

**U**

**LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

**TRABALHO FINAL**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Pediatria

**Novas Terapêuticas Neuroprotetoras  
Adjuvantes da Hipotermia no Tratamento da  
Encefalopatia Hipoxico-Isquémica do Recém-  
Nascido**

Ana Sofia Rodrigues da Silva

---

**Maio 2017**



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

**TRABALHO FINAL**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Pediatria

**Novas Terapêuticas Neuroprotetoras  
Adjuvantes da Hipotermia no Tratamento da  
Encefalopatia Hipoxico-Isquémica do Recém-  
Nascido**

Ana Sofia Rodrigues da Silva

**Orientado por:**

Dra. Paula Costa

---

**Mai**o 2017

## RESUMO

A encefalopatia hipoxico-isquêmica é uma das principais causas de mortalidade e morbidade no recém-nascido.

A hipotermia induzida é, atualmente, a única terapia com benefícios reconhecidos no tratamento da encefalopatia hipoxico-isquêmica. Não obstante, um número considerável de recém-nascidos fica com sequelas permanentes.

O conhecimento sobre a fisiopatologia e a evolução da lesão cerebral hipoxico-isquêmica tornaram possível a investigação de novas estratégias terapêuticas. As investigações atuais estão a clarificar o benefício da associação da hipotermia induzida com outras terapêuticas neuroprotetoras, sendo evidente a melhoria dos resultados clínicos.

Este trabalho centra-se nas terapêuticas neuroprotetoras adjuvantes da hipotermia, atualmente em estudo, como a eritropoietina, a melatonina, o resveratrol, o canabidiol, o sulfato de magnésio, o ácido docosahexanóico, o topiramato, o xénon, o fenobarbital, o alopurinol, a N-acetilcisteína, a 2-iminobiotina, as células estaminais e o pós-condicionamento isquêmico remoto.

A utilização de novas terapêuticas, com atuação específica nos diferentes mecanismos de progressão do processo neurodegenerativo, e a sua combinação com a hipotermia, demonstrou ter resultados promissores, com prognósticos neurológicos mais favoráveis, em comparação com a hipotermia isoladamente.

Serão necessários mais estudos pré-clínicos e clínicos para um conhecimento rigoroso da farmacocinética e farmacodinâmica das novas terapêuticas, a fim de se obter o melhor efeito clínico, com o menor efeito deletério no neurodesenvolvimento normal.

No futuro, com a utilização da hipotermia em combinação com as várias terapêuticas neuroprotetoras, perspectiva-se um melhor prognóstico para o recém-nascido com encefalopatia hipoxico-isquêmica, apesar de haver ainda um longo caminho de investigação a percorrer.

*O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML.*

## ABSTRACT

Hypoxic-ischemic encephalopathy is a major cause of mortality and morbidity in the newborn.

Induced hypothermia is currently the only therapy with recognized benefits in the treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy. Nonetheless, a considerable number of newborns are left with permanent sequelae.

Knowledge about the pathophysiology and evolution of hypoxic-ischemic brain injury has made it possible to investigate new therapeutic strategies. Current investigations are clarifying the benefit of the association of induced hypothermia with other neuroprotective therapies, with evident improvements in clinical outcome.

This work focuses on hypothermic adjuvant neuroprotection therapies currently under study, such as erythropoietin, melatonin, resveratrol, cannabidiol, magnesium sulfate, docosahexaenoic acid, topiramate, xenon, phenobarbital, allopurinol, N-acetylcysteine, 2-iminobiotin, stem cells and remote ischemic postconditioning.

The use of new therapies with a specific role in the different progression mechanisms of the neurodegenerative process, and its combination with hypothermia, has shown promising results, with more favorable neurological prognoses compared with hypothermia alone.

Further preclinical and clinical studies will be required for a thorough understanding of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new therapies in order to obtain the best clinical outcome with the least deleterious effect on normal neurodevelopment.

In the future, the use of hypothermia in combination with the various neuroprotective therapies, will allow a better prognosis for the newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy, although much remains to be elucidated.

*The final work expresses the opinion of the author and not of the FML.*

## ÍNDICE

1. Introdução.....	9
2. Encefalopatia hipoxico-isquêmica.....	10
3. Terapêuticas neuroprotetoras.....	14
3.1. Eritropoietina.....	16
3.2. Melatonina.....	21
3.3. Resveratrol.....	24
3.4. Canabinóides e sistema endocanabinóides.....	25
3.5. Sulfato de magnésio.....	27
3.6. Ácido docosahexanóico.....	28
3.7. Topiramato.....	31
3.8. Xénon.....	33
3.9. Fenobarbital.....	34
3.10. Alopurinol.....	35
3.11. N-acetilcisteína.....	36
3.12. 2-Iminobiotina.....	38
3.13. Outras terapêuticas.....	39
3.13.1. Células estaminais.....	39
3.13.2. Pós-condicionamento isquémico remoto.....	40
4. Conclusão.....	43
5. Bibliografia.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fases patológicas da lesão cerebral após uma lesão HI.....	13
Figura 2 - Alvos terapêuticos e substâncias neuroprotetoras na EHI.....	16

## SIGLAS

HI - hipoxico-isquémica(o) / hipoxia-isquémia

EHI - encefalopatia hipoxico-isquémica

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - sódio/potássio

ATP - adenosina trifosfato

NMDA - N-metil-D-aspartato

Ca<sup>2+</sup> - cálcio

AMPA - ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

Pi - fosfato inorgânico

PCr - fosfocreatina

NTP - nucleótido trifosfato

EPP - pool de fosfato permutável

NAA - N-acetilaspártato

AAE - aminoácidos excitatórios

PCIR - pós-condicionamento isquémico remoto

RN - recém-nascido(s)

EEG - eletroencefalograma

AVC - acidente vascular cerebral

EPO - eritropoietina

Jak2 - Janus cinase 2

STAT5 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 5

Akt - fator nuclear kappa B

PI3K - fosfatidilinositol 3 cinase

ERK - cinase regulada por sinal extracelular

SNC - sistema nervoso central

CBD - canabidiol

5HT<sub>1A</sub> - 5-hidroxitriptamina tipo 1A

NF-kB - fator nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

TPM - topiramato

NAC - N-Acetilcisteína

iNOS - inducible nitric oxide synthase

DHA - ácido docosahexanóico

2-IB - 2-iminobiotina

MgSO<sub>4</sub> - sulfato de magnésio

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

SIRS - síndrome de resposta inflamatória sistémica



## 1. INTRODUÇÃO

Os eventos de hipoxia-isquemia intraparto são a terceira causa mais importante de mortalidade e morbidade em recém-nascidos, apesar do progresso dos cuidados na área da obstetrícia e da neonatologia, verificados nos últimos anos.<sup>1</sup>

A nível mundial, estima-se que, a cada ano, morram cerca de 0.7 milhões de recém-nascidos e 1.15 milhões desenvolvam sequelas decorrentes da encefalopatia hipoxico-isquêmica.<sup>1</sup>

Em países desenvolvidos, estima-se que a EHI ocorra em 26 RN por cada 1000 nascimentos. A mortalidade estimada é significativa, cerca de 24%, e nos RN sobreviventes são frequentes sequelas a longo prazo, como epilepsia, paralisia cerebral (10-20%), déficit visual e auditivo (cerca de 40%), atraso global do desenvolvimento, perturbação de déficit de atenção e hiperatividade e perturbação do espectro do autismo.<sup>2,3</sup>

A hipotermia terapêutica é o tratamento de eleição na EHI<sup>4</sup>, contudo, a hipotermia terapêutica é apenas parcialmente efetiva e estima-se que aproximadamente 40-50% dos recém-nascidos com EHI, tratados com hipotermia, morrerão ou terão uma incapacidade grave.<sup>5</sup> É reconhecido que o benefício da hipotermia é limitado em bebés com encefalopatia muito grave ou no contexto de infeção.<sup>4</sup>

Considerando o impacto pessoal, familiar, económico e social da EHI, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de estratégias terapêuticas neuroprotetoras, seguras e eficazes,<sup>2,4</sup> como terapias adjuvantes da hipotermia terapêutica.

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo primordial, rever as promissoras terapêuticas neuroprotetoras adjuvantes da hipotermia, que constituam oportunidades terapêuticas no tratamento da EHI do recém-nascido.

## 2. ENCEFALOPATIA HIPOXICO-ISQUÊMICA

A encefalopatia hipoxico-isquêmica neonatal consiste numa disfunção neurológica no recém-nascido, manifestada por um conjunto de sintomas que incluem dificuldade com a iniciação ou manutenção da respiração, depressão do tónus e reflexos, alteração do estado de consciência, dificuldade na alimentação e convulsões.<sup>4</sup>

Os sinais clínicos da EHI evoluem, após um período latente, de horas a dias. Este tempo de evolução poderá refletir os níveis de energia no cérebro e a cascata de processos neuroquímicos responsáveis pela lesão cerebral.<sup>4</sup>

A fisiopatologia da lesão cerebral HI engloba as fases primária, latente, secundária e terciária.<sup>4</sup>

### **Fase primária (lesão HI aguda)**

Durante a lesão HI, algumas células sofrem morte celular primária, cuja magnitude depende da gravidade e duração da HI. Na ausência de substratos (glicose, oxigénio), o fornecimento de metabolitos de alta energia, como o ATP, aos neurónios, diminui abaixo de um limiar crítico.<sup>4</sup>

A bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependente de ATP entra em falência, ocorrendo despolarização neuronal e impregnação da fenda sináptica com glutamato, com consequente ativação dos recetores de NMDA e AMPA, e subsequente aumento do cálcio intracitoplasmático. O  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático pode elevar-se, também, secundariamente à ativação de canais transportadores ou através da libertação de depósitos internos, devido a lesão da mitocôndria e do reticulo endoplasmático.<sup>4</sup>

A libertação de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadeia uma cascata de eventos neurotóxicos subsequentes. O excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  promove, por um lado, um gradiente osmótico que conduz a edema e lise celular e, por outro, a ativação da óxido nítrico sintase, que gera níveis elevados de espécies reativas de oxigénio tóxicas, como o óxido nítrico. Em altas concentrações, o óxido nítrico reage com o superóxido para produzir peroxinitrito, que danifica a mitocôndria via peroxidação e nitrosilação de lípidos da membrana. Consequentemente, surge disfunção mitocondrial relacionada com a libertação de superóxido e com o declínio dos antioxidantes endógenos, como a glutathiona.<sup>4</sup>

O cálcio também despoleta a ativação de fosfolipases citosólicas, as quais incrementam a libertação de eicosanóides, conduzindo à inflamação, que tem um papel importante na EHI.<sup>4</sup>

### **Fase latente**

Após a reperfusão, o edema citotóxico induzido pela hipóxia e acumulação de aminoácidos excitatórios, resolve parcialmente em 30-60 minutos, com aparente recuperação do metabolismo oxidativo cerebral.<sup>6</sup>

Pensa-se que a cascata neurotóxica seja inibida durante a fase latente, onde existe uma inibição endógena do metabolismo oxidativo e aumento da oxigenação tecidual. Acredita-se que este período consista numa importante janela terapêutica.<sup>6</sup>

O conhecimento sobre o metabolismo cerebral após HI tem demonstrado que a duração da fase latente está inversamente relacionada com a gravidade da lesão.<sup>7</sup>

### **Fase secundária (falência energética secundária)**

Estudos pré-clínicos e em RN demonstraram uma deterioração do metabolismo oxidativo cerebral 6-24h após a HI, designada por falência energética secundária. Não obstante a oxigenação e circulação adequadas, há uma diminuição da PCr e do NTP (maioritariamente ATP) e um aumento do Pi. A diminuição cerebral da razão PCr/Pi, a razão NTP/totalidade fosfatos disponíveis, o aumento dos lactatos cerebrais e um pH intracelular alcalino, nos primeiros dias após a HI, estão associados a compromisso do neurodesenvolvimento e a aumento da mortalidade.<sup>4</sup>

A fase secundária caracteriza-se pelo início das convulsões, edema citotóxico secundário, acumulação de citocinas e falência mitocondrial. A falência mitocondrial é um passo-chave que conduz a morte celular.<sup>4</sup>

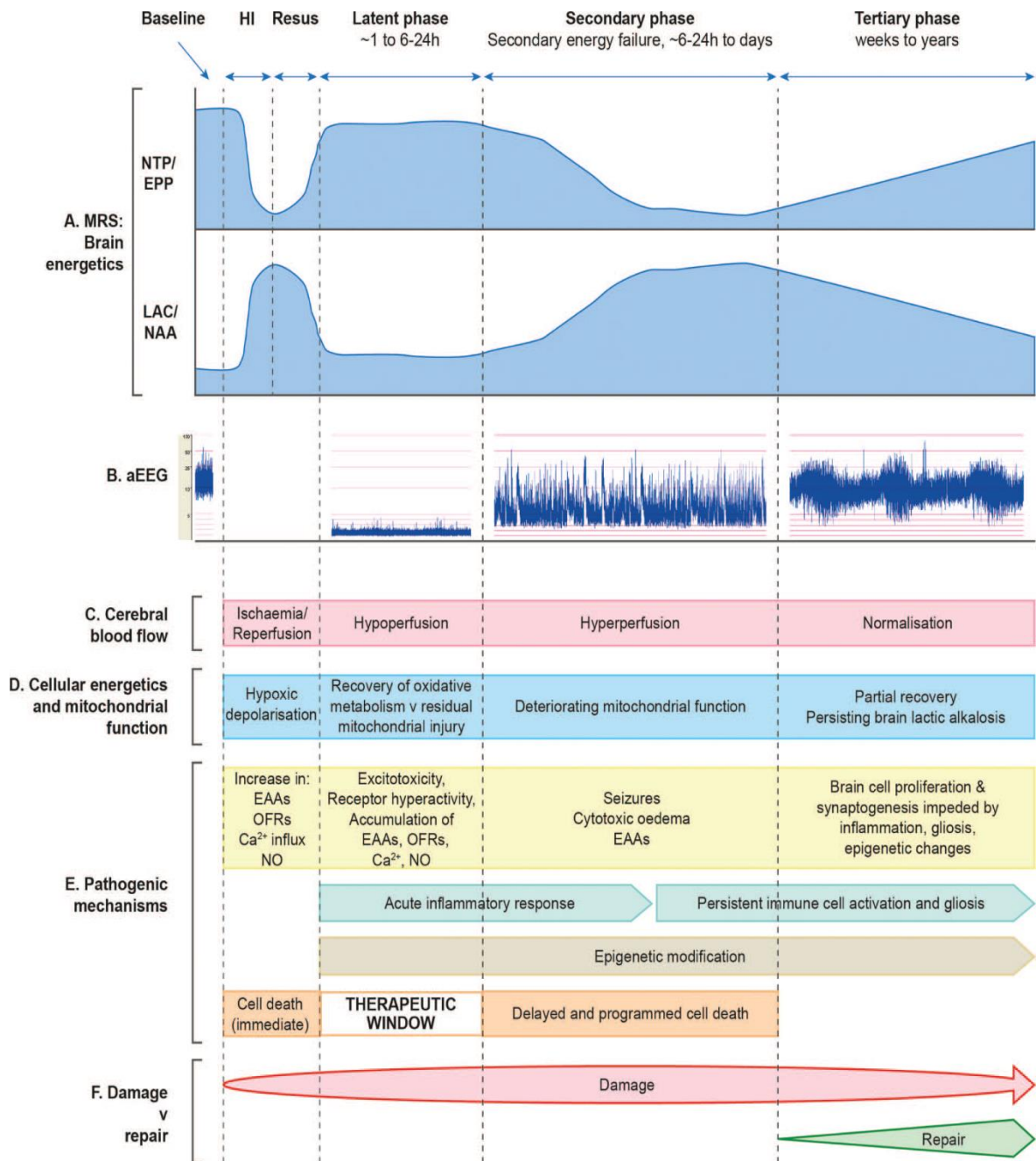
### **Fase terciária**

Existe evidência de que ocorrem processos patológicos ativos durante semanas, meses e anos após uma lesão HI, denominados de fase terciária.<sup>8</sup> Estes processos deletérios estão associados a uma alcalose láctica cerebral persistente, durante o primeiro ano após o nascimento e envolvem mecanismos de gliose, ativação da cascata inflamatória e

alterações epigenéticas, sendo mais proeminentes em crianças com prognóstico neurológico adverso.<sup>4</sup>

A figura 1 ilustra as diferentes fases patológicas da lesão cerebral após uma lesão HI. Em A, a ressonância magnética por espectroscopia mostra o padrão bifásico do declínio de NTP/EPP e do aumento do lactato/NAA, nas fases primária e secundária, sendo observada uma alcalose láctica na terceira fase. Em B, o EEG de amplitude integrada mostra um traçado normal na linha de base, um padrão deprimido após a HI, um padrão de surto-supressão na fase latente, o aparecimento de convulsões na fase secundária e a normalização com ciclo de sono-vigília na terceira fase. Em C, observa-se um período de hipoperfusão associado a hipometabolismo durante a fase latente, seguido de uma hiperperfusão relativa na fase secundária. Em D, a função energética celular e a função mitocondrial estão refletidas na resposta bifásica demonstrada pela ressonância magnética, com um período de recuperação na fase latente seguido de deterioração na fase secundária. Há uma recuperação parcial na fase terciária. Em E, estão demonstradas as mais importantes alterações patogénicas em cada fase, incluindo a geração de espécies tóxicas de radicais livres, acumulação de AAE, edema citotóxico, convulsões e inflamação. A lise celular ocorre imediatamente após a HI, enquanto a morte celular programada ocorre na fase secundária. A fase latente proporciona uma boa janela terapêutica. A inflamação persistente e as alterações epigenéticas são impeditivas de uma recuperação cerebral total a longo termo. Em (F), a lesão é máxima na fase secundária, mas persiste até à fase terciária, com o desenvolvimento de inflamação e gliose.<sup>4</sup>

Figura 1 - Fases patológicas da lesão cerebral após uma lesão HI.



Adaptado de: Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada, et al. *New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection.* 2015

### 3. TERAPÊUTICAS NEUROPROTETORAS

A lesão cerebral e o compromisso funcional a longo prazo após a EHI, são o resultado do equilíbrio entre os mecanismos nocivos (morte celular, inflamação persistente) e a proteção endógena (resposta aguda, reparação, recuperação). Por conseguinte, o tratamento ideal deverá ter subjacente a investigação de múltiplas vertentes, que previnam a morte das células cerebrais e promovam a reparação celular.<sup>9</sup>

Parte da investigação sobre neuroprotecção neonatal tem incidido nos mecanismos citotóxicos imediatos; contudo, o cérebro desencadeia uma forte resposta protetora contra muitos dos mecanismos deletérios da lesão. As terapias que promovam a resposta neuroprotetora endógena são particularmente promissoras, pois têm menos probabilidade de perturbar a neurotransmissão fisiológica, sendo mais eficazes e com menos efeitos colaterais indesejados.<sup>4</sup>

Atualmente, o tratamento de eleição para a EHI moderada a grave é a hipotermia terapêutica.<sup>10</sup>

Os mecanismos inerentes à neuroprotecção da hipotermia têm subjacente a diminuição da taxa metabólica, em paralelo com a diminuição do consumo de oxigénio e da produção de CO<sub>2</sub>, a diminuição da perda de fosfatos de alta energia durante a HI e da falência energética cerebral secundária, a redução excitotóxica, a redução da produção de espécies reativas de oxigénio, a preservação da síntese proteica, a diminuição do edema, a modulação da cascata inflamatória e a alteração da sinalização pró-apoptótica e anti-apoptótica.<sup>5,11,12</sup>

As recomendações clínicas apontam para que se inicie a hipotermia até às 6 horas de vida, em RN com mais de 36 semanas, com EHI moderada a grave, por um período de arrefecimento de 72 horas.<sup>13</sup>

A hipotermia está associada à diminuição das convulsões e da lesão cerebral, com melhoria dos marcadores da microestrutura e do metabolismo cerebral.<sup>13</sup> Numa meta-análise de 11 ensaios clínicos que envolveu 1505 recém-nascidos com idade gestacional superior a 35 semanas, Jacobs *et al* destacaram que existe a evidência clara que a hipotermia está associada a uma redução em 25% da mortalidade e de alterações do neurodesenvolvimento aos 18 meses,<sup>5</sup> sendo que os benefícios neurocognitivos são sustentados durante a infância e até aos 7 anos.<sup>14,15,16</sup> Edwards *et al* afirmam que a

hipotermia oferece apenas uma redução de 11% no risco de morte ou incapacidade, de 58% para 47%.<sup>17</sup>

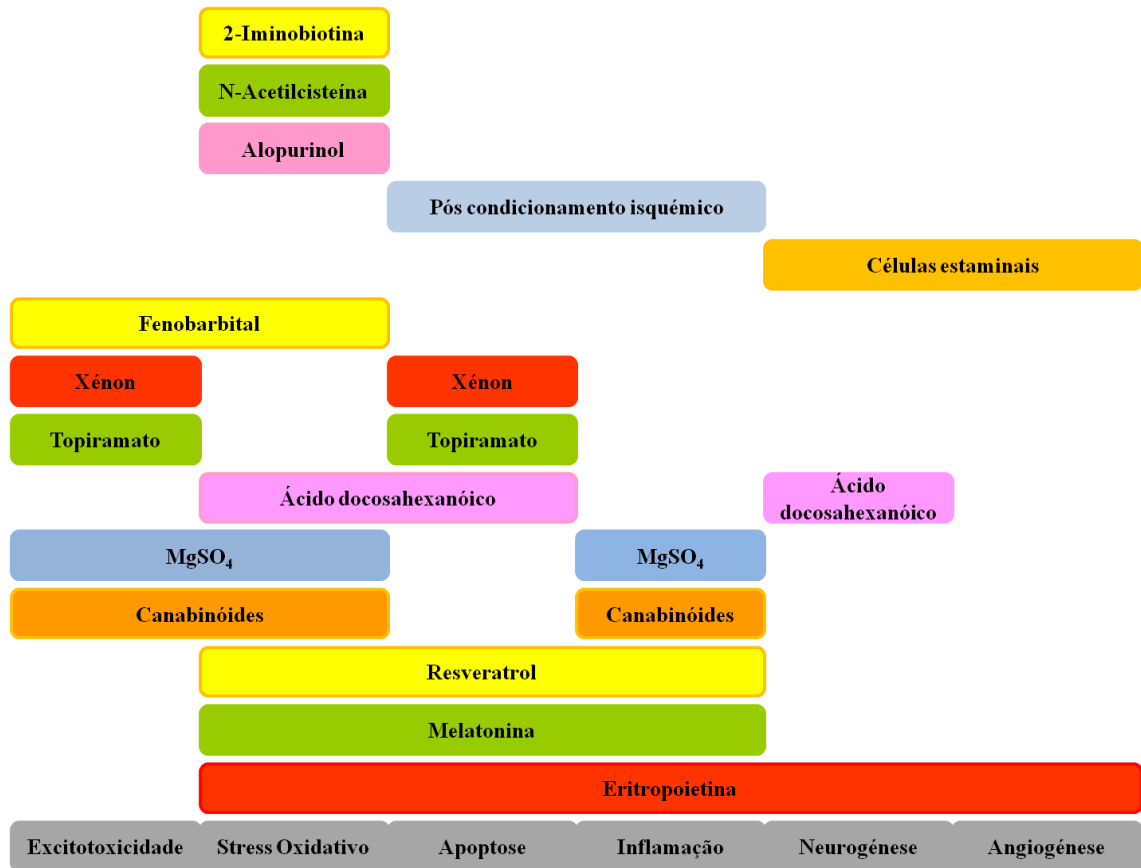
Estudos demonstraram que a hipotermia terapêutica é ineficaz e até prejudicial na presença de infecção e/ou inflamação.<sup>18</sup> Está demonstrado que a hipotermia tem efeito na modulação da resposta imunitária periférica, diminuindo o número de neutrófilos e linfócitos.<sup>19</sup> É possível, portanto, que a supressão do sistema imunitário pela hipotermia, tenha uma influência negativa em situações de lesão cerebral sensibilizada pela infecção.<sup>20</sup>

Embora os resultados no neurodesenvolvimento após a EHI tenham melhorado desde o advento da hipotermia terapêutica, a incapacidade e a alteração das funções executivas permanecem comuns, salientando a necessidade urgente de estratégias neuroprotetoras adicionais, entre elas a otimização da hipotermia terapêutica.<sup>13</sup>

Existem várias terapêuticas neuroprotetoras em investigação, grande parte como adjuvantes da hipotermia induzida. Este trabalho pretende abordar as substâncias neuroprotetoras atualmente em estudo, como a EPO, a melatonina, os canabinóides, o ácido docosahexanóico, o resveratrol, o sulfato de magnésio, o topiramato, o fenobarbital, o xénon, o alopurinol, a N- acetilcisteína, a 2-Iminobiotina, as células estaminais e o pós-condicionamento isquémico remoto. Estas terapêuticas atuam nas várias fases e mecanismos fisiopatológicos da EHI e poderão ser muito promissoras como terapêuticas adjuvantes da hipotermia induzida no tratamento da EHI.

A figura 2 pretende resumir os potenciais alvos terapêuticos na EHI, como a excitotoxicidade, o stress oxidativo, a apoptose, a inflamação, a angiogénese e a neurogénese, bem com as moléculas que atuam nesses alvos terapêuticos.

Figura 2 – Alvos terapêuticos e substâncias neuroprotetoras na EHI.



### 3.1. Eritropoietina

A EPO é uma citocina pleiotrópica que tem múltiplas funções, para além da sua função principal como fator de crescimento hematopoiético. O papel da EPO no desenvolvimento cerebral normal e na neuroprotecção tem vindo a tornar-se evidente.

Os recetores da EPO estão localizados por todo o sistema nervoso central nos neurónios, glia e células endoteliais, participando na proliferação e diferenciação destas células. A EPO é expressa no cérebro, principalmente pelos astrócitos.<sup>21</sup>

A EPO e os seus recetores são sobrerregulados após uma lesão cerebral HI.<sup>22</sup> RN com EHI e sem tratamento exógeno com EPO, demonstraram níveis significativamente elevados de EPO no líquido.<sup>23</sup> Está provado que, após uma lesão HI, a ausência de EPO endógena e seus recetores, potencia a lesão isquémica e prejudica a sobrevivência



neuronal<sup>4</sup>. Este facto torna evidente que a EPO é uma componente chave na resposta de condicionamento endógeno a eventos nocivos, incluindo a isquémia. O condicionamento endógeno ocorre quando a EPO é expressa após uma breve situação de hipóxia, contribuindo para a redução da lesão após um segundo episódio de HI. Este efeito pode ser replicado pelo tratamento com EPO exógena antes da HI.<sup>22</sup>

Estudos clínicos e pré-clínicos têm aproveitado o potencial condicionante e regenerativo da EPO, o qual está a emergir como um neuroprotetor promissor, que promove a reparação e recuperação na fase terciária da EHI.<sup>22</sup>

Os seus benefícios são precoces, com efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios,<sup>21</sup> neurotróficos e antioxidantes,<sup>24</sup> e tardios, como fator de crescimento promotor da neurogénese, oligodendrogénese e angiogénese.<sup>21,22</sup>

O mecanismo celular através do qual a EPO exerce a neuroprotecção é complexo e, ainda, não totalmente compreendido.<sup>23</sup> A ação da EPO inicia-se com o estabelecimento da hipóxia e libertação de citocinas pró-inflamatórias que ativam o fator induzido pela hipoxia, o qual, por sua vez, ativa a expressão da EPO e do recetor da EPO.<sup>25</sup> A ligação da EPO ao seu recetor desencadeia várias vias de sinalização intracelular diferentes, relacionadas com a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular<sup>26</sup>, entre as quais a da Jak2, a do STAT5, a do Akt e do PI3K, e da ERK.<sup>23,27</sup> A Akt limita a inflamação e diminuição da morte celular por apoptose e a STAT5 atua ao nível da sobrevivência celular. A via da ERK tem efeitos anti-apoptóticos e anti-inflamatórios, além do papel fundamental na neurogénese e recuperação celular.<sup>23</sup>

A EPO tem também ação sobre a neurogénese, a oligodendrogénese e a angiogénese, as quais estão sobrerreguladas após a lesão cerebral. Adicionalmente, a EPO aumenta a migração neuronal e glial em redor da área lesada, através da secreção de uma matriz de metaloproteinases.<sup>28</sup> Um estudo em animais demonstrou que a expressão do recetor da EPO pode aumentar a angiogénese, reduzir a lesão da substância branca e promover a recuperação cognitiva através da via de sinalização VEGF/VEGFR2 em ratos com anóxia.<sup>21</sup>

Estudos pré-clínicos sobre a ação neuroprotetora da EPO tiveram resultados robustos quanto ao benefício histológico e funcional.<sup>29</sup> Em roedores com EHI, a EPO promoveu a recuperação sensório-motora, melhorou o desempenho cognitivo e comportamental e

contribuiu para a preservação da integridade do tecido cerebral.<sup>27</sup> Outros estudos no modelo animal sustentam os efeitos neuroprotetores do tratamento com EPO.<sup>26,30</sup>

Em animais de termo e pré-termo com HI perinatal, o tratamento com EPO resultou na diminuição da perda de volume cerebral, melhoria cognitiva e motora<sup>28,31</sup> e aumento da neuroprotecção conferida pela hipotermia.<sup>32</sup> Traudt *et al.*, realizaram um estudo em primatas para avaliar o efeito neuroprotetor da terapêutica combinada da hipotermia com a EPO e verificaram que a taxa de mortalidade e o desenvolvimento de paralisia cerebral nos animais tratados com hipotermia e EPO, foram significativamente mais baixas, comparando com o grupo tratado apenas com hipotermia ou o grupo tratado com solução salina. Adicionalmente, os animais tratados com hipotermia e EPO tiveram melhores respostas motoras e cognitivas a longo prazo.<sup>33</sup> No entanto, Fan *et al*, mostraram que, no modelo animal com lesão HI, a hipotermia terapêutica isolada teve um efeito neuroprotetor importante, mais significativo no sexo feminino que no sexo masculino, com melhoria da histologia do volume da lesão cerebral e da lesão da substância branca. A terapia com EPO isolada melhorou as funções sensório-motoras, mas não causou melhoria do ponto de vista histopatológico. Houve um ligeiro efeito aditivo da EPO quando combinado com hipotermia.<sup>34</sup>

Num estudo que incluiu 167 RN com lesão hipóxico-isquémica, Zhu *et al* mostraram que, comparativamente ao grupo controlo, a taxa de mortalidade foi menor e os resultados do neurodesenvolvimento foram melhores aos 18 meses, em RN que receberam tratamento com EPO, na dose de 300-500 U/kg.<sup>35</sup> Elmahdy *et al* investigaram o efeito da terapia com EPO (2500 U/kg, a primeira dose administrada dentro das 24 horas após o parto), em 30 RN com HI e concluiu que a administração de eritropoietina a RN com EHI leve a moderada foi associada a uma diminuição favorável na produção de NO endógeno, diminuição da atividade convulsiva e melhoria dos resultados do neurodesenvolvimento aos 6 meses de idade.<sup>36</sup> Num ensaio clínico de fase I em RN com EHI moderada a grave, Wu *et al* demonstraram que a administração intravenosa de 1000 U/Kg de EPO, em 6 doses, a cada 48 horas, produziu ótimas concentrações plasmáticas neuroprotetoras de EPO, durante a hipotermia.<sup>37</sup> No seguimento ambulatorio de 22 dessas crianças, documentou-se aos 22 meses que uma criança de 2 anos de idade tinha incapacidade moderada a grave, duas tinham atraso da linguagem, uma tinha epilepsia e uma tinha hemiplegia ligeira.<sup>38</sup> O mesmo grupo completou, recentemente, um ensaio clínico de fase II sobre a terapêutica com hipotermia e EPO em 50 RN com EHI moderada a grave, e demonstrou que os RN

tratados com EPO apresentavam imagens de ressonância magnética com menor lesão cerebral global, bem como uma melhor função motora no primeiro ano de vida.<sup>39</sup>

A EPO pode ser administrada por via subcutânea ou intravenosa.<sup>27</sup> A sua farmacocinética foi estudada usando doses desde 250 U/Kg até 2500U/Kg.<sup>40</sup> A passagem através da barreira hematoencefálica é limitada e, em circunstâncias normais, apenas 1 a 2% atravessa por difusão passiva, pelo que doses baixas de EPO (250 U/Kg) não aumentam a concentração no líquido. Em contraste, estudos no modelo animal demonstraram que altas doses de EPO exógena, aumentaram a sua concentração no líquido. Isto é particularmente verdade no contexto da EHI, em que há um aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica.<sup>23</sup> Zhu *et al* referem que doses entre 300 U/Kg e 500 U/Kg foram associadas a um aumento significativo dos níveis de EPO no líquido.<sup>35</sup> Dados de investigação pré-clínica sugerem que doses muito elevadas podem diminuir a eficácia da EPO e doses extremamente elevadas podem ser prejudiciais, pelo que se considera que uma dose moderada de 1000 U/Kg permite níveis neuroprotetores, sem estar associada a efeitos adversos.<sup>23</sup> Não obstante, a posologia ideal ainda não foi determinada. Estudos em animais, esclareceram que a administração de múltiplas doses é mais eficaz do que uma dose única,<sup>41</sup> corroborando a importância da função anti-apoptótica e promotora da angiogénese e neurogénese. Por este motivo, é congruente uma terapia de longa duração, uma vez que se sabe que a apoptose é prolongada após a lesão HI e a neurogénese e angiogénese têm um papel fundamental na reparação cerebral.<sup>27</sup> Um estudo com 45 RN de termo com EHI, que comparou o tratamento com uma única dose de EPO, no primeiro dia de vida, com o tratamento com hipotermia durante 72 horas, obteve melhores resultados no grupo da hipotermia, comprovando que a hipotermia continua a ser o tratamento mais eficaz e que uma dose única de EPO não permite alcançar os efeitos terapêuticos desejados.<sup>42</sup>

Estudos de fase I/II realizados em RN de termo e pré-termo, para estabelecer a viabilidade, segurança e dosagem da EPO, não identificaram nenhum dos efeitos colaterais comuns em adultos (policitémia, trombose, hipertensão).<sup>43</sup>

Atualmente estão em curso vários estudos de fase II/III, sobre a segurança e eficácia do EPO em populações neonatais.<sup>22</sup> Em França, decorre o estudo “Phase III Study of Efficacy of High Dose Erythropoietin to Prevent Hypoxic-ischemic Encephalopathy Sequelae in Term Newborn (Neurepo), cujo objetivo é determinar a eficácia da EPO em doses elevadas para melhorar a sobrevivência e morbilidade neurológica em RN de termo

asfixiados tratados com hipotermia. Um estudo de fase II (NEAT-O trial), na Califórnia, pretende determinar se a EPO, administrada com hipotermia, é segura como tratamento adjuvante para reduzir o risco de sequelas neurológicas após EHI. Um ensaio clínico controlado e aleatorizado está a ser desenvolvido na Índia, com a administração de 500 unidades/kg/dia em 5 dias, com avaliação do impacto na mortalidade e na incapacidade moderada ou grave aos 18-22 meses de idade. Na Austrália e Nova Zelândia está a decorrer o PAEAN study (Preventing Adverse Outcomes of Neonatal Encephalopathy with Erythropoietin), um estudo multicêntrico de fase III em 300 RN, que utiliza 4000 IU/kg/dia nos primeiro, segundo, terceiro, quinto e sétimo dias de vida, com o objetivo de avaliar o impacto na mortalidade e neurodesenvolvimento aos 6, 12, 18 e 24 meses de idade.

A darbepoietina alfa, uma molécula derivada da eritropoietina humana recombinante com semivida circulante prolongada e atividade biológica equivalente à EPO, incluindo a ativação do recetor EPO, é um novo adjuvante atualmente a ser submetido a testes de farmacocinética e de segurança.<sup>2</sup> Devido à sua semivida prolongada, são necessárias menos administrações para atingir a concentração plasmática desejada, requerendo apenas 2 doses administradas com 7 dias de intervalo.<sup>44</sup> O estudo DANCE, um ensaio clínico de fase I/II liderado por Baserga, investigou a terapêutica combinada de hipotermia e darbepoietina em 30 RN de termo com asfixia de neonatal moderada a grave. Foram avaliados dois grupos com dosagens diferentes, de 2 ou 10 microgramas, administradas antes das 12 horas de vida e após 7 dias. Os investigadores concluíram que a dosagem de 10 microgramas atinge intervalos neuroprotetores, quando comparados com a dosagem de 2 microgramas. Não foram registados efeitos indesejados. Estas crianças ainda estão a ser monitorizadas em ambulatório, para avaliação dos resultados a longo prazo no neurodesenvolvimento.<sup>45</sup>

Tem sido de grande interesse o desenvolvimento de péptidos de EPO-miméticos que têm subconjuntos específicos de características da EPO, porque estas moléculas podem contornar os efeitos clínicos indesejados e/ou apresentar melhor permeabilidade para atravessar a barreira hematoencefálica ou placentária.<sup>27</sup> A função neuroprotetora da EPO pode ser isolada da ação estimuladora da eritropoiese<sup>37</sup>, como no caso dos novos derivados e miméticos da EPO, tais como asialo-EPO e EPO carbamilada.<sup>27</sup> A EPO carbamilada possui fortes propriedades neuroprotetoras, sem as propriedades hematopoiéticas da EPO recombinante.<sup>46</sup> Estudos em animais demonstraram que os EPO-miméticos em doses elevadas, são seguros e atravessam a barreira hematoencefálica, conferindo

neuroproteção.<sup>32,47</sup> O seu tamanho reduzido permite atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta de uma forma mais eficiente que a EPO recombinante.<sup>22</sup> No entanto, ainda não foram realizados estudos para avaliar a segurança ou a eficácia destes compostos como tratamentos perinatais.<sup>27</sup>

### 3.2. Melatonina

Em 2011, a melatonina foi avaliada por um grupo internacional de neurocientistas líderes em perinatologia, como a mais promissora entre 13 neuroprotetores com tradução clínica.<sup>27</sup>

A melatonina é uma substância neuroendócrina lipofílica e hidrofílica, secretada em resposta ao ritmo circadiano. Atravessa facilmente as membranas biológicas e atua via recetor-dependente e recetor-independente para modular a sinalização celular e a expressão genética.<sup>48</sup>

Embora a sua função principal, e mais bem conhecida, seja a regulação do ritmo circadiano corporal, a melatonina influencia numerosas funções fisiológicas, como o crescimento e desenvolvimento, a reprodução e a resposta imunitária,<sup>49</sup> tendo também propriedades anti-inflamatórias,<sup>2</sup> antioxidantes e anti-apoptóticas.<sup>50</sup>

A melatonina endógena tem um papel importante no neurodesenvolvimento normal, nomeadamente na proteção do cérebro em desenvolvimento das agressões. Os níveis maternos de melatonina estão aumentados na gravidez e a melatonina atravessa facilmente as barreiras placentária e hematoencefálica.<sup>51</sup>

RN de termo saudáveis têm uma produção relativamente baixa de melatonina.<sup>51</sup> Contudo, observou-se um aumento plasmático de melatonina entre 6 a 15 vezes, em modelos experimentais de HI perinatal e uma resposta semelhante foi observada em crianças gravemente doentes, implicando um papel importante da melatonina na resposta endógena protetora.<sup>51,52</sup>

Atuando em recetores específicos da membrana celular e do núcleo, a melatonina atinge o máximo efeito neuroprotetor por 3 vias, antioxidante, anti-apoptótica e anti-inflamatória e pela promoção do desenvolvimento neuronal e glial.<sup>53</sup>

O tecido cerebral em desenvolvimento é altamente suscetível à lesão por radicais livres e as potentes propriedades antioxidantes da melatonina, proporcionam um

mecanismo neuroprotetor fundamental.<sup>53</sup> Os efeitos antioxidantes adicionais da melatonina incluem a estimulação da expressão gênica e ativação de enzimas antioxidantes, e a preservação da integridade e eficiência mitocondrial.<sup>50</sup> Estudos em roedores e animais de grande porte, demonstraram que a melatonina reduz a lesão dos lípidos cerebrais por oxidação e melhora notavelmente a falência energética cerebral e a apoptose.<sup>54</sup>

O efeito anti-inflamatório está relacionado com a inibição da regulação de algumas moléculas relacionadas com a inflamação, como as citocinas.<sup>50</sup>

Adicionalmente, a melatonina é protetora na lesão HI sensibilizada por lipopolissacarídeos.<sup>52</sup> No modelo animal de lesão HI induzida por lipopolissacarídeos, Wang *et al* afirmam que a lesão cerebral reduziu em 45% com várias doses de 5 mg/Kg.<sup>55</sup> Dadas as evidências de que o arrefecimento terapêutico pode não ser eficaz na HI sensibilizada por infecção, a melatonina pode revelar-se um imunomodulador neuroprotetor eficaz nestas situações.<sup>18</sup>

Em estudos pré-clínicos, a melatonina é neuroprotetora independentemente ou em conjunto com a hipotermia.<sup>52</sup> Especificamente, reduz a área da lesão, inibe a morte celular neuronal, diminui a lesão da substância branca, diminui a assimetria sensoriomotora e os deficits de aprendizagem.<sup>2</sup>

Administrada em pequenas doses (0,005-5 mg/Kg), a melatonina reduziu as lesões na substância branca em mais de 80% e os défices de aprendizagem, tendo também diminuído a ativação microglial e reação astrogliar, além de ter promovido a maturação dos oligodendrócitos.<sup>27</sup> Num estudo no modelo animal RN com asfixia perinatal, Robertson *et al* demonstraram melhor eficácia neuroprotetora da melatonina em conjunto com a hipotermia terapêutica do que a hipotermia isolada. Nesse estudo, a administração de 5mg/Kg/h de melatonina (100 vezes a dose administrada na patologia do sono em crianças), imediatamente após a HI, durante 6 horas e repetida às 24 horas, melhorou o metabolismo energético cerebral (pela indução da produção de enzimas antioxidantes, incluindo glutatona peroxidase, glutatona redutase, glucose-6-fosfato desidrogenase e superóxido dismutase, e pelo aumento da produção de ATP cerebral através do transporte mitocondrial de eletrões), diminuiu a morte celular em estruturas cerebrais profundas e diminuiu a ativação microglial citotóxica no córtex, 48 horas após a lesão.<sup>52</sup>

Num estudo prospetivo aleatorizado em 30 RN de termo com EHI, foi demonstrado que a hipotermia associada à melatonina oral (5 doses diárias de 10mg/Kg), confere

melhores resultados neurológicos aos 6 meses, com diminuição das lesões da substância branca, diminuição da incidência de convulsões e melhoria da sobrevivência sem deficiências neurológicas ou de desenvolvimento, em comparação com a hipotermia em monoterapia.<sup>56</sup>

Colella *et al* referem que o neurodesenvolvimento normal pode ser afetado por vários fatores associados à exposição prematura a ambientes nocivos. Os efeitos da melatonina em vários sistemas (reatividade vascular, regulação da NO sintase, sistema imunológico, frequência respiratória, stress oxidativo sistêmico, alívio da dor) podem explicar propriedades neuroprotetoras indiretas, além dos efeitos benéficos diretos no cérebro.<sup>57</sup> Várias linhas de evidência sustentam o efeito benéfico da melatonina como um agente imunomodulador em vários órgãos. A administração de melatonina diminui a concentração sérica de marcadores do SIRS em RN com sépsis e pode diminuir os níveis de citocinas na síndrome de dificuldade respiratória no RN pré-termo e na doença pulmonar crônica, melhorando os resultados clínicos.<sup>58</sup> Gitto *et al*<sup>59</sup> demonstraram também que a melatonina tem um potencial efeito analgésico na dor do RN, durante procedimentos médicos, se um componente inflamatório está envolvido. Estas propriedades anti-inflamatórias sistêmicas da melatonina podem ser correlacionadas com benefícios em relação ao neurodesenvolvimento do RN.<sup>57</sup>

Apesar da aplicação clínica promissora da melatonina em RN, permanecem várias questões sobre a sua farmacocinética. Em particular, as concentrações plasmáticas relacionadas com a eficácia clínica e a melhor via de administração ainda não são claras.<sup>57</sup>

Dados pré-clínicos sugerem que são necessários níveis mais elevados de melatonina para uma proteção otimizada e estão, atualmente, em curso estudos para determinar a menor dose eficaz de melatonina que confere neuroprotecção. É também necessário o desenvolvimento de uma fórmula neonatal para administração intravenosa, sendo que ainda não é completamente evidente qual a absorção de fármaco por via oral e retal em crianças com EHI e submetidas a hipotermia.<sup>27</sup> Zetner *et al* concluíram, numa meta-análise recente, que a administração intranasal, a par da via intravenosa, tem um grande potencial.<sup>33</sup> A administração transmucosa oral também pode ser clinicamente relevante porque evita o metabolismo de primeira passagem no fígado. Em contraste, a injeção subcutânea de melatonina não documentou quaisquer vantagens em comparação com outras vias de administração.<sup>57</sup>

Vários estudos, acerca da melatonina adjuvante da hipotermia no tratamento da EHI, estão em curso ou planejados, entre eles o estudo “Melatonin as a Neuroprotective Therapy in Neonates With HIE Undergoing Hypothermia”, que está a ser desenvolvido desde 2016, na Universidade da Flórida, com o objetivo de avaliar as propriedades neuroprotetoras e dose adequada de melatonina em lactentes com EHI moderada a grave, submetidos a hipotermia terapêutica.

### 3.3. Resveratrol

O resveratrol é um composto polifenólico com amplas propriedades fisiológicas e farmacológicas, incluindo anti-inflamatórias, anti-oxidantes e anti-apoptóticas.<sup>60,61</sup>

Alguns estudos no modelo animal identificaram um papel neuroprotetor do resveratrol em casos de doença do SNC, tais como a doença de Alzheimer e a doença vascular isquêmica.<sup>62</sup>

Arteaga *et al* realizaram um estudo em animais RN, com o intuito de avaliar o efeito neuroprotetor do resveratrol quando administrado antes ou imediatamente após uma lesão cerebral HI. Os resultados indicaram que o tratamento com resveratrol antes da HI reduziu o volume da lesão, preservou a mielinização e minimizou a resposta reativa astrogliar; a longo prazo, verificou-se que os resultados comportamentais foram significativamente melhorados na idade adulta. Os autores especularam que um dos mecanismos para neuroprotecção pode estar relacionado com a manutenção da integridade e potencial da membrana interna mitocondrial e com a redução de espécies reativas de oxigênio. Nenhuma destas características protetoras foi observada quando o resveratrol foi administrado imediatamente após a HI.<sup>63</sup>

Pan *et al* avaliaram o efeito neuroprotetor do resveratrol em animais RN, administrado após a lesão HI, demonstrando que o tratamento reduziu significativamente as lesões cerebrais na avaliação ao sétimo dia após a lesão. Adicionalmente à diminuição da área de lesão, o resveratrol reduziu os níveis de expressão de fatores inflamatórios chave, inibindo a expressão de mRNA e a produção de proteína e, pelo menos parcialmente, através da inibição da ativação da microglia. Também se constatou um efeito anti-apoptótico e uma alteração na expressão dos genes Bax, Bcl-2 e caspase3, relacionados com a apoptose. Estes dados sugerem que o tratamento com resveratrol pós HI protege da lesão HI e sugerem uma estratégia terapêutica promissora para esta patologia.<sup>62</sup>



Os estudos sobre a terapêutica combinada de resveratrol com a hipotermia são escassos. Toader *et al* investigaram a eficácia neuroprotetora do resveratrol administrado antes da lesão HI, associado à hipotermia após a HI e os resultados demonstraram um efeito positivo significativo ao nível dos parâmetros de stress oxidativo.<sup>64</sup>

Estudos realizados em humanos demonstraram boa tolerância e baixa toxicidade do resveratrol, não havendo registo de efeitos adversos significativos, pelo que o resveratrol poderá ser uma estratégia sinérgica importante, que aguarda os resultados de novos estudos.<sup>65</sup>

### **3.4. Canabinóides e sistema endocanabinóide**

O sistema canabinóide é um sistema neuromodulatório que participa numa vasta gama de processos fisiológicos nos mamíferos. Este sistema endógeno é constituído por recetores alvo, ligandos endógenos e pelas enzimas responsáveis pela biossíntese, transporte e degradação de canabinóides.<sup>66</sup>

Atualmente, a evidência indica que os endocanabinóides, tal como a melatonina, estão inerentemente envolvidos no desenvolvimento normal do SNC fetal e das suas funções. Os níveis de endocanabinóides que habitualmente estão em baixas concentrações no cérebro, aumentam drasticamente em consequência de uma lesão neuronal, o que sugere que os endocanabinóides constituem um sistema endógeno neuroprotetor.<sup>66</sup>

A *Cannabis sativa* é usada para fins medicinais há muitos anos, com várias finalidades,<sup>43</sup> sendo que alguns estudos revelam que os canabinóides têm grande potencial neuroterapêutico.<sup>66</sup>

Os canabinóides produzem uma variedade de ações, pela ativação dos recetores CB1 e CB2 e através de outros possíveis alvos no SNC. Os recetores CB1 encontram-se maioritariamente no SNC e os recetores CB2 estão no sistema imunitário.<sup>67</sup>

O CBD é o principal componente não psicoativo da *Cannabis sativa* e exerce a sua função neuroprotetora pela modulação da intensidade e extensão dos acontecimentos neurotóxicos e da resposta inflamatória, e através da promoção da sobrevivência celular.<sup>68</sup>

No modelo animal, o CBD demonstrou reduzir a lesão cerebral através da modulação da excitotoxicidade, da inflamação e do stress oxidativo.<sup>69,70</sup> Algumas das características do CBD subjacentes a estes efeitos incluem as suas propriedades antioxidantes, a redução

do influxo de cálcio e de libertação de glutamato, a inibição da recaptação de endocanabinóides e hidrólise enzimática, a ativação dos recetores da serotonina 5HT<sub>1A</sub> e a inibição da ativação do NF-kB.<sup>69,70</sup> Lafuente *et al* relatam efeitos protetores nos neurónios e astrócitos e melhoria histológica, funcional, bioquímica e comportamental.<sup>70</sup> Em animais de grande porte, Alvarez *et al* observaram a redução da lesão cerebral induzida pelo CBD, através da modulação do compromisso hemodinâmico cerebral, da melhoria da atividade metabólica, e da redução do edema e das convulsões. Estes efeitos neuroprotetores também foram associados a benefícios extracerebrais, nomeadamente cardíacos, hemodinâmicos e ventilatórios, sem terem sido registados efeitos adversos.<sup>71</sup> Noutros estudos em animais, os agonistas dos canabinóides demonstraram uma proteção significativa da substância branca e cinzenta. O canabinóide WIN55212-2, administrado imediatamente após a HI, protegeu a lesão mitocondrial e preveniu a apoptose.<sup>72</sup> Alonso-Alconada *et al* descrevem uma diminuição da lesão neuronal, do compromisso hemodinâmico cerebral, do edema e das convulsões, com a administração de CBD imediatamente após a HI, assim como o restabelecimento do desempenho motor e comportamental às 72 horas.<sup>73</sup> Em modelos de roedores com EHI, a administração de canabinóide WIN55212-2 durante 7 dias e iniciado imediatamente após a lesão, melhorou a recuperação e regeneração neuronal e dos oligodendrócitos, a longo prazo.<sup>74</sup> Pazos *et al* realizaram um estudo para avaliar os efeitos protetores a longo termo do CBD, em animais RN. Ficou evidente que a administração de CBD após a lesão HI, conduziu a neuroprotecção de longa duração, com uma maior recuperação funcional do que histológica. O CBD reduziu o volume de enfarte cerebral em 17% e diminuiu a extensão da lesão histológica.<sup>69</sup>

Contudo, Hassell *et al* afirmam que os canabinóides alcançam o seu potencial neuroprotetor máximo através da hipotermia.<sup>4</sup> Num modelo experimental, verificou-se que os canabinóides tinham efeito protetor em modelos de hipotermia, no entanto, este efeito era suprimido quando os modelos eram reaquecidos.<sup>4</sup> Um estudo realizado por Lafuente *et al* em animais de grande porte com EHI neonatal, sugere que o CBD e a hipotermia complementam-se nos seus mecanismos de neuroprotecção, conduzindo a melhores resultados em termos de anti-excitotoxicidade (bloqueando o aumento da razão glutamato/NAA), anti-inflamação (reduzindo a produção de TNF alfa) e anti-oxidação (prevenindo o aumento de proteínas carboniladas), do que os resultados observados, quer com o canabidiol, quer com hipotermia isoladamente.<sup>75</sup> Estas duas terapias em combinação não competem entre si na neuromodulação, mas produzem efeitos aditivos, resultando num

maior benefício global. Estes resultados sugerem que o CBD e a hipotermia provavelmente atuam em complementaridade, pelas mesmas vias neuromoduladoras, durante a mesma fase de lesão cerebral ou em intervalos de tempo diferentes. Não se documentaram efeitos adversos com a utilização da associação terapêutica do canabidiol com a hipotermia. No entanto, há que salientar que os resultados deste estudo advêm de uma avaliação a curto prazo, sem haver seguimento e avaliação dos resultados a longo termo, nomeadamente no neurodesenvolvimento.<sup>75</sup>

O efeito neuroprotetor do CBD não foi associado a efeitos adversos significativos.<sup>69,70</sup> Os efeitos secundários relatados dos canabinóides foram leves e transitórios, incluindo sedação, ansiedade, tontura/vertigem e náusea.<sup>76</sup> No entanto, observou-se que os canabinóides se acumulam seletivamente no cérebro e a sua clearance é relativamente lenta.<sup>48</sup> Assim, estudos pré-clínicos de farmacocinética são imperativos antes dos ensaios clínicos com canabinóides para o tratamento da EHI.<sup>4</sup>

### 3.5 Sulfato de Magnésio

O magnésio é administrado nas mulheres com risco de parto pré-termo, para a neuroprotecção do feto, uma vez que vários estudos confirmaram o seu efeito neuroprotetor e redução do risco de paralisia cerebral.<sup>77,78</sup> No entanto, o efeito do magnésio quando administrado no período pós-natal é pouco conhecido.<sup>2</sup>

O mecanismo do seu efeito neuroprotetor ainda não foi completamente estabelecido. O MgSO<sub>4</sub> impede a entrada de cálcio na célula, por inibição não competitiva dependente de voltagem dos recetores de glutamato do tipo NMDA, residindo o seu efeito neuroprotetor na prevenção da lesão excitotóxica induzida por cálcio no cérebro.<sup>86</sup> Também parece reduzir a lesão secundária induzida por inflamação através da estabilização da membrana celular e inibição da formação de radicais livres.<sup>79</sup>

Num estudo de culturas de células de rato com lesão HI, Itoh *et al* demonstraram que as células precursoras de oligodendrócitos expostas a MgSO<sub>4</sub> apresentaram maior resistência à HI durante o período em que se diferenciaram em oligodendrócitos.<sup>80</sup> É sugerido, então, que o MgSO<sub>4</sub> acelera o passo de diferenciação das células de linhagem de oligodendrócitos, o que contribui para a proteção da substância branca em desenvolvimento contra a agressão HI. Este estudo sugere que, uma vez que o MgSO<sub>4</sub> não

protege os oligodendrócitos maduros contra HI, é recomendado para RN prematuros em vez de RN de termo.<sup>80</sup>

No entanto Galinsky *et al* salientam que, numa revisão sistemática de estudos pré-clínicos, encontraram resultados altamente inconsistentes sobre o efeito do tratamento com MgSO<sub>4</sub> antes ou logo após a EHI, em modelos de termo ou próximo do termo.<sup>81</sup>

Num estudo multicêntrico duplamente cego, controlado e aleatorizado, que incluiu 60 RN de termo e quase termo com HIE moderada ou grave, foi comparada a hipotermia terapêutica com e sem MgSO<sub>4</sub> (3 doses de 250 mg/kg/dose) e não foram encontradas diferenças nos resultados adversos a curto prazo (entre outros, morte, convulsões, coagulopatia, insuficiência renal, hemorragia intracraniana, hemorragia pulmonar). Tagin *et al*, numa metanálise de ensaios clínicos aleatorizados, comparou o magnésio com grupos controle em RN com EHI e não encontrou diferença na mortalidade, hipotensão, convulsões e incapacidade moderada a grave aos 18 meses. Neste estudo, foi relatado maior risco de mortalidade no grupo tratado com MgSO<sub>4</sub>, relacionado com hipotensão e depressão respiratória, embora estatisticamente não tenha expressividade. Por este motivo, a tendência para o aumento da mortalidade no grupo do magnésio é uma preocupação clínica importante e deve ser considerada em futuros estudos.<sup>82</sup>

Não existem provas suficientes para determinar se a terapêutica com magnésio, administrada logo após o nascimento a RN com HIE, reduz a morte ou incapacidade moderada a grave. A melhoria dos resultados a curto prazo sem aumento significativo dos efeitos adversos, suporta a necessidade de mais ensaios para determinar se existem benefícios a longo prazo do magnésio e para confirmar a sua segurança.<sup>26</sup>

### **3.6. Ácido docosahexanóico**

O DHA é o ácido gordo polinsaturado de cadeia longa mais abundante nos fosfolípidos da membrana da célula nervosa,<sup>83</sup> fazendo parte do grupo dos ácidos gordos polinsaturados ómega-3, em conjunto com o ácido linoleico e o ácido eicosapentanóico.<sup>84</sup>

O DHA é uma molécula pleiotrópica que não só modula as propriedades físico-químicas e a arquitetura da membrana plasmática neuronal, como também está envolvido em múltiplas facetas da biologia neuronal, desde a regulação da função sináptica até à neuroprotecção e modulação da expressão génica.<sup>83</sup> Além do seu papel estrutural nas

células neuronais, o DHA participa na modulação da neurogênese, da sinaptogênese e do crescimento das neurites, no estabelecimento da conectividade sináptica, na libertação de neurotransmissores e nos processos de consolidação da memória. Está comprovado que o DHA também atua contra cascatas oxidativas e inflamatórias, ativando vias de sinalização para a sobrevivência neuronal.<sup>85</sup> Mayurasakork *et al* salientam que o DHA atenua a necrose cerebral após lesão HI, principalmente pela modulação das propriedades biofísicas da membrana e pela manutenção da integridade das funções entre as áreas pré e pós-sinápticas, resultando em melhor equilíbrio iônico intracelular. Adicionalmente, o DHA atenua a apoptose, induzindo atividade anti-apoptótica, através da diminuição da reação às espécies reativas de oxigênio, da regulação positiva na expressão da proteína anti-apoptótica, da subregulação da expressão da proteína apoptótica e pela manutenção da integridade e função mitocondrial.<sup>86</sup> Casañas-Sánchez *et al* relataram a capacidade do DHA para regular o programa de transcrição que controla as defesas antioxidantes neuronais numa linhagem de células do hipocampo, especialmente no sistema glutatona/glutarredoxina.<sup>87</sup>

Mayurasakork *et al* concluíram que, em modelos animais RN, as perfusões de DHA por via intraperitoneal, a primeira imediatamente após a HI e a segunda 1 hora após a primeira, contribuíram para a redução da lesão oxidativa e melhoraram os resultados neurológicos a curto e a longo termo. Estes resultados foram associados ao aumento do teor de DHA nas mitocôndrias e aos metabólitos bioativos derivados de DHA no tecido cerebral, com aumento da resistência mitocondrial à permeabilização da membrana induzida pelo cálcio, ou seja, a interação de DHA com mitocôndrias altera a libertação de espécies reativas de oxigênio e melhora a capacidade de tamponamento do cálcio.<sup>88</sup> Williams *et al* administraram emulsões ricas em ácidos gordos n-3, nomeadamente DHA, por via intraperitoneal em animais RN, imediatamente após a HI e observaram que as propriedades neuroprotetoras do DHA ocorrem se este for administrado até às 2 horas pós HI, não havendo efeitos protetores se administrado após as 4 horas da lesão HI. Observou-se uma redução do volume da lesão em 51% quando o DHA foi administrado às 0 horas pós HI, de 46% quando administrado 1 hora pós HI e de 51% quando administrado 2 horas pós HI. Também se verificou uma redução significativa na morte do tecido cerebral, que se mantinha às 8 semanas após a injeção de Tri-DHA.<sup>89</sup> Arteaga *et al* realizaram um estudo em 2016, com o objetivo de investigar os efeitos a longo prazo do DHA, no modelo animal de EHI. Foi administrado 1 mg/kg de DHA intraperitoneal, 10 minutos antes da indução da

hipoxia. Verificou-se que, nas horas imediatamente após a lesão isquêmica, o DHA manteve a integridade da membrana mitocondrial e do potencial transmembranar, bem como a integridade dos processos sinápticos. Sete dias mais tarde, os danos morfológicos ao nível do hipocampo médio foram reduzidos, uma vez que os neurónios e a mielina foram preservados e a resposta reativa astrogliar e a ativação microglial foram constatadas como diminuídas. Na idade adulta, os testes comportamentais revelaram que os animais tratados apresentaram melhor memória de trabalho a longo prazo e menor ansiedade do que os animais com EHI não tratados, não se tendo documentado diferença na atividade locomotora espontânea. Os resultados indicaram que o tratamento com DHA pode ter efeitos neuroprotetores de longa duração em modelos animais de hipoxia neonatal, não apenas pela atenuação das alterações axonais, mas também pelo aumento do desempenho cognitivo na idade adulta.<sup>90</sup> Berman *et al*, num estudo com animais RN com EHI induzida em laboratório e pré-tratados com DHA, reportaram os efeitos neuroprotetores com uma injeção intraperitoneal única de DHA, antes da indução da HI, obtendo melhoria da função sensório-motora e redução das dimensões da lesão cerebral.<sup>91</sup> A mesma equipa de investigadores, posteriormente, testou a administração de DHA, após a indução da HI, verificando melhoria na função neurológica, mas ausência de redução da lesão tecidual.<sup>92</sup>

Subsequentemente, Berman *et al* propuseram-se a determinar se a associação de DHA com a hipotermia teria benefícios na redução da lesão cerebral e nos défices sensório-motores, em animais RN com EHI induzida em laboratório. Foram administrados 2,5 mg/Kg de DHA por via endovenosa, 15 minutos após a HI e iniciada hipotermia de curta duração (30°C durante 3 horas), 1 hora após a HI. Os resultados indicaram que a combinação do tratamento com DHA e hipotermia de curta duração confere melhoria notória da função sensório-motora e diminuição moderada da lesão tecidual, em comparação com o tratamento com hipotermia sem DHA. Os autores salientaram que, apesar da breve duração da hipotermia não ser equivalente à duração da hipotermia habitualmente aplicada na clínica, os dados obtidos forneceram elementos importantes de que a combinação de DHA com hipotermia poderá representar uma opção mais eficaz do que a hipotermia sozinha. No entanto, ressaltam-se algumas limitações deste estudo, como a inexistência de grupo de controlo e o desconhecimento dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à atuação conjunta do DHA e da hipotermia, para atenuar a lesão cerebral e preservar a função sensório-motora. Porém, este estudo poderá constituir o ímpeto para novos estudos.<sup>93</sup>

A utilização de ácidos gordos ómega-3 profilaticamente na gravidez, nomeadamente o DHA, poderão ter benefícios nos RN com EHI. Zhang *et al* concluíram que a suplementação com ácidos gordos ómega-3 em animais, atenua a lesão da BHE causada pela HI, pela inibição da produção e da atividade de metaloproteinases centrais e periféricas.<sup>84</sup>

### 3.7. Topiramato

O TPM é um anticonvulsivante com vários mecanismos de ação, incluindo a inibição dos recetores do glutamato.<sup>94,95</sup>

O seu mecanismo neuroprotetor parece estar relacionado, não só com a inibição dos recetores AMPA e kainato, como também com o bloqueio de canais de sódio, correntes de alta tensão ativadas por cálcio, isoenzimas de anidrase carbónica e poros de transição de permeabilidade mitocondrial.<sup>96,97,98</sup> Estes efeitos podem torná-lo um potencial neuroprotetor atuando através da redução da libertação de aminoácidos excitatórios e da sobrecarga de cálcio nas células isquémicas e pelo aumento do limiar de convulsão.<sup>77</sup>

Vários estudos demonstraram que o TPM reduziu os níveis de sódio no tecido cerebral HI, atenuou o edema cerebral, reduziu a apoptose dos neurónios e inibiu a geração de espécies reativas de oxigénio.<sup>99</sup> Como resultado, o TPM exerce os seus efeitos neuroprotetores pelo aumento da sobrevivência dos pré-oligodendrócitos, diminuição da disfunção mitocondrial e da apoptose neuronal, bem como pela diminuição das convulsões.<sup>77</sup>

A investigação em modelos animais tem revelado que a utilização de TPM em monoterapia na EHI, poderá reduzir a lesão cerebral.<sup>100</sup> Um estudo demonstrou que o tratamento com TPM, reduziu a lesão neuronal induzida pela HI, com forte inibição do recetor AMPA.<sup>26</sup> Noutro estudo liderado por Jiang *et al*, foram administradas dosagens diferentes de topiramato em dois grupos de modelo animal de HI, durante 10 dias. A avaliação do edema cerebral e de biomarcadores, ao quarto e ao décimo dias, permitiu concluir que a dosagem correta na terapêutica de curta duração com TPM tem efeito protetor na lesão cerebral HI, mas o uso prolongado ou excessivo pode causar novas lesões cerebrais e reduzir a capacidade cognitiva.<sup>99</sup>

Ozyener *et al* realizaram um estudo no modelo animal de EHI, com o objetivo de comparar os efeitos de dois agentes neuroprotetores, a melatonina e o TPM, administrados sozinhos ou em associação. As conclusões sugerem que a melatonina e o TPM, atuando em fases diferentes da EHI, administrados isoladamente ou em associação, reduziram significativamente a percentagem de volume de enfarte cerebral e a apoptose.<sup>101</sup> É necessário investigar as dosagens e tempo de administração ótimo dos dois neuroprotetores em terapia combinada, para que possam conferir uma neuroprotecção sinérgica mais eficaz.<sup>26</sup>

Em 2010, Filippi *et al* realizaram um estudo num grupo de 27 RN tratados com hipotermia e outro grupo de 27 RN co-tratados com hipotermia e TPM oral, uma vez ao dia, durante três dias consecutivos, em duas doses diferentes (5 mg/kg no primeiro dia e 3 mg/kg nos 2 dias seguintes). Os RN foram divididos em 6 grupos, de acordo com o grau de hipotermia e a associação com doses mais ou menos elevadas de topiramato. Uma comparação estatística dos grupos identificou algumas diferenças nas variáveis bioquímicas e hemodinâmicas, não tendo sido documentados efeitos adversos atribuíveis ao topiramato. Não se constataram diferenças estatisticamente significativas nos resultados a curto prazo, na taxa de sobrevivência ou na incidência de imagens patológicas na ressonância magnética. Embora o número de RN neste estudo tenha sido limitado, o resultado a curto prazo e os dados de segurança pareceram apoiar a avaliação do topiramato em ensaios clínicos, para explorar a sua possível ação neuroprotetora aditiva.<sup>100</sup>

Decorreu um ensaio clínico controlado multicêntrico, sobre a eficácia do tratamento combinado da hipotermia terapêutica e do TPM, o “Safety and Efficacy of Oral Topiramate in Neonates With Hypoxic Ischemic Encephalopathy Treated With Hypothermia: a Pilot Study of the Neonatal Neuroprotection of Asphyxiated Tuscan Infants (NeoNATI) Network”, partindo da hipótese de que a combinação da hipotermia e do TPM é segura e aumenta as propriedades neuroprotetoras da hipotermia para o tratamento do EHI neonatal em RN de termo. Os resultados no desenvolvimento neurológico foram avaliados aos 12, 18 e 24 meses de idade. Segundo *ClinicalTrials.gov*, o estudo está terminado, pelo que se aguarda a publicação dos resultados.

Decorre um outro estudo aleatorizado e controlado, O “Topiramate as an adjuvant to therapeutic hypothermia for infants with hypoxic ischemic encephalopathy”, dirigido por Ian Griffin, da Universidade da Califórnia, com finalização prevista para 2018, no qual os investigadores comparam o tratamento com hipotermia terapêutica isolada com a



hipotermia terapêutica combinada com topiramato. A hipótese colocada é a de que a terapia adjuvante com topiramato terá impacto a curto prazo, com a diminuição das convulsões e a longo prazo, com melhores resultados no neurodesenvolvimento.

### 3.8. Xénon

O xénon é um gás anestésico que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica.<sup>26</sup>

Tal como outros gases nobres, o xénon demonstrou ter efeitos neuroprotetores tanto *in vivo* como *in vitro*, parecendo ser um adjuvante importante da hipotermia.<sup>102</sup>

Uma vez que o xénon é um antagonista não competitivo dos recetores de glutamato do subtipo NMDA, a lesão neuronal causada por concentrações excessivas de glutamato e as convulsões resultantes, podem ser reduzidas pelos seus efeitos. Também foi documentado que diminui a apoptose pela ativação de fatores anti-apoptóticos.<sup>103</sup>

Em 2007, Hobbs *et al* demonstraram que, em modelos animais, a combinação da hipotermia com o xénon tem um efeito aditivo e concede maior proteção após HI do que cada tratamento isolado, conferindo grande melhoria funcional, sustentada a longo prazo.<sup>104</sup> Liu *et al* apresentaram um estudo no modelo animal, cuja conclusão sugeriu que a adição de 50% de xénon à hipotermia, melhorou significativamente o resultado funcional em comparação com a hipotermia isolada.<sup>105</sup>

Em 2014, Dingley *et al*, num estudo que descreve a utilização de xénon como um segundo neuroprotetor, adjuvante da hipotermia durante 72 horas, em RN de termo com EHI, demonstrou que a administração de xénon a 50% era possível até 18 horas após a lesão HI, sem efeitos adversos a longo prazo no seguimento até aos 18 meses de idade.<sup>106</sup>

Recentemente, foram publicados os resultados de um ensaio clínico multicêntrico, controlado e aleatorizado (TOBY-Xe), em RN de termo com EHI moderada a grave, submetidos a hipotermia terapêutica (iniciada nas primeiras 6 horas de vida, durante 72 horas) em combinação com o xénon a 30% durante 24 horas, iniciado nas 12 horas após o nascimento, realizado por Azzopardi *et al*. Este estudo foi interrompido precocemente porque a associação do xénon com a hipotermia não demonstrou melhoria do efeito neuroprotetor em comparação com a hipotermia isolada. Várias foram as hipóteses levantadas para a falta de eficácia do xénon, apesar dos estudos experimentais promissores prévios, entre elas a subotimização do momento, da dose e da duração do tratamento, e os

biomarcadores escolhidos são serem suficientemente sensíveis. Dois efeitos colaterais foram relatados no grupo do xénon: necrose de gordura subcutânea e dessaturação transitória durante a ressonância magnética, não tendo sido registados efeitos adversos graves.<sup>107</sup> Aguardam-se as conclusões de outro estudo, o CoolXenon3, liderado por Thoresen, no qual é avaliada a associação da hipotermia terapêutica com a inalação de xénon a 50%, durante 18 horas.

### 3.9. Fenobarbital

O fenobarbital é um anticonvulsivante agonista dos recetores GABA subtipo A.<sup>108</sup>

Num estudo retrospectivo realizado por Meyn *et al* foram analisados os efeitos da administração de uma dose única de 40mg/Kg de fenobarbital em RN com EHI, sob terapêutica com hipotermia corporal total. Os resultados demonstraram que houve diminuição das sequelas no neurodesenvolvimento e diminuição da mortalidade. Apesar da reduzida dimensão da amostra, foi visível que esta combinação terapêutica diminuiu as convulsões clinicamente detetáveis, mas não provou haver melhoria significativa do ponto de vista do neurodesenvolvimento.<sup>109</sup> Em RN de termo com EHI, o fenobarbital na dose de 20 mg/kg IV, administrado dentro das primeiras seis horas de vida, diminuiu significativamente a incidência de convulsões neonatais e foi bem tolerado. Porém, não alterou a mortalidade e não foi neuroprotetor.<sup>110</sup> Noutro estudo, o fenobarbital (dose única de 40 mg/Kg) administrado nas primeiras duas horas de vida, associou-se a uma redução na peroxidação lipídica no líquor e nos níveis de enzimas antioxidantes, mas não foi associado a qualquer melhoria significativa do ponto de vista neurológico, no seguimento após um mês.<sup>111</sup> Sarkar *et al* concluíram que o fenobarbital não teve impacto na mortalidade ou na melhoria das lesões nas imagens de ressonância magnética, quando administrado antes da hipotermia terapêutica.<sup>112</sup>

O uso de anticonvulsivantes profiláticos para neuroproteção é controverso<sup>109</sup>, sendo que alguns autores apontam o fenobarbital como potencialmente nocivo. Forcelli *et al* encontraram evidência de que a exposição a fármacos antiepilépticos, incluindo o fenobarbital, durante o período pós-natal prejudica a maturação fisiológica das sinapses, podendo ter impacto ao nível cognitivo e comportamental.<sup>113</sup> Em animais, o fenobarbital foi associado à neurodegeneração apoptótica generalizada, principalmente em cérebros no pico de crescimento, que na espécie humana, acontece desde o sexto mês de gestação até

vários anos após o nascimento.<sup>114</sup> Stefovská *et al* estudaram a utilização de agonistas GABA em animais jovens e verificaram a redução da proliferação celular e inibição da neurogênese, assim como alterações da memória e aprendizagem.<sup>115</sup>

O fenobarbital deve ser usado com muita precaução como estratégia neuroprotetora devido aos efeitos colaterais neurológicos potencialmente perigosos, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre o seu potencial risco-benefício.

### 3.10. Alopurinol

O alopurinol e o seu metabolito oxipurinol, inibem a enzima xantina oxidase, responsável pela produção de radicais superóxido durante lesões de reperfusão. É reconhecido também um papel na eliminação direta de radicais hidroxilo, na quelatação de íons metálicos, tais como íon férrico e na inibição da acumulação de neutrófilos, sugerindo que pode ser útil na neuroprotecção.<sup>116</sup>

Estudos no modelo animal, demonstraram as propriedades neuroprotetoras do alopurinol,<sup>86</sup> com redução do edema cerebral e da lesão cerebral a longo prazo<sup>27</sup>. Outros estudos ressaltam que a administração após as 24 horas de HI, em baixa dosagem, podem comprometer os seus efeitos neuroprotetores.<sup>116,117</sup>

Em RN, o alopurinol também demonstrou conferir neuroprotecção. Gunes *et al* demonstraram que os níveis séricos de NO diminuíram significativamente no grupo de RN tratados com alopurinol às 24, 72 e 96 horas após o nascimento, sendo que os resultados do desenvolvimento neurológico também foram melhores aos 12 meses e mais tarde.<sup>118</sup> Kaandorp *et al*, realizaram um estudo em 54 RN de termo com EHI moderada a grave, tratados com 20 mg/Kg de alopurinol, às 4 horas de vida, e 20 mg/Kg após a primeira dose. Este estudo demonstrou que, apesar de não se ter verificado nenhum efeito imediato significativo na redução da mortalidade ou no neurodesenvolvimento no grupo de RN com EHI, os dados sugeriram benefícios na mortalidade e incapacidade grave aos 4-8 anos de idade, no RN com asfixia moderada. Não foram documentados efeitos adversos com o tratamento utilizando doses elevadas de alopurinol.<sup>119</sup>

Contudo, Benders *et al*, ao investigarem se o alopurinol pós-natal poderia reduzir as lesões de reperfusão/reoxigenação induzidas pelos radicais livres em RN com EHI grave, não constataram resultados favoráveis. Concluíram que o tratamento com alopurinol

iniciado no período pós-natal poderá ser tardio para reduzir a onda de radicais livres induzida pela reperfusão precoce e colocaram a hipótese da administração de alopurinol através da mãe, durante o trabalho de parto, ser mais eficaz na redução da lesão cerebral.<sup>120</sup> Torrance *et al* administraram por via intravenosa, 500 mg de alopurinol a grávidas com idade gestacional superior a 36 semanas, com sinais de hipóxia fetal. Foram avaliados os biomarcadores indicativos de lesão neuronal e a formação de radicais livres, tendo sido documentado que os níveis de biomarcadores foram significativamente mais baixos no grupo tratado com alopurinol.<sup>121</sup> Em 2010, foi iniciado um estudo multicêntrico, duplo cego, controlado e aleatorizado, em grávidas de termo com suspeita de hipoxia fetal (ALLO-Trial), por Kaandorp e os seus colaboradores, com os objetivos de determinar se a administração pré-natal de 500 mg de alopurinol intravenoso, reduzia a EHI em RN e conhecer melhor a sua farmacocinética e farmacodinâmica. A análise dos resultados foi feita pela avaliação de marcadores de lesão cerebral, pela mortalidade, morbidade grave e sequelas neurológicas a longo prazo.<sup>122</sup> O estudo demonstrou que uma dose de 500 mg de alopurinol, por via intravenosa, atravessa rapidamente a placenta e fornece concentrações alvo em 95% dos fetos no momento do parto, com efeitos secundários muito reduzidos.<sup>123</sup> No entanto, o alopurinol não reduziu significativamente os marcadores de lesão neuronal no sangue do cordão umbilical. Este estudo sugeriu, ainda, um potencial benefício no tratamento de recém-nascidos do género feminino.<sup>124</sup>

### 3.11. N-Acetilcisteína

O stress oxidativo é um dos principais determinantes da lesão em situação de HI e dá origem à acumulação de espécies reativas de oxigénio e a cascatas inflamatórias desreguladas.<sup>125</sup>

O cérebro de um RN de termo não tem capacidade de lidar com situações extremas de stress oxidativo, uma vez que a sua atividade antioxidante é apenas metade dos níveis de um adulto.<sup>126</sup>

A glutathiona, como o principal antioxidante intracelular, é um marcador *in vivo* da gravidade do stress oxidativo no SNC e a sua depleção está intimamente associada à morte neuronal. A NAC constitui uma fonte de cisteína, um precursor de glutathiona, e remove radicais livres de oxigénio, atuando direta e indiretamente como um potente antioxidante.<sup>125</sup>

As respostas imunes e inflamatórias subsequentes à HI são moduladas pelo estado redox celular e o aumento das vias de sinalização apoptóticas surge em células com baixas reservas de antioxidantes.<sup>127</sup> A NAC atravessa a barreira hematoencefálica, onde reduz o stress oxidativo cerebral, preserva os peroxissomos e restaura a mielinização, tendo demonstrado melhorar o estado oxidativo, tanto celular como mitocondrial, e do potencial de membrana mitocondrial, o que está associado à melhoria da sobrevivência celular. Essas propriedades tornam a NAC um forte candidato para melhorar as cascatas de inflamação e estimular mecanismos endógenos de reparação após HI.<sup>128</sup>

Assim sendo, a NAC em combinação com a hipotermia, poderá fornecer neuroprotecção após lesão HI grave, em que a hipotermia isolada não é suficiente para melhorar o prognóstico.<sup>125</sup>

Foram observados efeitos protetores sinérgicos entre a hipotermia e a NAC, sendo que os resultados de um estudo em modelo animal com isquemia medular foram promissores para a terapia combinada. Cakir *et al* relataram que, após isquemia medular, a NAC e hipotermia isoladamente estavam associados a efeitos protetores limitados, enquanto a combinação de NAC e hipotermia resultou em recuperação altamente significativa da função da medula espinhal.<sup>129</sup>

Outro estudo com animais de maior porte, demonstrou que a administração de 150 mg/kg de NAC, em bólus e 20 mg/kg/h, por via intravenosa, durante 24 horas, reduziu o stress oxidativo cerebral.<sup>130</sup> A terapia combinada de hipotermia sistémica e NAC (50 mg/Kg, intraperitoneal), imediatamente após a HI em animais RN, melhoraram significativamente os reflexos neonatais e reduziram a lesão da substância branca e cinzenta, 4 semanas após a HI.<sup>131</sup> Nie *et al* afirmam que a NAC se mostra promissora para neuroprotecção em combinação com hipotermia, atenuando a neuroinflamação pós-HI devido ao stress oxidativo. No seu estudo no modelo animal, foi avaliado o potencial terapêutico da NAC em combinação com hipotermia, após lesão grave de HI. A NAC na dose de 50 mg/kg/d, administrada 1 hora após o início da hipotermia, diminuiu significativamente a expressão da iNOS e da ativação da caspase 3. No entanto, apenas as fêmeas apresentaram melhoria no volume da lesão, justificado pelo facto de os mecanismos de lesão HI e morte celular diferirem entre géneros. Com o tratamento continuado durante 6 semanas, observou-se uma melhoria significativa nos resultados neuromotores a longo prazo, em relação ao tratamento com hipotermia em monoterapia, em ambos os sexos. Os resultados deste estudo propõem que os antioxidantes podem

proporcionar neuroprotecção a curto prazo para o género feminino, enquanto que a terapia a longo prazo pode beneficiar ambos os géneros. Este estudo sugeriu ainda que o efeito benéfico da NAC em combinação com a hipotermia, só surge com baixas dosagens, uma vez que parece que a hipotermia poderá diminuir o limiar tanto para a atividade como para a toxicidade da NAC, possivelmente através da diminuição da depuração e do aumento vida semivida.<sup>125</sup>

Alguns estudos em animais revelaram efeitos adversos com a utilização da NAC, como a exacerbação da hipoxemia e indução de policitemia.<sup>129</sup> Algumas reações adversas poderão limitar a sua utilização em humanos, particularmente reações anafiláticas, incluindo erupção cutânea, prurido, angioedema, broncospasmo, taquicardia e hipotensão, que ocorrem geralmente nas 2 horas após a infusão inicial.<sup>132</sup>

### **3.12. 2-Iminobiotina**

A 2-IB, um análogo da biotina (vitamina B7), é um inibidor neuronal e indutível (mas não endotelial) da óxido nítrico sintase, que demonstrou melhorar a neuroprotecção em modelos animais de EHI.<sup>133,134</sup>

Embora o mecanismo exato de ação ainda esteja por definir, a 2-IB potencialmente protege contra lesões cerebrais hipóxico-isquémicas por prevenção das lesões mitocondriais causadas pelo óxido nítrico ou pelo peroxinitrato.<sup>134</sup>

Zitta *et al* realizaram um estudo em modelos de células neuronais humanas em hipoxia, para avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores de 2-IB e determinar as concentrações neuroprotetoras ótimas de 2-IB. A incubação das culturas de células com diferentes concentrações de 2-IB atenuaram a neurotoxicidade induzida pela HI e aumentaram a sua atividade metabólica. Os resultados sugeriram que 30 ng/ml é uma dosagem neuroprotetora ótima em testes *in vitro*.<sup>135</sup>

Os resultados das investigações no modelo animal sugerem que a 2-IB é uma substância com potencial para o tratamento da HI perinatal. Bjorkman *et al* testaram a administração de 6 doses de 1 mg/Kg/dose de 2-IB intravenosa, obtendo concentrações de 24 ng/ml de 2-IB no líquido. A estreita correlação da concentração neuroprotetora da 2-IB em animais e células humanas, apoia a ideia de que doses semelhantes de 2-IB (aproximadamente 30 ng/ml no líquido) poderão ser adequadas para reduzir as lesões da

EHI humanos.<sup>133</sup> Nijboer *et al* num estudo no modelo animal com HI, pré-termo e de termo, constatou que a resposta ao tratamento com 2-IB parece ser dependente do sexo, com a neuroprotecção demonstrada apenas em animais do sexo feminino.<sup>136</sup>

Foi concluído, na Turquia, um estudo de fase II (NCT01626924), aleatorizado e controlado, com RN de idade gestacional superior a 36 semanas, com HIE moderada a grave, com o objetivo de avaliar a eficácia, tolerabilidade e farmacocinética da 2-IB. Os RN foram tratados com 6 doses de 2-IB durante 20 horas, iniciados até às 6 horas de vida. Aguarda-se a publicação dos resultados. Está a decorrer um estudo de fase II na Holanda, o 2-STEP (NTR5221), com o objetivo de explorar a segurança, a tolerabilidade e o perfil farmacocinético, a curto prazo, da 2-IB quando administrada com a hipotermia.

### **3.13. Outras terapêuticas**

#### **3.13.1. Células estaminais**

A utilização de sangue do cordão umbilical e a terapia com células estaminais estão a ser explorados como promissoras opções de tratamento neuroprotetor e neuroregenerativo.<sup>2,26</sup>

As fontes para células estaminais incluem células estaminais/progenitoras neurais derivadas de tecido fetal, células estaminais mesenquimais, células estaminais pluripotentes induzidas por células embrionárias e células mononucleares do cordão umbilical.<sup>137,138,139</sup>

O sangue do cordão umbilical representa uma rica fonte de células estaminais. A transplantação autóloga de sangue do cordão umbilical, recolhida logo após o parto, tem as vantagens de uma manipulação mínima, sem necessidade de imunossupressão, acesso relativamente fácil e propriedades de armazenamento. O sangue do cordão é rico em células estaminais primitivas, contudo contém um número limitado de tipos de células, principalmente células mononucleares, e mostrou não ser tão pluripotente quanto as células estaminais embrionárias.<sup>140</sup>

A recuperação funcional ocorre através de substituição de células (neurogênese, angiogênese, sinaptogênese, secreção de fatores de crescimento), assim como, através da formação de uma bioponte que facilita os mecanismos endógenos de reparação.<sup>141</sup>

No contexto da EHI perinatal, a terapia com células estaminais ganhou importância como tratamento adjuvante da hipotermia, para melhorar a mortalidade e as sequelas neurológicas.

Estudos que analisaram o risco e os benefícios da infusão autóloga de sangue de cordão em RN com HIE e em crianças com paralisia cerebral mostraram resultados promissores.<sup>142</sup> O acompanhamento a curto prazo de 328 participantes com paralisia cerebral de várias etiologias, incluindo a EHI neonatal, tratados com células estaminais, demonstrou um pequeno efeito benéfico, estatisticamente significativo, na função motora grosseira.<sup>143</sup>

Recentemente, Cotten *et al* demonstraram que a colheita, preparação e infusão de sangue de cordão umbilical autólogo mostraram-se viáveis em crianças com HIE, sugerindo que poderá ser uma hipótese de terapêutica no futuro.<sup>144</sup>

Vários ensaios clínicos estão em curso, nomeadamente o ensaio iniciado por Cotten *et al.*, “Autologous Cord Blood Cells for Hypoxic Ischemic Encephalopathy Study 1. Phase I Study of Feasibility and Safety”, que pretende avaliar a segurança e a viabilidade de infusões de células sanguíneas autólogas do próprio cordão umbilical, em recém-nascidos de termo com EHI moderada a grave. Um estudo liderado por Mitchell Cairo, do New York Medical College, terá início em 2017 e pretende avaliar a segurança e eficácia das células estaminais derivadas do sangue do cordão umbilical e da placenta, em RN de termo com EHI grave.<sup>13</sup>

São necessários estudos adicionais para desenvolver a melhor estratégia terapêutica, considerando o tempo de transplante, a dosagem celular, o modo de administração e a escolha das células estaminais.<sup>140</sup>

De salientar que há pesquisas em curso no campo dos fatores de células estaminais, como o G-CSF e o fator neurotrófico derivado das células gliais, que têm mostrado resultados promissores.<sup>26</sup>

### **3.13.2. Pós-condicionamento isquémico remoto**

“Condicionamento” descreve um processo adaptativo de proteção endógena que ocorre nos mamíferos perante uma agressão ao organismo.<sup>4</sup>



Hassel, citando Wegene *et al*, enfatiza que o pré-condicionamento isquêmico descreve um episódio breve e não letal de isquemia, que confere proteção contra um episódio isquêmico grave subsequente.<sup>4</sup> O pós-condicionamento isquêmico evoluiu a partir deste conceito e é definido como uma interrupção subletal e intermitente do fluxo sanguíneo após uma isquemia celular letal. O pós-condicionamento isquêmico é eficaz se for realizado num órgão não vital, como um membro, distante do órgão afetado – denominado pós-condicionamento isquêmico remoto.<sup>145</sup> O PCIR poderá ser uma estratégia terapêutica na EHI.

Os mecanismos protetores do PCIR não estão completamente compreendidos, mas pensa-se que poderão envolver três vias interrelacionadas, a via neuronal, a via humoral e a resposta sistêmica, iniciadas pela libertação de autacóides endógenos (como a adenosina, a bradicinina e os opióides) a partir do músculo esquelético isquêmico.<sup>146</sup> Estudos no modelo animal demonstraram que a interrupção de qualquer uma das vias, anula a neuroproteção conferida pelo PCIR.<sup>4</sup>

A via neuronal envolve a estimulação dos nervos sensoriais locais e do sistema nervoso autônomo, incluindo a libertação de fatores humorais. A via humoral envolve a libertação e transporte até ao cérebro de fatores protetores endógenos, incluindo autacóides de atuação local e fatores humorais, desencadeada pela isquemia e pela ativação dos nervos eferentes. A resposta sistêmica descreve o impacto global do PCIR, incluindo a modulação imunitária (como a redução da ativação dos neutrófilos) e redução da expressão de genes inflamatórios e apoptóticos.<sup>147</sup>

Após o estímulo isquêmico remoto, as três vias convergem no cérebro para aumentar a circulação sanguínea cerebral, atenuar a neuroinflamação, ativar as cascatas de sinalização de sobrevivência celular, diminuir as necessidades energéticas e promover os mecanismos de reparação a longo prazo. A ação direta na sobrevivência celular é mediada via recetor acoplado à proteína G e incide na proteção mitocondrial (manutenção dos canais de potássio ATP sensíveis e prevenção da abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial) e na regulação da transcrição no núcleo (pela modulação genética e epigenética).<sup>147</sup>

Estudos no modelo animal RN e adulto, demonstraram que o PCIR reduziu o tamanho do enfarte na região de isquemia focal e global, estando associados a melhoria dos resultados motores a longo prazo, se aplicado até às 24 horas pós HI.<sup>146,148</sup>

Em animais de grande porte com EHI, submetidos a 4 ciclos de 10 minutos de isquemia/reperfusão dos membros inferiores, iniciados logo após a HI, o PCIR atenuou o aumento de lactato/NAA na substância branca e aumentou o ATP cerebral, conferindo proteção da substância branca, diminuição da inflamação e da morte celular.<sup>149</sup>

O PCIR tem sido investigado no âmbito da doença cardíaca e do AVC, em adultos e crianças, demonstrando níveis de cardio e neuroproteção satisfatórios, sendo seguro e bem tolerado.<sup>150</sup>

São necessários ensaios clínicos para fundamentar o mecanismo neuroprotetor exato, a segurança e eficácia do PCIR na EHI, em monoterapia e associado à hipotermia.<sup>4</sup>

## 4. CONCLUSÃO

A hipoxia-isquemia perinatal é uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade em recém-nascidos. Apesar da melhoria dos cuidados que visam a prevenção da EHI, a sua incidência não está a decrescer, sendo elevado o número de crianças que fica com sequelas permanentes, exigindo cuidados ao longo da vida.

Por este motivo, é premente o desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras eficazes, a fim de minimizar as consequências da EHI.

A hipotermia induzida é, atualmente, a terapêutica *gold standard* e os seus protocolos de implementação estão bem estabelecidos. No entanto, face à eficácia incompleta desta terapêutica, acrescendo à complexidade fisiopatológica da EHI, prevê-se que o tratamento ideal deverá atuar em vários alvos terapêuticos em simultâneo, na cascata de eventos da lesão cerebral.

A combinação da hipotermia com outras terapêuticas adjuvantes parece ser agora a próxima etapa nesta área. Neste trabalho, procurámos pesquisar e resumir a literatura recente sobre terapêuticas adjuvantes da hipotermia na neuroprotecção do recém-nascido.

Existem algumas moléculas promissoras em investigação, como a eritropoietina, a melatonina, o resveratrol, o canabidiol, o sulfato de magnésio, o ácido docosahexanóico, o topiramato, o xénon, o fenobarbital, o alopurinol, a N-acetilcisteína e a 2-iminobiotina, assim como outras terapêuticas, nomeadamente, as células estaminais e o pós-condicionamento isquémico remoto. Estas moléculas estudadas, atuam em vários eventos e diferentes locais da cascata de acontecimentos neurotóxicos, como a excitotoxicidade, o stress oxidativo, a apoptose a inflamação, a neurogénese e a angiogénese.

O momento da administração é crítico para otimizar o benefício e evitar a neurotoxicidade, sendo que as diferentes terapêuticas poderão ser iniciadas intraparto, em fetos de risco, ou em recém-nascidos com EHI, na fase latente, para prevenir a falência energética secundária e nas fases secundária e terciária, para compensar as lesões em evolução.<sup>4</sup>

Fatores de sensibilização, como a pirexia materna, a infeção materna e/ou fetal e o atraso do crescimento fetal poderão contribuir para a heterogeneidade da resposta e dos resultados à terapêutica na EHI.<sup>27</sup>

As moléculas abordadas neste trabalho, isoladamente ou em combinação, ainda necessitam de uma investigação profunda e rigorosa ao nível pré-clínico e/ou clínico. O alvo terapêutico preciso, o momento ideal de administração, a dosagem ótima, a via e a duração da administração são parâmetros que necessitam de ser clarificados, a fim de se obter melhores resultados com os menores efeitos secundários.

Embora a hipotermia e as farmacoterapias isoladas sejam promissoras, no futuro, perspectiva-se que a neuroprotecção do recém-nascido abrangerá uma combinação destas terapêuticas, uma vez que demonstraram ter mecanismos distintos de ação e são necessárias para atingir diferentes alvos; o desafio será alcançar o equilíbrio das intervenções terapêuticas, no que respeita ao momento certo em relação à natureza e estágio da lesão, e à dosagem adequada para a fase da lesão, com o intuito de garantir uma proteção efetiva e duradoura.

Adicionalmente, é necessário ter sempre em consideração que, apesar dos estudos pré-clínicos apresentarem resultados promissores, a translação para os estudos clínicos não é linear e poderão ser decepcionantes quando aplicados em recém-nascidos.

Por último, salienta-se a relevância da ponderação do risco-benefício na utilização das terapêuticas em monoterapia ou em combinação; existem terapêuticas que em monoterapia poderão prejudicar o desenvolvimento cerebral, e existem terapêuticas que individualmente são inofensivas, mas poderão exacerbar a neurodegeneração no cérebro em desenvolvimento quando administradas em combinação com outras substâncias. Esta premissa sugere que nas investigações pré-clínicas e clínicas será fundamental planear estratégias terapêuticas que atuem na lesão cerebral HI, sem interferir no neurodesenvolvimento normal.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Liu L, Oza S, Hogan D, et al. Global, regional and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an update systematic analysis. *Lancet* 2015; 385: 430-40.
2. Shea KL, Palanisamy A. What can you do to protect the newborn brain? *Curr Opin Anesthesiol* 2015, 28:261-266.
3. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA Pediatr* 2015; 169 (4):397-403.
4. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada, et al. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100:F541-F552.
5. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, et al. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 1:CD003311
6. Jensen EC, Bennet L, Hunter CJ, et al. Post-hypoxic hypoperfusion is associated with suppression of cerebral metabolism and increased tissue oxygenation in near-term fetal sheep. *J Physiol* 2006; 572 (Pt 1): 131-139.
7. Iwata O, Iwata S, Thornton JS, et al. "Therapeutic time window" duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. *Brain Res* 2007;1154: 173-180.
8. Fleiss B, Gressens P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 2012; 11:556-566.
9. Gonzalez FF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther* 2008; 120:43-53.
10. Roka A, Azzopardi D. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86:361-367.
11. Wassink G, Gunn ER, Drury PP, et al. The mechanisms and treatment of asphyxia encephalopathy. *Front Neurosci* 2014; 8:40.
12. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13:267-278.
13. Jelin AC, Salmeen K, Gano D, et al. Perinatal neuroprotection update [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2016, 5 (F1000 Faculty Rev):1939.

14. Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr Treat Options Neurol* 2012; 14:608-619.
15. Shankaran S, Pappas A, Mc Donald SA, *et al.* Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *N Engl J Med* 2012; 366(22): 2085-92.
16. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, *et al.* Effects of hypothermia for perinatal asphyxia in childhood outcomes. *N Engl J Med* 2014; 371(2): 140-9.
17. Edwards AD, Brocklehurst P, Gunn AJ, *et al.* Neurological Outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. *BMJ* 2010; 340:c363.
18. Osredkar D, Thorensen M, Maes E, *et al.* Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Resuscitation* 2014; 85:567-572.
19. Jenkins DD, Lee T, Chiuzan C, *et al.* Altered circulating leukocytes and their chemokines in a clinical trial of therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Pediatr Crit Care Med* 2013; 14:786-795.
20. Geurts M, Macleod MR, Kollmar R, *et al.* Therapeutic hypothermia and the risk of infection: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Crit Care Med* 2014; 42:231-242.
21. Mc Adams R, Juul S. Neonatal Encephalopathy. Update on Therapeutic Hypothermia and Other Novel Therapeutics. *Clin Perinatol* 2016; 43(3):485-500.
22. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol* 2014; 51:481-488.
23. Wu YW, Gonzalez FF. Erythropoietin: a novel therapy for hypoxic-ischaemic encephalopathy? *Developmental Medicine and Child Neurology* 2015. 57: 34-39.
24. Juul, SE, Pet GC. Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. *Clin Perinatol* 2015; 42: 469-481.
25. Juul SE, Beyer RP, Bammler TK, *et al.* Microarray analysis of high-dose recombinant erythropoietin treatment of unilateral brain injury in neonatal mouse hippocampus. *Pediatr Res* 2009, 65:485-492.
26. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, *et al.* Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 22368-401.
27. Robertson NJ, Tan S, Groenendaal F, *et al.* Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? *J Pediatr* 2012; 160:544-552 e4.

28. Fan X, Heijnen CJ, Van der KM, *et al.* Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice. *Pediatr Res* 2011; 69:56-61.
29. Yan F, Zhang M, Meng Y, *et al.* Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis. *Brain Research* 2016; 1651: 104-113.
30. Gonzalez FF, Larphaveesarp A, McQuillen P, *et al.* Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial precursor cells after neonatal stroke. *Stroke* 2013; 44(3): 753-8.
31. Gonzalez FF, Abel R, Almlil CR, *et al.* Erythropoietin sustains cognitive function and brain volume after neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2009; 31:403-411.
32. Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, *et al.* Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci* 2013; 35:491-503.
33. Traudt CM, McPherson RJ, Bauer LA, *et al.* Concurrent erythropoietin and hypothermia treatment improve outcomes in a term nonhuman primate model of perinatal asphyxia. *Dev Neurosci* 2013; 35: 491-503.
34. Fan X, van Bel F, van der Kooij MA, *et al.* Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatr Res* 2013; 982: 113-126.
35. Zhu C, Kang W, Xu F, *et al.* Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2009; 124: e218-e226.
36. Elmahdy H, El-Mashad AR, *et al.* Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. *Pediatrics* 2010; 125: e1135-e1142.
37. Wu YW, Bauer LA, Ballard RA, *et al.* Erythropoietin for neuroprotection in perinatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics. *Pediatrics* 2012; 130:683-691.
38. Rogers EE, Bonifacio SL, Glass HC, *et al.* Erythropoietin and hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Neurol* 2014;51:657-662.
39. Wu YW, Mathur AM, Chang T, *et al.* High-dose Erythropoietin and Hypothermia for Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Phase II Trial. *Pediatrics* 2016; 137(6): pii: e20160191.
40. Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, *et al.* A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* 2008; 122:383-91.

41. Kellert BA, Mc Pherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007; 61:451-5.
42. El Shimi MS, Awad HA, Hassanein SM, *et al.* Single dose recombinant erythropoietin versus moderate hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy in low resource settings. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014; 27:1295-300.
43. Benders MJ, Van der Aa NE, Roks M, *et al.* Feasibility and safety of erythropoietin for neuroprotection after perinatal arterial ischemic stroke. *J Pediatr* 2014; 164:481-6 e1-2.
44. Baserga MC, Beachy JC, Roberts JK, *et al.* Darbepoetin Administration to Neonates Undergoing Cooling for Encephalopathy (DANCE): A Safety and Pharmacokinetic Trial. *Pediatr Res* 2015;78: 315-22.
45. Patel S, Ohls RK. Darbepoetin administration in Term and Preterm Neonates. *Clin Perinatol* 2015; 42: 557-566.
46. Chen J, Yang Z, Zhang X. Carbamylated Erythropoietin: A Prospective Drug Candidate for Neuroprotection. *Biochemistry Insights* 2015; 8(S1): 25-29.
47. Van de Looij, Chatagner A, Quairiaux C, *et al.* Multi-modal assessment of long-term erythropoietin treatment after neonatal hypoxic-ischemic injury in rat brain. *PloS ONE* 2014; 9:e95643.
48. Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, *et al.* Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351: 152-66.
49. Reiter RJ, Tan D-X, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 2010; 181:127-151.
50. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, *et al.* Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. 2013; 14:9379-9395.
51. Marseglia L, Aversa S, Barberi I, *et al.* High endogenous melatonin levels in critically ill children: a Pilot study. *J Pediatr* 2013; 162:357-360.
52. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, *et al.* Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain* 2013; 136: 90-105.
53. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 2013; 54:245-257.



54. Yawno T, Castillo-Melendez M, Jenkin G, *et al.* Mechanisms of melatonin-induced protection in the brain of late gestation fetal sheep in response to hypoxia. *Dev. Neurosci* 2012; 34:543-551.
55. Wang X, Svedin P, Nie C, *et al.* N-acetylcysteine reduces lipopolysaccharide-sensitized hypoxic-ischemic brain injury. *Ann Neurol* 2007; 61: 263-271.
56. Aly H, Elmahdy H, El-Dib M, *et al.* Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study. *J Perinatol* 2015; 35:186-191.
57. Colella M, Biran V, Baud O. Melatonin and the newborn brain. *Early Human Development* 2016; 102: 1-3.
58. Gitto E, *et al.* Pain in neonatal intensive care: role of melatonin as an analgesic antioxidant. *J Pineal Res* 2012; 52: 291-295.
59. Gitto E, *et al.* Pain in neonatal intensive care: role of melatonin as an analgesic antioxidant. *J Pineal Res* 2012; 52: 291-295.
60. Fang LQ, Gao HM, Zhang WN, *et al.* Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis. *Internacional Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 8: 3219-3226.
61. Zhou XM, Zhou ML, Zhang XS, *et al.* Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model. *Journal of Surgical Research* 2014; 189: 159-165.
62. Pan S, Li S, Hu Y, *et al.* Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia. *Oncotarget* 2016; 7(48): 79247-79261.
63. Arteaga O, Revuelta M, *et al.* Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS ONE* 2015; 10(11): e0142424.
64. Toader AM, Filip A, *et al.* Neuroprotective strategy in an experimental newborn rat model of brain ischemia and hypoxia: effects of resveratrol and hypothermia. *Clujul Medical* 2013; 86(3): 203-207.
65. West T, Atzeva M, Holtzman DM. Pomegranate polyphenols and resveratrol protect the neonatal brain against hypoxic ischemic injury. *Dev Neurosci* 2007; 29(4-5): 363-72.
66. Gaffuri AL, Ladarre D, Lenkei Z. Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development. *Pharmacology* 2012, 90:19-39.
67. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, *et al.* The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. *Pharmacotherapy* 2013; 33: 195-209.

68. Kim SH, Won SJ, Mau XO, *et al.* Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol* 2006; 69:691-6.
69. Pazos, MR, Cinquina V, Gómez A, *et al.* Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* 2012; 63: 776-783.
70. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, *et al.* Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn piglets. *Pediatr Res* 2011; 70: 272-277.
71. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, *et al.* Neuroprotective effects of the non-psychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatr Res* 2008; 64: 653-658.
72. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Alvarez FJ, *et al.* The cannabinoid WIN 55212-2 mitigates apoptoses and mitochondrial dysfunction after hypoxia ischemia. *Neurochem Res* 2012; 37:161-70.
73. Alonso-Alconada D, Alvarez FJ, Alvarez A, *et al.* The cannabinoid receptor agonist WIN 55212-2 reduces the initial cerebral damage after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *Brain Res* 2010; 1362:150-9.
74. Fernandez-Lopez D, Pazos MR, Tolon RM, *et al.* The cannabinoid agonist WIN55212-2 reduces brain damage in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatr Res* 2007; 62:255-60.
75. Lafuente H, Pazos MR, Alvarez A, *et al.* Effects of Cannabidiol and Hypothermia on Short-Term Brain Damage in New-Born Piglets after Acute Hypoxia-Ischemia. *Front Neurosci* 2016; 10: 323.
76. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, *et al.* The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy* 2013; 33:195-209.
77. Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2016, 1-11.
78. Tataranno ML, Perrone S, Longini M, *et al.* New antioxidant drugs for neonatal brain injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015:108251.
79. Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, *et al.* Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. *J Immunol* 2012; 188: 6338-6346.

80. Itoh K, Maki T, Shindo A, *et al.* Magnesium sulfate protects oligodendrocyte lineage cells in a rat cell-culture model of hypoxic-ischemic injury. *Neurosci Res* 2016; 106: 66-69.
81. Galinsky R, Bennet L, Groenendaal F, *et al.* Magnesium is not consistently neuroprotective for perinatal hypoxia-ischemia in term-equivalent models in pre-clinical studies: a systematic review. *Dev Neurosci* 2014; 36:73-82.
82. Tagin M, Shah PS, Lee KS. Magnesium for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy; a systematic review and meta-analysis. *J Perinatol* 2013; 33: 663-669.
83. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, *et al.* Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (*Gpx4*) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. *Front. Physiol* 2015; 203 (6): 1-11.
84. Zhang W, Zhang H, Mu H, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids mitigate blood-brain barrier disruption after hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiology of Disease* 2016; 91: 37-46.
85. Moriguchi T, Harauma A, Salem N. Plasticity of mouse brain docosahexaenoic acid: modulation by diet and age. *Lipids* 2013; 48: 343–355.
86. Mayurasakorn K, Williams JJ, Ten VS, Deckelbaum RJ. Docosahexaenoic acid: brain accretion and roles in neuroprotection after brain hypoxia and ischemia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2011; 14(2): 158–167.
87. Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Fabelo N, *et al.* Docosahexaenoic (DHA) modulates phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase (*Gpx4*) gene expression to ensure self-protection from oxidative damage in hippocampal cells. *Front Physiol* 2015; 6:203.
88. Mayurasakorn K, Niatsetskaya ZV, Sosunov SA, *et al.* DHA but Not EPA Emulsions Preserve Neurological and Mitochondrial Function after Brain Hypoxia-Ischemia in Neonatal Mice. *PLoS ONE* 2016; 11(8): e0160870.
89. Williams JJ, Mayurasakorn K, Vannucci SJ, *et al.* N-3 Fatty Acid Rich Triglyceride Emulsions are Neuroprotective after Cerebral Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Mice. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:305.e1-305.e6.
90. Arteaga O, Revuelta M, Urigüen L, *et al.* Docosahexaenoic Acid Reduces Cerebral Damage and Ameliorates Long-Term Cognitive Impairments Caused by Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *Mol Neurobiol* 2016.

91. Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, *et al.* Docosahexaenoic Acid pretreatment confers neuroprotection in a rat model of perinatal cerebral hypoxia-ischemia. *Neonatology* 2013; 104 (1): 71-78.
92. Berman DR, Liu Y, Barks J *et al.* Treatment with docosahexaenoic acid after hypoxia–ischemia improves forepaw placing in a rat model of perinatal hypoxia ischemia. *Am J Obstet Gynecol.* 2010 October; 203(4): 385.e1–385.e5.
93. Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, *et al.* Docosahexaenoic Acid augments hypothermic neuroprotection in a neonatal rat asphyxia model. *Neonatology* 2013; 104 (1): 71-78.
94. Shank RP, Doose DR, Streeter AJ, *et al.* Plasma and whole blood pharmacokinetics of topiramate: the role of carbonic anhydrase. *Epilepsy Res* 2005; 63: 103-112.
95. Guerrini R, Parmeggiani L. Topiramate and its clinical applications in epilepsy. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7: 811-823.
96. Kaminski RM, Banerjee M, Rogawski MA, *et al.* Topiramate selectively protects against seizures induced by ATPA, a GluR5 kainate receptor agonist. *Neuropharmacology* 2004. 46: 1097-1104.
97. Costa C, Martella G, Picconi B, *et al.* Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. *Stroke* 2006; 37: 1319-1326.
98. Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Vielhaber S, *et al.* The mechanism of neuroprotection by topiramate in an animal model of epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 1478-1487.
99. Jiang H, Lei JJ, Zhang YH. Protective effect of topiramate on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2014; 496-500.
100. Filippi L, Poggi C, La Marca G, *et al.* Oral topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia: a safety study. *J Pediatr* 2010; 157: 361-366.
101. Ozyener F, Cetinkaya M, Alkan T, *et al.* Neuroprotective effects of melatonin administered alone or in combination with topiramate in neonatal hypoxic-ischemic rat model. *Restor Neurol Neurosci* 2012; 30: 435-444.
102. Lobo N, Yang B, Rizvi M, *et al.* Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *J Neurosci Res* 2013; 91: 473-478.

103. Ma D, Williamson P, Januzewski A, *et al.* Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology*, 2007; 106: 746-753.
104. Hobbs C, Thorensen M, Tucker A, *et al.* Xenon and hypothermia Combine Additively, Offering Long-Term Functional and Histopathologic Neuroprotection After Neonatal Hypoxia/Ischemia. *Stroke* 2008; 39: 1307-1313.
105. Liu X, Dingley J, Scull-Brown E, Thorensen M. Adding 5 h delayed xenon to delayed hypothermia treatment improves long-term function in neonatal rats surviving to adulthood. *Pediatr Res* 2015; 77(6): 779-83.
106. Dingley J, Tooley J, Liu X, *et al.* Xenon ventilation during therapeutic hypothermia in neonatal encephalopathy: A feasibility study. *Pediatrics* 2014; 133: 809-818.
107. Azzopardi D, Robertson N, Bainbridge A, *et al.* Moderate hypothermia within 6h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2016; 15: 145-153.
108. Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, *et al.* Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 2002; 12: 488-498.
109. Meyn DF, Ness J, Ambalavanan N, *et al.* Prophylactic phenobarbital and whole-body cooling for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 2010; 157: 334-336.
110. Singh D, Kumar P, Narang A. A randomized controlled trial of phenobarbital in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2005; 18(6): 391–395.
111. Gathwala G, Marwah A, Gahlaut V, Marwah P. Effect of High-dose Phenobarbital on Oxidative Stress in Perinatal Asphyxia: An Open Label Randomized Controlled Trial. *Indian Pediatrics* 2011; 48: 613-617.
112. Sarkar S, Barks JD, Bapuraj JR, *et al.* Does phenobarbital improve the effectiveness of therapeutic hypothermia in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy? *Journal of Perinatology* 2012; 32: 15–20.
113. Forcelli PA, Janssen MJ, Vicini S, Gale K. Neonatal exposure to antiepileptic drugs disrupts striatal synaptic development. *Ann Neurol* 2012; 72(3): 363–372.

114. Bittigau P, Sifringer M, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. *Ann NY Acad Sci* 2003, 993: 103-114.
115. Stefovskaja VG, Uckermann O, Czuczwar M, *et al.* Sedative and anticonvulsant drugs suppress postnatal neurogenesis. *Ann Neurol* 2008; 64: 434-45.
116. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, *et al.* Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2003; 54: 516-522.
117. Kelen D, Robertson NJ. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev* 2010; 86:369-377.
118. Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, *et al.* Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007; 36: 17-24.
119. Kaandorp JJ, van Bel F, Veen S, *et al.* Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: Follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2012; 97: 162-166.
120. Benders MJ, Bos AF, Rademaker JB, *et al.* Early postnatal allopurinol does not improve short term outcome after severe birth asphyxia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006; 91: 163-165.
121. Torrance HL, Benders MJ, Derks JB, *et al.* Maternal allopurinol during fetal hypoxia lowers cord blood levels of the brain injury marker S-100B. *Pediatrics* 2009; 124: 350-357.
122. Kaandorp JJ, Benders MJ, Rademaker C, *et al.* Antenatal allopurinol for reduction of birth asphyxia induced brain damage (ALLO-trial); a randomized double blind placebo controlled multicenter study. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2010; 10: 8.
123. Kaandorp JJ, van den Broek MP, Benders MJ, *et al.* Rapid target allopurinol concentrations in the hypoxic fetus after maternal administration during labor. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2014; 99: F144-F148.
124. Kaandorp JJ, Benders MJ, Rademaker JB, *et al.* Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: A novel neuroprotective intervention? A multicenter randomized placebo controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100: F216-F223.

125. Nie X, Lowe D, Rollins LG, *et al.* Sex-specific effects of N-acetylcysteine in neonatal rats treated with hypothermia after severe hypoxia-ischemia. *Neuroscience Research* 2016; 108: 24-33.
126. Sheldon RA, Jiang X, Francisco C, *et al.* Manipulation of antioxidant pathways in neonatal murine brain. *Pediatr Res* 2004; 56: 656-662.
127. Ten VS, Starkov A. Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurol Res Int* 2012; 542976.
128. Paintlia MK, Paintlia AS, Barbosa E, *et al.* N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res* 2004; 78: 347-361.
129. Cakir O, Erdem K, Oruc A, *et al.* Neuroprotective effect of N-acetylcysteine and hypothermia on the spinal cord ischemia reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 2003; 11: 375-379.
130. Liu JQ, Lee TF, Chen C, *et al.* N-acetylcysteine improves hemodynamics and reduces oxidative stress in the brains of newborn piglets with hypoxia-reoxygenation injury. *J Neurotrauma* 2010; 27: 1865-1873.
131. Jatana M, Singh I, Singh AK, Jenkins D. Combination of systemic hypothermia and N-acetylcysteine attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Pediatr Res* 2006; 59: 684-689.
132. Heard K. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med* 2008; 359: 285-292.
133. Bjorkman ST, Ireland Z, Fan X, *et al.* Short-term dose response characteristics of 2-iminobiotin immediately postinsult in the neonatal piglet after hypoxia-ischemia. *Stroke* 2013; 44: 809-811.
134. van den Tweel ER, van Bel F, Kavelaars A, *et al.*, Long-term neuroprotection with 2-iminobiotin, an inhibitor of neuronal and inducible nitric oxide synthase, after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 67-74.
135. Zitta K, Peeters-Scholte C, Sommer L, *et al.* Insights into the neuroprotective mechanisms of 2-iminobiotin employing an in-vitro model of hypoxic-ischemic cell injury. *European Journal of Pharmacology* 2016; 792: 63–69.

136. Nijboer CH, Groenendaal F, Kavelaars A, *et al.* Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 282-92.
137. Pimentel-Coelho PM, Mendez-Otero R. Cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Dev* 2010; 19:299-310.
138. van Velthoven CT, Gonzalez F, Vexler ZS, Ferriero DM. Stem cells for neonatal stroke- the future is here. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:207.
139. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with als can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 2008: 1218-1221.
140. Liao Y, Cotten M, Tan S, *et al.* Rescuing the neonatal brain from hypoxic injury with autologous cord blood. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 890-900.
141. Gonzalez-Portillo GS, Reyes S, Aguirre D, *et al.* Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurol* 2014; 5:147.
142. Sun J, Allison J, McLaughlin C, *et al.* Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: A pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion* 2010; 50: 1980-1987.
143. Novak I, Walker K, Hunt RW, *et al.* Concise Review: Stem Cell Interventions for People With Cerebral Palsy: Systematic Review With Meta-Analysis. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(8): 1014-25.
144. Cotton CM, Murtha AP, Goldberg RN, *et al.* Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 2014; 164: 973-979; e971.
145. Ren C, Gao X, Niu G, *et al.* Delayed postconditioning protects against focal ischemic brain injury in rats. *PLoS ONE* 2008; 3:e3851.
146. Lim SY, Hausenloy DJ. Remote ischemic conditioning: from bench to bedside. *Front Physiol* 2012; 3:27.
147. Saxena P, Newman MA, Shehatha JS, *et al.* Remote ischemic conditioning: evolution of the concept, mechanisms and clinical application. *J Card Surg* 2010; 25:127-134.
148. Drunalini Perera PN, Hu Q, Tng J, *et al.* Delayed remote ischaemic postconditioning improves long term sensory motor deficits in a neonatal hypoxic ischemic rat model. *PLoS ONE* 2014; 9:e90258.



149. Ezzati M, Bainbridge A, Broad KD, *et al.* Limb remote ischemic post-conditioning protects cerebral white matter in a piglet model of perinatal asphyxia. *PAS* 2014; 4118.305.
150. Brevoord D, Kranke P, Kuijpers M, *et al.* Remote ischemic conditioning to protect against ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. *PloS ONE* 2012; 7:e42179.

[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)

[www.trialregister.nl](http://www.trialregister.nl)