

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Rafael Bandeira Fabres

**Efeitos da administração de progesterona e da hipotermia  
terapêutica sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o  
comportamento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia  
neonatal**

Porto Alegre

2020

Rafael Bandeira Fabres

**Efeitos da administração de progesterona e da hipotermia  
terapêutica sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o  
comportamento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia  
neonatal**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto  
Co-orientador(a), Prof. Dr. Luciano Stümer de Fraga

Porto Alegre

2020

## **Agradecimentos**

Aos meus orientadores, Dr. Carlos Alexandre Netto e Luciano Stürmer de Fraga pelos exemplos profissionais e pessoais, os quais levarei por toda minha vida.

Aos colegas do laboratório LAMEC, Laboratório de isquemia Cerebral e NeuroMet, que sempre estavam dispostos a ajudar com ideias e/ou colocando “*a mão na massa*”, foi uma honra trabalhar ao lado de cada um de vocês.

Em especial, queria agradecer aos colegas e, hoje amigos, Elaine S, Samir de S., Débora R., Jorge M., Everton, Maiza, Fabrício N., Ana Paula M., Ricardo N., Yahi M, Mirella, Isadora T., Elcyus, Eduardo S.

Ao CNPq e a CAPES, pelo apoio financeiro no decorrer destes dois anos.

Ao PPG Fisiologia por proporcionar excelente formação e construção de conhecimentos aos seus alunos.

A minha família pelo amor, apoio e paciência incondicionais.

E a minha companheira, Daniele B., por ser uma das principais incentivadoras para eu ir atrás de meus sonhos

## **Apresentação**

Esta tese é constituída por:

### **PARTE I:**

1. Introdução: contém o embasamento teórico necessário para a compreensão da proposta de trabalho e objetivos.
2. Hipótese: expõe os principais resultados esperados.
3. Objetivos: definem os propósitos centrais do trabalho, desenvolvidos ao longo dos capítulos 1 e 2.

### **PARTE II:**

Capítulo 1: Artigo publicado no periódico Cellular and Molecular Neurobiology – “Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia”.

Capítulo 2: Artigo submetido ao periódico Brain Research – Therapeutic hypothermia for the treatment of neonatal hypoxia-ischemia: sex-dependent modulation of astrocyte reactivity

### **PARTE III:**

Discussão Geral: contém a interpretação dos resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, englobando-os em um contexto geral.

Conclusões: apresenta as conclusões gerais da tese.

Referências: lista as referências citadas nas seções Introdução e Discussão.

## **Lista de figuras**

- Figura 1.** Ilustração da circulação sanguínea encefálica em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal dentro de um período de 24 horas.....12
- Figura 2.** Ilustração do mecanismo de evolução da lesão neural na fase primária, fase latente, fase secundária e fase terciária.....16
- Figura 3.** Um diagrama das vias de sobrevivência e apoptose moduladas pela Akt.....87

## Lista de abreviaturas

HI: Hipóxia-isquemia

ATP: Adenosina trifosfato

TNF: Fator de necrose tumoral

IL: Interleucina

PI3K: fosfoinositídeo-3-cinase

HT: Hipotermia terapêutica

EEG: Eletroencefalografia

PROG: Progesterona

Bad: Proteína de morte associada ao Bcl-2

SNC: Sistema Nervoso Central

OPCs: Células progenitoras de oligodendrócitos

BHE: Barreira hematoencefálica

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

AIF: Fator indutor de apoptose

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear  $\kappa$ -B

GABA: Ácido gama-aminobutírico

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos

CA1: *Corno de Ammon-1*

TLRs: Receptores *Toll-like*

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>1.1 Modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal</b> .....	11
<b>1.2 Fisiopatologia da HI</b> .....	13
<b>1.3 Astrogliose no modelo de HI neonatal</b> .....	16
<b>1.4 Dimorfismo sexual</b> .....	20
<b>1.5 Hipotermia terapêutica</b> .....	20
<b>1.6 Progesterona</b> .....	24
<b>1.6 Hipótese</b> .....	28
<b>2. Objetivos</b> .....	30
<b>2.1 Geral</b> .....	30
<b>2.1. Específicos</b> .....	30
<b>3. Capítulo I</b> .....	31
<b>4. Capítulo II</b> .....	45
<b>5 Discussão</b> .....	81
<b>5.1 A PROG tem efeitos de longa duração em animais neonatais submetidos ao modelo de HI</b> .....	82
<b>5.2 A janela terapêutica da hipotermia é a mesma para ambos os sexos?</b> .....	89
<b>5.3 A hipotermia modula a astrogliose</b> .....	92
<b>5.4 A PROG pode ser uma alternativa para o tratamento após a fase latente?</b> .	93
<b>6 Conclusão</b> .....	95
<b>7 Perspectivas</b> .....	96
<b>8 Referências</b> .....	97

## Resumo

A hipóxia-isquemia (HI) neonatal moderada a grave afeta 1–3 a cada 1.000 nascidos a termo e continua sendo uma causa significativa de deficiência do neurodesenvolvimento de longo prazo. A morbidade neurológica nos sobreviventes envolve dificuldades de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral. O uso de hipotermia é a única terapia utilizada na clínica, no entanto, o tratamento deve ser iniciado dentro de uma janela terapêutica de 6h após o evento hipóxico-isquêmico. Os efeitos neuroprotetores da hipotermia terapêutica experimental iniciada em momentos distintos após a HI, bem como a provável influência do dimorfismo sexual sobre tais efeitos ainda não foram elucidados. A eficácia de potenciais agentes neuroprotetores tem sido testada em modelos animais. Há razão para se pensar que a progesterona tem um forte potencial para o tratamento da HI neonatal, já que a sua utilização tem se mostrado benéfica em pesquisas relacionadas à lesão cerebral traumática, lesão cerebral isquêmica e outros modelos de lesão do sistema nervoso central em adultos. Essa Tese tem como objetivos avaliar os efeitos da administração de progesterona e da hipotermia terapêutica sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o neurodesenvolvimento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. No primeiro capítulo da Tese avaliamos o efeito da progesterona em animais machos neonatais submetidos ao modelo de HI neonatal. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: SHAM, HI, HI+PROG-PRÉ (PRÉ), HI+PROG-PÓS (PÓS), HI+PROG-PRÉ/PÓS (PP). Os termos PRÉ e PÓS referem-se à administração de progesterona (na dose de 5 mg/kg) antes ou após o procedimento de HI neonatal. Dependendo do grupo experimental, os animais foram tratados com progesterona imediatamente antes da isquemia e/ou 6 e 24 horas após o início da hipóxia. Foram analisados volume de lesão do hemisfério e do hipocampo ipsilateral à lesão, além de células degenerativas nas áreas CA1 e hilo do hipocampo, como também a expressão das proteínas Akt, caspase-3 e GFAP. Neste capítulo foi possível observar neuroproteção da administração da progesterona quando administrada 6 e 24h após a lesão, reduzindo todos as propriedades analisadas em comparação ao grupo HI sem tratamento. No segundo capítulo avaliamos os efeitos da hipotermia terapêutica experimental em animais submetidos ao modelo de HI neonatal de ambos os sexos em diferentes janelas terapêuticas. Animais machos e fêmeas foram tratados por hipotermia (32°C) por 5h, o começo do tratamento foi distinto para cada grupo: 2h, 4h, e 6h após a lesão. Após 7 dias da lesão os animais foram a testes comportamentais e foram avaliados o volume de lesão no hemisfério, hipocampo e córtex cerebral, além de células degenerativas e astrogliose no hipocampo. Neste capítulo foi observado que os efeitos da hipotermia terapêutica podem ser dependentes tanto do momento de início do tratamento como do sexo dos animais. A HT iniciada 2h após a HI causou redução da lesão neural e dos tempos de latência nos testes comportamentais em ratos de ambos os sexos. Também foi possível ver um efeito na astrogliose dependente do sexo, uma vez que apenas fêmeas que iniciaram o tratamento 2h após o início da lesão apresentaram redução dos parâmetros morfológicos de astrogliose. No entanto, quando o tratamento tinha início ao final da janela terapêutica (6h), as fêmeas apresentavam aumento de células degenerativas e do tempo de latência em comparação ao grupo submetido ao modelo, mas sem tratamento. Os resultados na presente tese sugerem que a progesterona é um potencial candidato para o tratamento da HI neonatal, por ter produzido melhoras mesmo quando administrada após 6h da lesão; já os efeitos da hipotermia são dependentes do tempo de início do tratamento e do sexo dos animais.

**Palavras-chave:** hipóxia-isquemia neonatal (HI); progesterona; hipotermia terapêutica; janela terapêutica, astrogliose.

## Abstract

Moderate to severe neonatal hypoxia-ischemia (HI) affects 1–3 per 1,000 full-term births and remains a significant cause of long-term neurodevelopmental deficiency. Neurological morbidity in survivors involves learning disabilities, epilepsy and cerebral palsy. The use of hypothermia is the only therapy used in the clinic, however, treatment must be started within a therapeutic window of 6 hours after the hypoxic-ischemic event. The neuroprotective effects of experimental therapeutic hypothermia initiated at different times after IH, as well as the likely influence of sexual dimorphism on such effects have not yet been elucidated. The effectiveness of potential neuroprotective agents has been tested in animal models. There is reason to think that progesterone has a strong potential for the treatment of neonatal HI, since its use has been shown to be beneficial in research related to traumatic brain injury, ischemic brain injury and other models of central nervous system injury in adults. This Thesis aims to evaluate the effects of progesterone administration and therapeutic hypothermia on neural injury, astrocytic reactivity and neurodevelopment in Wistar rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. In the first chapter of the Thesis we evaluated the effect of progesterone in neonatal male animals submitted to the neonatal HI model. The animals were divided into five experimental groups: SHAM, HI, HI + PROG-PRE (PRE), HI + PROG-POST (POST), HI + PROG-PRE / POST (PP). The terms PRE and POST refer to the administration of progesterone (at a dose of 5 mg / kg) before or after the neonatal HI procedure. Depending on the experimental group, the animals were treated with progesterone immediately before ischemia and / or 6 and 24 hours after the onset of hypoxia. Lesion volume of the hemisphere and hippocampus ipsilateral to the lesion were analyzed, as well as degenerative cells in the CA1 and hilum areas of the hippocampus, as well as the expression of the Akt, caspase-3 and GFAP proteins. In this chapter, it was possible to observe neuroprotection of progesterone administration when administered 6 and 24h after the injury, reducing all the properties analyzed in comparison to the HI group without treatment. In the second chapter, we evaluated the effects of experimental therapeutic hypothermia in animals submitted to the neonatal HI model of both sexes in different therapeutic windows. Male and female animals were treated by hypothermia (32°C) for 5h, the beginning of treatment was different for each group: 2h, 4h, and 6h after the injury. After 7 days of the injury, the animals underwent behavioral tests and the volume of injury in the hemisphere, hippocampus and cerebral cortex was evaluated, in addition to degenerative cells and astrogliosis in the hippocampus. In this chapter it was observed that the effects of therapeutic hypothermia can be dependent both on the time of initiation of treatment and on the sex of the animals. HT initiated 2h after HI caused a reduction in neural injury and latency times in behavioral tests in rats of both sexes. It was also possible to see an effect on sex-dependent astrogliosis, since only females who started treatment 2h after the beginning of the lesion showed a reduction in the morphological parameters of astrogliosis. However, when treatment started at the end of the therapeutic window (6h), females had increased degenerative cells and latency time compared to the group submitted to the model, but without treatment. The results in the present thesis suggest that progesterone is a potential candidate for the treatment of neonatal HI, as it produced improvements even when administered 6 hours after the injury; the effects of hypothermia, on the other hand, are dependent on the time the treatment started and the sex of the animals.

**Keywords:** neonatal hypoxia-ischemia (HI); progesterone; therapeutic hypothermia; therapeutic window, astrogliosis.

## 1. Introdução

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, ou apenas hipóxia-isquemia (HI), é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças (Knox et al., 2013). A HI ocorre em cerca de 0,2% dos recém-nascidos, sendo que 60% destes são prematuros. Quando sobrevivem, 25% apresentam deficiências neuropsicológicas permanentes, como dificuldade de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral (McQuillen and Ferriero, 2006). As causas da HI, em sua maioria, ocorrem durante a gestação, porém podem ocorrer também no momento e após o nascimento (Douglas-Escobar and Weiss, 2013).

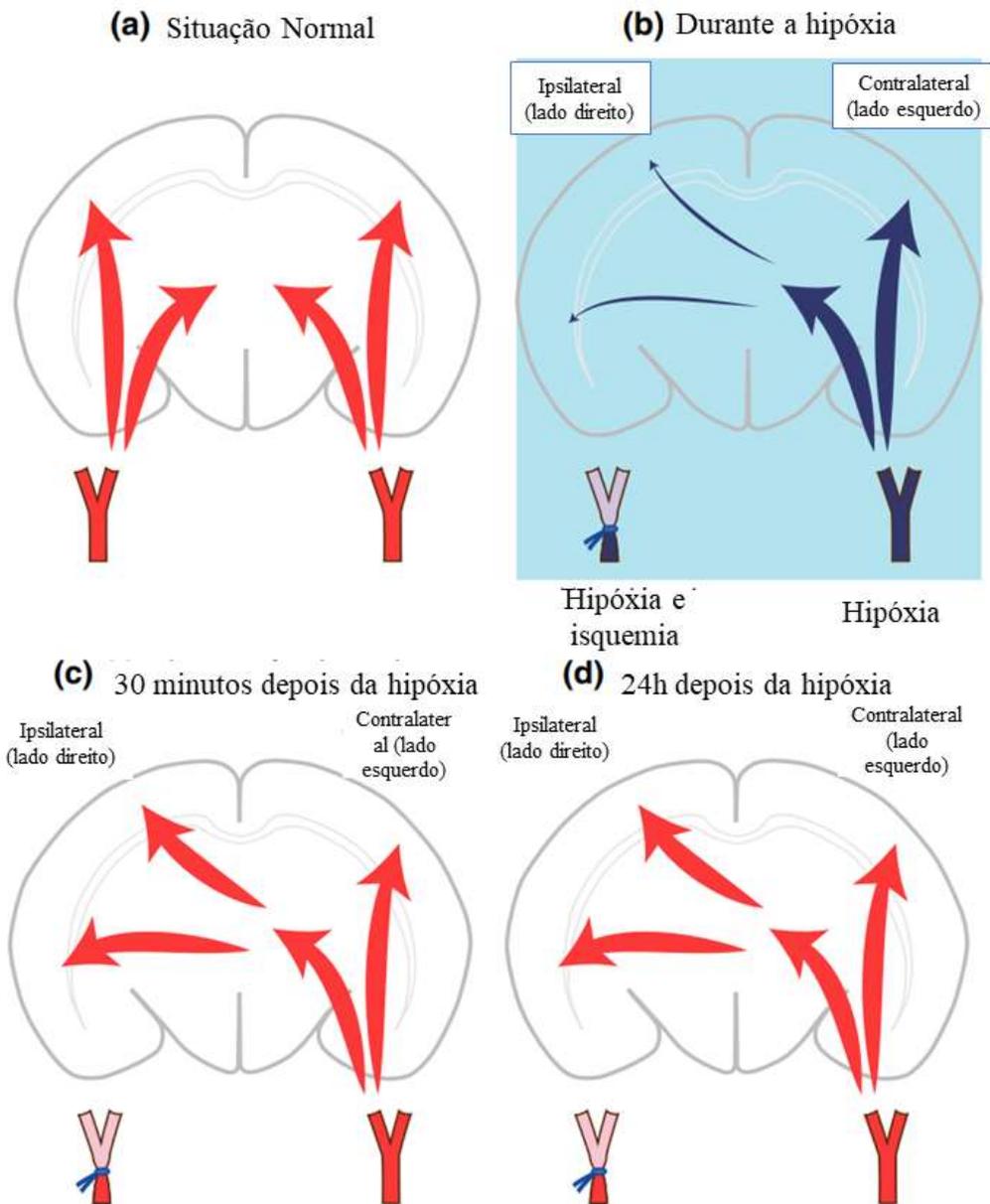
Segundo estudos clínicos, 20% dos casos de HI são causados por insulto anteparto; em 35% por distúrbios maternos, como diabetes, retardo de crescimento intrauterino e infecções; já 10% dos casos são causados por eventos pós-natais; e em 35% dos casos a HI surge em decorrência de problemas durante o trabalho de parto (Silveira and Procianoy, 2015).

A compreensão da fisiopatologia da HI neonatal é essencial para a concepção de intervenções eficazes para os recém-nascidos que sofrem eventos hipóxico-isquêmicos encefálicos (Vannucci and Hagberg, 2004), já que há poucas opções terapêuticas para o tratamento da HI (Ferriero, 2004). A única terapia bem estabelecida atualmente para a HI em neonatos nascidos a termo é a hipotermia terapêutica (HT). No entanto, a HT é apenas parcialmente protetora, reduzindo a taxa combinada de morte e de deficiências graves aos 18 meses de vida em torno de 11% (Cho et al., 2020). Além disso, ainda se estima um resultado adverso em 45% dos casos nos quais a hipotermia é utilizada. Devido a isso, a eficácia de outras abordagens neuroprotetoras têm sido testada em modelos animais (Rees et al., 2011).

## **1.1 Modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal**

Modelos experimentais tentam reproduzir as lesões do sistema nervoso central (SNC) encontradas em recém-nascidos humanos acometidos por HI (Johnston et al., 2001; Rice et al., 1981). Para a padronização de um melhor modelo experimental, estudos também têm observado certas semelhanças na maturação encefálica de ratos de 7 dias de idade com bebês recém-nascidos a termo (Rice et al., 1981). Utilizando o modelo animal de HI de Rice e Vannucci (Figura 1) é possível observar danos encefálicos semelhantes aos encontrados em recém-nascidos a termo acometidos por HI neonatal (Vannucci, 1990).

O modelo consiste na associação da oclusão unilateral de uma das artérias carótidas comuns com a exposição a uma atmosfera hipóxica (geralmente 8% de oxigênio) para produzir dano cerebral unilateral. Os danos podem variar desde morte neuronal, por necrose e/ou apoptose, infarto tecidual generalizado ou até uma combinação de ambos (Johnston et al., 2001; Rice et al., 1981). A lesão ocasionada por este modelo é normalmente restrita ao hemisfério ipsilateral à ligadura carotídea e é observada principalmente no córtex cerebral, na substância branca periventricular, no estriado, no tálamo e no hipocampo. Esses danos são raramente observados no hemisfério contralateral (Vannucci and Hagberg, 2004).



**Figura 1.** A figura "a" apresenta a situação normal, com fluxo sanguíneo através de ambas artérias carótidas comuns. Em "b", a artéria carótida comum direita está ocluída permanentemente. No entanto, a oclusão não causa dano cerebral por si só. Entretanto, quando o animal é submetido à hipóxia, a combinação entre oclusão da carótida e hipóxia leva a uma redistribuição do fluxo sanguíneo cerebral. O fluxo sanguíneo no hemisfério cerebral contralateral à oclusão não sofre mudanças significativas, enquanto o córtex parietal e frontal, bem como a substância branca subcortical ipsilateral à oclusão, recebem apenas 15-20% do fluxo sanguíneo. Assim, o hemisfério ipsilateral à isquemia está sujeito à hipóxia e isquemia, enquanto o hemisfério contralateral à oclusão está sujeito apenas à hipóxia. Quando a hipóxia termina, o fluxo sanguíneo é restabelecido, e 30 minutos após a hipóxia (c) o hemisfério ipsilateral à isquemia tem fluxo sanguíneo igual em comparação com o hemisfério contralateral à oclusão, ou seja, é perfundido novamente e a isquemia é encerrada. Este fluxo sanguíneo é mantido pelo menos até 24 horas após a hipóxia (d). Adaptado de Brekke e colaboradores (Brekke et al., 2017).

## 1.2 Fisiopatologia da HI

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro*, e observações clínicas permitiram desenvolver conhecimento sobre a fisiopatologia do evento HI; o entendimento é de que não se trata de um único "evento", mas de um processo evolutivo que leva à morte celular retardada (Figura 2) (Davidson et al., 2015). Durante o período imediato de HI (a fase "primária" da lesão), a deterioração do estado energético está associada à redução da síntese de ATP, prejudicando o equilíbrio iônico através da membrana celular, invertendo as concentrações iônicas e gerando edema cerebral (Korc et al., 1995; Prandini et al., 2005). Em função desta diminuição da concentração de ATP, há uma dificuldade em manter a atividade das bombas iônicas, como a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, levando a uma despolarização da célula que causa uma massiva liberação de neurotransmissores, especialmente do aminoácido excitatório glutamato (du Plessis and Johnston, 1997; E F Sanches et al., 2013). Durante o evento hipóxico, os neurônios pós-sinápticos que respondem a glutamato são ativados pela maior entrada de cálcio devido à despolarização (Delivoria-Papadopoulos and Mishra, 1998), e ocorre acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica devido à falha da recaptação pelos astrócitos e à liberação excessiva mediada pela despolarização (Davidson et al., 2015).

Embora possa haver morte neuronal durante um período suficientemente prolongado de isquemia ou asfixia, muitos neurônios podem se recuperar do insulto, ao menos parcialmente, em um período conhecido como "fase latente", que normalmente se estende ao longo das primeiras 6 horas após a lesão (Cho et al., 2020). Estudos mostraram que neonatos com evidências de asfixia moderada a grave apresentam recuperação transitória do metabolismo oxidativo cerebral após o nascimento, seguida por deterioração secundária com insuficiência energética cerebral entre 6 a 15 horas após o nascimento (Azzopardi et al., 1989).

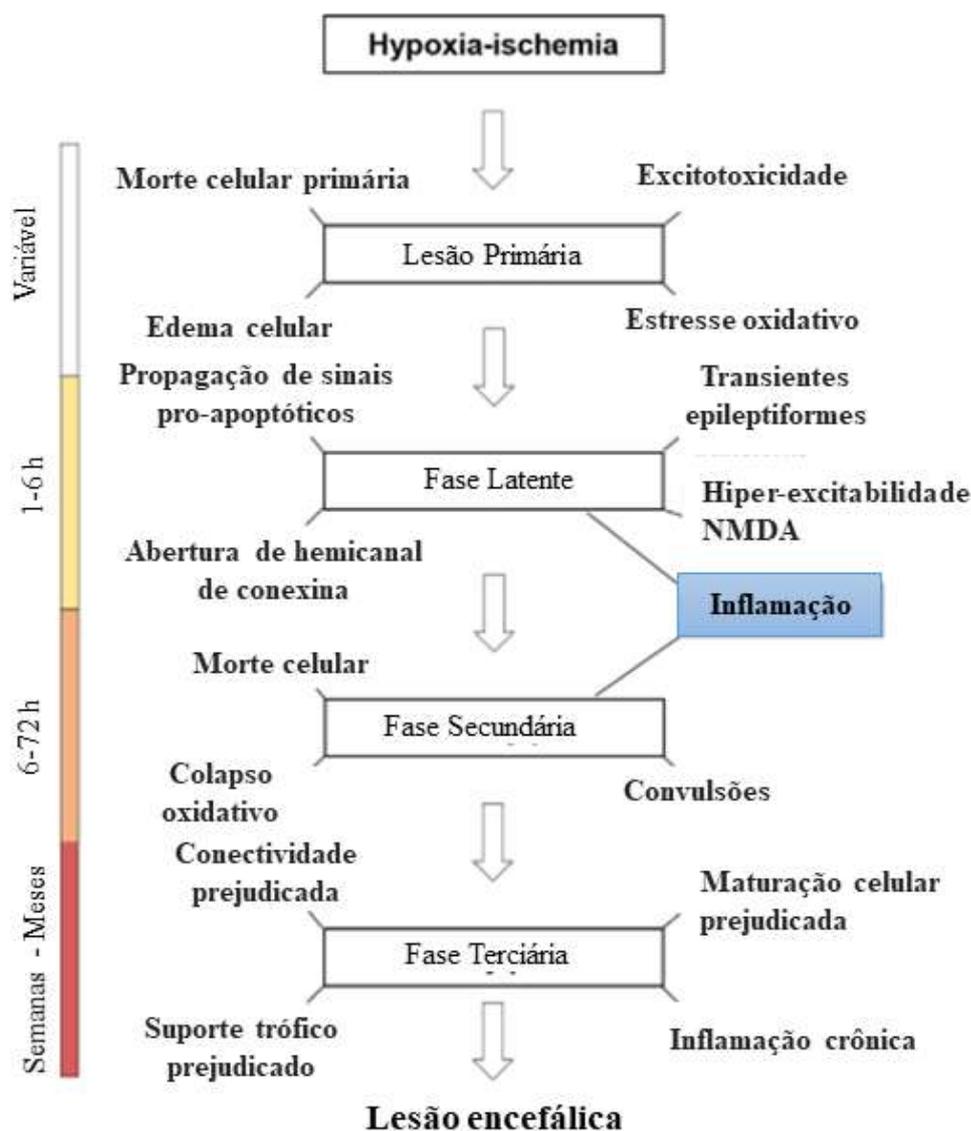
A gravidade da fase secundária está intimamente relacionada com o neurodesenvolvimento avaliado no primeiro e no 4º anos de vida, e neonatos com encefalopatia que não apresentaram recuperação inicial do metabolismo oxidativo cerebral tiveram piora em seus resultados (Azzopardi et al., 1989). Um padrão idêntico de recuperação inicial do metabolismo oxidativo cerebral seguido por falha energética ("secundária") também é visto após a HI em modelos animais de diversas espécies como porcos, ratos e ovelhas, e está intimamente relacionado à gravidade da lesão neuronal (Bennet et al., 2006; Blumberg et al., 1997; Lorek et al., 1994). O momento da falha energética após a HI está estreitamente associado ao aparecimento de dano cerebral, o que pode ser interpretado como um aumento da morte celular em andamento (Davidson et al., 2015).

Após a morte celular durante a fase secundária, há uma fase terciária de reparo e reorganização. Durante este período, o desenvolvimento de novas células e a "reconfiguração" dos circuitos neuronais sobreviventes são estimulados. Ao mesmo tempo, há evidências de que em alguns ambientes a apoptose fisiológica pode ser regulada positivamente, prejudicando a maturação e a sobrevivência de novas células em longo prazo (Cho et al., 2020; Marín-padilla, 1997). Os mecanismos precisos que contribuem para o desenvolvimento prolongado da lesão não são totalmente conhecidos, mas envolvem inflamação crônica e alterações epigenéticas (Davidson et al., 2015). A reação inflamatória tem início com a infiltração de leucócitos periféricos, indução microglial local e astrogliose (Xiong et al., 2009). Astrócitos reativos liberam citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a IL-6 por meio de um mecanismo que pode resultar em ação modulatória sustentada em neurônios vizinhos (Davidson et al., 2015; Xiong et al., 2009).

A regulação da proliferação celular e de vias apoptóticas associadas à morte celular é uma abordagem importante para o entendimento do evento hipóxico-isquêmico. PI3K/Akt/mTOR são cinases ativadas por muitos estímulos celulares e regulam funções celulares fundamentais, incluindo transcrição, tradução, proliferação, crescimento e sobrevivência (Asati et al., 2016). A ativação da PI3K por citocinas promove a fosforilação da Akt nos resíduos T308 e S473 (Calautti et al., 2005). A Akt ativada também impede a liberação de cálcio da mitocôndria, um processo importante para a apoptose (Asati et al., 2016).

A ativação da Akt estimula substratos envolvidos na sobrevivência celular e inibe substratos pró-apoptóticos, como Bad e caspase-9, inibindo as vias de apoptose e contribuindo para a sobrevivência celular (Cardone et al., 1998; Kim et al., 2007; Nair and Olanow, 2008).

A maioria dos estudos sobre o envolvimento da proteína Akt na lesão isquêmica observou algum grau de alteração na fosforilação dessa enzima, nos mais variados períodos após a lesão. Os processos de fosforilação/desfosforilação são mecanismos regulatórios que levam à ativação/inativação da Akt (Kitagawa et al., 2002a). Entretanto, outra forma de inativação da enzima é sua clivagem pela caspase-3, que anula os efeitos anti-apoptóticos da Akt (François and Grimes, 1999). A ativação da Akt promove sobrevivência através de diferentes ações celulares. Uma ação que pode mediar os efeitos neuroprotetores da Akt durante eventos hipóxicos é o aumento da captação de glicose pelas células afetadas (Li et al., 2015).



**Figura 2.** Mecanismos de evolução da lesão neural na fase primária, fase latente, fase secundária e fase terciária que contribuem para a geração de danos cerebrais e incapacidade a longo prazo. Adaptado de Cho e colaboradores (Cho et al., 2020).

### 1.3 Astrogliose no modelo de HI neonatal

Os astrócitos são o tipo celular mais abundante do SNC, com capacidade de modular o ambiente metabólico e iônico dos neurônios, além de ter funções importantes no tecido neurovascular. Os astrócitos também possuem papel importante no fornecimento aos neurônios de uma fonte renovável de neurotransmissores (Gordon et al., 2008; Mishra et al., 2016). Os astrócitos interagem com as células neurais e não

neurais, incluindo neurônios e suas sinapses, oligodendrócitos, células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs), microglia, várias células perivasculares, fibroblastos meníngeos e células imunes circulantes (Sofroniew, 2020). Quando um dano ou doença afeta o SNC, são desencadeadas respostas multicelulares coordenadas que envolvem células da glia, neurônios e células não neurais (M. V. Sofroniew, 2015).

Embora os principais efetores da inflamação do SNC sejam leucócitos circulantes derivados da medula óssea, há um reconhecimento crescente de que as células intrínsecas do SNC têm papéis essenciais no recrutamento, instrução e retenção destes leucócitos em locais do SNC que sofreram insultos. Entre as células intrínsecas do SNC, as células microgliais estão estabelecidas como sensores precoces de dano (Prinz and Priller, 2014). Além disso, os astrócitos podem exercer funções pró-inflamatórias potentes ou funções anti-inflamatórias cruciais para a neuroproteção, dependendo do tipo específico de sinalização (M. V. Sofroniew, 2015).

Astrócitos em tecido saudável expressam muitos receptores para padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a danos ou perigo, que são conhecidos por desencadear respostas imunes inatas (Gong et al., 2020), em particular receptores Toll-like (TLRs), incluindo o TLR4 (Gong et al., 2020).

Entretanto, além de suas funções no SNC saudável (sem lesão), os astrócitos exibem uma resposta evolutivamente antiga à lesão e à doença do SNC, comumente referida como reatividade astrocitária, que por muito tempo foi considerada homogênea e funcionalmente passiva (Plog and Nedergaard, 2018; Sofroniew and Vinters, 2010). Atualmente, a literatura mostra que os astrócitos reativos podem responder a diversos sinais moleculares que derivam de muitos tipos de células, incluindo neurônios, outras células da glia, células estromais locais, e proteínas séricas, bem como células imunes

transportadas pelo sangue, além de moléculas associadas a distúrbios metabólicos de outros tecidos (Sofroniew, 2020).

Durante o processo de astrogliose, os astrócitos envolvem o tecido danificado que contém infiltração de leucócitos, proliferação de células estromais e fibrose após trauma, isquemia, infecção, inflamação autoimune, acúmulo de toxinas, vazamento da barreira hematoencefálica (BHE) ou doença neurodegenerativa (Sofroniew, 2020).

Além disso, durante a astrogliose há possibilidade de liberação de diversas moléculas que afetam as células próximas de todos os tipos de muitas maneiras distintas. Há evidências clínicas e experimentais acumuladas de que disfunções de astrócitos e astrogliose, seja por perda de funções benéficas ou ganho inadequado de efeitos prejudiciais, têm o potencial de contribuir para ou serem as principais causas de distúrbios do SNC, levando à noção de astrocitopatias (M. V Sofroniew, 2015).

Estudos com roedores já demonstraram que os astrócitos localizados na substância cinzenta do hipocampo e do córtex cerebral apresentam morfologia complexa (Nedergaard et al., 2003). Por exemplo, astrócitos nestas regiões podem envolver milhares de sinapses individuais (Fields et al., 2015; Halassa et al., 2009, 2007) e uma infinidade de vasos sanguíneos do parênquima (Iadecola and Nedergaard, 2007), sendo células-chave para a modulação da atividade sináptica e a regulação do fluxo sanguíneo local, permitindo ajustar o fluxo sanguíneo cerebral aos níveis de atividade neuronal (Sheikhabaei et al., 2018). Embora o significado funcional desses arranjos astrocitários complexos não tenha sido definitivamente estabelecido, sugere-se que a sua morfologia esteja intimamente relacionada ao seu papel na função encefálica (Nedergaard et al., 2003; Sheikhabaei et al., 2018).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é um componente vital do citoesqueleto dos astrócitos durante o desenvolvimento do encéfalo (Middeldorp and Hol, 2011). A GFAP é essencial para o funcionamento dos astrócitos, principalmente na formação da barreira hematoencefálica e na regulação das atividades do SNC em desenvolvimento (Tripathi et al., 2017), além de desempenhar papel benéfico, estimulando as interações neurônio-glia e regulando a transdução sináptica (Albee and Michael, 2003; Middeldorp and Hol, 2011).

Por outro lado, a mudança nos níveis de GFAP altera o funcionamento dos astrócitos com consequências prejudiciais aos neurônios circundantes (Tripathi et al., 2017). Dessa forma, a astrogliose torna-se prejudicial, impedindo a plasticidade neural e, portanto, o crescimento do encéfalo (Pekny and Pekna, 2015). O aumento da expressão de GFAP e a hipertrofia glial estão associados a uma gama de patologias do SNC, incluindo trauma, isquemia e neurodegeneração (Middeldorp and Hol, 2011). O aumento da expressão de GFAP também induz astrogliose, agravando distúrbios neurológicos inflamatórios e a lesão cerebral (Williams et al., 2001). Portanto, a expressão de GFAP e a morfologia astrocitária são variáveis importantes para entender o funcionamento do astrócito.

Estudos sugerem que o aumento da expressão GFAP em modelos de lesão aumentam a expressão da caspase-3 (Aras et al., 2012). No entanto, um estudo mostrou que a via da Akt induzida por FABP7 é essencial para o desenvolvimento glial e facilita a gliogênese em linhagens gliais anormais (Hegedus et al., 2007). Estudo anterior de nosso grupo mostrou que Akt-p (Akt fosforilada) pode regular negativamente a expressão de GFAP. Portanto, o aumento da expressão da Akt-p poderia levar à redução da expressão da caspase-3 de forma direta, além de reduzir a expressão da GFAP, podendo levar a uma redução da caspase-3 de forma indireta (Fabres et al., 2020).

#### **1.4 Dimorfismo sexual**

As diferenças do sexo em resposta à hipóxia já foram demonstradas em recém-nascidos prematuros humanos e em roedores nos períodos pré-natal e pós-natal (Burnsed et al., 2015). Estudos experimentais com animais de ambos os sexos descreveram diferenças no metabolismo basal e na expressão e atividade das enzimas mitocondriais (Brekke et al., 2017; Dukhande et al., 2009), com as fêmeas apresentando maior atividade de transporte de elétrons mitocondrial do que os machos (Weis et al., 2012). Além disso, estudos recentes com humanos e animais adultos indicam que o sexo pode ser um modulador da morte de células isquêmicas cerebrais: há evidências de que tanto a vulnerabilidade para o dano cerebral HI quanto os mecanismos de morte celular após a HI diferem entre os sexos (Netto et al., 2017).

Foi recentemente demonstrado em ratos submetidos à HI neonatal que uma translocação mais pronunciada do fator indutor de apoptose (AIF) ocorreu em machos, enquanto a caspase-3 foi mais ativada em fêmeas (Zhu et al., 2006). A diferença sexual em modelos experimentais de lesão encefálica pode ter influência em mecanismos apoptóticos dependentes de caspase: liberação de citocromo C da mitocôndria e subsequente ativação da caspase-3, culminando em aumento da apoptose (Netto et al., 2017). Como consequência, o dimorfismo sexual pode ser um fator determinante no desenvolvimento de novos tratamentos para a HI neonatal.

#### **1.5 Hipotermia terapêutica**

Há mais de uma década surgiram evidências experimentais e, posteriormente, estudos clínicos, sugerindo que a HT pode reduzir a lesão encefálica, e assim melhorar o desfecho neurológico, em recém-nascidos, após a HI (Silveira and Procianoy, 2015).

Nas décadas de 1950 e 1960, Miller e Westin estudaram a base fisiológica do papel neuroprotetor da hipotermia no tratamento da “asfixia neonatal”, primeiro em animais neonatos e depois em recém-nascidos humanos. Eles e outros demonstraram melhora na sobrevivência, sem paralisia cerebral ou retardo mental, nos recém-nascidos apneicos que foram resfriados rapidamente para 23°C a 32°C após o parto, quando as técnicas convencionais de ressuscitação falharam. Apesar de seus resultados, a hipotermia não se tornou uma terapia aceita no cuidado neonatal, em parte porque nunca foi avaliada por ensaios clínicos randomizados (Blackmon et al., 2006).

Ainda na década de 1960, a parada circulatória hipotérmica (temperatura central de 18–20°C) foi introduzida para facilitar o reparo de cardiopatias congênitas complexas (Kirklin et al., 1961). Essa técnica permitiu o reparo precoce de alterações e, portanto, menos morbidade cardíaca na primeira infância. Logo a técnica foi amplamente adotada, embora a duração da isquemia aceita para que o tratamento fosse iniciado sem ter chances de efeito que intensificasse a lesão no SNC não foi estabelecida. A heterogeneidade das lesões e a falta de uniformidade dos procedimentos operatórios e da duração da parada circulatória dificultaram conclusões sobre a segurança do tratamento com hipotermia (Blackmon et al., 2006).

A patogênese da lesão neural de um insulto hipóxico-isquêmico foi melhor definida e mecanismos tecnicamente aplicáveis para resfriar neonatos foram desenvolvidos. Reduções na temperatura do encéfalo entre 2°C e 5°C fornecem neuroproteção em modelos animais recém-nascidos e adultos de isquemia cerebral (Cho et al., 2020; Gunn et al., 1997; Sabir et al., 2012; Shankaran et al., 2005). A temperatura alvo de 33,5°C foi selecionada com base em estudos em animais que mostraram atenuação da lesão cerebral nesta temperatura sem os efeitos adversos (por exemplo, lesão miocárdica) que ocorrem em temperaturas mais baixas (Weinrauch; et al., 1992). O

resfriamento do encéfalo tem um efeito redutor da fatores que contribuem para a lesão cerebral, incluindo aminoácidos excitatórios, o estado de energia cerebral, fluxo sanguíneo cerebral e metabolismo, produção de óxido nítrico e apoptose (Shankaran et al., 2005).

A proteção parcial, e não total, com os atuais protocolos de hipotermia encontrados em estudos clínicos está em grande parte relacionada às dificuldades clínicas envolvidas para que se possa iniciar a hipotermia dentro da janela de oportunidade ideal ou janela terapêutica. Os protocolos clínicos atuais recomendam que, para recém-nascidos com HI moderada a grave, a hipotermia deve ser iniciada nas primeiras 6 horas de vida com uma temperatura entre 33-34°C, e continuada por 72h (Cho et al., 2020).

Já estudos pré-clínicos utilizando fetos de ovelha mostraram que, quando a hipotermia é iniciada na fase latente, em 90 minutos ou 3h após o final da isquemia, a morte de neurônios e de oligodendrócitos é reduzida e a atividade cerebral retorna aos níveis basais encontrados em animais controle, que não foram submetidos à HI (Bennet et al., 2006; Rutherford et al., 2010). No entanto, quando o tratamento é iniciado ao final da fase latente, em torno de 5,5h após a isquemia, é observada apenas uma melhora parcial na sobrevida neuronal e na recuperação da atividade no eletroencefalograma (EEG), sem melhora na sobrevida dos oligodendrócitos (Fleiss and Gressens, 2012; Vannucci et al., 2004). Se a HT for adiada para 8,5h após o fim da isquemia, o tratamento não mais se associa a qualquer melhora na sobrevivência celular ou recuperação da atividade do EEG (Fleiss and Gressens, 2012). Logo, é importante ressaltar que há evidências consistentes de que a hipotermia iniciada o mais cedo possível na fase latente melhora seus efeitos neuroprotetores em animais submetidos à HI neonatal (Sabir et al., 2012).

Ademais, existem poucos estudos publicados sobre o efeito da HT iniciada tardiamente após HI de gravidades diferentes, e ainda menos estudos que questionam se a HT pode aumentar a lesão se iniciada tardiamente (Sabir et al., 2012; Taylor et al., 2002). Ainda, em estudos experimentais com fetos de ovelha, a extensão da duração da hipotermia para 120h foi associada a sobrevida neuronal prejudicada em algumas regiões, em comparação com 72h de HT. Os resultados dos estudos que utilizam HT como tratamento para animais submetidos ao modelo de HI neonatal podem apresentar resultados distintos por haver diferenças de espécie, idade, intensidade de lesão e diferença de sexo entre os estudos realizados (Burnsed et al., 2015; Sabir et al., 2012; Smith et al., 2015, 2016).

Os mecanismos de proteção que fundamentam a HT são multifatoriais (Wassink et al., 2018). A neuroproteção produzida pela hipotermia após HI grave está intimamente associada à supressão de processos apoptóticos e necróticos, provavelmente por meio da redução da permeabilidade mitocondrial e ativação reduzida de vias extrínsecas de morte celular (Cho et al., 2020). A hipotermia também pode ter efeitos que reduzem propriedades excitatórias no SNC, conforme mostrado pela restauração da expressão (reduzida por isquemia) do mRNA do GluR2, a subunidade que limita o influxo de íons de cálcio por meio do receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico (AMPA) e, portanto, sugerindo que a hipotermia pode ajudar a prevenir a excitação excessiva (Colbourne et al., 2002).

Um mecanismo chave da proteção da HT é a imunossupressão. A hipotermia após a HI tem característica de inibir a ativação microglial e a indução de citocinas pró-inflamatórias (Wassink et al., 2018, 2014). A hipotermia também pode suprimir a translocação e a ligação dos principais fatores de transcrição da inflamação, incluindo o

fator nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B), a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$  após isquemia transitória focal (Han et al., 2003).

No entanto, estudos clínicos e ensaios experimentais mostraram que a hipotermia não é neuroprotetora em todos os casos de HI moderada, e também não mostra efeitos benéficos em casos de HI grave (Sabir et al., 2012; Silveira and Procianoy, 2015; Wood et al., 2016). Portanto, é necessário o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento baseadas na fisiopatologia do evento hipóxico-isquêmico.

### **1.6 Progesterona**

Os mecanismos moleculares que ativam a cascata de lesão isquêmica no encéfalo adulto são semelhantes aos encontrados pela HI encefálica em animais neonatos (Peterson et al., 2015). Ambos os modelos de lesão encefálica, adulta e neonatal, produzem edema cerebral, infiltração de macrófagos e ativação microglial e aumento de astrogliose, o que pode levar a uma resposta inflamatória exacerbada, excitotoxicidade e morte celular (Sayeed et al., 2009). À medida que a cascata de lesão progride, pode ocorrer desmielinização, geração de radicais livres e indução de apoptose, o que significa mais danos e, conseqüentemente, morte celular (PETERSON et al., 2015).

A progesterona (PROG) pode amenizar a lesão cerebral ao afetar muitos mecanismos diferentes para prevenir danos imediatos e de longo prazo. O conceito de que os esteroides gonadais têm funções apenas de controle reprodutivo, de que sua síntese é realizada apenas pelas glândulas adrenais, e de que regulam apenas respostas adaptativas e a homeostase de fluidos corporais tem mudado com o passar dos anos (Schumacher et al., 2004). Diversos estudos mostram ações diversas tanto da PROG, quanto de outros esteroides como estradiol e androgênios no SNC. A influência desses

esteroides pode afetar o funcionamento de neurônios e das células gliais (Sayeed et al., 2007; Schumacher et al., 2004; Stein, 2011).

Os esteroides não apresentam funções apenas endócrinas, mas também exercem ação como neurotransmissores (Baulieu, 1998). Portanto, foi criado o termo "esteroides neuroativos" (Paul and Purdy, 1992) referindo-se a todos os esteroides capazes de regular as funções neurais, incluindo hormônios esteroides, neuroesteroides e esteroides sintéticos (Melcangia et al., 2008).

Como mencionado, a PROG é um neuroesteroide e pode ser sintetizada a partir do colesterol ou a partir de precursores esteroides importados de estruturas periféricas que são metabolizados "*in situ*" (Dubrovsky, 2006), no SNC e periférico, nas células gliais e em neurônios (Chen et al., 2008; Stein, 2009). A PROG é capaz de modular a atividade neural e de regular diversas outras funções do organismo, como desenvolvimento, diferenciação, metabolismo e reprodução de fêmeas de várias espécies (Dubrovsky, 2006).

Sendo um esteroide, a PROG pode atravessar a membrana plasmática e atuar em receptores intracelulares, produzindo efeitos genômicos de longo-prazo (minutos a horas) como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes de redes neurais para o início ou para a manutenção de respostas fisiológicas (Schumacher et al., 2004). Por outro lado, a PROG também pode produzir efeitos não-genômicos, que podem ser observados de milissegundos até poucos segundos, ou seja, são muito mais rápidos do que os efeitos clássicos sobre a expressão gênica (Arbo et al., 2014). Muitos desses efeitos são mediados por metabólitos da PROG, como por exemplo, a alopregnanolona. Esses efeitos incluem a modulação da excitabilidade neuronal através de ações na superfície celular e efeitos moduladores sobre a função e composição de alguns receptores, como por exemplo, os

receptores serotoninérgicos e o receptor GABA<sub>A</sub> (Arbo et al., 2014). Este efeito da ativação do receptor GABA<sub>A</sub> também é dependente da idade do animal, como explicado por Tsuji e colaboradores (Tsuji et al., 2012). Especula-se que a lesão produzida pela hipóxia-isquemia poderia atrasar o desenvolvimento do receptor GABA<sub>A</sub> ou afetar outros mecanismos, além da ação do GABA, que podem ocorrer em animais imaturos (Tsuji et al., 2012).

Alguns autores já demonstraram que a PROG também pode diminuir o edema cerebral, diminuir a peroxidação lipídica, diminuir a apoptose e anormalidades neuronais, promover a estabilidade da BHE, além de melhorar a cognição após danos cerebrais (AGGARWAL et al., 2008; SARKAKI et al., 2013). A PROG também pode diminuir o edema, a inflamação, a excitotoxicidade do glutamato, os radicais livres e a apoptose em lesões de encéfalos adultos (Jiang et al., 2017; Wang et al., 2013).

O possível mecanismo neuroprotetor da PROG ainda não está completamente esclarecido. Estudos sobre o efeito neuroprotetor da PROG têm focado principalmente nos danos encefálicos em ratos adultos, enquanto aqueles em ratos recém-nascidos são raramente relatados (Wang et al., 2013). As concentrações séricas da PROG e da alopregnanolona, principal metabólito da PROG, em uma gestante, tendem a aumentar durante a gravidez, mostrando uma elevação em torno de 10 a 100 vezes no momento do parto (LUISI et al., 2000). Já foi demonstrado que a concentração de alopregnanolona encontrada no cordão umbilical é praticamente a mesma daquela encontrada no sangue materno (Hill et al., 2000). Além disso, esses esteroides têm a característica de cruzar facilmente a BHE (Li et al., 2013). O encéfalo do rato recém-nascido também está exposto a altas concentrações de PROG e alopregnanolona (Grobin et al., 2003). Estes dois neuroesteroides são fornecidos pela circulação materna, além de serem produzidos pelo encéfalo do feto. Por outro lado, as concentrações de PROG e de alopregnanolona

diminuem muito no encéfalo do neonato após o nascimento, devido à perda do fornecimento de sangue materno (Wang et al., 2010).

Sabe-se que a PROG ativa algumas vias de sinalização envolvidas com estímulos pró-sobrevivência em diferentes áreas encefálicas, promovendo a fosforilação da Akt e a fosforilação da Erk (componente da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos - MAPK) (GUERRA-ARAIZA et al., 2009; KAUR et al., 2007). Essas cinases participam das ações da PROG envolvendo o controle da diferenciação e da função neuronal e do comportamento reprodutivo, além das ações de neuroproteção (KAUR et al., 2007). A PROG pode, ainda, reduzir a expressão e a atividade da enzima caspase-3, que é considerada a caspase efetora central e final, sendo responsável pela maior parte da apoptose biológica. O efeito preventivo ao dano cerebral e o mecanismo de ação da PROG têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores (WANG et al., 2013).

As amplas propriedades neuroprotetoras da PROG já foram demonstradas em várias espécies animais e em uma variedade de modelos de lesão neurológica (Skolnick et al., 2014). Há razões para se pensar que o neuroesteroide PROG tem um forte potencial para o tratamento da HI neonatal já que o mesmo apresenta efeitos benéficos em pesquisas relacionadas com lesão cerebral traumática, lesão cerebral isquêmica e outros modelos de lesão do sistema nervoso central (SNC) de adultos (KAORE et al., 2012; LUOMA; STERN; MERMELSTEIN, 2012; STEIN, 2011).

A PROG também tem característica modulatória na astrogliose após lesões do SNC (Djebaili et al., 2004; Fabres et al., 2020; Labombarda et al., 2011). A astrogliose é um fenômeno comum em casos de lesão do SNC, dano excitotóxico, envelhecimento, neurodegeneração, neuroinflamação, isquemia e doenças metabólicas (Benarroch, 2005; Sofroniew, 2009). Astrócitos podem ter efeitos prejudiciais após lesões do SNC, levando

à exacerbação da cascata inflamatória, liberação de níveis neurotóxicos de espécies reativas de oxigênio e glutamato e ao comprometimento da função da BHE, aumentando a formação de edema citotóxico (Sofroniew, 2009). Em muitas dessas condições, os hormônios esteróides desempenham um papel anti-gliótico, diminuindo a astrogliose. O efeito anti-gliótico já foi demonstrado para muitos esteróides, incluindo estradiol, moduladores seletivos do receptor de estrogênio, PROG, andrógenos e glicocorticóides (Djebaili et al., 2004; Garcia-Segura et al., 1999). Uma vez que os astrócitos expressam receptores intracelulares e de membrana para a PROG (Labombarda et al., 2011; Schumacher et al., 2004; Waters et al., 2008), especula-se que os efeitos dos esteróides sobre os astrócitos podem ser diretos. Exemplos de efeitos da PROG administrada *in vivo* sobre a função dos astrócitos incluem a inibição da óxido nítrico sintase, da GFAP e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-18 (Coughlan et al., 2005; Labombarda et al., 2011; Meyer et al., 2010). Também é conhecido que uma inativação seletiva do fator NF-kB astrogliar, um regulador chave da inflamação e da cascata de lesão secundária, leva a uma melhora da recuperação funcional em modelos de esclerose múltipla (Brambilla et al., 2009). A este respeito, a inibição de NF-kB pela PROG sugere que a PROG possa agir como um regulador da astrogliose e dos danos secundários provocados pela HI.

### **1.6 Hipótese**

A HI neonatal envolve a ativação de diversas vias moleculares, o que dificulta a busca por um tratamento único adequado. Entretanto, um dos processos centrais associados à lesão cerebral pós-HI é a astrogliose, a qual intensifica o processo neuroinflamatório. A HT, tratamento usado na clínica neonatológica, apresenta efeitos multifatoriais como redução do metabolismo e da neuroinflamação; porém esse método não é efetivo em todos os casos e deve ser iniciado em até 6 horas após o início da lesão. Tendo em vista essa limitação de janela terapêutica, novos tratamentos têm sido buscados.

A PROG apresenta características multifatoriais agindo em diversas vias do SNC (inclusive como anti-inflamatório), podendo ser uma boa candidata a agente neuroprotetor mesmo se administrada tardiamente após a HI.

Com base no que foi exposto, nossa hipótese é de que a PROG irá reduzir a lesão encefálica em animais neonatos submetidos ao modelo de HI, mesmo sendo utilizada após a janela terapêutica da HT. Também prevemos que os benefícios do tratamento hipotérmico serão dependentes do período de início da HT, com tratamentos iniciados mais cedo levando a um maior grau de neuroproteção. Ambos os tratamentos (PROG e HT) reduzirão a reatividade astrocitária causada pela HI, contribuindo para a diminuição da lesão cerebral e melhora dos parâmetros comportamentais. Por outro lado, os efeitos do resfriamento podem ser dependentes do dimorfismo sexual, com uma melhor resposta neuroprotetora sendo observada nas fêmeas (cuja morte celular é dependente de caspase-3), devido a uma reversão ou inibição das vias apoptóticas ativadas pela HI.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos da administração de PROG e da HT sobre a lesão neural, a reatividade astrocitária e o comportamento em ratos Wistar submetidos à hipóxia-isquemia neonatal.

### **2.1. Específicos**

- Avaliar o grau de severidade da lesão encefálica, a expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas e a astrogliose no hipocampo ipsilateral à lesão em ratos machos submetidos à HI neonatal e tratados com PROG;

- Investigar, em ratos machos e fêmeas submetidos à HI, os efeitos da TH iniciada em diferentes intervalos pós-HI (janela terapêutica), sobre parâmetros do neurodesenvolvimento (peso corporal e reflexos de geotaxia negativa e endireitamento), parâmetros morfológicos (volume de lesão cerebral e porcentagem de células hipocampais em degeneração) e parâmetros astrocitários (imunorreatividade à GFAP e morfologia astrocitária);

- Avaliar os efeitos do dimorfismo sexual sobre os desfechos produzidos pela TH iniciada em diferentes intervalos pós-HI (janela terapêutica).

### **3. Capítulo I**

Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia

Rafael Bandeira Fabres, Nathalia Lima Montes, Yahi de Menezes Camboim, Samir Khal de Souza, Fabrício Nicola, Isadora D'Ávila Tassinari, Maria Flavia Marques Ribeiro, Carlos Alexandre Netto, Luciano Stürmer de Fraga

Cellular and Molecular Neurobiology. **40**, 1417–1428 (2020).

<https://doi.org/10.1007/s10571-020-00827-0>



## Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia

Rafael Bandeira Fabres<sup>1,2</sup> · Nathalia Lima Montes<sup>1</sup> · Yahi de Menezes Camboim<sup>1</sup> · Samir Khal de Souza<sup>1,2</sup> · Fabricio Nicola<sup>3,4</sup> · Isadora D'Ávila Tassinari<sup>1,2</sup> · Maria Flavia Marques Ribeiro<sup>1,2</sup> · Carlos Alexandre Netto<sup>2,3,4</sup> · Luciano Stürmer de Fraga<sup>1,2</sup>

Received: 14 October 2019 / Accepted: 2 March 2020  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

### Abstract

Neonatal hypoxia–ischemia (HI) is the leading cause of mortality and morbidity in newborns, occurring in approximately 2% of live births. Neuroprotective actions of progesterone (PROG) have already been described in animal models of brain lesions. However, PROG actions on neonates are still controversial. Here, we treated male Wistar rats exposed to HI with PROG. Five experimental groups were defined ( $n=6/\text{group}$ ) according to the scheme of PROG administration (10 mg/kg): SHAM (animals submitted to a fictitious surgery, without ischemia induction, and maintained under normoxia), HI (animals undergoing HI), BEFORE (animals undergoing HI and receiving PROG immediately before HI), AFTER (animals undergoing HI and receiving PROG at 6 and 24 h after HI) and BEFORE/AFTER (animals undergoing HI and receiving PROG immediately before and 6 and 24 h after HI). At P14 (7 days following HI), the volumes of lesion of the cerebral hemisphere and the hippocampus ipsilateral to the cerebral ischemia were evaluated, along with p-Akt, cleaved caspase-3 and GFAP expression in the hippocampus. PROG reduces the loss of brain tissue caused by HI. Moreover, when administered after HI, PROG was able to increase p-Akt expression and reduce both cleaved caspase-3 and GFAP expression in the hippocampus. In summary, it was possible to observe a neuroprotective action of PROG on the brain of neonatal animals exposed to experimental HI. This is the first study suggesting PROG-dependent Akt activation is able to regulate negatively cleaved caspase-3 and GFAP expression protecting neonatal hypoxic-ischemic brain tissue from apoptosis and reactive gliosis.

**Keywords** Neonatal hypoxia–ischemia · Akt · GFAP · Caspase-3 · Astrogliosis · Neuroprotection

### Introduction

Neonatal hypoxia–ischemia (HI) is a condition associated with a variety of harmful events, such as perinatal asphyxia, intraventricular hemorrhage, stroke among others. Therefore, HI is a major cause of mortality and morbidity for neonates (Shankaran et al. 2005). In underdeveloped countries the rate of HI incidents exceeds that of developed countries up to ten times (Silveira and Procianny 2015). Therapeutic hypothermia is the only clinical treatment for newborns suffering from HI. However, clinical studies and experimental trials have shown hypothermia is not neuroprotective in all cases of moderate HI, and also does not show beneficial effects in cases of severe HI (Sabir et al. 2012; Silveira and Procianny 2015; Wood et al. 2016). Hence, it is necessary to develop new strategies of treatment based on the pathophysiology of the hypoxic-ischemic event.

✉ Luciano Stürmer de Fraga  
lucianof@ufrgs.br

<sup>1</sup> Departamento de Fisiologia, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre 90050-170, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre 90050-170, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre 90035-003, Brazil

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre 90050-170, Brazil

Published online: 13 March 2020

Springer



Here, we proposed to use the administration of the steroid progesterone (PROG) as a treatment for neonatal HI. A neuroprotective role of PROG has already been shown in several studies of lesions in the adult central nervous system (for review see Deutsch et al. 2013), including stroke (for review see Guennoun et al. 2019). On the other hand, just a few studies using PROG have been performed in animal models of neonatal HI; still, results are controversial (Tsuji et al. 2012; Wang et al. 2013; Li et al. 2014b, 2015; Peterson et al. 2015; Fabres et al. 2018).

PROG regulates cell proliferation, apoptosis, excitotoxicity and anti-inflammatory features during brain development (Whitaker-azmitia et al. 2014; Atif et al. 2016). In addition, PROG also modulates cell survival pathways by increasing p-Akt expression and inhibiting caspase-3 expression (Djebaili et al. 2004; Li et al. 2015; Stanojlović et al. 2019).

Caspase-3 is the leading factor in the activation of the apoptosis pathway (Djebaili et al. 2004; Li et al. 2015). After an initial phase of necrosis caused by HI, apoptosis is the main process involved in the increase of neural cells death (Davidson et al. 2015). Afterwards, neuroinflammation plays a role in the extension of the brain lesion with astrocytic hypertrophy being the main component of the neuroinflammatory process (Li et al. 2014a; Odorecyk et al. 2017). Astrocytes have an important role in the metabolism, glutamate uptake and maintenance of the blood–brain barrier following a HI event. However, astrocytes hyperactivation produces harmful effects (Teo et al. 2015; Concepcion and Zhang 2018; Burda and Sofroniew 2014). Hyperactivation of astrocytes is associated with secretion of proinflammatory cytokines, leading to a secondary neuronal damage (Rocha-Ferreira and Hristova 2016; Burda and Sofroniew 2014).

In a previous study, we did not find any effect of PROG on the expression of procaspase-3 and p-Akt when animals were evaluated just 48 h following HI. Here, we used the same schedule of PROG administration (before HI and/or 6 h and 24 h after HI) but evaluated the animals a week later. One-week post-injury period was chosen because it encompasses brain damage due to all mechanisms of injury (Teo et al. 2015). Notwithstanding we did not observe any neuroprotective effect of PROG 24 h following HI (Fabres et al. 2018), PROG neuroprotective effects had already been demonstrated when neonatal animals submitted to HI reach adulthood (Peterson et al. 2015).

Our hypothesis is that astrogliosis is increased after injury, which may be related to the activation of apoptosis pathways. In addition, administration of PROG a few hours following HI will produce long-lasting effects reducing brain damage when it is evaluated a week following HI insult. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of PROG on the volume of brain lesion, astrogliosis and cell survival and apoptosis pathways a week later neonatal cerebral HI.

## Material and Methods

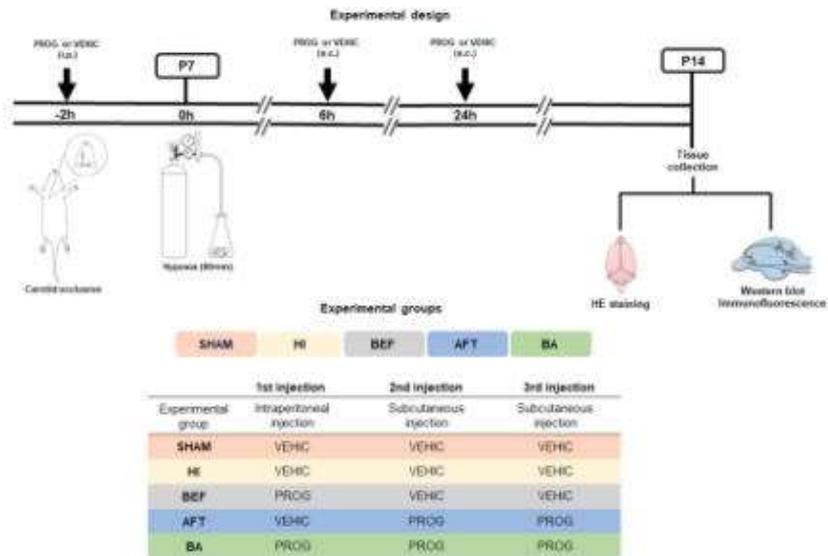
### Animals

For this study we used 60 seven-day-old (P7) male Wistar rats ( $n = 6/\text{group}$ ), since at this age the level of brain maturation is comparable to that of full-term human neonates (Dobbing and Sands 1979; Netto et al. 2017). Puppies were kept together with their dams which received food and water ad libitum. Light–dark cycle (12 h light/12 h dark) and temperature ( $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) were controlled. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, #26669) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, #14-0578).

HI procedure was performed according to the model of Rice et al. (1981) (see Fig. 1 for details). Animals were anesthetized with isoflurane (5% for induction and 3% for maintenance), and then submitted to surgical occlusion of the right common carotid artery. Animals were exposed to isoflurane for no more than 10 min during surgery. After recovering under a heat lamp, pups were left with their mothers during 1–2 h and then placed in a hypoxic chamber (8%  $\text{O}_2/92\% \text{N}_2$ , 5L/min) for 60 min at  $37^\circ\text{C}$  (animal body temperature). After hypoxic exposure, the puppies were kept in a box under heating for approximately 30 min and then returned to their mothers.

### Experimental Groups And Progesterone Administration

PROG (Sigma) was dissolved in 22.5% cyclodextrin (2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin) and administered at a dose of 10 mg/kg of body weight (at a concentration of 5 mg/ml). Animals were assigned to five experimental groups depending on the schedule of PROG and/or vehicle (cyclodextrin) administration, according to our previous paper (Fabres et al. 2018) (see Fig. 1 for details): SHAM, HI, HI + PROG-BEFORE (BEF), HI + PROG-AFTER (AFT), HI + PROG-BEFORE/AFTER (BA). The first administration of PROG was performed immediately before ischemia (to produce in P7 rats high levels of PROG similar to the high prenatal physiological ones) (Tsuji et al. 2012). This first administration was performed intraperitoneally (with animals anesthetized) for quick absorption. The next two administrations were performed 6 h and 24 h after the onset of hypoxia and were done subcutaneously for slower absorption. SHAM group was used as a control group and injected only with vehicle. SHAM animals were submitted to a fictitious surgery (without



**Fig. 1** Experimental design (*upper panel*) and experimental groups (*lower panel*). The procedure of hypoxia-ischemia (HI) was performed according to the model of Rice et al. (1981). Animals were submitted to HI on the seventh postnatal day (P7) and euthanized at P14 for tissue collection and processing. The HI procedure consisted of two steps: animals were first anesthetized and submitted to a surgery to occlusion of the right common carotid artery (time = 2 h). Then, after a period of recovery, animals were placed inside a hypoxic chamber (8% O<sub>2</sub>) for 60 min at 37°C (body temperature). The beginning of hypoxia exposure was taken as time zero (0 h). Every animal was injected three times with progesterone (PROG) dissolved in cyclodextrin and/or vehicle (cyclodextrin), depending on the specific experimental group. First injection was performed with animals anesthetized immediately before the surgery to carotid occlusion (time = 2 h). Second and third injections were administered 6 h e 24 h after the beginning of hypoxia, respectively. Animals

were assigned to five experimental groups (*lower panel*) depending on the schedule of PROG and/or vehicle administration, according to our previous paper (Fabres et al. 2018): SHAM, HI, HI + PROG-BEFORE (BEF), HI + PROG-AFTER (AFT), HI + PROG-BEFORE/AFTER (BA). SHAM group was used as a control group and injected only with vehicle. SHAM animals were submitted to a fictitious surgery (without carotid occlusion) and kept under normoxia throughout the experiment; HI animals were submitted to the hypoxic-ischemic procedure (carotid occlusion followed for exposure to a hypoxic atmosphere) and were also injected with vehicle; BEF animals were submitted to HI and received PROG before ischemia; AFT animals were submitted to HI and received PROG after hypoxia; BA animals were submitted to HI and received PROG before ischemia and after hypoxia. CO=carotid occlusion, PROG=progesterone, VEHIC=vehicle, i.p.=intraperitoneal, s.c.=subcutaneous

carotid occlusion) and kept under normoxia throughout the experiment; HI animals were submitted to the hypoxic-ischemic procedure (carotid occlusion followed for exposure to a hypoxic atmosphere) and were also injected with vehicle; BEF animals were submitted to HI and received PROG before ischemia; AFT animals were submitted to HI receiving PROG after hypoxia; BA animals were submitted to HI and received PROG before ischemia and after hypoxia.

### Brain Volume Measurement

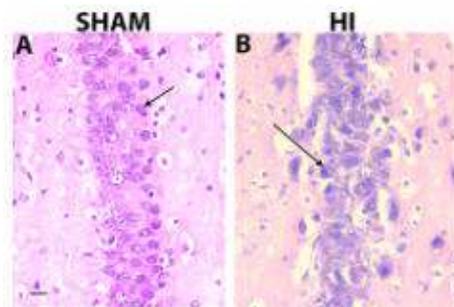
In order to estimate the volume of lesion of the cerebral hemisphere and hippocampus ipsilateral to carotid occlusion animals were deeply anesthetized with isoflurane at P14 and transcardially perfused with cooled saline (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were dissected out, post-fixed in 4% PFA overnight and

dehydrated using an alcoholic series. Next, brains were embedded in paraffin and then sectioned coronally (7  $\mu\text{m}$ ) using a microtome (Microm HM 340E, ThermoScientific). Sections were collected on gelatin-coated slides and stained with hematoxylin and eosin (HE).

Sections were collected as from the corpus callosum was visualized until the disappearance of the hippocampus, corresponding from bregma +2.52 to -6.84 mm in adult rats, according to Paxinos and Watson rat brain atlas (Paxinos and Watson 2007). Twenty-five sections were collected per animal (one every thirty sections, i.e., one every 210  $\mu\text{m}$  of interval) in order to evaluate the whole cerebral hemisphere volume. For analysis of hippocampal volume, fifteen sections per animal were analyzed (-2.04 to -6.12 mm), also with an interval of 210  $\mu\text{m}$  in between. The images were captured and digitalized and the area of each hemisphere and hippocampus was measured using ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). The Cavalieri method was used to calculate the volume of the structures (Arteni et al. 2010). Briefly, the areas of the analyzed structures were summed up and multiplied by the distance between each section. The results were expressed as a percentage of volume of lesion relative to the volume of the contralateral hemisphere, according to Sun et al. (Sun et al. 2015).

### Cell Counting

Using the HE stained slides we were able to capture images of the hippocampal areas of CA1 and hilus of the dentate gyrus, in order to quantify the number of degenerated and total pyramidal cells (Fig. 2). The images were captured with



**Fig. 2** Representative images of HE stained sections from hippocampal neurons ipsilateral to cerebral ischemia of 14-day-old rats for visualization of normal cells and degenerative cells. a representative brain section of a SHAM animal not submitted to HI. Arrow is indicating a normal cell. b Representative brain section of an animal from the HI group. Arrow indicates a degenerative cell. Bar = 100  $\mu\text{m}$

a microscopy (Zeiss) at magnification of  $\times 400$ . The average of 70 pyramidal neurons per captured image was counted and the mean value of five different sections was calculated (one field for each section totalizing five images per animal). The cells which showed shrinkage and deformity of the cell body or karyorrhectic and pyknotic nuclei were defined as degenerated cells (Garman 2011; Mano et al. 2014). The results were expressed as the percentage of degenerative cells, i.e., the mean of the degenerative cells divided by the mean of the total cells  $\times 100$  (%).

### GFAP Immunofluorescence

Sectioned slices were washed with phosphate-buffer saline (PBS) and cell membranes were permeabilized in 0.25% PBS-Triton X-100. Sections were then blocked with 1% albumin for 30 min and incubated with the anti-gial fibrillary acidic protein antibody (anti-GFAP, #G9269, rabbit IgG, 1:200, Sigma-Aldrich) to identify astrocytes. This procedure was carried out in 1% albumin in PBS-Triton X-100 at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Following PBS washes, sections were incubated with the Alexa 555 anti-rabbit secondary antibody (1:500, A32732, Molecular Probes, Invitrogen). Slices were mounted with mounting medium containing DAPI (Merck, F6057) and coverslipped. In order to quantitatively compare GFAP immunofluorescence among groups, we choose two hippocampal areas (CA1 and hilus) for fluorescence intensity analysis. An area of optical interest was determined (3800  $\mu\text{m}^2$ ) and positioned on each of five images. A total of ten images (five for each area, i.e., CA1 and hilus) was evaluated per animal. Images were analyzed with the ImageJ software (NIH, Bethesda, USA), and the value of the integrated density per unit of area was obtained (Nicola et al. 2016).

### Western Blotting

After euthanasia, the hippocampus was quickly dissected out and frozen in liquid nitrogen and stored at -80  $^{\circ}\text{C}$  for subsequent homogenization. Right hippocampus (i.e., hippocampus ipsilateral to carotid occlusion) was processed apart, and 40  $\mu\text{g}$  of proteins were separated by SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with primary antibodies anti-phospho-Akt (1:250, #sc-293125, Santa Cruz), anti-GFAP (1:1000, #G9269, Sigma), and anti-cleaved caspase-3 (1:1000, #9661, Cell Signaling). The results were normalized by the expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GFAP/GAPDH), total Akt (phospho-Akt/total Akt) and procaspase-3 (cleaved caspase-3/procaspase-3). The concentration

used for the anti-GAPDH antibody (#MAB-374, Millipore) was 1:2000, for the total anti-Akt antibody (#sc-5298, Santa Cruz) was 1:250 and for the anti-procaspase-3 (#9662, Cell Signalling) was 1:1000. The following secondary antibodies coupled to peroxidase were used: anti-mouse IgG (1:10,000, #AP124P, Millipore) for GAPDH and GFAP and anti-rabbit IgG (1:10,000, #AP132P, Millipore) for phospho-Akt, total Akt, caspase-3 and cleaved caspase-3. Membranes were developed by chemiluminescence and were analyzed densitometrically using the ImageJ software (NIH, Bethesda, USA).

### Data Analysis

All data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test. The data were expressed as mean  $\pm$  SEM. The significance level was set as  $p < 0.05$ .

## Results

### Volume of Cerebral Hemisphere and Hippocampus

Figure 3 (upper panel) shows representative images of histological slices stained with HE from animals of all experimental groups. Images were used to calculate the volume of lesion of the cerebral hemisphere and hippocampus ipsilateral to carotid occlusion of each group. An increase in the volume of lesion of both hemisphere (Fig. 3a) and

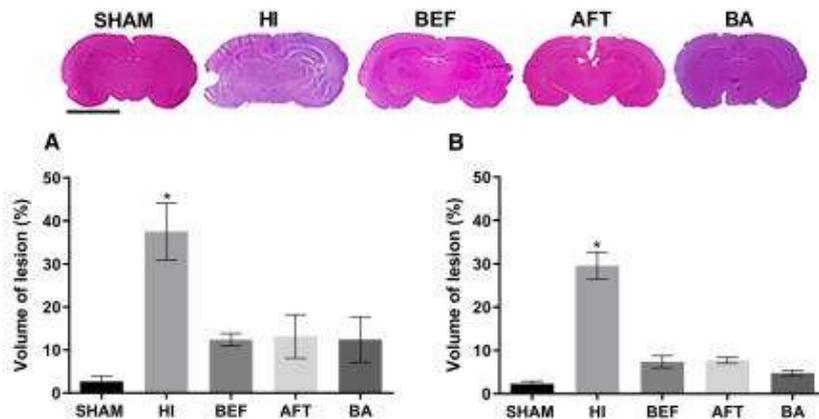
hippocampus (Fig. 3b) ipsilateral to carotid occlusion was seen in animals of the HI group ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the volume of lesion in the brain of animals from groups receiving PROG was similar to the SHAM group ( $p > 0.05$ ).

### Cell Counting

The percentage of degenerative neuronal cells in relation to the total neuronal cells was analyzed in the CA1 and hilus of the hippocampus ipsilateral to carotid occlusion (Fig. 4). A significant increase in the percentage of degenerative cells was seen in the hippocampus of animals submitted to HI as compared to SHAM animals (Fig. 4a, b,  $p < 0.05$ ). Administration of PROG caused a significant decrease in the percentage of degenerative cells compared to the animals of the HI group ( $p < 0.05$ ) in both areas, CA1 and hilus. However, PROG was not able to return the number of degenerative cells to values similar to those of the SHAM group ( $p < 0.05$ ).

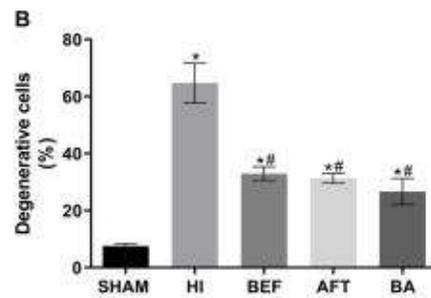
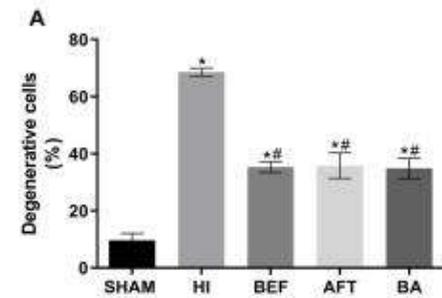
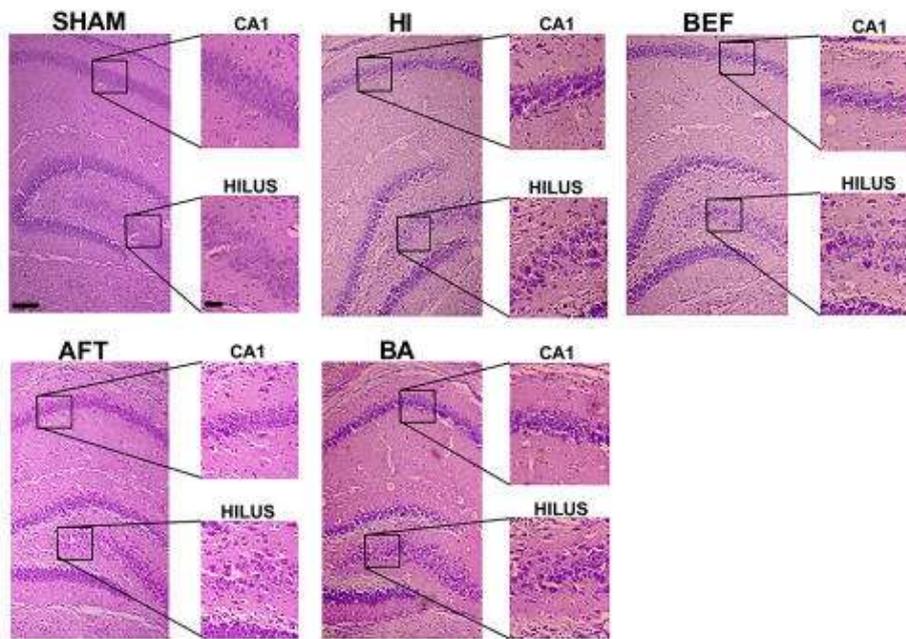
### GFAP Immunoreactivity and Immunocontent

GFAP immunofluorescence was evaluated in the CA1 and hilus of the hippocampus ipsilateral to the carotid occlusion 7 days after the hypoxic-ischemic event (Fig. 5). Animals from groups HI and BEF showed a significant increase in GFAP immunofluorescence in both areas (CA1



**Fig. 3** Volume of lesion (%) in the hemisphere (a) and hippocampus (b) ipsilateral to carotid occlusion. Upper panel representative images of HE stained sections of the brain from animals of each experimen-

tal group. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni and expressed as mean  $\pm$  SEM. \*significant differences compared to the SHAM group ( $p < 0.05$ ). Bar = 0.5 cm



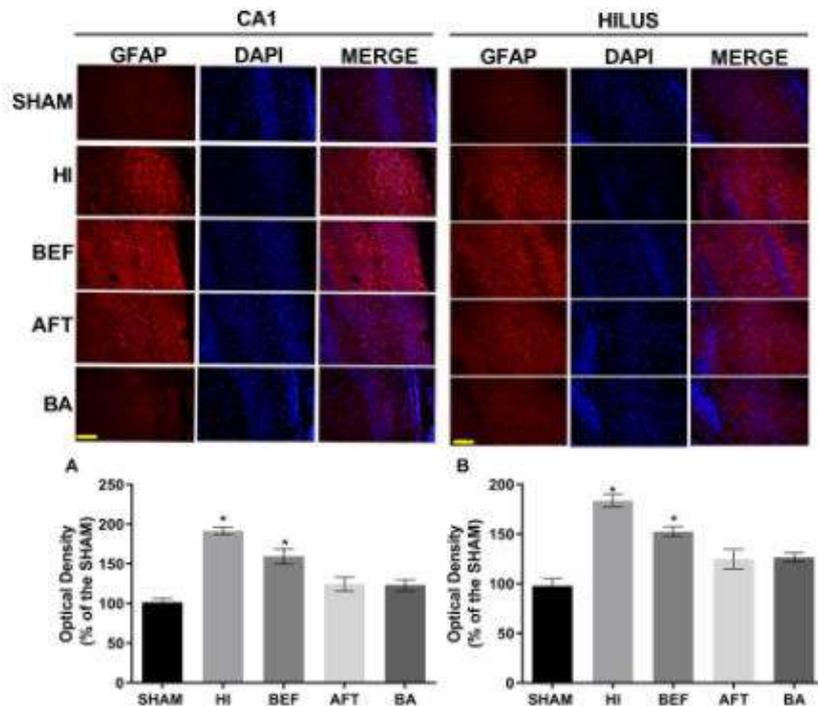
**Fig. 4** Percentage of degenerative neurons in the areas of CA1 (a) and hilus (b) of the hippocampus ipsilateral to carotid occlusion. *Upper panel* representative images of HE stained sections of the brain from animals of each experimental group. Data were ana-

lyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni and expressed as mean  $\pm$  SEM. \*significant differences compared to the SHAM group ( $p < 0.05$ ); #significant differences compared to the HI group ( $p < 0.05$ ). Bars: main photomicrographs = 200  $\mu$ m; insets = 100  $\mu$ m

and hilus) relative to SHAM animals (Fig. 5a, b,  $p < 0.05$ ). Groups AFT and BA did not present significant differences in relation to the SHAM group ( $p > 0.05$ ). These results were corroborated when GFAP immunocontent from the hippocampus ipsilateral to ischemia was analyzed by Western blotting (Fig. 6).

#### Expression of Survival and Apoptosis Proteins

The ratios of p-Akt/total Akt and cleaved caspase-3/procaspase-3 are represented in Fig. 7. The p-Akt/total



**Fig. 5** GFAP immunofluorescence in the areas of CA1 (a) and hilus (b) of the hippocampus ipsilateral to carotid occlusion. *Upper panel* representative images of GFAP immunofluorescence staining of the brain from animals of each experimental group. Data were ana-

lyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni and expressed as mean  $\pm$  SEM. \*significant differences compared to the SHAM group ( $p < 0.05$ ). Bar = 100  $\mu$ m

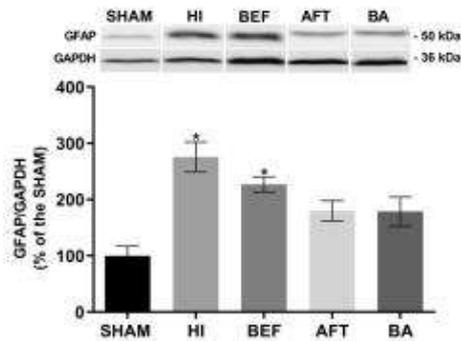
Akt ratio in the hippocampus of HI animals did not show significant differences in relation to the SHAM group (Fig. 7a,  $p > 0.05$ ). Despite that, when PROG was administered in neonates submitted to HI, an increase in p-Akt immunocontent was seen (Fig. 7a,  $p < 0.05$ ). The opposite effect was observed when analyzing the cleaved caspase-3 content (Fig. 7b). The HI group showed higher values of cleaved caspase-3 in relation to all the other groups ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

Most studies using PROG administration in animal models of brain injury in both adults and newborns show that this steroid displays neuroprotective effects (Ishrat et al. 2010, 2012; Li et al. 2014b; Dong et al. 2018; Guennoun et al.

2019). However, there are also studies showing an absence of protective effects (Fabres et al. 2018) or even harmful effects (Murphy et al. 2002; Tsuji et al. 2010) of PROG in neonates submitted to HI. Therefore, there is a need for further studies in order to elucidate the mechanism of action and the physiological effects of PROG.

Here, we have calculated the hemispheric and hippocampal volumes of lesion of neonates exposed to HI whether or not receiving PROG administration. It was possible to observe a reduction of the volume of brain lesion in animals treated with PROG as compared to animals that received only vehicle, regardless of the time-point of hormone administration (before and/or after HI). As compared to HI groups, animals that received PROG showed a significant reduction in the volume of lesion, suggesting a beneficial effect of PROG. It is worth to mention brain volume of lesion was evaluated a week following HI. In a previous study using



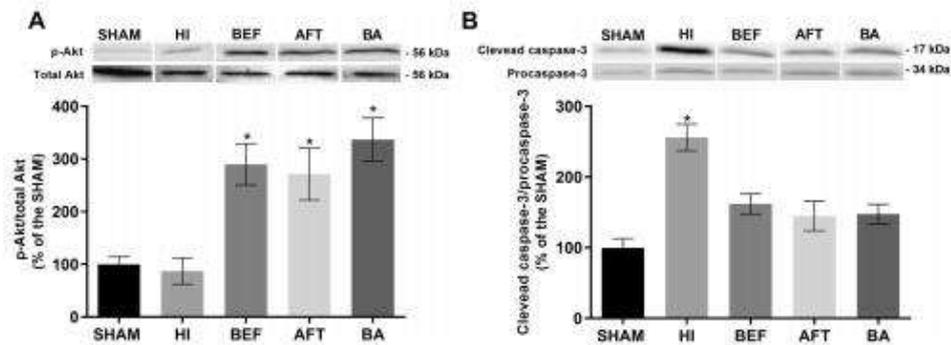
**Fig. 6** GFAP immunoprotein in the hippocampus ipsilateral to carotid occlusion. *Upper panel* representative Western blotting bands of GFAP immunoprotein in the ipsilateral hippocampus from animals of each experimental group. GAPDH was used as a loading control (GFAP/GAPDH). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni and expressed as mean  $\pm$  SEM. \*significant differences compared to the SHAM group ( $p < 0.05$ )

the same experimental design presented here we evaluated animals just 48 h following HI (Fabres et al. 2018). In that case, we were not able to see any effect of PROG administration in reducing the brain volume of lesion. We are confident these differences are due to the distinctions in the time-point of analysis. It is well known HI lesion continue extending for days or even months following the HI event (Mano et al. 2014) and PROG could act reducing this later neuroinflammatory process.

For example, in a study by Peterson et al. (Peterson et al. 2015) animals submitted to HI in P7 and receiving PROG right after injury showed a reduction in the hemisphere-injured area ipsilateral to ischemia when evaluated at 52 days of life (P52). A more recent study also showed a decrease in the area of lesion 8 weeks after injury in mice receiving PROG treatment for one week following HI (Dong et al. 2018).

However, in the literature, only our previous (Fabres et al. 2018) and current papers have evaluated the effects of PROG using histological and biochemical analysis in a short period after the injury, respectively 48 h and 7 days following neonatal HI. The evaluation of the animals following a longer period after the insult may be more adequate to observe the effects of PROG on the brain volume. Nevertheless, in order to understand the biochemical pathways responsible for the extension of injury it is necessary to study short periods after the HI event, since cell signaling pathways activated there could be responsible for structural changes observed in more advanced ages.

Thus, the maintenance of brain volume observed in PROG-treated animals could be related to the activation of signaling pathways involved in cell survival (Ishrat et al. 2012). When we evaluated the percentage of degenerative pyramidal neurons in the areas of CA1 and hilus of the ipsilateral hippocampus, it was possible to note HI animals showed a 7–8.5-fold increase in the number of degenerative cells as compared to SHAM animals. Otherwise, animals submitted to HI and which received PROG (groups BEF, AFT and BA) showed a reduction about 50% in the number of degenerative cells. This result suggests a



**Fig. 7** p-Akt (a) and cleaved caspase-3 (b) immunoprotein in the hippocampus ipsilateral to carotid occlusion. *Upper panel* representative Western blotting bands of p-Akt and cleaved caspase-3 immunoprotein in the ipsilateral hippocampus from animals of each experimental group. Total Akt and procaspase-3 were used as loading controls

(p-Akt/total Akt and cleaved caspase-3/procaspase-3). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni and expressed as mean  $\pm$  SEM. \*significant differences compared to the SHAM group ( $p < 0.05$ )

neuroprotective action of PROG on cell survival and corroborates with our brain volume data.

Since PROG reduces the volume of brain lesion along with reducing degeneration of neurons, we decided also check the effects of PROG administration on astrocytes. Some studies have shown that increases in GFAP immunoreactivity are related to increases in neuronal death indicative of brain injury (Widestrand et al. 2007; Li et al. 2008). In the present study, an increase in GFAP immunoreactivity was observed in CA1 and hilus of hippocampus ipsilateral to injury in HI and BEF groups. When PROG was administered after injury (groups AFT and BA), GFAP immunoreactivity was similar to the SHAM group. These same results were obtained to the ipsilateral hippocampus when the immunoccontent of GFAP was evaluated by Western blotting.

The effects of changes in GFAP expression on neuronal injury are controversial. Some studies show that increases in GFAP expression are neuroprotective (Li et al. 2008). Otherwise, it has also been suggested GFAP expression may inhibit normal restorative processes in later stages following adult central nervous system injury (Wilhelmsson 2004; Widestrand et al. 2007). However, a study using GFAP-knockout mice showed no effect on the size of the lesion, besides improved neurogenesis following HI (Järlestedt et al. 2010). It shows the importance of reducing GFAP-overexpression following neonatal HI. The administration of PROG following HI seems to have a beneficial effect on the reduction of GFAP expression.

In the present study, the expression of p-Akt and cleaved caspase-3 in PROG-treated animals was also evaluated at P14. The PROG-treated groups showed an increase in the expression of p-Akt relative to HI and SHAM groups. Whereas, a reduction in the expression of cleaved caspase-3 could be observed in the groups receiving administration of PROG. Altogether, these findings suggest the effects of PROG can last for many days following injury, inhibiting the process of apoptosis along this first week post brain injury (Ishrat et al. 2012).

Apoptosis is one of the major processes of cell death activated after HI injury in neonates (Davidson et al. 2015). Moreover, caspase-3 is one of the main proteins involved in the effector phase of apoptosis (Srinivasan et al. 1998). Inhibition of caspase-3 may be a consequence of the effects of Akt phosphorylation (Asati et al. 2016). Thus, PROG-dependent increase of Akt expression may be involved in the beneficial effects of PROG in animal models of brain injury (Ishrat et al. 2012; Li et al. 2014b, 2015; Stanojlović et al. 2019). In our previous paper (Fabres et al. 2018), PROG (when administrated immediately before ischemia) was unable to increase p-Akt expression 48 h after HI. Li and coworkers (Li et al. 2015) administered PROG 30 min before ischemia and observed an increased expression of p-Akt 24 h after HI. These results show PROG can act at

different periods after its administration. Thus, in order to improve PROG-beneficial effects is necessary to elucidate the best therapeutic window for PROG administration.

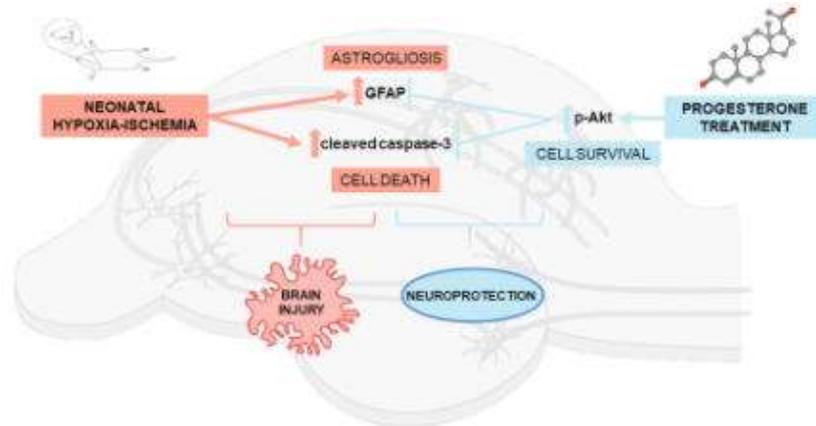
Along with Akt activation, inhibiting caspase pathway is the best way to block apoptosis. We showed cleaved caspase-3 expression in hippocampus was raised even 7 days following HI. This finding is similar to that of Teo and colleagues (Teo et al. 2015) which showed an increase in caspase-3 expression in the somatosensory cortex neurons 7 days after HI.

Nevertheless, PROG administration was able to revert this increase in cleaved caspase-3 caused by HI, as shown here. In a previous study (Fabres et al. 2018), we showed the expression of procaspase-3 in the hippocampus ipsi and contralateral to ischemia was similar between HI and SHAM animals when evaluated 48 h after HI. Thus, it is likely that an increase in caspase-3 is occurring later, between 48 h and 7 days following HI. In other words, it is likely the existence of distinct periods of increase in caspase-3 expression between the onset of injury, related to the HI event itself, and the later neuroinflammatory process which occurs along days after HI. It is important to pursue this temporal pattern of caspase activation in order to determine more accurately the timing of an intervention as PROG administration.

Our results suggest a relationship between astrogliosis and increased caspase-3 expression, consequently a rise in apoptosis following HI. Tripathi et al. (Tripathi et al. 2017) also suggest p-Akt can regulate negatively GFAP expression through FABP7-PPAR $\gamma$  and MKP3. In the present study, animals which showed increased p-Akt expression (because they were treated with PROG) also showed a decrease in GFAP expression. Thus, we have shown for the first time an increase in p-Akt expression associated with a decrease in GFAP expression in neonates submitted to HI.

Here, we have shown that the administration of PROG in a dose of 10 mg/kg is effective in protect the neonatal brain from male Wistar rats exposed to HI irrespective of the moment of administration (immediately prior ischemia or after hypoxia). All groups treated with PROG showed increased expression of p-Akt and a decrease in cleaved caspase-3 expression. PROG exerts a long-lasting effect since this neuroprotection was observed 7 days after the HI event. On the other hand, a decrease in GFAP was observed only in animals that received PROG after HI (AFT and BA groups), suggesting the timing of administration is relevant for PROG regulation of astrogliosis (Fig. 8). It is a limitation of the present study we have evaluated just one time-point (P14) following PROG administration. However, it does not exclude the fact that animals receiving PROG showed a positive outcome one week after the induction of brain injury when compared to animals in the HI group.

In summary, the present study was the first one to evaluate the effect of PROG on the astrogliosis in rodents



**Fig. 8** Schematic diagram of the proposed mechanism for progesterone (PROG) neuroprotection following neonatal hypoxia-ischemia. Neonatal hypoxia-ischemia activates caspase-3 and induces exacerbated astrogliosis which, in turn, causes hippocampal damage (left).

PROG promotes Akt phosphorylation. p-Akt inhibits activation of caspase-3 as well as expression of GFAP, reducing cell death and astrogliosis which, in turn, leads to hippocampal neuroprotection (right)

submitted to neonatal HI. Results suggest PROG promotes Akt signal and decreases caspase-3 and GFAP expression 7 days after HI. However, we have also shown that PROG administration before ischemia was not able to reduce astrogliosis. Thus, studies evaluating different doses of PROG, gender effects and other cell signaling pathways are necessary to elucidate the effects of PROG and allow its use as a clinical therapy for HI treatment.

**Acknowledgements** This study was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA-Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil).

**Author Contributions** All authors contributed in this work. RBF, LSF, CAN and MFMR planned the study design. RBF, NLM, YMC, SKS and FN conducted the experiments. RBF and LSF performed data analysis and wrote the manuscript. RBF, LSF and IDT prepared the figures. RBF, LSF, NLM and IDT revised critically the manuscript. LSF, CAN and MFMR were recipient of funding used to support the study.

#### Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** All authors declare that they have no conflicts of interest.

**Ethical Approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, #26669) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, #14-0578).

#### References

- Arteni NS, Pereira LO, Rodrigues AL et al (2010) Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav Brain Res* 210:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.015>
- Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK (2016) PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem* 109:314–341
- Atif F, Yousuf S, Stein DG (2016) Neuropharmacology Progesterone in the treatment of neonatal arterial ischemic stroke and acute seizures: Role of BDNF / TrkB signaling. *Neuropharmacology* 107:317–328. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.052>
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81(2):229–248
- Concepcion KR, Zhang L (2018) Corticosteroids and perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discov Today* 23:1718–1732
- Davidson JO, Wassink G, Van Den HLG et al (2015) Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy—where to from here? *Front Neurol*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00198>
- Deutsch ER, Espinoza TR, Atif F et al (2013) Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain Res* 1530:82–105. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.014>
- Djebaili M, Hoffman S, Stein D (2004) Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123:349–359. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.023>
- Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3:79–83. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90022-7)
- Dong S, Zhang Q, Kong D et al (2018) Gender difference in the effect of progesterone on neonatal hypoxic/ischemic brain injury

- in mouse. *Exp Neurol* 306:190–198. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.05.013>
- Fabres RB, da Rosa LA, de Souza SK et al (2018) Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia. *Metab Brain Dis* 33:813–821. <https://doi.org/10.1007/s11014-018-0193-7>
- Garman RH (2011) Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol* 39:22–35. <https://doi.org/10.1177/0192623310389621>
- Guennoun R, Zhu X, Fréchet M, Gaignard P, Slama A, Liere P, Schumacher M (2019) Steroids in stroke with special reference to progesterone. *Cell Mol Neurobiol* 39:551–568
- Ishrat T, Sayeed I, Atif F et al (2010) Progesterone and allopregnanolone attenuate blood-brain barrier dysfunction following permanent focal ischemia by regulating the expression of matrix metalloproteinases. *Exp Neurol* 226:183–190
- Ishrat T, Sayeed I, Atif F et al (2012) Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience* 210:442–450. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.008>
- Järlestedt K, Roussel CI, Faiz M et al (2010) Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. *PLoS ONE* 5:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010397>
- Li L, Lundkvist A, Andersson D et al (2008) Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:468–481. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546>
- Li S-J, Liu W, Wang J-L et al (2014a) The role of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18:905–909
- Li X, Zhang J, Chai S, Wang X (2014b) Progesterone alleviates hypoxic-ischemic brain injury via the Akt / GSK-3  $\beta$  signaling pathway. *Exp Ther Med* 8:1241–1246. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1858>
- Li X, Zhang J, Zhu X et al (2015) Progesterone reduces inflammation and apoptosis in neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage through the PI3K/Akt pathway. *Int J Clin Exp Med* 8:8197–8203
- Mano Y, Kotani T, Ito M et al (2014) Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage caused by in utero ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 69:324–330. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.037>
- Murphy SJ, Littleton-Kearney MT, Hurn PD (2002) Progesterone administration during reperfusion, but not preischemia alone, reduces injury in ovariectomized rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1181–1188. <https://doi.org/10.1097/00004647-200210000-00005>
- Netto CA, Sanches E, Odorcyk FK et al (2017) Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J Neurosci Res* 95:409–421
- Nicola FC, Rodrigues LP, Crestani T et al (2016) Human dental pulp stem cells transplantation combined with treadmill training in rats after traumatic spinal cord injury. *Brazilian J Med Biol Res* 49:1–11. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165319>
- Odorcyk FK, Nicola F, Duran-Carabali LE et al (2017) Galantamine administration reduces reactive astrogliosis and upregulates the anti-oxidant enzyme catalase in rats submitted to neonatal hypoxia ischemia. *Int J Dev Neurosci* 62:15–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.07.006>
- Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier, San Diego
- Peterson BL, Won S, Geddes RI et al (2015) Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. *Behav Brain Res* 286:152–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.005>
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131–141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
- Rocha-Ferreira E, Hristova M (2016) Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. *Neural Plast*. <https://doi.org/10.1155/2016/4901014>
- Sabir H, Scull-Brown E, Liu X, Thoresen M (2012) Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke* 43:3364–3370. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.674481>
- Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA et al (2005) Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 353:1574–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMcps050929>
- Silveira RC, Prociandy RS (2015) Hypothermia therapy for newborns with hypoxic ischemic encephalopathy. *J Pediatr (Rio J)* 91:78–83
- Srinivasan A, Roth KA, Sayers RO et al (1998) In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system. *Cell Death Differ* 5:1004–1016. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400449>
- Stanojlović M, Guševac Stojanović I, Zarić M et al (2019) Progesterone protects prefrontal cortex in rat model of permanent bilateral common carotid occlusion via progesterone receptors and Akt/Erk/eNOS. *Cell Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s10571-019-00777-2>
- Sun H-S, Xu B, Chen W et al (2015) Neuronal K(ATP) channels mediate hypoxic preconditioning and reduce subsequent neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Exp Neurol* 263:161–171. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.10.003>
- Teo JD, Morris MJ, Jones NM (2015) Hypoxic preconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatr Res* 77:757–764. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.47>
- Tripathi S, Kashwaha R, Mishra J et al (2017) Docosahexaenoic acid up-regulates both PI3K/AKT-dependent FABP7-PPAR $\gamma$  interaction and MKP3 that enhance GFAP in developing rat brain astrocytes. *J Neurochem* 140:96–113. <https://doi.org/10.1111/jnc.13879>
- Tsuji M, Aoo N, Harada K et al (2010) Sex differences in the benefits of rehabilitative training during adolescence following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol* 226:285–292. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.09.002>
- Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M et al (2012) Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. *Exp Neurol* 233:214–220
- Wang X, Zhang J, Yang Y et al (2013) Progesterone attenuates cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage by inhibiting the expression of matrix metalloproteinase-9 and aquaporin-4. *Exp Ther Med* 6:263–267. <https://doi.org/10.3892/etm.2013.1116>
- Whitaker-azmitia PM, Lobel M, Moyer A (2014) Low maternal progesterone may contribute to both obstetrical complications and autism. *Med Hypotheses* 82:313–318. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.12.018>
- Widestrand Å, Fajjerson J, Wilhelmsson U et al (2007) Increased Neurogenesis and Astrogenesis from Neural Progenitor Cells Grafted in the Hippocampus of *GFAP<sup>-/-</sup>Vim<sup>-/-</sup>* Mice. *Stem Cells* 25:2619–2627. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0122>

- Wilhelmsson U (2004) Absence of Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Prevents Hypertrophy of Astrocytic Processes and Improves Post-Traumatic Regeneration. *J Neurosci* 24:5016–5021. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0820-04.2004>
- Wood T, Osredkar D, Puchades M et al (2016) Treatment temperature and insult severity influence the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia. *Sci Rep* 6:23430. <https://doi.org/10.1038/srep23430>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.