores indiretos de estresse oxidativo, além das atividades enzimáticas envolvidas no balanço redox celular, tais como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). A GSH (glutathiona redutase) embora não seja uma enzima, atua na conversão

de radicais superóxidos em peróxidos e uma depleção de GSH resultará em disfunção mitocondrial. GSH é um dos antioxidantes mais abundantes no corpo e importante no cérebro altamente oxigenado, protegendo a célula contra compostos reativos de oxigênio (PARISOTTO *et al.*, 2016; PAIVA *et al.*, 2017; HUUN *et al.*, 2018). Outros biomarcadores, denominados produtos de danos oxidativos, também podem ser mensurados e o principal deles é o malondialdeído (MDA), formado ao final dos processos de lipoperoxidação (CAMPOS; LEME, 2018).

Desde o período neonatal, a GSH é o antioxidante endógeno não enzimático mais importante, pois protege a célula contra compostos reativos de oxigênio e uma depleção de GSH resultará em disfunção mitocondrial. A habilidade de doar elétrons a outros compostos também faz da glutatona um bom redutor. Diversos estudos de hipóxia e reoxigenação em camundongos mediram altos níveis da relação GSH/ GSSG. A proporção GSH / GSSG é considerada um indicador de homeostase redox (HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008; HUUN *et al.*, 2018; TORRES-CUEVAS; CORRAL-DEBRINSKI; GRESSENS, 2019).

A mieloperoxidase (MPO) tem sido relatada como um importante parâmetro na avaliação precoce de diversas condições patológicas. A ativação inflamatória precede o início de uma doença coronária confirmada por diagnóstico, o que poderia indicar a MPO como um marcador mais precoce para possíveis alterações vasculares inflamatórias. Trabalhos que visem definir, ou auxiliar a definição dos intervalos de referência para os níveis de MPO em condições de saúde e doença são muito importantes, especialmente em pacientes com alterações neurológicas (VELLOSA *et al.*, 2013).

Entre estes vários mecanismos, uma superprodução de espécies reativas oxigênio (ERO) tem sido implicada em lesão hipóxico-isquêmica (HI). A lesão cerebral induzida por hipóxia-isquemia poderia ser aliviada por intervenções para diminuir EROs após o dano (LIU *et al.*, 2010).

HIPÓXIA

Aproximadamente 1 em cada 10 recém-nascidos requer assistência para começar a respirar em um ambiente extrauterino ao nascer. A encefalopatia neonatal afeta aproximadamente 3 em 1.000 nascimentos e é causada por infecção e inflamação, hipóxia-isquemia global e acidente vascular cerebral focal. Apesar dos avanços na redução da mortalidade infantil por infecções, a taxa de mortalidade por asfixia ao nascimento permanece

alta e os sobreviventes muitas vezes sofrem morbidade persistente (KAYTON *et al.*, 2018; KOEHLER *et al.*, 2018).

A EHI neonatal é um dos primeiros comprometimentos fisiológicos em resposta à asfixia grave, causando dano cerebral de grau variado, que associados a alterações metabólicas e conseqüentemente alterações fisiológicas, se traduzem por manifestações clínicas secundárias ao comprometimento fisiológico ou estrutural (CUNHA *et al.*, 2018).

Os mamíferos recém-nascidos que sofrem de hipóxia moderada durante ou após o nascimento são capazes de compensar uma falta transitória de oxigênio, adaptando suas funções vitais. Em condição de prematuridade, apresentam diversas situações de risco por possuírem instabilidade fisiológica e/ou hemodinâmica. Após o nascimento, o ambiente extrauterino condiciona o neonato a uma série de adaptações à vida, podendo gerar ou desenvolver problemas com sequelas de difícil reversão, como os relacionados ao desenvolvimento físico, cognitivo, de aprendizagem e comportamental (MAIA; PAIVA; CLEMENTE, 2016; SCHULZ *et al.*, 2011).

No útero, o feto recebe oxigênio através das trocas gasosas que ocorrem na placenta. Os pulmões fetais e a vasculatura pulmonar crescem e amadurecem neste ambiente hipóxico em preparação para assumir as trocas gasosas através dos pulmões ao nascimento. A hipóxia, ou deficiência de oxigênio, ocorre quando o suprimento de oxigênio não atende ao consumo de oxigênio. É importante ressaltar que as alterações no metabolismo celular associadas à hipóxia podem levar ao acúmulo de hipoxantina, que também pode gerar EROs em excesso, principalmente durante a ressuscitação de neonatos. No entanto, nos últimos 20 a 30 anos, pesquisas determinaram que a superexposição ao oxigênio imediatamente após a hipóxia pode levar ao acúmulo de EROs de oxigênio e lesão de isquemia-reperfusão (KAYTON *et al.*, 2018).

O oxigênio terapêutico é uma opção de tratamento importante para a insuficiência respiratória hipóxica em prematuros; no entanto, a exposição excessiva ao oxigênio pode levar ao estresse oxidativo, que tem o potencial de danificar vários sistemas orgânicos do recém-nascido, incluindo olhos, pulmões e intestinos. A hiperóxia pode causar toxicidade ao oxigênio, que é causada pela formação de EROs durante a reperfusão de tecidos hipóxicos, bem como durante a infecção e inflamação (KAYTON *et al.*, 2018).

Estudos clínicos prospectivos falharam em fornecer uma recomendação conclusiva para faixas-alvo de saturação de oxigênio, mas almejar a saturação de oxigênio na faixa de 91% a

95% pode ser mais seguro do que almejar faixas mais baixas (por exemplo, 85% -89%). O uso de oxigênio suplementar para reverter a hipóxia no recém-nascido destina-se a evitar a morte e distúrbios graves, como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio ou dano cerebral permanente, devido à falta de oxigênio nos tecidos. Equilibrar as necessidades de oxigênio dos neonatos é crucial para evitar danos causados por muito ou pouco oxigênio (KAYTON *et al.*, 2018).

Considera-se bem estabelecido que, em recém-nascidos a termo e animais, mesmo após HI severa, há frequentemente uma sobrevivência celular considerável com recuperação do metabolismo oxidativo mitocondrial em uma fase “latente” caracterizada pela supressão da atividade neural e hipoperfusão, seguida por progressiva insuficiência secundária do metabolismo celular energético. O processo de lesão celular secundária prolonga-se por várias horas após a agressão inicial, constituindo uma janela de oportunidade para a intervenção terapêutica (GRACA; SAMPAIO; MONIZ, 2011; WASSINK *et al.*, 2019).

MODELO ANIMAL

A hipóxia-isquemia perinatal resultando em morte ou incapacidade permanente continua sendo um distúrbio clínico importante. Modelos animais de hipóxia têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia da EHI e destacado o processo dinâmico que ocorre na lesão cerebral por asfixia perinatal. Assim, estudos em animais colabora para estratégias de tratamento após o dano, bem como o melhor momento para aplicá-las. (KYNG *et al.*, 2015; KOEHLER *et al.*, 2018).

Experimentalmente, os modelos globais de HI têm sido os mais estudados em animais neonatais e fetais. No entanto, vale ressaltar que existem muitas diferenças vasculares, hematológicas e hemodinâmicas entre humanos e animais comumente usados. CHAKKARAPANI e colaboradores (2010) citam um modelo unilateral de ligadura da carótida / hipóxia pequena de ratos neonatos que produz um insulto cerebral puro, como um golpe, sem ferir o restante do organismo. Dessa forma os efeitos sistêmicos da injúria, alterações cardiovasculares e bioquímicas não podem ser avaliados, sendo necessário replicar o modelo em um neonato de grande porte, de modo a desenvolver uma injúria global hipóxica-isquêmica (CHAKKARAPANI *et al.*, 2010; KOEHLER *et al.*, 2018).

Os modelos de camundongos nos quais o mecanismo e o efeito da hipóxia são estudados são muito diversos, podendo encontrar variabilidade entre eles em diferentes parâmetros como a idade do camundongo, as porcentagens de oxigênio a que são submetidos e o tempo em que

ficam expostos a diferentes concentrações de oxigênio. Existem modelos que utilizam câmara de privação de oxigênio, sem procedimento isquêmico prévio, com variação da concentração de oxigênio entre 4 e 14% O₂. O tempo de exposição é objeto de estudo, também variando de 4 min a 48h, descrevendo lesões leves e evitando a oclusão não fisiológica da artéria carótida comum (TORRES-CUEVAS; CORRAL-DEBRINSKI; GRESSENS, 2019).

Uma configuração experimental na qual a influência da variação biológica pode ser minimizada é essencial ao testar novas ferramentas de prognóstico e diagnóstico e estratégias de tratamento. Um modelo animal deve aproximar-se o mais possível da situação clínica, contribuindo assim para a compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes à lesão induzida e o processo dinâmico envolvido na doença e seu desfecho. Modelos animais de HIE neonatal incluem várias espécies (roedores, cordeiros, primatas e suínos). O leitão recém-nascido apresenta maior semelhança com um recém-nascido humano em relação ao tamanho, sistema cardiovascular e maturidade cerebral no momento do parto. O monitoramento, instrumentação e avaliação de resultados no modelo leitão é semelhante ao utilizado no atendimento clínico de lactentes com EHI. Nesse sentido, há um alto grau de tradução desse modelo para o cuidado ao recém-nascido. O modelo leitão EHI também é usado para ressuscitação neonatal e estudos hemodinâmicos, bem como em investigações de hipóxia cerebral em nível celular (EIBY *et al.*, 2013; KYNG *et al.*, 2015).

Os esforços de desenho de drogas são criticamente dependentes de modelos pré-clínicos de lesão e doença. Muitas vezes, esses esforços são dificultados pelas limitações dos modelos animais e sua relevância para a anatomia e fisiologia humana. O modelo leitão de lesão cerebral neonatal é um sistema relevante, uma vez que a trajetória de desenvolvimento do cérebro suíno compartilha muitas semelhanças com o cérebro humano. É importante ressaltar que a lesão induzida por dano hipóxico afeta o cérebro do leitão de maneira semelhante à observada no tecido cerebral neonatal humano. Assim, não é surpreendente que uma porcentagem significativa de estudos sobre lesão cerebral neonatal empregue o modelo leitão (KRATIMENOS *et al.*, 2022).

Modelos neonatais de HI em roedores melhoraram a compreensão dos mecanismos celulares de lesão neural no cérebro em desenvolvimento, mas existem limitações na simulação do alcance, precisão e fisiologia da HI clínica e da neuropatologia de sistemas relevantes que contribuem para o padrão de lesão no cérebro humano. Modelos de hipóxia perinatal em animais de grande porte, como asfixia parcial ou completa de fetos de macacos no momento do

parto, oclusão do cordão umbilical e hipoperfusão cerebral em diferentes estágios fetais da gestação em ovelhas, e hipóxia e hipoperfusão graves em leitões recém-nascidos, têm superado essas limitações (KOEHLER *et al.*, 2018).

Existem grandes desvantagens neuroanatômicas no uso de modelos de roedores de EHI que podem ser remediados por animais de grande porte. Os modelos de HI mais comumente usados em camundongos e ratos envolvem oclusão unilateral permanente de uma artéria carótida comum e hipóxia sistêmica transitória. Eles apresentam limitações consideráveis: enquanto o componente de hipóxia do dano é sistêmico, o componente isquêmico é unilateral e incompleto, resultando em lesões cerebrais focais semelhantes a acidente vascular cerebral. Em camundongos neonatais, os animais podem não desenvolver danos cerebrais evidentes, apesar da injúria sofrida (KOEHLER *et al.*, 2018).

Leitões recém-nascidos fornecem um modelo de HIE relevante para recém-nascidos humanos a termo por muitas razões. O pico de crescimento cerebral em leitões e humanos ocorre perto do momento do nascimento, enquanto os roedores têm um grande surto de crescimento pós-natal. Semelhante aos humanos, o peso do cérebro ao nascer em leitões é aproximadamente 35-40% do peso de suínos adultos. Suínos neonatos de 30 dias têm tractografia da substância branca semelhante ao humano infantil que diferem apenas em quantidade, com padrões de mielinização também similares. Além disso, os genomas, de ambos têm semelhanças importantes. O leitão também representa modelo ideal para o estudo do período de transição cardiovascular pré-termo devido à sua fisiologia semelhante e também à maturação estrutural (EIBY *et al.*, 2013; KOEHLER *et al.*, 2018).

Outras vantagens do modelo suíno são consequência do tamanho da ninhada relativamente grande. Primeiramente ninhadas grandes oferecem uma oportunidade para experimentos paralelos sobre questões inter-relacionadas a serem respondidas em leitões das mesmas ninhadas, além disso companheiros de ninhada também podem ser usados como controles internos ou para lidar com diferenças de sexo (EIBY *et al.*, 2013).

A modelagem experimental de lesão cerebral e desenvolvimento com grandes animais apresenta muitos desafios. Os experimentos são mais caros de conduzir. Os animais são mais caros individualmente, e as necessidades fiscais de equipamentos e equipes de pessoal para terapia intensiva animal são grandes. Variações nos protocolos de podem resultar em lesão cerebral muito leve ou muito grave. De acordo com o objetivo do experimento, atenção cuidadosa deve ser dada à escolha dos medicamentos, método de indução de hipóxia-isquemia,

método de controle da duração e gravidade do dano provocado, ressuscitação e cuidados pós-injúria e avaliação do resultado. No entanto, isso permite um melhor cuidado do animal, e o monitoramento fisiológico caracteriza o modelo para gerar resultados altamente reprodutíveis e previsíveis para testes pré-clínicos terapêuticos rigorosos. O tamanho maior dos leitões oferece uma vantagem em estudos fisiológicos, permitindo monitoramento extensivo e amostragem de tecidos e/ou fluidos (EIBY *et al.*, 2013; KYNG *et al.*, 2015; KOEHLER *et al.*, 2018).

Diferentemente de adultos, recém-nascidos humanos não são rotineiramente anestesiados, mas podem ser sedados e recebem tratamento anticonvulsivante se desenvolverem convulsões clínicas (THORESEN *et al.*, 2001).

Assim, torna-se importante determinar quais alterações metabólicas e inflamatórias estão relacionadas com o estresse oxidativo durante a hipóxia-isquêmica no desenvolvimento de encefalopatia neonatal. Esse estudo justifica-se pela necessidade em desenvolver e caracterizar um modelo animal experimental compatível com as alterações fisiopatológicas que vemos em neonatos, sem anestesia, a fim de buscar novas estratégias terapêuticas para o controle dos danos oxidativo e neurológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar o estado redox em modelo suíno neonato submetidos à hipóxia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o conteúdo de GSH;
2. Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT);
3. Determinar os marcadores de dano (TBARS e PC);
4. Estudar a atividade da MPO;
5. Investigar os efeitos da hipóxia em neonatos suínos;
6. Analisar o suíno como modelo animal de hipóxia neonatal.

METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo de nº 1.088/2019.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dez leitões recém-nascidos, Large White, saudáveis, de ambos os sexos, com idade média de 48 horas, peso médio de 1470 ($\pm 0,24$) foram retirados da porca 3 horas antes do início do experimento, provenientes de uma granja comercial (Rancho Alegre), localizada na cidade de Campo Grande – MS. O transporte dos animais ocorreu em ambiente quente e silencioso para minimizar o estresse, e sua alimentação realizada com leite materno oriundos da própria granja, a cada 3 horas.

No dia do experimento, após chegar ao Laboratório de Modelos Experimentais de Doenças (LMED-UFMS) os animais foram avaliados por meio de registro de dados fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial média, temperatura e oximetria) e pesados, alocando-os aleatoriamente em dois grupos, grupo hipóxia (GH=6) e grupo controle (GC=4). Uma amostra de sangue foi coletada de todos os animais antes e após a indução/simulação da hipóxia, para a gasometria arterial e exames bioquímicos. Os exames bioquímicos foram feitos no soro (ALT, AST, creatinina e uréia). A eutanásia dos animais foi realizada após o experimento com associação de tiopental (100mg/kg) seguida de cloreto de potássio (75mg/kg).

Protocolo experimental para a indução da hipóxia

Os animais (n=6) foram alocados, em duplas, em câmara de vidro (33x40x30 cm) com fechamento hermético realizado por tampa da caixa com adesivo de silicone em combinação com suplementação de oxigênio. O controle da concentração de oxigênio no interior da câmara foi realizado com o auxílio de um fluxômetro calibrado (capacidade de 15 litros/min) alimentado por um cilindro de oxigênio de grau médico. Após monitorar o estado de repouso, a fração inspirada de oxigênio foi diminuída de 0,3 para cerca de 0,1 l/min por meio da redução do volume corrente de oxigênio, e a caixa foi fechada de modo a limitar as trocas gasosas com o meio externo, induzindo hipóxia normocápnica por 180 minutos. Em seguida, o volume inicial de gás foi restabelecido para registro dos dados fisiológicos dos animais (pós-injúria).

Da mesma maneira, o grupo controle, composto por quatro animais (n=4) foi manipulado e avaliado simultaneamente aos demais animais, porém teve o oxigênio

administrado de forma contínua, prevenindo assim o acúmulo de dióxido de carbono (CO₂) e mantendo a concentração constante de oxigênio desejável (aproximadamente 21-30%) a todos os animais no tempo determinado de 180 minutos. Após a exposição ao oxigênio, os animais foram retirados da caixa, reavaliados quanto aos parâmetros fisiológicos e realizada nova coleta de sangue. Decorridos 60 minutos do fim da hipóxia/ simulação, os animais foram eutanasiados e o encéfalo retirado para análise do encéfalo e dosagem tecidual de enzimas antioxidantes neste. Durante todo o procedimento os animais se mantiveram acordados, com leve sedação por acepromazina 1% (0,03ml i.m.), quando necessário.

A gasometria arterial e as análises bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da UFMS. As análises do estresse oxidativo (conteúdo de GSH, TBARS e PC bem como atividade da SOD, CAT, MPO) foram realizadas no Laboratório de Hematologia Clínica (FACFAN/LAC/ UFMS) em colaboração com o Prof. Dr Eduardo Benedetti Parisotto.

Coleta e preparação das amostras

Após a eutanásia dos animais, amostras de encéfalo foram coletadas em 2 tubos do tipo Falcon (um com ácido tricloroacético – TCA 12% e outro sem reagente) e armazenadas em nitrogênio líquido (\cong -170°C). No tubo contendo TCA 12%, as amostras de encéfalo foram maceradas e homogeneizadas, obtendo assim, uma amostra processada, denominado extrato ácido, a qual foi utilizado para determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH). A segunda amostra de encéfalo (tubo 2) foi descongelada em temperatura gradativamente (gelo e temperatura ambiente), macerada e homogeneizada em tampão Tris (hidroximetil) aminometano 300mM HCl, pH 7,4 (denominado tempão de lise). O conteúdo dessa amostra foi centrifugado a 3000 g por 5 min e o sobrenadante foi usado para realizar os demais marcadores de estresse oxidativo (TBARS, PC, MPO, SOD e CAT). Todos os marcadores de estresse oxidativo foram normatizados por meio da quantificação de proteínas totais nas amostras, utilizando uma curva padrão de albumina. A concentração de proteínas totais (PT) foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando uma curva padrão de albumina. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Glutationa reduzida (tióis não-proteicos)

O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) foi avaliado no extrato ácido obtido do encéfalo por meio da determinação dos tióis não-proteicos (GSH representa $\cong 95\%$ do total destes tióis). Foi adicionado 20 μL de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5 mM em placa de 96 poços contendo 190 μL de tampão fosfato de potássio 0,2M pH 8,0 e 10 μL da amostra (extrato ácido encefálico). Posteriormente, as placas foram agitadas intermitentemente, até a obtenção máxima de formação do ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412nm. Os valores medidos em duplicata e expressos em $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína.

Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480nm mediante a oxidação da adrenalina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0), que forma o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, onde a enzima presente na amostra retarda sua formação. Os valores foram expressos em termo de atividade da enzima, onde uma unidade arbitrária de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade de formação do adrenocromo. Diante disso, as amostras homogeneizadas em tampão de lise, foram adicionadas em placas de 96 poços, em ordem crescente de volume (5, 10, 20, 40 μL) e o volume foi completado para 200 μL com tampão glicina 50mM, pH 10,2. Na sequência, foi adicionado 5 μL de adrenalina 60mM (pH 2,0 aproximadamente, em gelo e frasco âmbar). A velocidade de formação do adrenocromo foi monitorada, para então adicionar a alíquota da amostra (5 a 40 μL), totalizando um tempo de 8 minutos. As curvas permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD. Os valores foram expressos em USOD/mg de proteína.

Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase foi determinada nas amostras homogeneizadas em tampão de lise, segundo o modelo descrito e adaptado de Parisotto (2016), que quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em 240nm durante 5 minutos, pela enzima presente na amostra. Utilizou-se a solução de H_2O_2 10mM em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, a qual foi preparada e titulada no dia da análise. Para isso, adicionou-se 5 μL da amostra nos poços da placa, com acréscimo de 200 μL desta solução, em seguida realizou-se a leitura da queda da absorbância. Os valores foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

MARCADORES DE DANO

Peroxidação lipídica (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica no encéfalo, foi realizada em duplicata, por detecção em 535 nm dos derivados de seus produtos de oxidação, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) -TBARS, destacando-se o malondialdeído (MDA), produzindo uma base de Schiff de coloração rosa. Para este ensaio, em microtubos contendo 500 μL de TCA 12% foi adicionado 50 μL do sobrenadante da amostra homogeneizada em tampão de lise e centrifugada. Em seguida, foi adicionado 450 μL de tampão TRIS (Solução TRIS HCl 7,4), e por fim, 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,73%. Após homogeneização em vórtex foi feita incubação por 60 min a 100°C. Posteriormente, o material foi resfriado durante 15 min a 4°C e centrifugado (5000 g por 5 min). O sobrenadante foi utilizado para a leitura e os resultados expressos em mmol/mg.

Proteína carbonilada (PC)

O dano oxidativo à proteínas foi determinado pela carbonilação de proteínas por medida espectrofotométrica. Para esta análise foram utilizados microtubos de centrifugação contendo 600 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e acrescentado 100 μL da amostra. Posteriormente, foi incubado durante 1 h (à temperatura ambiente, protegido da luz, sob agitação). Em seguida, foi adicionado 600 μL de TCA 20%, seguido de agitação e refrigeração (banho de gelo) por 15 min e centrifugado por 5 min a 800 g. O *pellet* formado foi lavado por 3 vezes, seguidas de centrifugação durante 5 min a 800 g, utilizando 800 μL de etanol:acetado de etila (1:1). Após a última lavagem, o excesso de etanol:acetado de etila foi removido com auxílio de um cotonete e foram adicionados 800 μL de guanidina [6,0 M em KH_2PO_4 (20mm)] e incubado por 60 min a 37°C e na sequência, realizada a leitura em 360 nm. A concentração de proteína carbonilada foi expressa em nmol/mg de proteína.

MARCADOR INFLAMATÓRIO

Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase sérica foi mensurada segundo o método descrito por Rao e colaboradores (1993). Primeiramente, as amostras foram descongeladas gradualmente e 20 μL foram transferidos para placas contendo 180 μL de meio de reação (0,167 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de o-dianisidina 2HCl, 0,0005% de H_2O_2 , H_2O destilada e NaH_2PO_4 50 mM). Após 15 min de incubação em temperatura ambiente a reação foi interrompida com a adição de 30 μL de azida

sódica 1%. Após incubação de 10 min à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em 450 nm em placas de 96 poços e comparadas com uma curva-padrão de atividades conhecidas de MPO (0,7 a 140 mU/mL). Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Análises bioquímicas e de gasometria foram realizadas por analisadores automáticos da Roche, Cobas c111 e Cobas b221, respectivamente. Os reagentes utilizados para os ensaios de estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios foram adquiridos juntos à Sigma-Aldrich ® Ltda (São Paulo, BRA). Os demais reagentes foram de grau analítico provenientes de empresas nacionais. As soluções reagentes assim como os meios, foram preparados no Laboratório de Hematologia Clínica (FACFAN /UFMS) utilizando balança analítica marca Ohaus® modelo AR2140 e pHmetro marca Digimed®, modelo DM20. Foi utilizado leitor de placas, a Molecular Devices Spec-tra Max 190® do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular e Cultura de Células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN/UFMS).

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE DADOS

O teste *t* de Student para amostras independentes foi aplicado para a avaliação estatística de todas as diferenças de médias e desvio padrão pertencentes ao Grupo Controle e Grupo Hipóxia, admitindo um nível de significância mínimo de $p < 0,05$. Para verificar o uso do teste *t*, o teste de Shapiro Wilk foi realizado previamente, verificando a normalidade das amostras. A estatística descritiva foi usada para descrever as características básicas dos dados em termos de valor médio (média) e desvio padrão (SD). As análises foram realizadas no programa estatístico BioEstat 5.3.

RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros fisiológicos, análise bioquímica e gasometria dos animais, de acordo com o tempo de análise e o grupo pertencente (GH ou GC) são apresentados nas tabelas a seguir.

TABELA 1: Parâmetros fisiológicos nos animais avaliados para o modelo animal de hipóxia neonatal, grupo hipóxia e grupo controle, antes e após o dano hipóxico.

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	GRUPO HIPÓXIA (n=6)	GRUPO CONTROLE (n=4)	Valor de p
Peso Corporal (Kg)	1,47 (\pm 0,22)	1,46 (\pm 0,30)	0,9566
Sexo (macho:fêmea)	4:2	1:3	
FC (bpm)			
Inicial	184,5 (\pm 57,74)	210 (\pm 39,64)	0,4552
Final	130,17 (\pm 39,34)	200,25 (\pm 34,57)	0,0203
FR (mpm)			
Inicial	53,67 (\pm 34,89)	33 (\pm 7,57)	0,127
Final	44,33 (\pm 18,40)	33 (\pm 6,73)	0,1506
Temperatura (°C)			
Inicial	37,98 (\pm 1,55)	36,40 (\pm 1,23)	0,127
Final	36,63 (\pm 0,62)	37,23 (\pm 0,51)	0,1506
PAM (mmHg)			
Inicial	103,67 (\pm 41,11)	127 (\pm 16,87)	0,2541
Final	88,17 (\pm 27,21)	110,5 (\pm 31,86)	0,2939
Oximetria (%)			
Inicial	91,67 (\pm 5,82)	94,75 (\pm 2,75)	0,3582
Final	77,33 (\pm 6,53)	95,50 (\pm 3,7)	0,0011

Valores listados como média (\pm DP). Diferenças de grupo significativas: valores de p em negrito. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. Os valores em negrito representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Comparação entre grupo hipóxia (GH) e grupo controle (GC): teste t de Student. Abreviaturas: FC, frequência cardíaca; FR, frequência respiratória; PAM, pressão arterial média.

Houve diferença significativa na oximetria e na frequência cardíaca dos grupos de animais, após o dano hipóxico de 180 minutos, conforme tabela 1. A medida da aspartato aminotransferase (AST) e da creatinina (CRE) também apresentou diferença significativa após o experimento, tabela 2.

TABELA 2: Análises bioquímicas nos animais avaliados para o modelo animal de hipóxia neonatal, grupo hipóxia e grupo controle, antes e após o dano hipóxico.

BIOQUÍMICA	GRUPO HIPÓXIA (n=6)	GRUPO CONTROLE (n=4)	Valor de p
ALT (U/L)			
Inicial	32,24 (\pm 5,94)	24 (\pm 6,39)	0,0945
Final	30,48 (\pm 6,77)	23,73 (\pm 5,95)	0,1693
AST (U/L)			
Inicial	49,92 (\pm 10,23)	40,15 (\pm 24,85)	0,5016
Final	50,02 (\pm 10,91)	29,15 (\pm 9,03)	0,0188
URE (mg/dL)			
Inicial	25,88 (\pm 15,58)	19,50 (\pm 7,26)	0,4477
Final	29,17 (\pm 9,54)	22,20 (\pm 8,23)	0,2941
CRE (mg/dL)			
Inicial	0,54 (\pm 0,13)	0,43 (\pm 0,15)	0,2763
Final	0,57 (\pm 0,05)	0,40 (\pm 0,07)	0,0151

Valores listados como média (\pm DP). Diferenças de grupo significativas: valores de p em negrito. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. Os valores em negrito representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$). Comparação entre grupo hipóxia (GH) e grupo controle (GC): teste t de Student. Abreviaturas: ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; URE, uréia; CRE, creatinina.

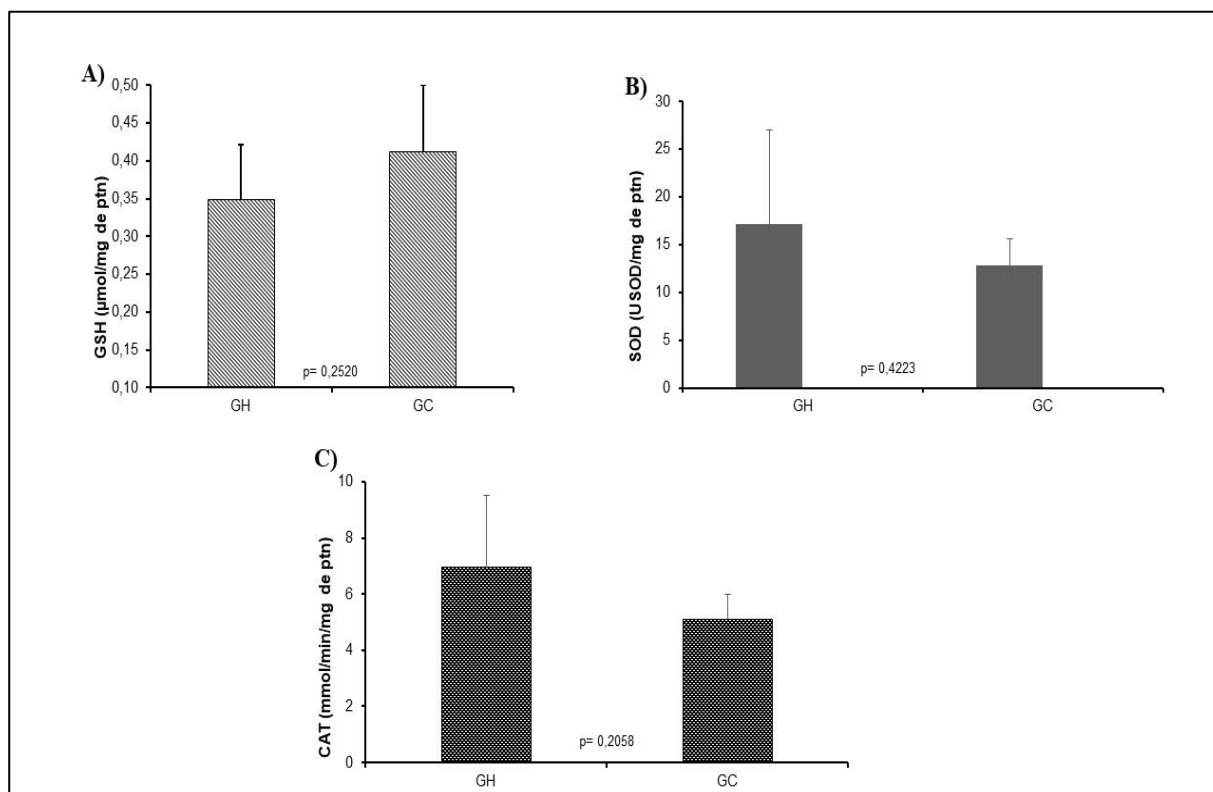
TABELA 3: Gasometria nos animais avaliados para o modelo animal de hipóxia neonatal, grupo hipóxia e grupo controle, antes e após o dano hipóxico.

GASOMETRIA	GRUPO HIPÓXIA (n=6)	GRUPO CONTROLE (n=4)	Valor de p
pO₂ (mmHg)			
Inicial	37,82 (± 14,73)	33,85 (± 13,17)	0,6698
Final	32,33 (± 11,53)	18,53 (± 3,18)	0,032
pCO₂ (mmHg)			
Inicial	35,53 (± 4,69)	30,40 (± 1,80)	0,0458
Final	32,50 (± 8,88)	35,23 (± 3,33)	0,5164
HCO₃ (mmol/L)			
Inicial	22,22 (± 7,39)	20,20 (± 2,37)	0,5569
Final	19,37 (± 6,58)	22,35 (± 0,45)	0,3186
pH			
Inicial	7,38 (± 0,14)	7,42 (± 0,04)	0,5373
Final	7,38 (± 0,08)	7,41 (± 0,05)	0,4476
Na (mmol/L)			
Inicial	147,88 (± 6,25)	145 (± 2,62)	0,3478
Final	149,03 (± 4,92)	148,03 (± 2,58)	0,684
K (mmol/L)			
Inicial	2,94 (± 0,68)	3,10 (± 0,59)	0,7147
Final	3,08 (± 0,48)	3,17 (± 0,36)	0,7672
iCA (mmol/L)			
Inicial	0,85 (± 0,18)	0,89 (± 0,15)	0,696
Final	0,86 (± 0,21)	0,81 (± 0,07)	0,6538
Cl (mmol/L)			
Inicial	107,97 (± 4,10)	107,50 (± 1,64)	0,8093
Final	112,97 (± 6,26)	107,98 (± 1,63)	0,2296
Glu (mg/dL)			
Inicial	85,22 (± 26,33)	85,50 (± 12,71)	0,9825
Final	94,33(± 11)	76 (± 7,87)	0,0154
Lac (mmol/L)			
Inicial	7,71 (± 3,98)	5,70 (± 1,07)	0,2852
Final	7,50 (± 5,11)	3,80 (± 0,18)	0,1366

Valores listados como média (± DP). Diferenças de grupo significativas: valores de p em negrito. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão da média. Os valores em negrito representam diferenças estatísticas significativas (p<0,05). Comparação entre grupo hipóxia (GH) e grupo controle (GC): teste t de Student. Abreviaturas: PO₂, pressão parcial de oxigênio; PCO₂, pressão parcial do gás carbônico; HCO₃, bicarbonato de sódio; Na, sódio; K, potássio; iCA, cálcio; Cl, cloro; Glu, glicose; Lac, lactato.

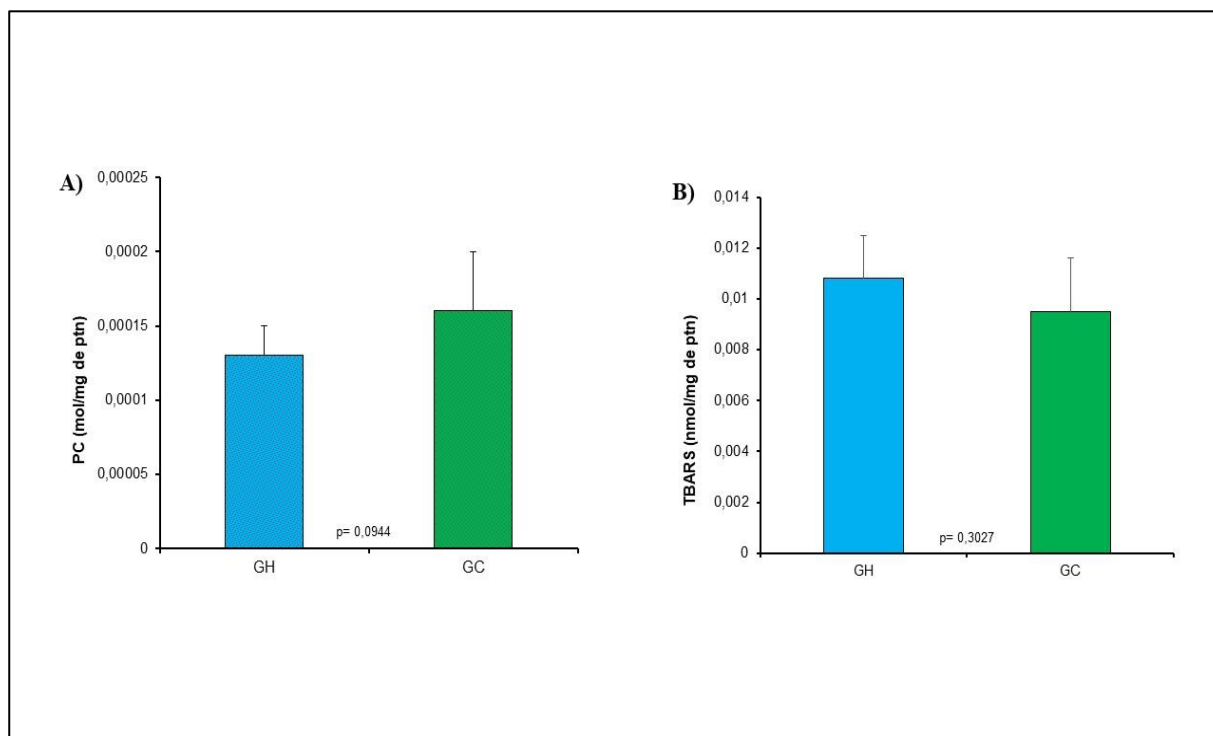
Os resultados da caracterização do estado redox no modelo animal suíno, GSH, enzimas antioxidantes, marcadores de dano oxidativo e marcador inflamatório são apresentados na forma de figuras a seguir.

Figura 1: Caracterização do estado redox, GSH e enzimas superóxido dismutase e catalase em modelo animal suíno de hipóxia neonatal.



Valores encontrados na comparação entre os grupos do estudo, grupo hipóxia (180min) e grupo controle. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. Abreviaturas: GSH, glutatona reduzida; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase. GSH expressa em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína; SOD expresso em USOD/mg de proteína; CAT expresso em mmol/min/mg de proteína.

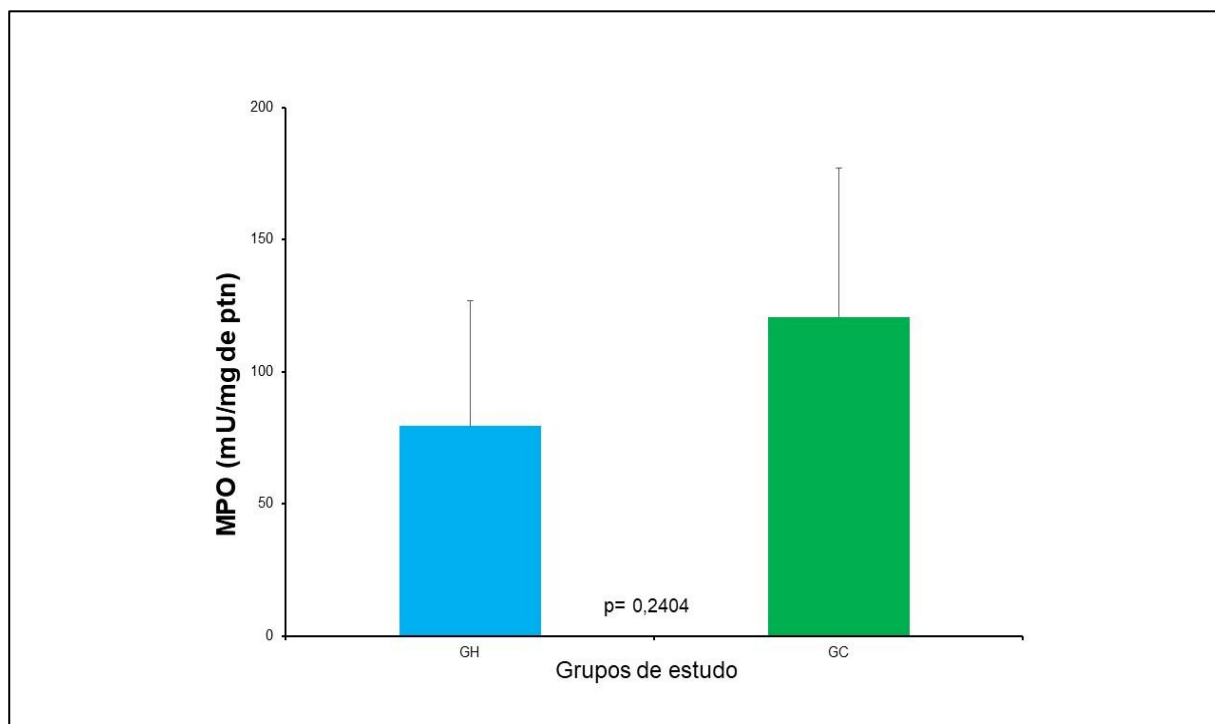
Na análise do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) o grupo hipóxia apresentou 0,3481 ($\pm 0,0730$) e o grupo controle apresentou 0,4113 ($\pm 0,0890$), com $p=0,2520$ conforme gráfico A apresentado na Figura 1. A atividade da superóxido dismutase no grupo hipóxia foi de 17,1663 ($\pm 9,7926$) USOD/mg de proteína e no grupo controle 12,8420 ($\pm 2,7412$) USOD/mg de proteína com $p=0,4223$. A catalase apresentou 6,9616 ($\pm 2,5582$) no grupo hipóxia e 5,0995 ($\pm 0,8949$) no grupo controle, com $p=0,2058$ conforme gráfico C da Figura 1. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média.

Figura 2: Marcadores de dano em modelo animal suíno de hipóxia neonatal.

Valores encontrados na comparação entre os grupos do estudo, grupo hipóxia (180min) e grupo controle. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. Abreviaturas: PC, proteína carbonilada; TBARS, substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico. PC expressa em nmol/mg de proteína; TBARS resultados expressos em mmol/mg.

Os marcadores de dano caracterizados neste estudo referem-se à carbonilação de proteína (PC) e as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) -TBARS, destacando-se o malondialdeído (MDA). A proteína carbonilada no grupo hipóxia foi 0,00013 (\pm 0,00002) nmol/mg de proteína e 0,00016 (\pm 0,00004) nmol/mg de proteína no grupo controle, com $p= 0,0944$. TBARS no grupo hipóxia 0,0108 (\pm 0,0017) e no grupo controle 0,0095 (\pm 0,0021) mmol/mg de proteína, com $p=0,3057$ conforme gráfico B da figura 2. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média.

Figura 3: Marcador de inflamação em modelo animal súino de hipóxia neonatal.



Valores encontrados na comparação entre os grupos do estudo, grupo hipóxia (180min) e grupo controle. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão da média. MPO = mieloperoxidase, expressos em mU/mg de proteína.

A mieloperoxidase foi analisada como marcador de inflamação e apresentou 79,4125 (\pm 47,2810) mU/mg de proteína no grupo hipóxia, 120,6752 (\pm 56,4665) mU/mg de proteína no grupo controle e $p=0,2404$ conforme apresentado na Figura 3.

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no estudo apresentaram uma condição de estresse oxidativo cerebral desenvolvido em leitões como modelo animal de hipóxia neonatal. Ainda que o tamanho da amostra seja pequeno (respeitando o princípio dos 3Rs), observou-se medições bioquímicas no soro e encéfalo dos animais (sérica e tecidual) e características clínicas de comprometimento do animal frente à injúria. De forma semelhante a estudos relacionados foi observada a restauração rápida do leitão ao dano hipóxico. SCHULZ e colaboradores relatam que em estudos experimentais são comuns trabalhos com “amostras pequenas”, especialmente no caso de recém-nascidos (SCHULZ *et al.*, 2011).

As alterações nos animais durante o período de hipóxia demonstraram sinais clínicos compatíveis com encefalopatia. Alterações na respiração, orientação e marcha dos animais foram observadas durante o período de redução de oxigênio, além de nível de atividade reduzida e presença de movimentos patológicos, conforme descrito por KYNG *et al.*, 2015. Entretanto não apresentou diferença estatística significativa quando comparado os dados fisiológicos dos grupos hipóxia e controle ($p>0,05$), tabela 1. HUUN e colaboradores (2018) também relatam a dificuldade em expressar sintomas clássicos de hipóxia em neonatos no modelo suíno.

Foram observadas diferenças significativas na frequência cardíaca após 180 minutos da diminuição do oxigênio ($p=0,0203$) e na oximetria dos grupos comparados ($p=0,0011$), tabela 1. Durante o período de redução do volume de oxigênio aos animais, observou-se alteração no comportamento dos animais, como mioclonia, dificuldade de marcha e hipotensão. O protocolo de experimento previa administração de leve sedação nos animais, em caso de necessidade. Apenas um animal foi sedado no período pré-hipóxico, para melhor ambientação no laboratório, sendo aplicado Acepromazina (0,25mg/kg) uma única vez.

Apenas ventilação hipóxica não induz hipercapnia grave que poderia afetar criticamente o desenvolvimento de convulsões (NEMETH *et al.*, 2016). O modelo animal desenvolvido nos leitões tem como objetivo a maior similaridade ao vivenciado por neonatos, onde raramente são anestesiados. Os leitões não foram anestesiados, sem o viés das drogas. Era esperado um dano moderado, sem a incidência de convulsões. KOEHLER e colaboradores (2018) relata que a oclusão das vias aéreas de 7 a 8 minutos por si só não produz danos cerebrais significativos, enquanto durações mais longas de asfixia produzem assistolia prolongada e dificuldades em ressuscitar o coração. A ventilação com 10% de O₂ por 30 a 45 minutos antes de 7 a 8 minutos de oclusão das vias aéreas leva a danos cerebrais reprodutíveis regionalmente seletivos.

Nesse estudo foi observado diferença significativa na oximetria dos grupos avaliados (Grupo Hipóxia x Grupo Controle), conforme tabela 1, com $p=0,0011$ após o período de hipóxia/ simulação. Todavia ressaltamos a rapidez com que os leitões oxigenaram, portanto, há necessidade de monitoramento precoce rigoroso e ajuste da ventilação, conforme descrito por EIBY *et al.*, 2013. Há um esforço do seu metabolismo em reverter o dano o mais rapidamente possível. Outros estudos reforçam a presença do dano hipóxico mesmo após rápida recuperação do animal (THORESEN *et al.*, 2001; NEMETH *et al.*, 2016).

Embora seja descrito um quadro de acidose metabólica nos leitões para a confirmação da lesão hipóxica, diversos autores reiteram certa tolerância à hipóxia em leitões (THORESEN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2010; EIBY *et al.*, 2013; KYNG *et al.*, 2015), e até mesmo registram a breve recuperação ao dano sofrido (THORESEN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2021). Em nosso estudo não foi observada diferença significativa no pH dos animais (GH=7,38±0,08 e GC=7,41±0,05 após 180min) conforme descrito na tabela 3 dos resultados.

THORESEN e colaboradores (2001) avaliaram a hipotermia moderada como estratégia terapêutica para um modelo de EHI em leitões e não encontraram diferença significativa entre os grupos avaliados.

HUUN e colaboradores (2018) também não encontraram diferenças significativas na fisiologia basal dos grupos antes do dano hipóxico e, retrata a boa recuperação do pH dos leitões horas após o dano, demonstrando sua resistência e boa recuperação, sem deixar de produzir os danos desejados do modelo animal de doença hipóxica. Esses parâmetros de gasometria se recuperaram e não foram estatisticamente diferentes de leitões do grupo controle 4 h após reoxigenação.

CHEN e colaboradores (2021) avaliaram leitões machos neonatos (2-3 dias de idade, 1-2,5 kg), randomizados para HI ou procedimento simulado. A concentração inspirada de oxigênio foi reduzida para 10% por 45 minutos. Em seguida, o tubo endotraqueal foi clampeado por 8 minutos para produzir asfixia. Todos os leitões desenvolvem bradicardia grave ou hipotensão com este protocolo com frequência cardíaca inferior a 60 batimentos por minuto ou PAM inferior a 45. Entretanto, relatou breve recuperação após o dano. Pouca alteração do Ph durante a hipóxia, $pH < 7$ apenas durante a isquemia e recuperação em 5 minutos ($pH > 7$), e recuperação total do dano 2 horas após.

THORESEN e colaboradores (2001) desenvolveram um modelo de hipóxia grave em que leitões recém-nascidos anestesiados e intubados oralmente, são ventilados mecanicamente com 6% de O₂ por até 45 min. O O₂ inspirado é titulado para manter a amplitude do EEG <7 µV, evitando a parada cardíaca. Aos três dias de recuperação, a lesão neuronal é proeminente em partes do córtex cerebral, substância branca subcortical e hipocampo e também é evidente nos gânglios da base, cerebelo e tálamo. A atividade convulsiva geralmente ocorre dentro de várias horas e está associada a uma pior neurodegeneração. Este modelo também foi replicado por outros pesquisadores para estudar o benefício da hipotermia e da inalação de xenônio (THORESEN *et al.*, 2001, CHAKKARAPANI *et al.*, 2010; KOEHLER *et al.*, 2018).

O grau de EHI induzido é essencial. Um modelo animal útil de EHI também deve permitir o teste de novos procedimentos de diagnóstico e opções de tratamento. Para permitir isso, os modelos devem induzir EHI moderada onde há um potencial de tratamento, pois lesão cerebral grave com pouco ou nenhum potencial de tratamento seria menos relevante ao avaliar novos tratamentos. A tolerância à hipóxia varia consideravelmente entre os animais de teste. (KYNG *et al.*, 2015). Nenhum animal apresentou convulsão ou desconforto grave durante o protocolo. Não era objetivo suprimir o metabolismo a ponto de convulsionar, então desenvolveu-se um dano moderado, porém resguardando o bem estar dos animais sem anestesia. Ainda que moderadamente, foi possível caracterizar as alterações no modelo e estado redox dos animais. Os parâmetros descritos foram publicados afim de que possam ser aprimorados em experimentos futuros.

Ao contrário de adultos e crianças após trauma cerebral, recém-nascidos humanos com encefalopatia neonatal não são rotineiramente anestesiados. Dependendo da prática local, os lactentes podem ser sedados durante a ventilação mecânica e os cuidados intensivos podendo receber tratamento anticonvulsivante se desenvolverem convulsões clínicas (THORESEN *et al.*, 2001; SCHULTZ *et al.*, 2011). Dessa forma, nosso objetivo era replicar a rotina clínica e não anestesiá-los, mas promover leve sedação afim de proporcionar bem-estar aos leitões durante o experimento.

Um modelo animal de doença, com leitão como modelo de EHI, é tecnicamente desafiador a desenvolver, e até mesmo replicar. Estudos mostram diversas maneiras de promover o dano hipóxico, e todos salientam a resistência e breve recuperação do animal ao quadro, bem como os diferentes fatores que precisam ser levados em consideração ao promover a hipóxia (método de indução da hipóxia, anestesia, clampeamento do cordão umbilical,

clameamento da artéria carótida, entre outros). O método aplicado na indução da lesão hipóxico-isquêmica é importante. A hipóxia global que leva à EHI geralmente resulta em falência de múltiplos órgãos envolvendo cérebro, coração, pulmões, rins e fígado. Dependendo dos desfechos avaliados, os modelos de EHI devem basear-se em hipóxia e isquemia globais, e não em isquemia focal, por exemplo, por ligadura de artérias carótidas (KYNG *et al.*, 2015; NEMETH, *et al.*, 2016).

Em um estudo conduzido na Dinamarca, KYNG e colaboradores (2015) demonstram os procedimentos técnicos necessários para estabelecer um modelo estável de EHI em neonatos suínos. O leitão recém-nascido (< 24 horas de idade, peso médio de 1.500 g) é anestesiado, entubado e monitorado em uma configuração comparável à encontrada em uma unidade de terapia intensiva neonatal. A hipóxia é induzida pela redução da fração inspiratória de oxigênio para atingir hipóxia global, isquemia por hipotensão e um EEG integrado de amplitude de traçado plano (aEEG) indicativo de hipóxia cerebral. A sobrevivência é promovida ajustando a oxigenação de acordo com a resposta do aEEG e a pressão arterial. A lesão cerebral é quantificada por histopatologia e ressonância magnética após 72 horas.

Em níveis fisiológicos os oxidantes desempenham um papel necessário no organismo em diversas funções vitais, como a produção de energia e defesa do hospedeiro. O desbalanço em favor dos oxidantes (excesso destes) que acarreta danos ao organismo. Dessa forma torna-se interessante a determinação do estado redox, em indivíduos sob diferentes situações patológicas, como nosso modelo de hipóxia neonatal sem anestesia, por meio de diferentes vias, tais como a GSH, enzimas antioxidantes (SOD e CAT), marcadores de dano (TBARS, PC) e marcador inflamatório (MPO) (VELLOSA *et al.*, 2013).

O cérebro é um dos principais órgãos afetados pela hipóxia no período neonatal e um dos mais vulneráveis ao estresse oxidativo, levando ao comprometimento da neurogênese, dano mitocondrial e neuroinflamação. O acúmulo de altos níveis de metais de transição, como ferro e cobre, tornam o cérebro um importante órgão a demonstrar alterações no equilíbrio antioxidante (TORRES-CUEVAS; CORRAL-DEBRINSKI; GRESSENS, 2019).

Para avaliar os efeitos da hipóxia sobre o dano oxidativo cerebral, foi mensurado o conteúdo de proteína carbonilada, um marcador de dano oxidativo à proteína e de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, destacando-se o MDA) um marcador de peroxidação lipídica, resultados apresentados na Figura 2. A mieloperoxidase (MPO) é uma

enzima presente em neutrófilos a qual está associada ao processo fagocitário, atuando como um marcador inflamatório importante em diversas patologias, Figura 3 (PARISOTTO *et al.*,2016).

Nossos resultados apresentaram uma diminuição de GSH no grupo Hipóxia em relação ao grupo controle, embora não haja diferença estatística significativa ($0,3481 \pm 0,0730$ GH versus $0,4113 \pm 0,0890$ GC), Figura 1. HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA (2008) afirma que os níveis celulares de glutathiona reduzida são altamente elevados, indicando sua relevância no mecanismo de detoxificação do organismo, em condições normais. Os valores de SOD e CAT se expressaram de modo muito similar nos grupos.

Em um estudo que analisou pacientes com síndrome de Down antes e após suplementação antioxidante, PARISOTTO e colaboradores (2015) encontraram diminuição da atividade da SOD e CAT mesmo após 6 meses da terapêutica de intervenção, não alterando significativamente seus valores (PARISOTTO *et al.*,2015). Em nossos resultados, embora não haja diferença significativa entre os grupos hipóxia e controle, vemos uma expressão maior de SOD e CAT no grupo hipóxia, ainda que discreta, quando comparada ao grupo controle de animais, sugerindo uma tendência provavelmente mais acentuada se os grupos apresentassem mais animais ($n >$).

LIU e colaboradores (2010) analisaram o estresse oxidativo de leitões recém-nascidos e após 48 horas de recuperação de hipóxia e reoxigenação. Não houve diferença na concentração de GSH no cérebro dos leitões entre os grupos experimentais, embora o grupo tratado com N-acetilcisteína tenha sido maior do que o controle a diferença não atingiu significância estatística.

Os modelos animais de grande porte mais frequentemente usados de asfixia perinatal incluem asfixia parcial ou completa no momento do parto, oclusão de cordão umbilical, hipoperfusão e hipóxia em leitões neonatos, mas ainda se ressalta a necessidade de pesquisa contínua para estabelecer o modelo ideal e encontrar terapia adjuvante de neuroproteção (KOEHLER *et al.*,2018). No modelo suíno neonatal há abundância de material para pesquisas diversas, diferentemente do encontrado em animais de pequeno porte, onde muitas vezes é necessário um “*pool*” de amostras para a realização de uma única análise.

A diversidade de protocolos e modelos descritos na literatura contrapõem com nossa realidade de pesquisa no Brasil. Uma das limitações desse estudo, os desafios como custos do experimento, aquisição dos animais, necessidades de equipamentos e equipe qualificada para a assistência dos animais pelo período necessário da pesquisa, inviabilizou objetivos esperados,

como uma melhor caracterização do modelo (exames de imagem, histopatologia, sobrevivência maior dos animais após o dano, entre outros. Todavia, foi possível apresentar os resultados da pesquisa desenvolvida, respondendo muitas perguntas no que tange a fisiologia redox auxiliando na caracterização do modelo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apresentou outras limitações como a disponibilidade de equipamentos e uma melhor estrutura de equipe, onde garantisse avaliar este animal de modo mais amplo, por um período maior de sobrevivência pós injúria, como relatado em outros estudos de hipóxia. Somado a todos os desdobramentos da pesquisa, ainda impactou a Covid-19, que impossibilitou melhorias no protocolo da pesquisa, utilização do número total de animais aprovado pelo CEUA/ UFMS e até mesmo trabalhar as amostras em laboratório, pois foram fechados ao público, visando resguardar durante a epidemia.

Estudos futuros devem otimizar os parâmetros aqui descritos, e incluir avaliações adicionais, como outros testes complementares (PCR, imagem, histologia, Western blot, entre outros).

Também vale ressaltar a variedade de material oriunda deste modelo experimental com suínos, podendo atender não somente a pesquisa, mas também ensino e extensão.

CONCLUSÃO

O presente estudo contribui para a utilização do leitão como modelo animal de hipóxia neonatal e dano cerebral. Mesmo com um grupo reduzido de animais, foi possível estabelecer parâmetros para estudos futuros no aperfeiçoamento do protocolo de indução do dano sem anestesia, bem como desenvolvimento de opções terapêuticas. O tamanho da amostra foi limitado a apenas 10 animais, mas o desenho inicial previa também um estudo da hipotermia como opção terapêutica aos danos da HI. Não há dados publicados sobre a tolerância dos leitões a um modelo hipóxico sem uso de anestesia, visando eliminar o viés da droga e seus efeitos colaterais, todavia o dano ainda se mostrou brando no desenvolvimento da patologia (EHI).

Neste estudo piloto de um modelo animal de hipóxia de grande porte, o dano foi moderado, não ocasionando uma encefalopatia hipóxica isquêmica, mas com alterações clínicas nos animais e relevância do modelo comprovada estatisticamente. O bem estar dos leitões e a caracterização do estado redox no modelo animal de doença apresentam dados inéditos para a compreensão do processo hipóxico em neonatos, sem o viés da anestesia.

Quanto à caracterização do estresse oxidativo, o diagnóstico precoce aumenta as chances de sucesso do tratamento, mas para isso é necessária ininterrupta pesquisa sobre novos biomarcadores, bem como seu status, seja em condições normais ou patológicas desenvolvidas em modelos experimentais de doenças. Neste estudo, apresentamos a caracterização encontrada em suínos neonatos de 48h de vida, contemplando a atividade da GSH, estado das enzimas antioxidantes (SOD, CAT), expressão de marcadores de dano proteico (PC, TBARS) e um marcador inflamatório (MPO).

REFERÊNCIAS

- AUSTIN, T.; **Therapeutic hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy: challenges during transfer and global perspectives.** J Pediatr (Rio J), v. 94, n. 3, p. 221-223, may/june.2018. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.09.002>.
- CAMPOS, M.T.G.; LEME, F.O.P. **Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial.** Rev. Pubvet, v. 12, n. 1, a10, p.1-8, jan. 2018. Doi: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n1a10.1-8>.
- CHAKKARAPANI E.; DINGLEY J.; LIU X.; HOQUE N.; AQUILINA K.; PORTER H.; THORESEN M. **Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs.** Ann Neurol., v. 68, n. 3, p.330-41, sep., 2010, doi: 10.1002/ana.22016.
- CHEN, M.W; SANTOS, P; KULIKOWICZ, E; KOEHLER, R.C; LEE, J.K; MARTIN, L.J. **Targeting the mitochondrial permeability transition pore for neuroprotection in a piglet model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.** J Neurosci Res., v. 99, n. 6, p. 1550-1564, jun., 2021, doi: 10.1002/jnr.24821.
- CUNHA, C.R.S. DOS S.; VIANA, L.M.A.T.; SOUZA, C.V.B.; MANGUEIRA, M. DE A.M.M.; LIMA, F.P.L. **Hipotermia terapêutica em recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica: Revisão Integrativa.** Rev. Soc. Bras. Enferm. Ped, v. 18, n. 1, p. 37-42, jun. 2018.
- DUMITRESCU, L.; POPESCU-OLARU, I.; COZMA, L.; TULBĂ, D.; HINESCU, M.E.; CEAFALAN, L.C.; GHERGHICEANU, M.; POPESCU, B.O. **Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis.** Oxid Med Cell Longev., v. 2018:2406594, dec., 2018. Doi: 10.1155/2018/2406594.
- EIBY Y.A.; WRIGHT L.L.; KALANJATI V.P.; MILLER S.M.; BJORKMAN S.T.; KEATES H.L.; LUMBERS E.R.; COLDITZ P.B.; LINGWOOD B.E. **A pig model of the preterm neonate: anthropometric and physiological characteristics.** PLoS One, v.8, n.7, e.68763, jul., 2013. Doi: 10.1371/journal.pone.0068763.
- GRACA, A.M.; SAMPAIO, I.; MONIZ, C. **Hipotermia induzida na encefalopatia hipóxico-isquêmica.** Nascer e Crescer, v.20, n.3, p.158-164, 2011. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S087207542011000300015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 15 maio 2019.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. **Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos.** Quim. Nova, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.
- HUUN M.U.; GARBERG H.; LØBERG E.M.; ESCOBAR J.; MARTINEZ-ORGADO J.; SAUGSTAD O.D.; SOLBERG R. **DHA and therapeutic hypothermia in a short-term follow-up piglet model of hypoxia-ischemia: Effects on H⁺MRS biomarkers.** PLoS One.;v. 13, n. 8, e. 0201895, aug., 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0201895.
- KAYTON A.; TIMONEY P.; VARGO L.; PEREZ JA. **Uma Revisão da Fisiologia do Oxigênio e Gestão Adequada dos Níveis de Oxigênio em Recém-nascidos Prematuros.** Cuidados Neonatais Adv., v. 18, n. 2, p. 98-104, 2018. Doi:10.1097/ANC.0000000000000434

KOEHLER R.C.; YANG Z.J.; LEE J.K.; MARTIN L.J. **Perinatal hypoxic-ischemic brain injury in large animal models: Relevance to human neonatal encephalopathy.** *J Cereb Blood Flow Metab.*, v. 38, n. 12, p. 2092-2111, dec., 2018. Doi: 10.1177/0271678X18797328.

KRATIMENOS P.; VIJ, A.; VIDVA, R.; KOUTROULIS, I.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M.; GALLO, V.; SATHYANESAN, A. **Computational analysis of cortical neuronal excitotoxicity in a large animal model of neonatal brain injury.** *J Neurodev Disord.*, v. 14, n. 1, mar., 2022, doi: 10.1186/s11689-022-09431-3.

KYNG K.J.; SKAJAA T.; KERN-JESPERSEN S.; ANDREASSEN C.S.; BENNEDSGAARD K.; HENRIKSEN T.B. **A Piglet Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy.** *J Vis Exp.*, v. 16; n. 99, e. 52454, may., 2015. Doi: 10.3791/52454. PMID: 26068784; PMCID: PMC4542803.

LI, P.; STETLER, R.A.; LEAK, R.K.; SHI, Y.; LI, Y.; YU, W.; BENNETT, M.V.L.; CHEN, J. **Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery.** *Neuropharmacology.* v.134, p.208-217, may., 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.011>

LIU, JIANG-QIN; LEE, TZE-FUN; CHEN, C.; BAGIM, D. L.; CHEUNG, PO-YIN. **N-acetylcysteine improves hemodynamics and reduces oxidative stress in the brains of newborn piglets with hypoxia-reoxygenation injury.** *Journal of Neurotrauma*, v.27, n.10, p. 1865-1873, oct., 2010. Doi: 10.1089/neu.2010.1325

LOWRY, O.H; ROSEBROUGH, N.J; FARR, A.L; RANDALL, R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAIA, F.E.S.; PAIVA, M.B.M.; CLEMENTE, C.J.E. **Suporte Ventilatório e o Estresse Oxidativo em Prematuro.** *Rev. Aten. Saúde*, v.14, n.50, p.105-110, out/dez. 2016. Doi: <http://dx.doi.org/10.13037/ras.vol14n50.3861>.

NEMETH J.; TOTH-SZUKI V.; VARGA V.; KOVACS V.; REMZSO G.; DOMOKI F. **Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy.** *J Physiol Pharmacol.*, v. 67, n. 5, p. 677-689, oct., 2016. PMID: 28011948.

PAIVA, L.A.; SILVA, I.S.; SOUZA, A.S.; CASSINO, P.C. **Estresse oxidativo pulmonar em ratos diabéticos expostos à hiperóxia.** *Acta Cir. Bras.* São Paulo, v. 32, n. 7, p. 503-514, jul. 2017. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502017000700503&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 15 de maio de 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-865020170070000001>.

PARISOTTO E.B.; GIARETTA A.G.; ZAMONER A.; MOREIRA E.A.; FRÖDE T.S.; PEDROSA R.C.; FILHO D.W. **Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome.** *Res Dev Disabil.*, v. 45-46, p. 14-20, oct-nov., 2015. Doi: 10.1016/j.ridd.2015.07.010.

PARISOTTO E.B.; VIDAL V.; GARCÍA-CERRO S.; LANTIGUA S.; WILHELM FILHO D.; SANCHEZ-BARCELÓ E.J.; MARTÍNEZ-CUÉ C.; RUEDA N. **Chronic Melatonin Administration Reduced Oxidative Damage and Cellular Senescence in the Hippocampus of a Mouse Model of Down Syndrome.** *Neurochem Res.*; v. 41, n. 11, p. 2904-2913, nov., 2016. Doi: 10.1007/s11064-016-2008-8.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKASON, P.C. **Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation.** *Inflammation*, v. 17, n. 6, p. 723–741, 1993, <https://doi.org/10.1007/BF00920477>.

SANTOS, A.F.; MACHADO, R.R.; NETO, J.M.M.; MENEZES, M.G.V.; SILVA, G.B.A.; SANTOS, S.L. **Efeito antioxidante da diosmina: revisão integrativa.** *ABCS Health Sci.*, v.43, n.3, p.175-180, dec., 2018. Doi: 10.7322/abcshs.v43i3.1024

SCHULZ, S.; REULECKE, S.; EISELT, M.; SCHWAB, K.; WITTE, H.; WALTER, B.; BAUER, R.; VOSS, A. **Quantification of compensatory processes of postnatal hypoxia in newborn piglets applying short-term nonlinear dynamics analysis.** *Biomed Eng Online*. v.10, n.88, oct., 2011. Doi: 10.1186/1475-925X-10-88.

THORESEN, M.; SATAS, S.; LOBERG, E.M.; WHITELAW, A.; ACOLET, D.; LINDGREN, C.; PENRICE, J.; ROBERTSON, N.; HAUG, E.; STEEN, P.A. **Twenty-four hours of mild hypothermia in unsedated newborn pigs starting after a severe global hypoxic-ischemic insult is not neuroprotective.** *Pediatr Res.*, v.50, n.3, p.405-411, sep. 2001. Doi: 10.1203/00006450-200109000-00017

TORRES-CUEVAS I.; CORRAL-DEBRINSKI M.; GRESSENS P. **Brain oxidative damage in murine models of neonatal hypoxia/ischemia and reoxygenation.** *Free Radic Biol Med.*; v.142, p.3-15, oct. 2019. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.011.

VELLOSA, J.C.R.; PARABOCZ, G.C.; MANENTE, F.A.; RIBAS, J.T.; LIMA, L.W. **Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo.** *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v.34, n.3, p.305-312, 2013.

WASSINK, G.; DAVIDSON, J.O.; DHILLON, S.K.; ZHOU, K.; BENNET, L.; THORESEN, M.; GUNN, A.J. **Therapeutic hypothermia in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.** *Curr Neurol Neurosci Rep.*, v.19, n.2, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0916-0>

ANEXOS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CERTIFICADO






Certificamos que a proposta intitulada "Análise do estresse oxidativo em suínos submetidos à hipóxia e efeito neuroprotetor da hipotermia seletiva", registrada com o nº 1.088/2019, sob a responsabilidade de landara Schettert Silva - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2019 a 01/03/2021
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Sus scrofa domesticus / Large White</i>
Nº de animais	36 (18 machos + 18 fêmeas)
Peso/Idade	1200 g / 2 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Estância Rancho Alegre

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 30 de setembro de 2019.



Characterization of oxidative stress in animal model of neonatal hypoxia

Liliane de Mello Santos Bochenek¹ , Eduardo Benedetti Parisotto² , Evelyn de Andrade Salomão³ , Maria José Martins Maldonado³ , Iandara Schettert Silva⁴ 

1. Fellow Master degree. Postgraduate Program in Health and Development - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brazil.
2. PhD. Associate Professor. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brazil.
3. Fellow PhD degree. Postgraduate Program in Health and Development - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brazil.
4. PhD. Associate Professor. Postgraduate Program in Health and Development - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the oxidative stress in swine neonates submitted to hypoxia. **Methods:** Ten large white piglets, healthy newborns, of both sexes, were divided into two groups and submitted to an experimental hypoxia protocol with reduced inspired oxygen fraction. The hypoxia group, composed of six animals, was submitted to oxygen reduction for 180 min. The animals in the control group, n = 4, were handled and evaluated simultaneously, but without oxygen reduction. **Results:** 180 min after the start of the hypoxic insult, a significant difference was observed in the oximetry, and heart rate of the hypoxia group was compared to the control group ($p > 0.05$). There was no significant difference in the oxidative stress analyses. Reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lipid peroxidation (TBARS), protein carbonyl (PC), and myeloperoxidase (MPO) in the piglets' brain tissue were analyzed. **Conclusions:** Hypoxia causes adverse effects in swine neonates, although there is a natural physiological resistance of swine neonates to respond to this insult. Analyses of GSH, SOD, CAT, TBARS, MPO, and PC were tabulated and are presented as parameters for further studies to be carried out on an animal model of swine hypoxia.

Key words: Oxidative Stress. Hypoxia. Swine.

*Corresponding author: iandara.schettert@gmail.com | (55 67) 99982-8635

Received: July 02, 2021 | Review: Sept 06, 2021 | Accepted: Oct 09, 2021

Conflict of interest: Nothing to declare.

Research performed at Laboratory of Carcinogenesis and Experimental Animal Model, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Health and Development, West Central Region, UFMS. Tutor: Iandara Schettert Silva.



■ Introduction

Oxidative stress occurs due to an imbalance of oxidants in relation to antioxidants. At physiological levels, oxidants play a beneficial role in energy production, cell signaling and host defense. In excess, they can lead to pathological consequences for tissue and cell damage, disorders and diseases, resulting from the lack of antioxidant protection systems, or defects in the genes that regulate the antioxidant machines^{1,2}.

Reactive oxygen species (ROS) have been implicated in the pathogenesis of hypoxic-ischemic injury leading to an increase in oxidative stress and causing significant damage to biological macromolecules such as proteins (degeneration of membrane proteins), lipids (lipid oxidation) and acids (DNA degeneration). No intervention after asphyxia in human birth has been shown to reduce encephalopathy and subsequent brain damage. However, from recent work in newborn and adult animals, there is compelling evidence that neuronal rescue therapy is effective even if applied after the insult³⁻⁶.

During the metabolism of oxygen and nitrogen, several toxic molecules are produced, such as ROS. Any species that uses oxygen during cell respiration or nitrogen, by breaking down dietary amino acids for energy, are subject to oxidative stress^{3,7,8}.

Perinatal asphyxia resulting in hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is the cause of several pathologies in neonates, especially preterm ones, and more than one million of them die. In Europe, complications of prematurity are the cause of more than half of deaths in the first year of life, and there are still clinical manifestations in adulthood in those who survive².

Large animal models are an essential tool in the development of new rationale-based clinical therapies for preterm infants. The pig provides a relevant model for the study of premature human physiology and for the investigation of new therapies to improve outcomes⁹. The newborn piglet reaches a degree of maturity at birth similar to that of humans with regard to cardiovascular regulation. Therefore, this species has been considered an excellent subprimate's laboratory model for comparison studies with human infants¹⁰.

Although the newborn piglet is an accepted large animal model of perinatal asphyxia/HIE, there is no consensus on the methodology of inducing perinatal asphyxia to produce clinically relevant HIE¹¹.

Therefore, it is important to characterize what alterations are related to oxidative stress during hypoxia in the neonatal development of encephalopathy. This study intended to characterize oxidative stress in an experimental animal model compatible with the pathophysiological changes we see in neonates, in order to seek alternatives for the control of oxidative and neurological damage.

■ Methods

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), protocol no. 1,088/2019.

Ten newborn pigs, large white, healthy, of both sexes, aged 48 hours old and having 1,470 g (\pm 0.24) of average weight. They were removed from the mother three hours before the start of the experiment. Animals were transported from a commercial farm in a warm and quiet environment to minimize stress. Piglets were fed with breast milk, every three hours, purchased from the farm. Upon arrival at the laboratory, they were evaluated and had their physiological data (heart rate, respiratory rate, mean arterial pressure, temperature, and oximetry), weight, and group identification recorded in the protocol.

The animals were randomly distributed into two groups: hypoxia group (HG=6) and control group (CG=4). Blood collection was performed before and after hypoxia induction/simulation, for arterial blood gas analysis, blood count and biochemical tests. A quantity of whole blood was collected in a tube containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to carry out the blood test of the animals. Biochemical tests were performed on whole blood serum alanine transaminase (ALT, aminotransferase-AST, creatinine and urea).

The animals were euthanized after the experiment with the association of Thiopental (100 mg/kg) followed by potassium chloride (75 mg/kg), via intracardiac.

Experimental protocol for hypoxia induction

The animals were placed, in pairs, in glass chambers (33 × 40 × 30 cm) with hermetic closing performed by a lid/box seal with silicone adhesive in combination with oxygen supplementation, according to the model described by Paiva. Control of the concentration of oxygen inside the chamber was performed with the aid of a calibrated flowmeter (capacity 15 L/min) fed by a medical grade oxygen cylinder.

After monitoring the resting state, the inspired oxygen fraction was reduced from 0.3 to 0.1 by reducing the tidal volume of oxygen, and the box was closed in order to limit gas exchange with the external environment, inducing normocapnic hypoxia for 180 min. Then, the initial gas volume was reestablished to record the physiological data of the animals (post insult).

The control group was manipulated and evaluated simultaneously with the other animals, but it had oxygen administered continuously, thus preventing the accumulation of carbon dioxide (CO₂) and maintaining a constant desirable oxygen concentration (24%) to all

animals in the set time of 180 min. After exposure to oxygen, the animals were removed from the box, reassessed for physiological parameters, and a new blood collection was performed.

Sixty min after the end of the insult, the animals were euthanized, and the brain was removed for analysis of oxidative stress markers. During the entire procedure, the animals remained awake. Two animals required sedation with 1% acepromazine (0.03 mL i.m.) for containment during blood sample collection, in order to reduce stress.

Collection, preparation and analysis of brain tissue

The entire brain was collected after the animal's death was confirmed. A longitudinal section of the brain was performed, ensuring that all structures were included (brain, hypothalamus, cerebellum, and brainstem).

The samples were macerated in two Falcon tubes (one with trichloroacetic acid – 12% TCA; and the other without reagent) and stored in liquid nitrogen ($\cong 170^{\circ}\text{C}$). In the tube containing 12% TCA (tube 1), the brain samples were macerated and homogenized, thus obtaining a processed sample called acid extract, which was used to determine the content of reduced glutathione (GSH). The second brain sample (tube 2) was gradually thawed at temperature (ice and room temperature), macerated and homogenized in TRIS 300 mM HCl buffer, pH 7.4 (called lysis buffer). The content of this tissue homogenate was centrifuged at 3,000 g for 5 min, and the supernatant was used to perform the other oxidative stress markers (lipid peroxidation–TBARS, protein carbonyl–PC, myeloperoxidase–MPO, superoxide dismutase–SOD, and catalase–CAT). All oxidative stress markers were normalized through the quantification of total proteins in the samples, by the Bradford method, using an albumin standard curve. Assays were performed in duplicates.

Oxidative stress assessment

Enzyme activities were measured as described:

- Reduced glutathione (non-protein thiols): The content of reduced GSH was evaluated in the acid extract obtained from the brain through the determination of non-protein thiols (GSH represents $\cong 95\%$ of the total of these thiols). Twenty μL of 2.5 mM 2-nitrobenzoic acid (DTNB) was added in a 96-well plate containing 190 μL of 0.2 M potassium phosphate buffer pH 8 and 10 μL of the sample (brain acid extract). Subsequently, the plates were intermittently agitated, until the maximum formation of the yellow color thiolate anion (TNB) was obtained, measurable at 412 nm. Values measured in duplicate and expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein;

- Superoxide dismutase (SOD): SOD activity was measured spectrophotometrically at 480 nm through the oxidation of adrenaline (change from pH 2 to pH 10), which forms the superoxide anion and a pink chromophore, the adrenochrome, in which the enzyme presents in the sample delays its formation. Values were expressed in terms of enzyme activity, that is, an arbitrary unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to halve the rate of adrenochrome formation. Therefore, the samples homogenized in lysis buffer were added to 96-well plates, in ascending order of volume (5, 10, 20, 40 μL), and the volume was made up to 200 μL with 50 mM glycine buffer, pH 10. In sequence, 5 μL of 60 mM adrenaline (approximately pH 2 in ice and amber bottle) was added. The speed of adrenochrome formation was monitored, and then the sample aliquot was added (5 to 40 μL), totaling 8 min. The curves made it possible to indirectly assess the enzymatic activity of SOD. Values were expressed in USOD/mg protein;
- Catalase (CAT): Catalase activity (CAT) was analyzed at 240 nm, quantifying the decrease in the level of H_2O_2 (expressed in mmol/min/g) in a 10 mM H_2O_2 solution. For the determination of superoxide dismutase (SOD) activity, the oxidation of epinephrine (pH 2 – pH 10.2), which produces a superoxide anion and a pink chromophore (expressed in USOD/g), was quantified at 480 nm.

The content of reduced GSH was evaluated in the acid extract obtained from the brain through the determination of non-protein thiols (GSH represents $\cong 95\%$ of the total of these thiols), measurable at 412 nm.

Duplicate measured values were expressed in $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein.

Oxidative damage markers

- Lipid peroxidation (TBARS): The evaluation of lipid peroxidation in the brain was performed in duplicate, by detection at 535 nm of derivatives of their oxidation products, through substances that react with thiobarbituric acid (TBA)–TBARS, mainly MDA, producing a Schiff base of pink color. For this assay, in microtubes containing 500 μL of 12% TCA, 50 μL of the sample supernatant were added, homogenized in lysis buffer and centrifuged. Then, 450 μL of TRIS buffer (Tris HCl solution 7.4) were added and, finally, 500 μL of thiobarbituric acid (TBA) 0.73%. After vortex homogenization, incubation was carried out for 60 min at 100°C . Then, the material was cooled for 15 min at 4°C and centrifuged (5,000 g for 5 min).

The supernatant was used for reading, and the results were expressed in mmol.mg;

- Protein carbonyls (PC): Oxidative damage to proteins was determined by protein carbonylation by spectrophotometric measurement. For this analysis, centrifuge microtubes containing 600 µL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) were used, and 100 µL of the homogenized and centrifuged sample were added. Subsequently, it was incubated for 1 h (at room temperature, protected from light, under agitation). Then, 600 µL of 20% TCA was added, followed by stirring and refrigeration (ice bath) for 15 min and centrifuged for 5 min at 800 g. The pellet formed was washed 3 times, followed by centrifugation for 5 min at 800 g, using 800 µL of ethanol:ethyl acetate (1:1). After the last wash, the excess of ethanol:ethyl acetate was removed with the aid of a cotton swab, and 800 µL of guanidine were added and incubated for 60 min at 37°C and then reading at 360 nm. The carbonyl protein concentration was expressed in nmol.mg of protein.

Inflammatory marker

- Myeloperoxidase (MPO): Serum MPO activity was measured according to the method described by Rao et al.. First, samples were gradually thawed, and 20 µL were transferred to plates containing 180 µL of reaction medium (0.167 mg.mL⁻¹ o-dianisidine 2HCl, 0.0005% H₂O₂, distilled H₂O and 50 mM NaH₂PO₄). After 15 min of incubation at room temperature, the reaction was stopped with the addition of 30 µL of 1% sodium azide. After 10 min incubation at room temperature, optical density was measured at 450 nm in 96-well plates and compared to a standard curve of known MPO activities (0.7 to 140 mU.mL⁻¹). Results were expressed in mU.mg.

Statistical analysis

Student's t test for independent samples was applied for the statistical evaluation of all mean and standard deviation (SD) differences belonging to the control (CG) and hypoxia groups (HG), admitting the minimum significance level of p<0.05. To verify the use of the t test, the Shapiro-Wilk test was previously performed, checking the normality of the samples. Descriptive statistics were used to describe the basic characteristics of the data in terms of mean value (mean) and SD. Analyses were performed using the BioEstat 5.3 statistical program.

Results

The results of the physiological parameters, blood gases, and biochemical analysis of the animals according

to the time of analysis and the belonging group (HG or CG) are shown in Table 1.

Table 1 - Values listed as mean (± SD). Significant group differences: p values in bold. Results are presented as mean ± SD of the mean. Values in bold represent statistically significant differences (p<0.05). Comparison between hypoxia group and control group: Student's t test.

Physiological measurements	Hyposxia group	Control group	p-value
	(n=6)	(n=4)	
Body weight (kg)	1.47 (± 0.22)	1.46 (± 0.30)	0.9566
Sex (male:female)	4:2	1:3	
HR (bpm)			
Start	184.5 (± 57.74)	210 (± 39.64)	0.4552
End	130.17 (± 39.34)	200.25 (± 34.57)	0.0203
RR (mpm)			
Start	53.67 (± 34.89)	33 (± 7.57)	0.127
End	44.33 (± 18.40)	33 (± 6.73)	0.1506
Temperature (°C)			
Start	37.98 (± 1.55)	36.40 (± 1.23)	0.127
End	36.63 (± 0.62)	37.23 (± 0.51)	0.1506
Mean arterial blood pressure (mmHg)			
Start	103.67 (± 41.11)	127 (± 16.87)	0.2541
End	88.17 (± 27.21)	110.5 (± 31.86)	0.2939
Oximetry (%)			
Start	91.67 (± 5.82)	94.75 (± 2.75)	0.3582
End	77.33 (± 6.53)	95.50 (± 3.7)	0.0011
pO ₂ (mmHg)			
Start	37.82 (± 14.73)	33.85 (± 13.17)	0.6698
End	32.33 (± 11.53)	18.53 (± 3.18)	0.032
pCO ₂ (mmHg)			
Start	35.53 (± 4.69)	30.40 (± 1.80)	0.0458
End	32.50 (± 8.88)	35.23 (± 3.33)	0.5164
HCO ₃ (mmol/L)			
Start	22.22 (± 7.39)	20.20 (± 2.37)	0.5569
End	19.37 (± 6.58)	22.35 (± 0.45)	0.3186
pH			
Start	7.38 (± 0.14)	7.42 (± 0.04)	0.5373
End	7.38 (± 0.08)	7.41 (± 0.05)	0.4476

Continue...

Table 1 - Continuation.

Physiological measurements	Hypoxia group	Control group	p-value
	(n=6)	(n=4)	
Na (mmol/L)			
Start	147.88 (± 6.25)	145 (± 2.62)	0.3478
End	149.03 (± 4.92)	148.03 (± 2.58)	0.684
K (mmol/L)			
Start	2.94 (± 0.68)	3.10 (± 0.59)	0.7147
End	3.08 (± 0.48)	3.17 (± 0.36)	0.7672
iCA (mmol/L)			
Start	0.85 (± 0.18)	0.89 (± 0.15)	0.696
End	0.86 (± 0.21)	0.81 (± 0.07)	0.6538
Cl (mmol/L)			
Start	107.97 (± 4.10)	107.50 (± 1.64)	0.8093
End	112.97 (± 6.26)	107.98 (± 1.63)	0.2296
Glu (mg/dL)			
Start	85.22 (± 26.33)	85.50 (± 12.71)	0.9825
End	94.33(± 11)	76 (± 7.87)	0.0154
Lac (mmol/L)			
Start	7.71 (± 3.98)	5.70 (± 1.07)	0.2852
End	7.50 (± 5.11)	3.80 (± 0,18)	0.1366
ALT (U/L)			
Start	32.24 (± 5.94)	24 (± 6.39)	0.0945
End	30.48 (± 6.77)	23.73 (± 5.95)	0.1693
AST (U/L)			
Start	49.92 (± 10.23)	40.15 (± 24.85)	0.5016
End	50.02 (± 10.91)	29.15 (± 9.03)	0.0188
URE (mg/dL)			
Start	25.88 (± 15.58)	19.50 (± 7.26)	0.4477
End	29.17 (± 9.54)	22.20 (± 8.23)	0.2941
CRE (mg/dL)			
Start	0.54 (± 0.13)	0.43 (± 0.15)	0.2763
End	0.57 (± 0.05)	0.40 (± 0.07)	0.0151

SD: standard deviation; HR: heart rate; RR: respiratory rate; iCA: calcium; Glu: glucose; Lac: lactate; ALT:alanine transaminase; AST: aspartate aminotransferase; URE: urea; CRE: creatinine,

There was a significant difference in the oximetry and heart rate of the animal groups after the 180-min hypoxic insult. The measurement of AST and CRE also showed a significant difference after the experiment.

The results related to the analysis of oxidative stress, oxidative damage markers and inflammatory marker are presented in Table 2. There was no significant difference in the analyses ($p>0.05$).

Table 2 - Values listed as mean (± SD). Results are presented as mean ± SD on of the mean.

	Hypoxia group	Control group	p-value
GSH	0.3481 ±0.0730	0.4113 ± 0.0890	0.2520
SOD	17.1663 ±9.7926	12.8420 ±2.7412	0.4223
CAT	6.9616 ±2.5582	5.0995 ±0.8949	0.2058
PC	0.00013 ±0.00002	0.00016 ±0.00004	0.0944
TBARS	0.0108 ±0.0017	0.0095 ±0.0021	0.3057
MPO	79.4125 ±47.2810	120.6752 ±56.4665	0.2404

SD: standard deviation; GSH: glutathione; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; PC: protein carbonyl; TBARS: lipid peroxidation; MPO: myeloperoxidase.

■ Discussion

The results found in our study present an overview of cerebral oxidative stress developed in piglets as an animal model of neonatal hypoxia. Although the sample size is the minimum necessary (respecting the principle of 3Rs), biochemical measurements and clinical characteristics of the animal's impairment in face of the insult were observed. Similar to several related studies, rapid restoration of the piglet to hypoxic damage was observed. Schulz *et al.*¹⁰ report that, in experimental studies, work with "small samples" is common, especially in the case of newborns.

Changes in animals during the hypoxia period demonstrate clinical signs compatible with encephalopathy. In addition to the significant changes observed in heart rate and oximetry, changes in breathing, orientation, gait, reduced activity level and presence of pathological movements were also evidenced as described by other authors¹³.

Although a picture of metabolic acidosis in piglets is described to confirm the hypoxic lesion, several authors reiterate the tolerance to hypoxia in many animals^{4,5,9,13} and even report a brief recovery from the insult suffered^{4,5}. In our study, no significant difference was observed in the pH of the animals (HG=7.38±0.08 and CG=7.41±0.05 after 180 min).

An animal model of disease, with piglet as the EHI model, is technically challenging to develop, and even replicate. The literature describes several ways to promote the insult, and all emphasize the animal's resistance and short recovery to the condition, as well as the different factors that need to be taken into account when promoting hypoxia (hypoxia induction method, anesthesia, cord clamping umbilical, clamping of the carotid artery, and others).

Unlike adults and children after brain trauma, human newborns with neonatal encephalopathy are not routinely anesthetized. Depending on local practice, infants can be sedated during mechanical ventilation, and intensive care can receive anticonvulsant treatment if they develop clinical seizures^{4,10}. After birth, the extrauterine environment conditions the newborn to a series of adaptations to life, which can generate or develop problems with sequelae that are difficult to reverse, such as those related to physical, cognitive, learning, and behavioral development^{10,14}. Thus, our objective was to replicate the clinical routine and not anesthetize the animals, but promote mild sedation in order to provide well-being to the piglets during the experiment.

At physiological levels, oxidants play a beneficial role in the body in several vital functions, such as energy production and host defense. Excessive presence of oxidants (ROS) in relation to antioxidants is defined as oxidative stress that results in pathological changes in the body^{1,7}. Thus, it is interesting to determine the antioxidant status, in individuals under different pathological situations, such as our model of neonatal hypoxia, through different parameters such as: lipid peroxidation, SOD, GSH, among others⁸.

The excessive production of ROS has been implicated as the main mediators of perinatal brain damage, especially in preterm infants, as there is potentially an imbalance between the generation of oxidant substances and the interaction of the antioxidant defense system, and it is important to know the oxidative status to control the progression of the disorder. Biological membranes are sensitive to lipid peroxidation induced by ROS, and the increase in lipid peroxidation will lead to several deleterious effects. Oxidative stress followed by apoptosis has been considered a critical step in neonatal brain injury^{5,7,14}.

Compounds that can be modified by the action of free radicals, such as lipids and proteins, are also used as indirect measures of oxidative stress, as well as the enzymatic activities involved in cellular redox balance, such as SOD and CAT. Although GSH is not an enzyme, it acts in the conversion of superoxide radicals into peroxides^{1,15}. Other biomarkers, called oxidative damage products, can also be measured and the main one is MDA, formed at the end of lipoperoxidation processes⁷.

The brain is one of the main organs affected by hypoxia in the neonatal period and one of the most vulnerable to oxidative stress. Therefore, it leads to compromised neurogenesis, mitochondrial damage, and neuroinflammation. The brain also accumulates high levels of transition metals, such as iron and copper, being an important organ to demonstrate changes in the antioxidant balance².

To assess the effects of hypoxia on cerebral oxidative damage, we measured PC levels, a marker of ROS-induced

protein damage, and TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, especially malondialdehyde) a marker of lipid peroxidation. MPO is an enzyme present in neutrophils which is associated with the phagocytic process, acting as an important inflammatory marker in several pathologies¹⁵.

MPO has been reported as an important parameter in the early assessment of several pathological conditions. Inflammatory activation precedes the onset of a diagnosis-confirmed coronary disease, which could indicate MPO as an earlier marker for possible inflammatory vascular changes⁸. Works aimed at defining or helping to define reference intervals for MPO levels in health and disease conditions are very important, especially in patients with neurological disorders.

In the neonatal period, GSH is the most important endogenous non-enzymatic antioxidant. Several hypoxia and reoxygenation studies in mice have measured high levels of the GSH/oxidized glutathione (GSSG) ratio. GSH is one of the most abundant antioxidants in the body and important in the highly oxidative brain, as it protects the cell against reactive oxygen compounds, and a depletion of GSH will result in mitochondrial dysfunction^{2,16}. Our results show a reduction in GSH from the hypoxia group in relation to the control group, although there was no statistically significant difference (0.3481 ± 0.0730 HG *versus* 0.4113 ± 0.0890 CG).

It was analyzed in Down syndrome patients before and after antioxidant supplementation. Parisotto *et al.*¹⁷ found reduction in SOD and CAT levels even after six months of intervention therapy, not significantly changing their values¹⁷. In our results, although there is no significant difference between the hypoxia and control groups, we saw a higher expression of SOD and CAT in the hypoxia group, albeit mild, when compared to the control group of animals.

Thoresen *et al.*⁴ evaluated moderate hypothermia as a therapeutic strategy for a model of hypoxic ischemic encephalopathy in piglets and found no significant difference between the evaluated groups.

Huun *et al.*¹⁶ also did not find significant differences in the basal physiology of the groups before the hypoxic insult and portrayed the good pH recovery of the piglets hours after the damage, demonstrating their resistance and good recovery, while producing the desired damages of the animal model hypoxic disease. These blood gas parameters recovered and were not statistically different from sham-operated piglets 4 h after reoxygenation¹¹.

Liu *et al.*⁵ analyzed the oxidative stress of newborn piglets and after 48 h of recovery from hypoxia and reoxygenation. There was no difference in the GSH concentration in the piglet brain between the experimental groups. Although the group treated with N-acetylcysteine was greater than the control, the difference did not reach statistical significance⁵.

The mouse models whose mechanism and effect of hypoxia are studied are very diverse. A lot of variability was found, as well as different parameters such as the age of the mouse, the percentages of oxygen to which they are submitted to and the time they are exposed to different concentrations of oxygen. There are models that use an oxygen deprivation chamber, without a previous ischemic procedure, with a variation in oxygen concentration between 4 and 14% O₂. The exposure time is the object of study, also ranging from 4 min to 48 hours, describing mild lesions and avoiding non-physiological occlusion of the common carotid artery².

The most frequently used large animal models of perinatal asphyxia include partial or complete asphyxia at parturition, umbilical cord occlusion, hypoperfusion, and hypoxia in newborn piglets. The need for continuous research to establish the ideal model and find adjuvant neuroprotection therapy is highlighted¹⁸.

■ Conclusions

The present study contributes to the use of the piglet as an animal model of neonatal hypoxia and brain damage, although it did not show any significant difference compared to the analyzed control group, in the brain of newborn piglets. More studies are needed to improve the harm induction protocol, as well as the development of studies of different therapeutic options, as observed in several countries. As for the characterization of oxidative stress, early diagnosis increases the chances of treatment success, but continuous research on new biomarkers, as well as their status, is necessary, whether under normal or pathological conditions developed in experimental disease models.

■ Author's contribution

Scientific and intellectual content of the study: Bochenek LMS; **Analysis and interpretation of data:** Parisotto EB; **Technical procedures:** Salomão EA and Maldonado MJM; **Manuscript preparation:** Bochenek LMS; **Manuscript writing:** Bochenek LMS; **Critical revision:** Silva IS; **Final approval of the version to be published:** Silva IS.

■ Data availability statement

Data will be available upon request.

■ Funding

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

[<https://doi.org/10.13039/501100002322>]

Grant nº XXXX

Financiadora de Estudos e Projetos

[<https://doi.org/10.13039/501100004809>]

Grant no. xxxx

■ Acknowledgments

To the team at the Laboratory of Hematology at the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition at UFMS for their oxidative stress analysis.

■ References

1. Paiva LA, Silva IS, Souza AS, Cassino PC. Pulmonary oxidative stress in diabetic rats exposed to hyperoxia. *Acta Bras Cir.* 2017;32(7):503-14. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020170070000001>
2. Torres-Cuevas I, Corral-Debrinski M, Gressens P. Brain oxidative damage in murine models of neonatal hypoxia/ischemia and reoxygenation. *Free Radic Biol Med.* 2019;142:3-15. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.011>
3. Li P, Stetler RA, Leak RK, Shi Y, Li Y, Yu W, Bennett MVL, Chen J. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology.* 2018;134(Pt B):208-17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.011>
4. Thoresen M, Satas S, Løberg EM, Whitelaw A, Acolet D, Lindgren C, Penrice J, Robertson N, Haug E, Steen PA. Twenty-four hours of mild hypothermia in unsedated newborn pigs starting after a severe global hypoxic-ischemic insult is not neuroprotective. *Pediatr Res.* 2001;50(3):405-11. <https://doi.org/10.1203/00006450-200109000-00017>
5. Liu JQ, Lee TF, Chen C, Bagim DL, Cheung PY. N-acetylcysteine improves hemodynamics and reduces oxidative stress in the brains of newborn piglets with hypoxia-reoxygenation injury. *J Neurotrauma.* 2010;27(10):1865-73. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1325>
6. Zhao M, Zhu P, Fujino M, Zhuang J, Guo H, Sheikh I, Zhao L, Li XK. Oxidative stress in hypoxic-ischemic encephalopathy: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):2078. <https://doi.org/10.3390/ijms17122078>
7. Campos MTG, Leme FOP. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. *Pubvet.* 2018;12(01):1-8. <https://doi.org/10.22256>
8. Velloso JCR, Parabocz GC, Manente FA, Ribas JT, Lima LW. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2013;34(3):305-12.
9. Eiby YA, Wright LL, Kalanjati VP, Miller SM, Bjorkman ST, Keates HL, Lumbers ER, Colditz PB, Lingwood BE. A pig model of the preterm neonate: anthropometric and physiological characteristics. *PLoS One.* 2013;8(7):e68763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068763>

10. Schulz S, Reulecke S, Eiselt M, Schwab K, Witte H, Walter B, Bauer R, Voss A. Quantification of compensatory processes of postnatal hypoxia in newborn piglets applying short-term nonlinear dynamics analysis. *Biomed Eng Online*. 2011;10:88. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-10-88>
11. Nemeth J, Toth-Szuki V, Varga V, Kovacs V, Remzso G, Domoki F. Molecular hydrogen affords neuroprotection in a translational piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Physiol Pharmacol*. 2016;67(5):677-89.
12. Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*. 1993;17(6):723-41. <https://doi.org/10.1007/BF00920477>
13. Kyng KJ, Skajaa T, Kerrn-Jespersen S, Andreassen CS, Bennedsgaard K, Henriksen TB. A piglet model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Vis Exp*. 2015;(99):e52454. <https://doi.org/10.3791/52454>
14. Maia FES, Paiva MBM, Clemente CJE. Suporte ventilatório e o estresse oxidativo em prematuro. *Rev Aten Saúde*. 2016;14(50):105-10. <https://doi.org/10.13037/rbcs.vol14n50.3861>
15. Parisotto EB, Vidal V, García-Cerro S, Lantigua S, Wilhelm Filho D, Sanchez-Barceló EJ, Martínez-Cué C, Rueda N. Chronic melatonin administration reduced oxidative damage and cellular senescence in the hippocampus of a mouse model of Down syndrome. *Neurochem Res*. 2016;41(11):2904-13. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2008-8>
16. Huun MU, Garberg H, Løberg EM, Escobar J, Martinez-Orgado J, Saugstad OD, Solberg R. DHA and therapeutic hypothermia in a short-term follow-up piglet model of hypoxia-ischemia: effects on H+MRS biomarkers. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201895>
17. Parisotto EB, Giaretta AG, Zamoner A, Moreira EA, Fröde TS, Pedrosa RC, Filho DW. Persistence of the benefit of an antioxidant therapy in children and teenagers with Down syndrome. *Res Dev Disabil*. 2015;45-46:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2015.07.010>
18. Koehler RC, Yang ZJ, Lee JK, Martin LJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury in large animal models: Relevance to human neonatal encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(12):2092-111. <https://doi.org/10.1177/0271678X18797328>