



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOANA PATRÍCIA CUNHA DOS SANTOS

Tratamentos Neuroprotetores na Encefalopatia Hipóxico-Isquémica

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE PEDIATRIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

MESTRE MARIA CRISTINA ROCHA RESENDE BERNARDO

PROFESSORA DOUTORA GUIOMAR GONÇALVES OLIVEIRA

MARÇO 2016

Índice

Índice de abreviaturas	2
Resumo	5
<i>Abstract</i>	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	10
Fisiopatologia.....	10
Resposta fetal à hipóxia-isquémia	10
Mecanismos da lesão cerebral	11
Tratamentos neuroprotetores	20
Hipotermia	21
Melatonina.....	26
Eritropoetina	29
Alopurinol.....	30
Anticonvulsivantes.....	31
Fenobarbital	31
Topiramato	32
Gases Nobres.....	33
Xénon	33
Árgon.....	34
Hélio	35
Hidrogénio.....	36
Agonistas de Recetores de Canabinóides.....	36
Agonistas dos adrenorecetores- α_2	38
Condicionamento	39
Glucocorticóides.....	42
Ácidos gordos	42
Etil-piruvato.....	44
Creatina-monohidrato.....	45
Transplante de células estaminais	45
Discussão	46
Agradecimentos	48
Referências bibliográficas.....	49

Índice de Abreviaturas

- EN – Encefalopatia Neonatal;
- EHI – Encefalopatia Hipóxico-Isquémica;
- HI – Hipóxia-Isquémia / Hipóxico-Isquémico(a);
- ACOG – *American College of Gynecology and Obstetrics* (Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia);
- AAP – *American Association of Pediatrics* (Associação Americana de Pediatria);
- EEG – Eletroencefalograma;
- SNC – Sistema Nervoso Central;
- ATP – Adenosina Trifosfato;
- PCr – *Phosphocreatine* (fosfocreatina);
- Na⁺ – Sódio;
- K⁺ – Potássio;
- Ca²⁺ – Cálcio;
- AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato;
- NMDA – N-metil-D-aspartato;
- NOS – *Nitric Oxide Synthase* (óxido nítrico sintetase);
- ADN – Ácido Desoxirribonucleico;
- Bax – *Bcl-2 associated X protein* (proteína X associada a Bcl-2);
- Bcl-2 – *B-cell lymphoma 2* (linfoma células B 2);
- Bcl-xL – *B-cell lymphoma-extra large* (linfoma células B extra grande);
- eNOS – NOS endotelial;
- nNOS – NOS neuronal;
- iNOS – NOS indutível;
- NO – *Nitric Oxide* (óxido nítrico);
- O₂• – Superóxido;
- OH• – Hidroxilo;
- ONOO⁻ – Peroxinitrito;
- GPx – Glutathione Peroxidase;
- SOD – Superóxido Dismutase;
- ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio);
- NF- κ B – *Nuclear Factor kappa B* (fator nuclear *kappa B*);

- JNK – *c-jun-N-terminal kinase* (cinase c-jun-N-terminal);
- TNF α – *Tumor Necrosis Factor α* (fator de necrose tumoral α);
- IL – Interleucina;
- Fas – Recetor de morte celular;
- PARP1 – *poly-ADP-ribose polymerase 1* (polimerase poli-ADP-ribose 1);
- NAD⁺ – *Nicotinamide Adenine Dinucleotide oxidized* (dinucleótido nicotinamida adenina oxidado);
- APAF1 – *Apoptotic Protease Activating Factor 1* (fator ativador de protease apoptótico 1);
- AIF – *Apoptosis-inducing Factor* (fator indutor da apoptose);
- HIF-1 α – *Hipoxia Inducible Factor 1 α* (fator-1 α induzido pela hipóxia);
- EPO – Eritropoetina;
- VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (fator de crescimento do endotélio vascular);
- SHC – *Selective Head Cooling* (arrefecimento seletivo da cabeça);
- WBC – *Whole Body Cooling* (arrefecimento corporal total);
- NICHD – *National Institute of Child Health and Human Development*;
- TOBY – *Total Body Hypothermia for Neonatal Encephalopathy Trial*;
- aEEG – *Amplitude integrated EEG* (EEG de amplitude integrada);
- HSM-CHLN – Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar de Lisboa Norte;
- ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro;
- COX – Cicloxigenase;
- BHE – Barreira Hemato-Encefálica;
- Xe – Xénon;
- p-Akt – Proteína cinase B fosforilada;
- GABA – *γ -aminobutyric acid* (ácido γ -aminobutírico);
- Ar – Árgon;
- He – Hélio;
- H₂ – Hidrogénio;
- 2-AG - 2-araquidonoil-glicerol;

- PI3K – *Phosphatidylinositol-3-kinases* (fosfatidilinositol-3-cinases);
- Akt – Proteína cinase B;
- CB – Recetores canabinóides;
- ROS – *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigénio);
- UGT – 5-difosfogluconosil-transferase;
- CYP450 – Citocromo P450;
- DHA – *Docosohexanoic acid* (ácido docosahezanóico);
- Cr – Creatina-monohidrato;
- EP – Etil-piruvato.

Resumo

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) é uma das principais causas de mortalidade e sequelas neurológicas evitáveis no recém-nascido, principalmente em países em desenvolvimento. São reconhecidas três fases de lesão hipóxico-isquêmica: fase primária/aguda de lesão neuronal e esgotamento das reservas cerebrais de energia com necrose, fase secundária/tardia mediada por *stress* oxidativo, citocinas e apoptose, onde ocorre a maior parte da lesão cerebral, e a fase terciária de perpetuação da inflamação com alterações epigenéticas, que trava a recuperação. O tratamento clássico consistia em medidas de suporte, mas o maior conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes levou ao desenvolvimento de terapêuticas neuroprotetoras, para uso em monoterapia ou como adjuvantes, uma vez que a combinação de vários agentes com diferentes alvos terapêuticos seria benéfica.

Neste trabalho, são abordados os avanços dos últimos 5 anos na área da neuroproteção, nomeadamente a hipotermia, utilizada na clínica com bons resultados mas algumas limitações, e novos agentes atualmente em estudo: melatonina, eritropoetina, alopurinol, anticonvulsivantes, gases nobres, hidrogénio, agonistas de recetores de canabinóides, condicionamento, glucocorticoides, agonistas dos adrenorecetores- α_2 , ácidos gordos, creatina-monohidrato, etil-piruvato e transplante de células estaminais. Apesar destes grandes avanços, ainda não foi possível acrescentar nenhuma arma terapêutica ao arsenal contra a EHI para além da hipotermia. Para todas as outras, são necessários ainda mais estudos que permitam determinar a sua eficácia e segurança em monoterapia ou como adjuvantes da hipotermia.

Palavras-chave: Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica; Asfixia Neonatal; Fármacos Neuroprotetores; Hipotermia Induzida; Melatonina; Eritropoetina; Alopurinol; Fenobarbital; Topiramato; Xénon; Árgon; Hélio; Agonistas de Recetores de Canabinóides; Pré-

Condicionamento Isquémico; Memantina; Pós-Condicionamento Isquémico; Dexametasona; Dexmedetomidina; Ácido Docosohexanóico; Creatina; Etil-piruvato; Transplante de Células Estaminais.

Abstract

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) is one of the main avoidable causes of death and neurodisability in the newborn, particularly in developing countries. There are three stages in the hypoxic-ischemic lesion: primary stage with acute neuronal damage and depletion of the cerebral energy storages and necrosis, secondary stage with delayed injury through oxidative stress, citocines and apoptosis, and a terciary stage of continued inflammation and epigenetic alterations which put a halt in recovery. Previously, the treatment consisted of support mesures, but the increased knowledge of the underlying physiopathological mechanisms lead to the development of neuroprotective agents, meant to be used exclusively or as adjuvants, since the combination of different agentes with different targets would be beneficial.

This article reviews the advancements in neuroprotection in the last 5 years, namely hypothermia, currently used in the clinical setting with good results and a few limitations, and new agentes currently on trial, such as melatonin, erythropoietin, allopurinol, phenobarbytal, noble gases, hydrogen, cannabinoid receptor agonists, conditioning, gluccocorticoids, α_2 - adrenoreceptor agonists, fatty acids, creatine monohydrate and ethyl-pyruvate. Despite these advancements, there are no other clinical options in the treatment of HIE apart from hypothermia. Further studies regarding efficacy and safety in monotherapy or as adjuvants with hypothermia are needed.

Keywords: *Hypoxia-Ischemia, Brain; Asphyxia Neonatorum; Neuroprotective Agents; Hypothermia, induced; Melatonin; Erythropoietin; Allopurinol; Phenobarbytal; Topiramate; Xenon; Argon; Helium; Cannabinoid Receptor Agonists; Ischemic Preconditioning; Memantine; Ischemic Postconditioning; Dexamethasone; Dexmedetomidine; Docosohexanoic Acid; Creatine; Ethyl-pyruvate; Stem Cell Transplantation.*

Introdução

A encefalopatia neonatal (EN) consiste num conjunto de manifestações clínicas de disfunção neurológica num recém-nascido de termo durante o período neonatal precoce¹⁻³, nomeadamente: dificuldade em iniciar e manter a função respiratória, diminuição do tónus e reflexos, depressão do estado de consciência e convulsões³⁻⁵.

O termo encefalopatia hipóxico-isquémica (EHI) diz respeito aos casos de EN em que exista evidência clara de um evento que provoque défice de oxigenação tecidual (hipóxia) e/ou redução da perfusão sanguínea em determinado território (isquémia) - lesão hipóxico-isquémica (HI), ou seja, asfixia perinatal^{1,2,6,7}. Não há acordo entre os diversos autores no que diz respeito à definição de asfixia, embora a tendência atual seja a de adotar os recentes critérios do *American College of Gynecology and Obstetrics* (ACGO - Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia) e da *American Association of Pediatrics* (AAP - Associação Americana de Pediatria) e que são : acidose metabólica ou mista grave ($\text{pH} < 7$) no sangue arterial umbilical, quando for possível fazer esta determinação; índice de Apgar < 3 aos 5 minutos de vida, apesar de ter sido feita uma reanimação correta; presença de manifestações neurológicas no período neonatal imediato (convulsões, hipotonia, coma, sinais de EH-I) e/ou evidência de disfunção multiórgão dentro das primeiras 72 horas após o parto¹.

A classificação de Sarnat e Sarnat (Tabela 1) divide a EHI em três graus, consoante as suas manifestações clínicas^{1,5,8}.

	Grau I (Ligeira)	Grau II (Moderada)	Grau III (Grave)
Nível de consciência	Irritabilidade/Hiperalerta	Letargia	Estupor ou Coma
Movimentos espontâneos	Normais ou ↓	↓	Ausentes
Tónus	Normal ou ↑	Hipotonia	Hipotonia marcada
Reflexos primitivos	Exagerados	Difícil elicitação	Ausentes
Sucção	Fraca	↓	Ausente
Convulsões	Ausentes	Tónico-clónicas ou Tónicas	Mal convulsivo
Pupilas	Dilatadas	Miose	Resposta lenta ou sem resposta
Frequência cardíaca	Taquicardia	Variável	Bradycardia, hipotensão, apneia

Tabela 1- Classificação de Sarnat e Sarnat.

EN e EHI são usados incorretamente como sinónimos^{1,3}, o que torna difícil determinar com exatidão a incidência e prevalência da EHI¹.

Apesar da melhoria dos cuidados de saúde perinatais nos países desenvolvidos, permitindo uma diminuição da sua incidência^{1,4,9,10}, esta permanece elevada. Estima-se que ocorre em 1,5 em cada 1000 nados vivos de termo em países desenvolvidos^{8,11-14}. É uma causa importante de morbimortalidade^{2,5,8,9,11,15-17} quer a curto quer a longo prazo, sendo a asfixia a causa de morte em cerca de ¼ dos óbitos neonatais globais anualmente⁷⁻⁹. Associa-se a sequelas neurológicas significativas, nomeadamente paralisia cerebral, epilepsia^{5,9,11,12,18}, atrasos do desenvolvimento e défices cognitivos⁹.

O impacto psicossocial e económico que acarretam^{2,5,16} faz com que o desenvolvimento de novos tratamentos que sejam eficazes, seguros, facilmente acessíveis e economicamente viáveis se mantenha na ordem do dia.

Classicamente, o tratamento da EHI consistia apenas em tratamentos de suporte^{1,3}, nomeadamente reanimação, ventilação, oxigenação e administração de fármacos

anticonvulsivantes¹. No entanto, a maior compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à lesão HI cerebral levou ao desenvolvimento de terapêuticas neuroprotetoras¹⁹. Proteger o cérebro do recém-nascido no período perinatal é uma prioridade de saúde global².

Assim, este trabalho pretende compilar o conhecimento adquirido acerca destas novas terapêuticas nos últimos cinco anos (2010-2015), de forma a perceber os novos caminhos a traçar.

Material e Métodos

Procedeu-se à pesquisa de artigos nas bases de dados PubMed, B-On e ClinicalKey®, usando como termos de pesquisa os termos MeSH “*hypoxia-ischemia, brain*”, “*neuroprotective agentes*” e “*asphyxia neonatorum*”. Dos 65 artigos obtidos, foram excluídos os artigos publicados com data prévia a de janeiro de 2010 e artigos não publicados em inglês, português ou espanhol. Após análise dos restantes 31 artigos, foram excluídos 5 cujo conteúdo não se adequava ao objetivo deste trabalho, resultando num total de 26 artigos. Posteriormente foi acrescentado um artigo publicado em 2016. Algumas referências adicionais foram incluídas para contextualização e por serem consideradas de particular relevância, num total de 39.

Fisiopatologia

A compreensão da fisiopatologia da EHI é decisiva para compreender as diferentes estratégias de neuroproteção.

Resposta fetal à hipóxia-isquémia

Na sequência do estímulo HI, há uma resposta fetal no sentido de reduzir o consumo energético (oxigénio (O₂) e glucose) e de manter a oxigenação cerebral, nomeadamente pela redução dos movimentos fetais¹. Assim, ocorre uma redistribuição do fluxo sanguíneo para órgãos vitais como o coração e sistema nervoso central (SNC), com diminuição da frequência cardíaca e de aporte sanguíneo periférico¹, inicialmente sem condicionar acidose metabólica.

Quando a HI é mais grave ou prolongada, desencadeia-se uma acidose metabólica¹⁵, uma vez que a irrigação músculo-esquelética e visceral é insuficiente, sendo privilegiado o metabolismo anaeróbio¹. No entanto, o déficit mantido de O₂ e glucose esgota este mecanismo, pelo que o aporte sanguíneo se torna globalmente insuficiente¹. O feto e o recém-nascido reagem à hipóxia com cessação da respiração (apneia primária) seguida de *gasping* (respiração profunda irregular), culminando numa respiração fraca e subsequente exaustão e apneia secundária¹ (Figura 1). Ao nascer, a apneia primária e secundária são indistinguíveis, uma vez que em ambas o recém-nascido não respira e está bradicárdico¹. Apenas a resposta à reanimação será diferente: na primeira a resposta ao estímulo será suficiente, enquanto que na segunda será necessária reanimação com ventilação assistida para que reinicie a respiração espontânea¹.

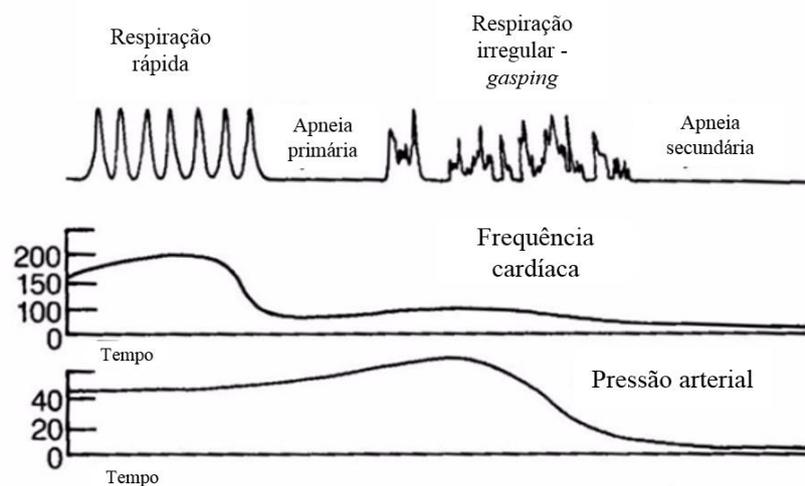


Figura 1 - Alterações respiratórias decorrentes da hipóxia e seu rebote cardiovascular. Adaptado de "Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology".

Mecanismos da lesão cerebral

O cérebro do recém-nascido é particularmente vulnerável à lesão hipóxico-isquémica^{18,22,23} devido a algumas particularidades: aumento da sensibilidade neuronal aos neurotransmissores^{1,15,21}, mecanismos de absorção de glicose imaturos¹, estado pró-oxidante^{1,15} com defesas anti-oxidantes imaturas^{1,4,5,15,24} e alta taxa metabólica¹, que o tornam mais vulnerável à HI. O fluxo sanguíneo cerebral, com um fraco mecanismo de autorregulação dependente da normal atividade endotelial, associado ao facto da circulação cerebral ser

terminal e sem anastomoses, aumentam esta vulnerabilidade¹. Todas estas características apresentam algum grau de variabilidade regional, o que faz com que o insulto HI, embora global, se traduza em lesões cerebrais focais, nomeadamente nos gânglios da base e córtex parassagital¹.

São reconhecidas três fases de lesão HI (Figura 2): fase primária/aguda de lesão neuronal e esgotamento das reservas de energia, fase secundária/tardia mediada por *stress* oxidativo, citocinas inflamatórias e apoptose^{4,7,12,25} e uma fase terciária de perpetuação da inflamação com alterações epigenéticas⁴.

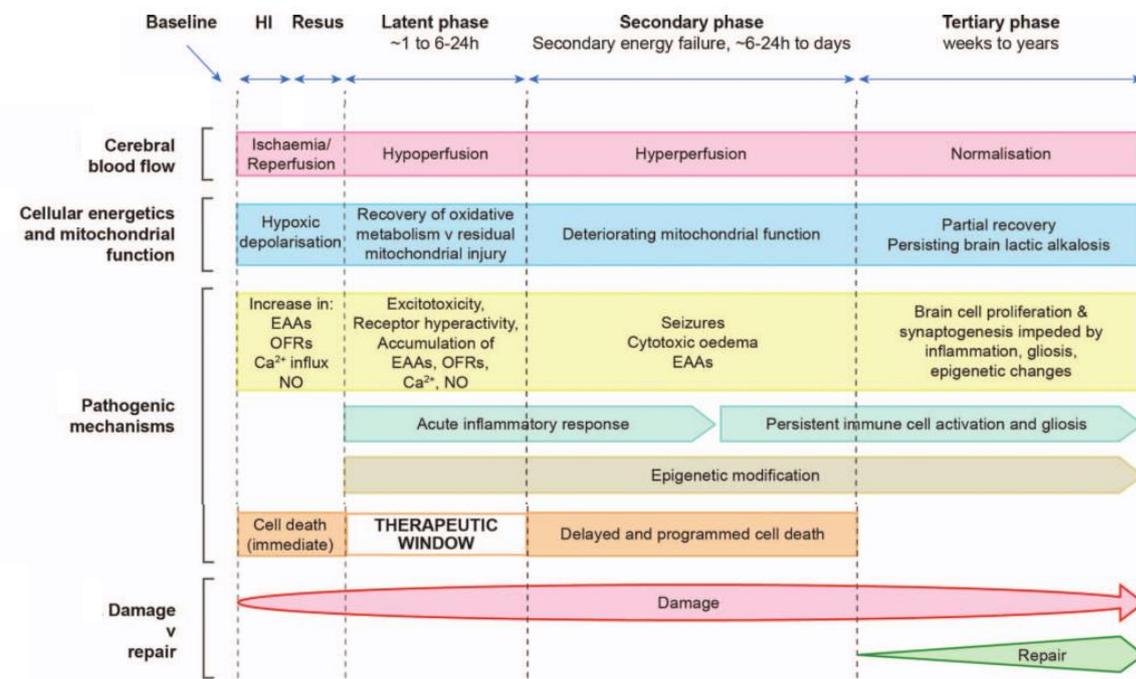


Figura 2- Fases de lesão hipóxico-isquémica. Adaptado de "New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection". EAA=aminoácidos excitatórios; OFR= radicais livres de oxigénio; Ca²⁺=cálcio; NO= óxido nítrico.

A fase aguda corresponde à lesão HI propriamente dita, com duração de minutos²⁵. Nesta primeira fase ocorre morte celular cuja magnitude é dependente da gravidade e duração da HI^{4,11,17}. Predomina a disfunção das bombas eletrolíticas^{1,4,7,15}, gerando edema cerebral citotóxico e morte celular necrótica^{18,26} (Figura 3). Na ausência de substratos nutritivos (O₂ e glucose)^{1,24,26}, as reservas cerebrais de metabolitos de alta energia, nomeadamente adenosina

trifosfato (ATP), diminuem de forma rápida e significativa^{1,2,4,5,15,18,26} (insuficiência energética primária)⁷ uma vez que o metabolismo anaeróbio resulta na produção de menores quantidades de ATP que o metabolismo oxidativo. Inicialmente a acumulação de ácido láctico promove a produção de ATP a partir da fosfocreatina (*phosphocreatine* (PCr)) e o aumento do fluxo sanguíneo cerebral, mas similarmente, este mecanismo também se esgota¹. Conseqüentemente, há falência de transportadores dependentes do ATP, inclusivé da bomba de sódio/potássio (Na^+/K^+)^{1,4,7,15}. A falha deste processo químico leva à acumulação intracelular de Na^+ , cálcio (Ca^{2+}) e água^{1,2,7,15,25,26}, provocando edema e lise celular^{1,2,4,7,15,25,26}, e à despolarização da membrana neuronal^{1,4,5,7,24,26}. Esta última desencadeia um processo denominado excitotoxicidade, devido à libertação e subsequente acumulação de aminoácidos excitatórios na fenda sináptica, sobretudo o glutamato^{1,4,5,7,15,16,18,24,26}. Esta acumulação deve-se ao facto do glutamato apenas poder ser removido por transportadores dependentes de ATP^{1,5,15,26}, o que não é exequível num contexto de défices energéticos⁷.

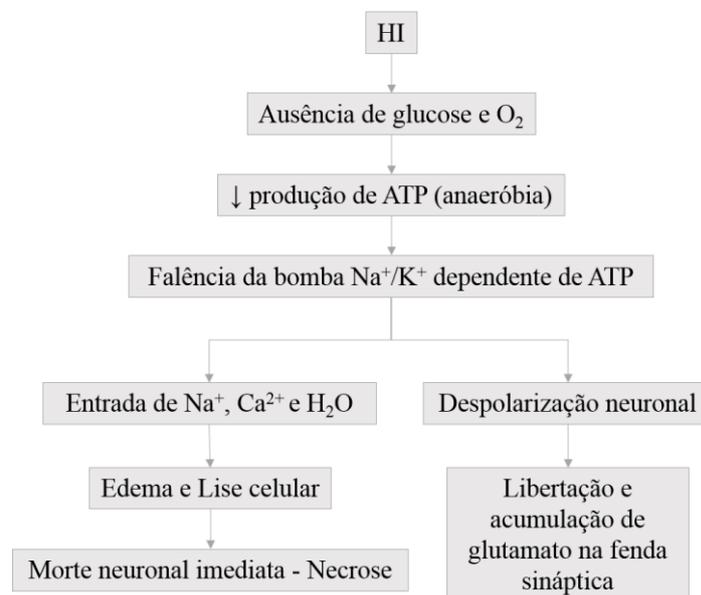


Figura 3- Mecanismos de lesão neuronal aguda. O_2 =oxigénio; Na^+/K^+ =sódio/potássio; ATP=adenosina trifosfato; Ca^{2+} =cálcio.

A maioria dos neurónios e células da glia possuem recetores do glutamato, que se dividem em 3 grandes grupos: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e N-

metil-D-aspartato (NMDA) e kainato¹. O excesso de estimulação excitatória extracelular provoca ativação dos recetores, nomeadamente NMDA^{1,4,5,7,9,11,15-17,20,24-26}. Os canais NMDA imaturos abrem mais facilmente e ficam abertos durante mais tempo, uma vez que são mais ricos em subunidades NR2B^{5,15}, permitindo a entrada de grandes quantidades de Ca²⁺ na célula^{1,4,5,7,9,11,15-17,20,24-26} (Figura 4). Algumas células entram num processo de necrose na sequência destes eventos^{18,26}, enquanto outras ficam num estado de “penumbra isquémica”¹⁸, sendo estas últimas que estão sujeitas a mecanismos desencadeados pelo Ca²⁺ e glutamato que ativam reações químicas em cascata com geração de radicais livres e morte celular, cuja maior expressão se verifica na fase de lesão seguinte.

O excessivo influxo de Ca²⁺ (Figura 4) faz com que este atinja concentrações intracelulares tóxicas⁴. Transportadores de Ca²⁺ dependentes de ATP, na tentativa de corrigirem os níveis intracelulares excessivos, acabam por perpetuar o processo, pois agravam o défice energético^{1,7,15}. Consequentemente são ativadas cascatas neurotóxicas: ativação da óxido nítrico sintetase (*nitric oxide synthase* - NOS), com a formação de altas concentrações de radicais livres e espécies reativas de óxido nítrico^{1,2,4,5,7,15,16,18,24}; ativação de fosfolipases, proteases e nucleases (degradação de lípidos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (ADN))^{1,7,11,15,25}; disfunção mitocondrial⁷ com desacoplamento da fosforilação oxidativa^{1,15}, ativação de cinases¹⁵ e transcrição de genes pró (*Bcl-2 associated X protein* (Bax)) e anti-apoptóticos (*B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-xL))^{2,15,20,26} e acumulação de xantina¹⁶ libertada por um ataque proteolítico à xantina desidrogenase¹⁴.

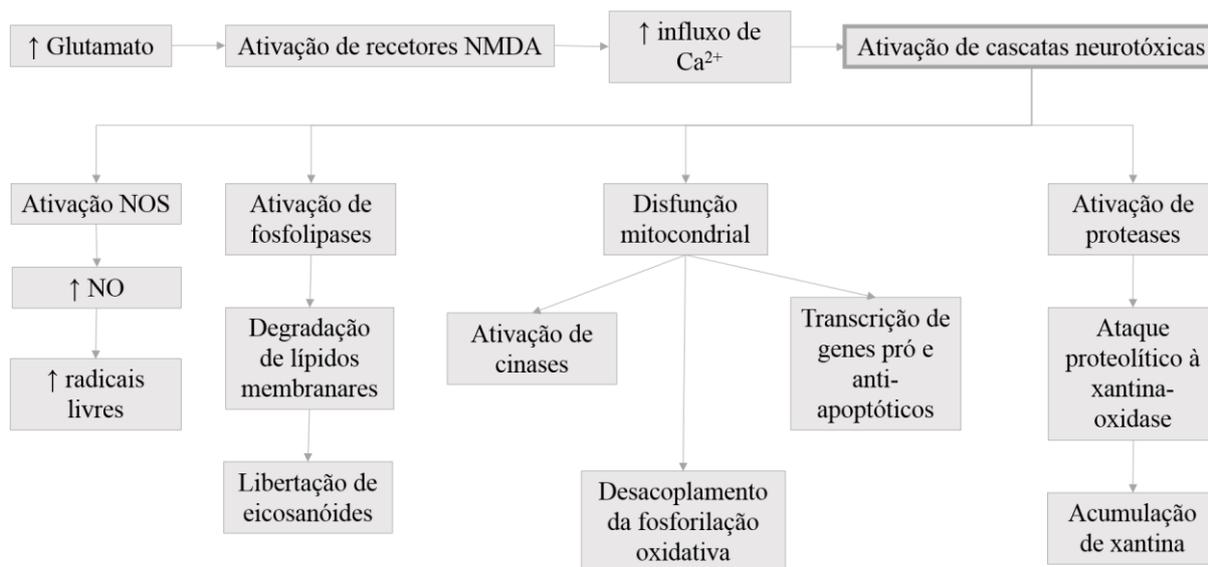


Figura 4 - Consequências do excessivo influxo de cálcio. NMDA= N-metil-D-aspartato; Ca^{2+} = cálcio; NOS= óxido nítrico sintetase; NO= óxido nítrico.

São conhecidas três isoformas de NOS: a endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), ambas constitucionais, e a indutível (iNOS)^{11,15}, que se encontram aumentadas após a HI^{1,11}. Quando ativada, a NOS leva à produção de óxido nítrico (*nitric oxide* (NO)), que modifica os locais de ligação de glicina dos receptores NMDA, facilitando ainda mais a entrada de cálcio.

Na reperfusão, o edema e a acumulação de aminoácidos excitatórios resolve parcialmente em 30-60 minutos, com aparente recuperação da função mitocondrial e do metabolismo oxidativo e inibição das cascatas neurotóxicas^{4,5,7,11,26}. Nos recém-nascidos nos quais não se observa esta melhoria está descrito um pior prognóstico²⁶. No entanto, a chegada de O_2 às células vai criar as condições necessárias para uma grande formação de radicais livres²⁶ (Figura 5). A xantina acumulada é metabolizada pela xantina oxidase em ácido úrico, ocorrendo a formação do radical livre superóxido ($O_2\cdot$)^{11,14-16}, fundamental para a produção de radicais livres e outros tóxicos: reage com ferro livre, formando o radical hidroxilo ($OH\cdot$) e reage com o NO, formando peroxinitrito ($ONOO^-$)^{5,11,16}, que danificam as mitocôndrias através da peroxidação e nitrosilação de lipídios membranares^{1,4,5,11,15,26} e fragmentam o ADN⁵. A disfunção mitocondrial e a despolarização de membrana perpetuam-se com aumento da

libertação de radicais de oxigénio e declínio dos antioxidantes endógenos (por exemplo, glutatona peroxidase (GPx), catalase ou superóxido dismutase (SOD), imaturos no cérebro

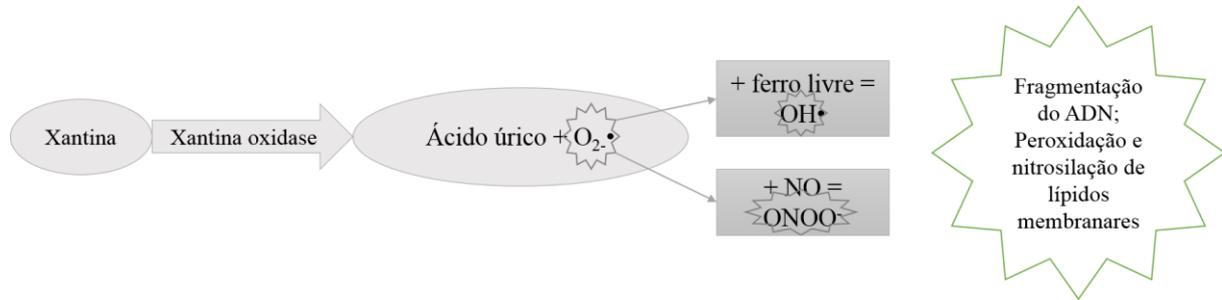


Figura 5- Produção de radicais livres. $O_2^{\bullet -}$ = superóxido; OH^{\bullet} = hidroxilo; NO = óxido nítrico; ONOO- = peroxinitrito.

neonatal)^{1,4,5,15,24}. As espécies reativas de oxigénio são ainda responsáveis por novas alterações da unidade neurovascular, perpetuando o processo patológico⁶. O cérebro em desenvolvimento é pró-oxidante¹⁵, com alta concentração de ácidos gordos polinsaturados, alvos das espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species* (ROS)) para formação de radicais livres¹⁵, e ferro livre abundante^{15,24}. O ferro livre é tóxico, sendo um forte agente oxidante e redutor biológico¹⁵. Reage com radicais intermediários de oxigénio, produzindo oxidantes agressivos, que por sua vez são capazes de induzir a libertação de mais ferro a partir da ferritina¹⁵, encerrando o ciclo.

Os elevados níveis de aminoácidos excitatórios e a grande concentração de radicais livres conduzem à ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear *kappa* B (*nuclear factor kappa B* (NF- κ B))⁵ e a cinase c-jun-N-terminal (*c-jun-N-terminal kinase* (JNK)), ativadores da resposta inflamatória com abundante formação de citocinas pró e anti-inflamatórias, da produção de iNOS e de apoptose inapropriada, perpetuando a lesão¹⁶ (Figura 6). A ativação de fosfolipases citosólicas anteriormente referida também desencadeia o aumento da libertação de eicosanóides e consequentemente início da cascata da inflamação^{1,4}. A inflamação regula simultaneamente os mecanismos patológicos de lesão HI e os mecanismos de reparação tecidual (Figura 6)². O processo de HI leva à libertação de citocinas e quimiocinas provenientes dos neurónios, astrócitos e microglia, com subsequente ativação da microglia^{4,7,15,17}, libertação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose

tumoral α - *tumor necrosis factor α* (TNF α), interleucina (IL)-1, IL-8, IL-10)^{4,7,15,17,26} e recrutamento de leucócitos, nomeadamente macrófagos, cuja infiltração agrava a lesão^{17,26}. A micróglia ativada e os leucócitos são ainda fontes de metaloproteínases capazes de clivar proteínas da matriz extracelular¹⁵.

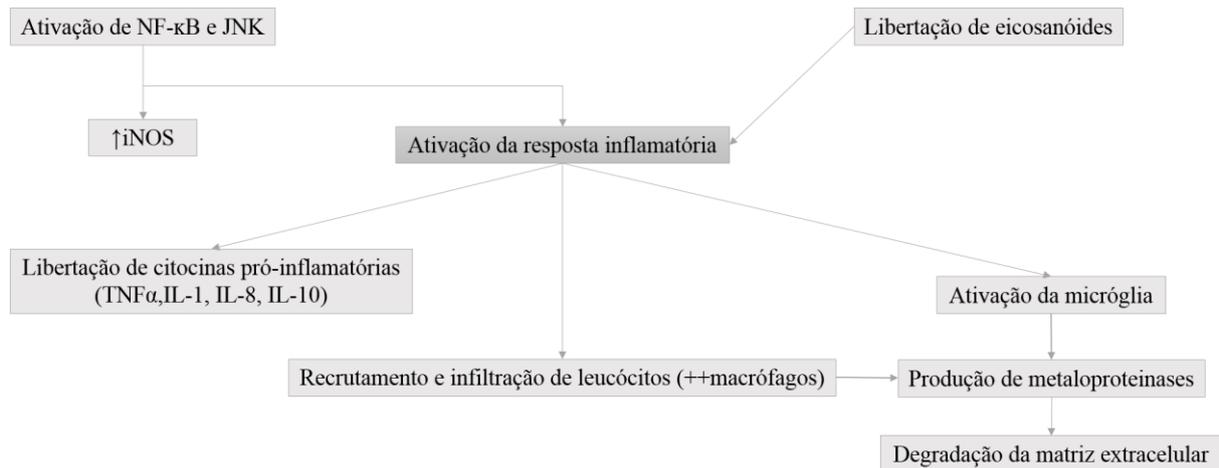


Figura 6- Ativação da resposta inflamatória. *NF-κB*= fator nuclear kappa B; *JNK* = cinase c-jun-N-terminal; *iNOS* = óxido nítrico sintetase indutível; *TNF* = fator de necrose tumoral; *IL* = interleucina.

Estes mecanismos continuam a decorrer a nível intracelular na fase latente, nas células em “penumbra isquémica”, ocorrendo hipoperfusão^{4,26} e hipometabolismo, cuja duração tem uma relação inversa com a gravidade do insulto⁴. Neste período de recuperação precoce, um aumento de PCr está associado a melhor prognóstico, enquanto que um aumento de lactato e fosfato inorgânico estão associados a sequelas agravadas⁴. Considera-se este período como a “janela terapêutica”, uma vez que ainda não ocorreu lesão secundária^{2,4,7,11}.

Na fase secundária, com hiperperfusão relativa^{4,26}, ocorre nova deterioração do metabolismo oxidativo, 6 a 24 horas após a lesão (insuficiência energética secundária)^{4-6,11,16}, com diminuição de PCr e ATP e aumento de lactatos⁴. Esta é a fase de lesão máxima^{2,4}, com duração de horas a dias ou até semanas⁵. Surgem convulsões^{4,5,7,11,26}, edema citotóxico

secundário, acumulação de citocinas^{4,7,11}, formação de radicais livres tóxicos^{7,23,26} e insuficiência mitocondrial, culminando na morte celular tardia/programada^{4,7,11,26}.

A apoptose é o principal mecanismo de morte celular em resposta ao *stress* oxidativo^{5,15} (Figura 7). Pode ocorrer de forma dependente ou independente de caspases¹⁵, pela via intrínseca (ativada por sinais mitocondriais) ou extrínseca (ativada pela ligação de citocinas inflamatórias ao recetor de morte celular Fas)^{5,20}. O desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial e a fragmentação do ADN levam ao aumento da atividade da enzima de reparação do ADN polimerase poli-ADP-ribose 1 (*poly-ADP-ribose polymerase 1* (PARP1)), que consome dinucleótido nicotinamida adenina oxidado (*nicotinamide adenine dinucleotide oxidized* (NAD⁺)), agravando a falha energética e subsequente indução da permeabilidade da membrana mitocondrial externa com libertação de citocromo-c através de canais formados por proteínas Bax^{5,15}. O citocromo-c ativa a caspase-3 de forma direta e indireta após a formação do apoptossoma, conjuntamente com o fator ativador de protease apoptótico 1 (*apoptotic protease activating factor 1* (APAF1)) e caspase-9^{5,15}. Por outro lado, a ativação do recetor Fas determina a ativação da caspase-8 e os recetores NMDA ativam a calpain, que também ativam a caspase-3⁵. A caspase-3 ativa outras caspases da cascata, culminando na morte celular^{5,15,26}. A mitocôndria lesada produz também fator indutor de apoptose (*apoptosis-inducing factor* (AIF)), que promove a fragmentação do ADN diretamente^{5,15}.

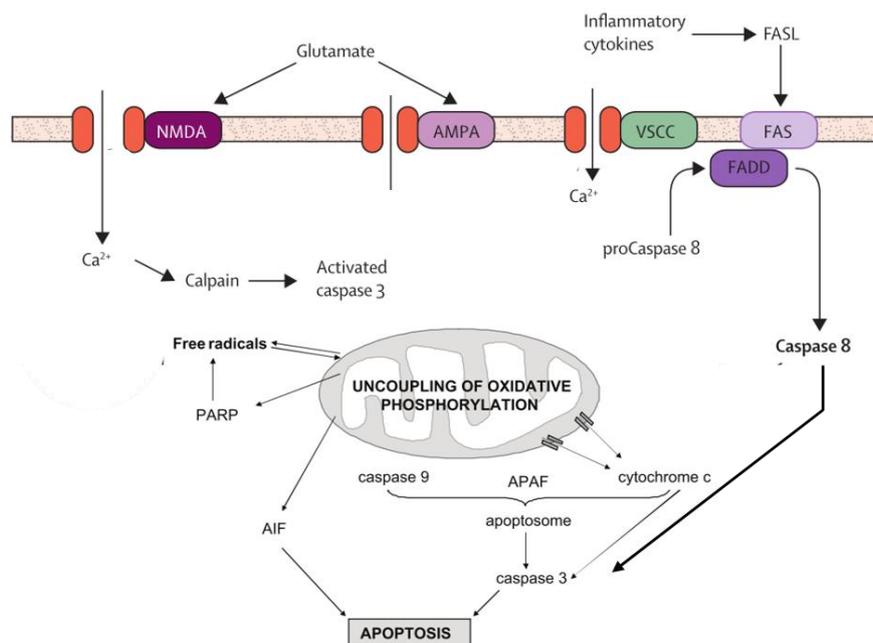


Figura 7- Indução da apoptose - morte neuronal tardia. Adaptado de “Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care” e “New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn”. FAS= recetor de morte celular; APAF= fator ativador de protease apoptótica; PARP = polimerase poli-ADP-ribose; AIF = fator indutor de apoptose.

A ativação destes mecanismos parece ter algumas diferenças de género: o sexo masculino é mais suscetível à morte celular pela via de NMDA e exposição ao NO, com libertação preferencial de AIF da mitocôndria, enquanto o feminino é mais sensível à caspase-3, com libertação preferencial de citocromo c mitocondrial⁵. Estas diferenças parecem explicar a maior incidência de paralisia cerebral em rapazes⁵.

Tendo em conta que os processos patológicos persistem durante semanas, meses e até anos, considera-se a existência de uma fase terciária⁴. Observa-se uma recuperação parcial da função mitocondrial e do seu metabolismo oxidativo⁴. No entanto, a perpetuação do mecanismo inflamatório através da gliose e ativação persistente de recetores inflamatórios, bem como a ocorrência de alterações epigenéticas, impedem a reparação a longo-prazo⁴. O suporte trófico inadequado, com baixos níveis de fatores de crescimento neuronais como o fator-1 α induzido pela hipóxia (*hipoxia inducible factor 1 α* (HIF-1 α)), que é ativado durante a HI, conduzindo à

produção de eritropoetina (EPO) e fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor* (VEGF)) e consequente reparação cerebral¹⁶, tem também um efeito deletério na angiogénese e neurogénese durante a fase de recuperação^{4,11,15,16}.

A complexidade fisiopatológica subjacente ao processo da EHI implica várias vias de potencial alvo terapêutico.

Tratamentos neuroprotetores

A lesão cerebral e a incapacidade funcional resultam do desequilíbrio entre os mecanismos lesionais, como a morte celular e a inflamação persistente, e o processo de proteção endógena (restabelecimento da função mitocondrial e metabolismo oxidativo, produção de antioxidantes endógenos, angio e neurogénese, entre outros)². Deste modo, o fundamento principal da neuroproteção é a mobilização dos mecanismos neuroprotetores endógenos próprios do organismo^{2,21} de forma a reduzir os efeitos deletérios da lesão HI (Tabela 2). O entendimento de que a lesão celular ocorre não só durante o insulto HI, mas também na fase secundária, conduz a uma janela terapêutica que permite o uso de neuroproteção^{1,16,21,25}, situada nas primeiras seis horas de vida após o insulto^{16,25}. Assim, as propostas terapêuticas num quadro de EHI, que a seguir se detalham, devem ser iniciadas em diferentes momentos (janela terapêutica ótima), consoante os seus mecanismos de ação¹⁴.

Ação neuroprotetora	Tratamentos neuroprotetores
↓ Taxa metabólica cerebral	Hipotermia; Fenobarbital; Condicionamento hipóxico
Bloqueio dos recetores NMDA	Xénon; Memantina; (+)MK-801
↓ Liberação/excitotoxicidade do glutamato	Hipotermia; Fenobarbital; Topiramato; Canabinóides; Dexmedetomidina
↓ Formação/concentração de radicais livres	Hipotermia; Melatonina; Eritropoetina; Alopurinol; Fenobarbital; Hidrogénio; Canabinóides; Condicionamento hipóxico; Ácido docosohexanóico; Creatina monohidrato
↓ Resposta inflamatória	Hipotermia; Melatonina; Eritropoetina; Alopurinol; Canabinóides; Dexmedetomidina; Condicionamento hipóxico; Ácido docosohexanóico; Etilpiruvato; Transplante de células estaminais
Atenuação da apoptose	Hipotermia; Melatonina; Eritropoetina; Xénon; Árgon; Hélio; Canabinóides; Dexmedetomidina; Condicionamento hipóxico; Ácido docosohexanóico; Etilpiruvato; Transplante de células estaminais
Estímulo da reparação celular/tecidual	Eritropoetina; Xénon; Canabinóides; Condicionamento hipóxico; Creatina monohidrato; Transplante de células estaminais

Tabela 2- Ação neuroprotetora dos tratamentos abordados neste trabalho

Hipotermia

A hipotermia enquanto agente terapêutico usado em recém-nascidos tem sido relatado desde os anos 50^{5,20}, mas foi na última década que ganhou grande aplicabilidade clínica, sendo hoje largamente reconhecida como terapêutica de eleição em países desenvolvidos^{4,5,7,8,10,20,21,27}. Esta medida terapêutica está associada à redução das taxas de mortalidade e de défices neurológicos nas primeiras 24 horas de vida^{7,21,28} e a menor incidência de lesões cerebrais^{7,28}. Atualmente é a única terapêutica com eficácia comprovada na clínica^{2,8,14,22,23,29}.

Embora o seu mecanismo de ação específico não seja conhecido^{3,5,24}, a hipotermia é neuroprotetora pela atenuação de quase todas as fases de lesão HI^{3,7}. Há uma redução da taxa

de metabolismo cerebral de cerca de 5 a 7% por cada grau Celsius de descida de temperatura^{2,4,7,26}. Deste modo, inibe a insuficiência de energia cerebral e a acumulação de ácido láctico, preserva os fosfatos cerebrais de alta energia (ATP), reduz as concentrações de glutamato e NO^{4,5,7}, suprime as cascatas inflamatórias pós-isquêmicas e inibe a via intracelular da apoptose (diminuição da translocação de citocromo-c e da atividade das caspases e aumento da expressão de Bcl-2)^{4,26}, culminando globalmente na diminuição do edema citotóxico e na perda de tecido cerebral^{4,7,26}. Conhecer o exato ponto a partir do qual estas ações se tornam irreversíveis permitiria otimizar a administração de hipotermia²⁶.

Quanto à janela terapêutica, sabe-se que a hipotermia deve ser iniciada durante a fase latente de lesão HI e mantida até ao final da fase secundária, pelo que se deve iniciar o mais cedo possível após a reanimação²⁶. No entanto, o tempo que medeia até ao diagnóstico correto de EHI pode ultrapassar a janela ótima de intervenção, diminuindo a eficácia desta técnica^{26,29}.

O sucesso dos estudos em modelos animais alargou a sua realização a estudos em humanos, confirmando a sua aplicabilidade e segurança⁷. No recém-nascido, foram estudados dois métodos para indução da hipotermia, com resultados sobreponíveis³⁰⁻³². A hipotermia pode ser sistémica, com arrefecimento corporal total (*whole body cooling* - WBC) até uma temperatura retal alvo de 33,5°C^{4,5,7,8,29,30,32} ou arrefecimento seletivo da cabeça (*selective head cooling* - SHC) com hipotermia sistémica moderada, através da colocação de um capacete de arrefecimento até uma temperatura retal obtida de 34,5°C^{4,5,7,29,31}. A temperatura deve ser monitorizada continuamente através de uma sonda de determinação de temperatura central (retal ou esofágica), indicadora fiável da temperatura cerebral^{2,28,30}. Ambas se traduzem numa redução da temperatura central de 3 a 4°C comprovadamente neuroprotetora²⁹.

A SHC pode ser vantajosa, uma vez que é possível que diferentes regiões cerebrais tenham temperaturas de neuroproteção ótimas diferentes, mas o arrefecimento apenas se

verifica numa profundidade de dois centímetros a partir do escalpe²⁹. Por outro lado, o papel da inflamação sistémica na propagação da lesão cerebral pode ser relevante, o que conferiria vantagens à WBC, uma vez que permitiria atenuar a disseminação sistémica de citocinas, o que não é viável do SHC²⁹. Apesar de tudo, ainda não se sabe qual será o modo que atinge mais benefício ou mesmo se há diferenças de todo⁴. O reaquecimento é iniciado às 72 horas de tratamento, independentemente da evolução clínica, a um ritmo de aumento de 0,1 a 0,4°C por hora até aos 36,5°C de temperatura retal, devendo ser mais lento em caso de convulsões frequentes ou instabilidade hemodinâmica².

Nos três principais estudos realizados (*CoolCap* - arrefecimento seletivo da cabeça, NICHD - *National Institute of Child Health and Human Development* e o TOBY- *Total Body Hypothermia for Neonatal Encephalopathy Trial*) a metodologia é muito semelhante, nomeadamente no que diz respeito à população selecionada: recém-nascidos com idade gestacional igual ou superior a 36 semanas, com documentação de asfixia (baixo índice de Apgar ou necessidade de ressuscitação prolongada ou ventilação) ou acidose metabólica grave na 1ª hora de vida e clínica de encefalopatia moderada ou grave³⁰⁻³². No *CoolCap* e no TOBY era também necessária a documentação neurofisiológica da encefalopatia usando EEG de amplitude integrada (*amplitude integrated EEG (aEEG)*)^{30,32}. Todos os participantes foram recrutados até às seis horas de vida, de acordo com o estabelecido pelos estudos experimentais e a terapêutica foi mantida durante 72 horas³⁰⁻³². O método de arrefecimento, a temperatura alvo e o local de monitorização da temperatura foi diferente nos três estudos, tendo o reaquecimento ocorrido de forma semelhante, a um ritmo de 0,5°C por hora³⁰⁻³². Os três estudos tiveram como objetivo primário avaliar o resultado combinado de morte e alterações moderadas a graves do neurodesenvolvimento aos 18 meses, tendo sido documentada a sua redução no grupo sujeito a hipotermia em todos, apesar de apenas no estudo NICHD essa redução ter significado estatístico³⁰⁻³². Inicialmente, antes dos ensaios estarem concluídos, havia uma

preocupação na possibilidade da hipotermia permitir a sobrevivência dos recém-nascidos com EHI, que sem terapêutica estariam destinados a morrer, aumentando a incidência de sequelas graves nos sobreviventes³³. Na realidade, constatou-se quer uma redução da mortalidade quer uma redução das sequelas nos sobreviventes³³.

O programa de hipotermia induzida na EHI do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria – Centro Hospitalar de Lisboa Norte (HSM-CHLN), pioneiro em Portugal, relata nos primeiros dois anos de experiência com WBC e sedação com morfina em perfusão contínua 10-20µg/kg/h uma mortalidade de 15%, taxa de sequelas neurológicas de 41%, com incidência de mortalidade e sequelas neurológicas em 50% dos doentes submetidos a hipotermia, sendo que destes 38% tinham encefalopatia grave à admissão⁸. Os critérios de inclusão utilizados foram os seguintes: recém-nascidos com mais de 36 semanas de gestação e menos de 6 horas de vida à data da referenciação, evidência de asfixia perinatal (índice de Apgar ≤ 5 aos 10 minutos e/ou necessidade de manobras de reanimação aos 10 minutos e/ou pH < 7.0 nos primeiros 60 minutos de vida e/ou déficit bases ≥ 16 mM nos primeiros 60 minutos de vida), clínica de encefalopatia moderada/grave ou convulsões (alteração do estado de consciência, hipotonia generalizada ou focal, diminuição dos reflexos primitivos, convulsões) e alteração na atividade de base ou convulsões no aEEG^{2,8}. Os critérios de exclusão foram malformações congénitas major, necessidade de cirurgia nos primeiros 3 dias de vida ou ausência de vaga nos centros de tratamento^{2,8}. Todos os protocolos seguidos estavam em conformidade com o Consenso Nacional de Hipotermia Induzida².

Os seus efeitos secundários sistémicos descritos compreendem compromisso cardiovascular, hipertensão pulmonar, infeção, desequilíbrio metabólico e coagulopatia^{28,29}. A sua ocorrência é proporcional ao grau de arrefecimento, geralmente em situações de controlo inadequado da temperatura^{28,29}. A necrose gorda subcutânea é também uma complicação descrita em alguns recém-nascidos, após o tratamento com hipotermia terapêutica³⁰. O panículo

adiposo do recém-nascido é constituído por ácidos gordos saturados (ácidos esteárico e palmítico) com um ponto de fusão relativamente elevado, pelo que a exposição a uma superfície fria pode induzir a sua cristalização e dar origem a áreas de necrose³⁴. Habitualmente a necrose é autolimitada, mas pode complicar-se de hipercalcémia ou outras alterações metabólicas^{1,34}. Apesar disso, a hipotermia é considerada segura, uma vez que estes efeitos raramente são significativos^{2,28}. Contudo, é de referir que a excreção e metabolismo de alguns fármacos de uso comum no período neonatal, como a morfina, anticonvulsivantes e antibióticos, podem estar alterados pela hipotermia ou insuficiência renal, o que exige monitorização e, se necessário, adequação da posologia².

Tendo em conta a segurança, tentou-se uma nova abordagem no sentido de minimizar os efeitos adversos: arrefecimento seletivo da cabeça com hipotermia sistémica mínima (redução de 1,5°C da temperatura central durante 48 horas) em modelo animal porcino²⁹. Os achados iniciais foram desfavoráveis, com aumento da mortalidade, ocorrência de hipotensão com necessidade de suporte inotrópico e sem melhoria neuropatológica global ou alteração na incidência de convulsões quando comparados com normotermia²⁹. A principal causa apontada foi a demora na obtenção da redução da temperatura cerebral, que demorou cerca de 3 a 4 horas com este método, em combinação com o rápido aumento da temperatura cerebral sempre que se removia a touca para verificar a ocorrência de lesões cutâneas e durante o reaquecimento, resultando em grandes flutuações térmicas durante o tratamento²⁹.

O impacto a longo prazo da hipotermia ainda não é conhecido. Nem todos os estudos demonstraram diferenças significativas em termos de mortalidade ou sequelas neurológicas, mas há menor incidência de paralisia cerebral, menor probabilidade de desenvolver défices neurológicos e melhor desempenho em avaliações do neurodesenvolvimento^{5,7,14,28}. Assim, são necessários mais estudos de seguimento longitudinal para compreender o total potencial desta terapêutica, bem como determinar o tempo ótimo de tratamento, o grau de hipotermia mais

adequado, a duração do reaquecimento e os critérios de seleção dos recém-nascidos que terão maior ganho com esta intervenção^{5,7,28}.

Apesar de ser o padrão de ouro da neuroproteção^{2,12,14,16,20,27,35,36}, a hipotermia é ineficaz em cerca de 45% dos recém-nascidos com EHI moderada a grave^{12,14,16,20,27,35,36} (cerca de 25% vêm a falecer e 20% sobrevivem com défices sensoriais, motores e/ou cognitivos)^{26,37}, sendo inclusivamente considerada ineficaz em bebés com EHI grave^{7,14,15,23}. A necessidade de sedação pode comprometer a avaliação neurológica dos doentes, dificultando a sua vigilância⁸. Adicionalmente, a necessidade de equipamento específico e apoio de cuidados intensivos neonatais limita a sua disponibilidade a centros diferenciados⁷ sendo de difícil utilização em países em desenvolvimento^{4,10}, pelo que se iniciou o estudo de outros agentes mais acessíveis, eficazes e seguros⁴ que possam ser usados na intervenção pós-asfixia²³ de forma adjuvante^{12,16,20–22,26,27,35,37} (hipotermia enquanto “expansor” da janela terapêutica para outros fármacos)^{5,14,21} ou como alternativa.

Melatonina

A melatonina é uma indolamina endógena sintetizada na glândula pineal^{11,12,14,21,27} a partir da serotonina¹² de acordo com os ciclos de luz-escuridão ambiental^{4,27}. A melatonina é tanto lipofílica como hidrofílica, pelo que atravessa facilmente as membranas biológicas quer por mecanismos recetor-dependentes quer recetor-independentes^{4,11}. O principal papel da melatonina é a regulação do ritmo regular circadiano e do sono^{4,11,12,21,27}, mas influencia inúmeras funções fisiológicas, incluindo o crescimento e desenvolvimento, reprodução e resposta imune^{12,27}.

A melatonina endógena é essencial para o desenvolvimento neurológico normal, protegendo o cérebro em desenvolvimento de lesão⁴. Os níveis de melatonina maternos aumentam no final da gravidez^{4,12}, atravessando livremente a placenta e a barreira hematoencefálica (BHE) fetal^{4,11,12,14,15,21,27}. Os recém-nascidos de termo saudáveis produzem doses

relativamente baixas de melatonina, contudo a sua produção aumenta quando ocorre insulto HI, o que pode relevar o seu papel neuroprotetor endógeno⁴.

A melatonina tem um poderoso efeito neuroprotetor através das suas propriedades antioxidante^{4,11,12,14-16,21,27}, anti-inflamatória^{4,11,12,14,16,21,27} e anti-apoptótica^{4,11,12,14,16,21,27} (Tabela 3). As potentes propriedades removedoras de radicais livres que a melatonina e os seus metabolitos possuem promovem o desenvolvimento neuronal e das células da glia do tecido cerebral em desenvolvimento, que são altamente susceptíveis à lesão pelos radicais livres^{4,12,14}. Outros efeitos adicionais incluem a regulação positiva de enzimas e a preservação da integridade mitocondrial^{4,12,14}. Estudos realizados em roedores mostraram que a melatonina reduz o dano oxidativo nos lípidos cerebrais, melhora a falência energética cerebral secundária e a apoptose^{12,14}. Além disso, as propriedades imuno-modeladoras^{12,14,21,27} da melatonina facilitam a neuroproteção após HI.

Antioxidante	Anti-inflamatória	Anti-apoptótica
Estimula a atividade de enzimas antioxidantes	Reduz o recrutamento de leucócitos	Ativa vias de resgate celular
Neutraliza diretamente espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico	Reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da fosfolipase A ₂ , lipoxigenase e COX	
	Reduz a concentração de VEGF	

Tabela 3- Ações da melatonina.

A melatonina é um fármaco extremamente seguro, não tendo demonstrado nenhum efeito secundário grave^{4,14,16,27}, e é facilmente administrada¹¹, quer por via intravenosa, oral ou retal²⁷. Para além disso, já foi demonstrado o seu efeito neuroprotetor em modelos animais, tanto em monoterapia como em associação com a hipotermia terapêutica^{4,12,21,27}.

Um estudo recente que pretendia avaliar a eficácia e aplicabilidade da administração entérica de melatonina em combinação com hipotermia terapêutica em recém-nascidos com EIH (em comparação com a hipotermia exclusiva) concluiu que esta tem resultados bioquímicos e clínicos favoráveis sem efeitos secundários de relevo: a concentração sérica de melatonina era superior em indivíduos com EHI comparados com indivíduos saudáveis, traduzindo a sua maior produção endógena em resposta ao *stress* oxidativo; após a administração de melatonina 10mg/kg em cinco doses diárias via sonda orogástrica, a sua concentração aumentou, indicando absorção entérica adequada; a SOD sérica era inicialmente elevada mas diminuiu com a administração de melatonina, embora de uma forma menos significativa do que com a hipotermia, devido à ação direta e indireta da melatonina; o NO sérico, embora inicialmente elevado, diminuiu em cinco dias com ambos os tratamentos mas de forma mais abrupta com a administração de melatonina¹². Em termos de meios complementares de diagnóstico as diferenças não eram significativas, destacando-se apenas menor incidência de anomalias da substância branca e de atividade convulsiva nos que receberam o suplemento de melatonina¹². A avaliação do neurodesenvolvimento aos seis meses revelou melhores resultados no grupo que recebeu melatonina¹². Embora limitado pelo reduzido número de participantes, este estudo demonstra o efeito sinérgico entre a melatonina e a hipotermia na redução do *stress* oxidativo, apresentando como grande vantagem a facilidade de acesso e de administração de comprimidos de melatonina¹².

Anteriormente, um estudo que pretendia avaliar a combinação de melatonina intravenosa (5mg/kg administrados durante 6 horas, 10 minutos após a reanimação) com a hipotermia em modelo animal porcino demonstrou melhoria do metabolismo energético cerebral (aumento dos níveis ATP, usualmente associado a melhores resultados funcionais *a posteriori*), menor lesão cerebral, redução da atividade da caspase-3 e diminuição do número

de indivíduos com pior recuperação, sem efeitos secundários de nota associados²⁷, concluindo pela sua eficácia e segurança pré-clínica.

Em 2012, a melatonina foi considerada o fármaco com maior potencial de translação para a prática clínica devido à sua segurança, eficácia e facilidade de administração¹¹. Apesar de todos estes dados favoráveis à sua utilização, ainda são necessários estudos que determinem a janela terapêutica da melatonina, bem como doses e vias de administração ótimos^{11,15,16,27}.

Eritropoetina

A EPO é uma glicoproteína endógena produzida células endoteliais dos capilares peritubulares do rim¹⁴ que estimula a eritropoiese^{14,16,21}, já utilizada em recém-nascidos no tratamento de anemia neonatal na sua forma humana recombinante^{14,16,21}. A EPO atravessa a BHE por um mecanismo de transporte ativo e pelos pontos da barreira danificados pela lesão HI^{4,14,21}. Os seus recetores no SNC localizam-se nos neurónios, células da glia e células endoteliais^{4,16}. A expressão de ambos aumenta a nível cerebral em resposta ao estímulo hipóxico em recém-nascidos^{4,11,21}.

Tem uma ação neuroprotetora múltipla: é anti-apoptótica, através da redução da atividade da caspase-3, aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição da expressão de Bax; é anti-inflamatória, uma vez que inibe a resposta inflamatória celular cerebral e anti-oxidante, melhorando lesões induzidas pelo glutamato^{4,5,14-16,21}. Como foi abordado anteriormente, o estímulo hipóxico e o decorrente aumento de citocinas pró-inflamatórias ativa o HIF-1 α , que por sua vez induz a expressão de EPO e dos seus recetores, reforçando as ações referidas anteriormente, mas também a reparação celular, através do estímulo de neurogênese, oligodendrogênese e angiogênese (VEGF e outros fatores neurotróficos) e da migração neuronal e glial nas zonas lesadas por metaloproteinases^{4,5,11,14-16}.

A EPO está associada a menor perda de volume cerebral e melhores resultados funcionais cognitivos e motores, sobretudo se usada em associação com a hipotermia⁴. Quando administrada na dose de 300 ou 500 U/kg, a EPO está associada a menores taxas de convulsões no período pós-natal e de défices no neurodesenvolvimento aos 6 meses, bem como a menores riscos de re-hospitalização e de défices neurológicos aos 18 meses, sem aparentes efeitos adversos, mas sem impacto na mortalidade^{7,14,15,21}. No entanto, a sua eficácia é limitada a indivíduos com encefalopatia moderada^{7,14,15}. Assim, são necessários mais estudos que permitam confirmar a sua ação neuroprotetora e determinar a dose e regime terapêutico ótimos^{4,11,16}.

Alopurinol

O alopurinol é um fármaco inibidor da xantina oxidase^{14-16,23} com potencial efeito neuroprotetor pela redução da produção de radicais livres e, em altas doses, tem função de sequestrador de radicais livres e quelante de ferro livre^{14,16,23}. Foi estudada a administração de alopurinol em alta dose (40mg/kg/dia) em recém-nascidos, em duas administrações de 20mg/kg via endovenosa nas primeiras quatro horas de vida, com 12 horas de intervalo²³, que mostrou reduzir o risco de morte ou défices severos na asfixia moderada sem efeitos secundários negativos, mas sem vantagens nos casos de asfixia grave^{16,23}.

Na fase aguda da lesão, na reperfusão e na reoxigenação (30-60 minutos após o nascimento) ocorre uma grande formação de radicais livres, pelo que o início da administração pode já não abranger este patamar²³. Por ser capaz de atravessar a placenta^{14,16}, coloca-se a hipótese de que a sua administração mais precoce, inclusivamente por via oral ou intravenosa à mãe quando houver sinais de sofrimento fetal (cardiotocograma com variabilidade nula, desacelerações tardias persistentes, bradicardia em agravamento ou padrão sinusoidal⁸, poderá ter uma ação mais eficaz, uma vez que já haveria concentrações terapêuticas de fármaco em circulação na altura da propagação da lesão^{11,14-16,23}. Contudo, atualmente ainda não há

informação suficiente que permita comprovar a sua ação benéfica ou os efeitos da hipotermia sobre a sua farmacocinética^{11,14,16,23}.

Anticonvulsivantes

O uso de fármacos para o controlo das convulsões precede a instauração da hipotermia no tratamento da EHI. Colocou-se a hipótese de alguns destes fármacos terem efeitos neuroprotetores próprios.

Fenobarbital

O fenobarbital é um fármaco anticonvulsivante com ação neuroprotetora inespecífica, uma vez que atua em diversos processos da cascata lesiva²²: diminui o metabolismo cerebral e o consumo de oxigénio (metabolismo oxidativo), reduz do influxo de Ca^{2+} pós HI e a excitotoxicidade do glutamato e é sequestrador de radicais livres^{22,25}. Por outro lado, pelo efeito deletério das convulsões, muitos clínicos consideram que impede o agravamento do *status* decorrente da sua ocorrência, usando-o de modo profilático, mas não há evidência do seu benefício, uma vez que não altera o risco de morte ou de alterações do neurodesenvolvimento graves²².

A administração de 40mg/kg em infusão endovenosa durante 60 minutos, com início nas primeiras duas horas de vida a recém-nascidos com asfixia grave foi bem tolerada, com controlo das convulsões mais precoce e redução da peroxidação lipídica e radicais livres (envolvidos na lesão neuronal da EHI) e das enzimas antioxidantes (explicada pelo menor estímulo decorrente da diminuição dos parâmetros anteriores)²⁵. No entanto, não houve melhoria dos resultados neurológicos no primeiro mês de seguimento²⁵.

A potencial ação neuroprotetora do fenobarbital quando administrado antes da hipotermia terapêutica foi também analisada através do estudo retrospectivo de recém-nascidos a quem foi administrado profilaticamente ou para tratamento de convulsões²². Este concluiu

que não há benefício a curto prazo na associação, estando associado a aumento da taxa de mortalidade neonatal ou com a presença de anomalias imagiológicas após a hipotermia, mas não conseguiu excluir a influência da pré-existência de convulsões (e subsequente risco aumentado de prognóstico adverso) nos resultados obtidos²².

Assim sendo, o uso de fenobarbital pode ser prejudicial, uma vez que tem como potenciais efeitos adversos a neurodegeneração apoptótica, a interferência na proliferação e migração celular, sinaptogênese e plasticidade sináptica, que reduzem a eficácia da hipotermia²², pelo que são necessários mais estudos que permitam esclarecer esta questão.

Topiramato

O topiramato é um anticonvulsivante usado frequentemente no tratamento de convulsões em recém-nascidos^{5,16,21}, bem tolerado, eficaz²¹ e com um bom perfil de segurança^{5,14}, em doses recomendadas de 7,5mg/kg²¹. A sua ação neuroprotetora é dose-dependente^{14,21}: modula os canais iônicos ativados por recetores de aminoácidos excitatórios, nomeadamente recetores GABA (com ação excitatória no cérebro imaturo) e AMPA^{14,21}, e canais de Na⁺ e Ca²⁺ dependentes de voltagem, diminuindo a despolarização neuronal com subsequente libertação excessiva de glutamato após HI e aumentando o limiar convulsivo¹⁴. Tem uma janela terapêutica curta, inferior a duas horas¹⁴.

Vários estudos em modelos animais mostraram supressão das convulsões, diminuição da fragmentação neuronal e melhoria das sequelas neurológicas^{14,21}. Um estudo em modelo porcino estudou duas posologias possíveis, 20mg/kg e 10 mg/kg uma hora após o insulto, tendo-se observado uma redução marcada da gravidade da lesão neuronal na dose mais elevada sem redução significativa do número de convulsões, o que indica que o efeito neuroprotetor do topiramato não se prende com o controlo das convulsões^{14,21}.

Tem um efeito neuroprotetor significativo quando usado em combinação com a hipotermia, pois aumenta a sua janela terapêutica⁵, sendo a combinação mais potente do que a hipotermia em monoterapia, com efeitos persistentes até quatro semanas após a lesão e menos défices neurológicos^{14,21}. Um estudo de segurança da associação em recém-nascidos não mostrou efeitos adversos significativos⁵. No entanto, a hipotermia reduz a absorção e eliminação de topiramato¹⁴, pelo que são necessários mais estudos que documentem as suas ações neuroprotetoras, bem como o impacto da hipotermia na sua farmacocinética.

Gases Nobres

O seu potencial uso como agentes neuroprotetores assenta no facto de apresentarem uma boa penetração da BHE e um início de ação rápido^{15,16,20,37}.

Xénon

O xénon (Xe) é um gás nobre inerte com ação de antagonista não-competitivo sobre o recetor NMDA^{5,7,11,14-16,20,21,36}. Recorde-se que a contribuição do glutamato para a morte neuronal assenta na ativação deste recetor, o que o torna num importante alvo terapêutico⁷. Mecanismos adicionais de ação incluem a ativação de cascatas de cinases pró-sobrevivência (nomeadamente a via proteína cinase B fosforilada (p-Akt))⁷ e o aumento da expressão dos fatores anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL^{7,11,14,15,20} e indução da expressão de HIF-1 α , EPO e VEGF^{11,14,15} e de hipotermia secundária¹⁵. Tem também propriedades anestésicas em pressões normobáricas^{7,11,14-16,20,21,36,37} através da inibição competitiva do local de ligação da glicina do recetor NMDA^{5,7}, dificultando a avaliação neurológica do doente e a sua monitorização³⁶.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a sua ação neuroprotetora^{7,16,20,21,37} em monoterapia ou associado com a hipotermia^{14,20,21,37}. Apresenta grandes vantagens, uma vez que tem poucos efeitos secundários sistémicos (excelente perfil de segurança)^{7,15,21}, não é teratogénico^{11,14}, é hemodinamicamente estável e é passível de ser utilizado como adjuvante no tratamento da EHI (ventilação até 18 horas em combinação com a hipotermia é exequível)³⁶.

As suas principais desvantagens prendem-se com os elevados custos de produção e a necessidade de utilizar sistemas de ventilação fechados que o reciclam, limitando extensivamente a sua acessibilidade^{7,11,14-16,20,21,36,37}.

A sua administração exclusiva a 70% em modelo animal neonatal (rato) tem um impacto favorável a nível cerebral, aumentando o número de células viáveis e resultando em melhor função neurológica²⁰, mas o seu impacto funcional a longo prazo não foi apurado. Falta ainda determinar a concentração ideal do gás, o tempo ótimo de administração e a duração do tratamento, pelo que são necessários mais estudos^{7,11}.

A sua administração conjunta com a hipotermia, 3 a 4 horas após a lesão, demonstrou uma redução da apoptose neuronal significativa e menor perda de massa cerebral com melhoria da função neurológica motora e da coordenação até 30 dias após a lesão comparável ao estado pré-mórbido, em detrimento da hipotermia em monoterapia, em modelo animal, mesmo quando sujeitos a exposições curtas a Xe (1 hora) ou quando administradas em diferentes pontos no tempo⁷. Estes dados são favoráveis a esta combinação, mas ainda são necessários estudos que determinem o tempo de exposição, temperatura ideal e concentração de Xe neste contexto⁷.

Árgon

Este gás nobre tem propriedades neuroprotetoras^{16,20,36} em modelos *in vitro* e em modelos *in vivo*, nomeadamente roedores e porcos^{20,36}. O mecanismo neuroprotetor subjacente não é completamente conhecido, mas foram colocadas várias hipóteses, como o seu efeito no aumento da expressão de Bcl-2 ou ação indireta mediada pelo recetor ácido γ -aminobutírico (*γ -aminobutyric acid (GABA)*) tipo A^{36,37}. Ao contrário do Xe, não tem efeito sobre os recetores NMDA³⁷. Tem uma janela terapêutica muito limitada de até três horas³⁷.

Por ser mais abundante na atmosfera, ter menores custos de produção e não requerer o uso de ventiladores complexos, apresenta vantagens significativas quando comparado com o

Xe^{14-16,20,36,37}. Também tem propriedades anestésicas, mas estas são apenas aparentes em pressões hiperbáricas, não influenciando o estado neurológico do doente^{20,36,37}. Em termos de ação neuroprotetora, o Xe e o árgon (Ar) são equiparáveis^{20,37}.

Um estudo de segurança realizado em leitões recém-nascidos concluiu que a administração de Ar não altera a pressão arterial, frequência cardíaca, saturação cerebral e atividade electrocortical cerebral, tanto em normonóxia (Ar a 30%, 50% e 80%), como em hipóxia (Ar a 50%)³⁶. Quando seguida de hipotermia, não alterou a sua ação terapêutica³⁶. Para além disso, não induziu lesão cerebral adicional³⁶. Árgon a 50% é a concentração com maior probabilidade de ser utilizada na prática clínica, uma vez que pode ser necessária uma maior suplementação de oxigénio em recém-nascidos com problemas respiratórios adicionais^{36,37}.

Um estudo recente, usando o mesmo modelo, com administração de Ar a 45-50% duas horas após a lesão HI durante 24 horas em combinação com hipotermia revelou níveis mais elevados de ATP, diminuição dos lactatos, melhoria dos padrões electroencefalográficos e redução da morte celular cerebral sem efeitos fisiológicos adversos quando comparado com hipotermia exclusiva, ou seja, ocorreu potenciação da ação terapêutica da hipotermia³⁷.

Estes dados, em combinação com outros estudos em que o Ar foi usado de forma segura, nomeadamente em adultos para medição do fluxo sanguíneo coronário e miocárdico³⁶, bem como um estudo prévio em modelo roedor de asfixia que demonstrou uma restauração de células viáveis ao nível de indivíduos saudáveis sem efeitos deletérios e melhoria da função neurológica²⁰ favorece a realização de mais estudos, eventualmente em recém-nascidos humanos³⁶.

Hélio

Também o hélio (He) tem reconhecidas propriedades neuroprotetoras *in vitro* e *in vivo*²⁰. No entanto, são-lhe atribuídos simultaneamente efeitos protetores e deletérios²⁰. Por um lado,

não tem efeitos anestésicos à pressão atmosférica, tem baixos custos associados à sua utilização e, quando administrado a 70% em ratos recém-nascidos, levou ao aumento da expressão de Bcl-xL e Bcl-2 com conseqüente aumento do número de células viáveis na lesão HI moderada e melhoria da função neurológica²⁰. Por outro, aumentou a expressão de Bax, não ofereceu proteção contra o insulto HI grave e teve como efeito adverso a redução do peso corporal²⁰. Fica em aberto a realização de mais estudos com He ou o seu abandono em detrimento de outros gases eficazes mesmo no insulto grave, como o Ar e o Xe.

Hidrogénio

O uso de hidrogénio molecular (H₂), um sequestrador seletivo de radicais OH•, nas primeiras quatro horas (2,1% H₂) após o insulto HI tem um efeito protetor sobre alterações neurovasculares tardias decorrentes, com menor vasoconstrição, segundo um estudo em leitões recém-nascidos⁶. O esquema terapêutico proposto, com início de ventilação com H₂ na reanimação até à chegada ao local onde será instituída a hipotermia terapêutica⁶, permitiria garantir a manutenção da janela terapêutica.

Agonistas de Recetores de Canabinóides

Os químicos canabinóides, assim denominados por serem sintetizados a partir da planta *Cannabis sativa*, são responsáveis pelos seus vários efeitos psicoativos e farmacológicos¹⁸. São utilizados na prática clínica para tratamento de dor crónica, espasmos musculares e como estimuladores do apetite, podendo ter como efeitos secundários sedação, ansiedade, tonturas e náuseas⁴. No entanto, são também produzidos de forma endógena, sendo denominados endocanabinóides: compostos lipídicos derivados de ácidos gordos polinsaturados de cadeia larga sintetizados quando ocorre intensa atividade do SNC¹⁸. Os principais são N-araquidoniletanolamida (anandamida) e 2-araquidonoil-glicerol (2-AG)¹⁸.

Integram o denominado sistema endocanabinóide, que para além de ter propriedades anti-oxidantes e hipotérmicas, participa em diversos processos fisiológicos: modulação da

homeostase do Ca^{2+} ^{4,15,18} e da excitabilidade celular, regulação das respostas imune e inflamatória, ativação de vias de sinalização citoprotetoras, modulação da plasticidade sináptica e da neurotransmissão glutamatérgica^{4,18}. Este último ocorre através de um fenômeno de inibição retrógrada, no qual a liberação de glutamato e consequente elevação do Ca^{2+} intracelular ativa enzimas produtoras de endocanabinóides, que são libertados para a fenda sináptica, ativando os recetores canabinóides pré-sinápticos e subsequentemente inibindo canais de Ca^{2+} e levando à diminuição da liberação de neurotransmissores¹⁸. Este processo tem um impacto positivo na sobrevivência neuronal, uma vez que impede a acumulação intracelular excessiva de Ca^{2+} , NO e ROS e integra vias de sobrevivência celular como a fosfatidilinositol-3-cinases (*phosphatidylinositol-3-kinases*)/proteína cinase B (PI3K/Akt), de migração e de diferenciação celular¹⁸.

O uso de canabinóides sintéticos permite modular o sistema endógeno, potenciando os efeitos decorrentes da ativação dos seus recetores - recetores canabinóides (CB) 1 e 2¹⁸. São conhecidos agonistas seletivos dos recetores CB1 (ACEA), agonistas seletivos dos recetores CB2 (AM1241 ou JWH015) e agonistas não seletivos (CP55,940, HU210 ou WIN55,212-2) (WIN) ¹⁸. Também induzem hipotermia secundária¹⁵.

As suas grandes vantagens consistem numa ação multifatorial em múltiplos pontos fisiopatológicos de interesse e a capacidade de atravessar a BHE pelo seu carácter lipofílico ¹⁸. Estes compostos demonstraram efeitos neuroprotetores *in vitro* e *in vivo*^{4,18}, com redução da lesão cerebral, da morte celular tardia e da lesão glial através da administração de WIN em cordeiros¹⁸, o que justifica a pertinência de mais estudos no sentido de os utilizar na prática clínica. No entanto, é de ressaltar a possibilidade de causarem efeitos neurotóxicos ^{4,15,18}, pelo que ainda se tem de determinar o tipo e dose de canabinóide a administrar, a janela terapêutica¹⁸ e a farmacocinética⁴.

Agonistas dos adrenoreceptores- α_2

A sedação é necessária para obter o benefício máximo da hipotermia, sendo usualmente obtida pela administração de morfina^{2,13}. No entanto, os opióides podem aumentar os efeitos deletérios neuronais da HI¹³, pelo que se tentaram encontrar outros fármacos com propriedades sedativas que se apresentem como alternativas, idealmente com atividade neuroprotetora própria.

A dexmedetomidina é um agonista dos adrenoreceptores- α_2 altamente seletivo com propriedades sedativas, anti-inflamatórias, analgésicas, simpaticolíticas e protetoras de órgão (cardíaca, renal e neuronal)^{13,14}. Para além disso, tem efeitos neuroprotetores demonstrados em modelos de lesão HI^{13,14} (diminui a secreção de epinefrina induzida pela isquémia, aumenta a expressão de cinases de adesão, modula a libertação de glutamato e diminui a entrada de Ca^{2+} na célula e a apoptose)¹⁴ e uma ação anti-inflamatória superior a outros sedativos¹³.

Da experiência prévia em cuidados intensivos, sabe-se que a sedação em crianças é obtida com concentração sérica de 0.4-0.8 $\mu\text{g/L}$, tendo sido verificados efeitos cardiovasculares dose-dependentes, nomeadamente bradicardia/hipotensão (efeito simpaticolítico) e hipertensão (estimulação periférica de adrenoreceptores- α_{2B} pós-sinápticos e adrenoreceptores- α_1), que permitem inferir a necessidade de monitorização e titulação de dose apertadas¹³.

Um estudo de farmacocinética em leitões mostrou que devido à diminuição da *clearance* deste fármaco condicionada não só pela hipotermia terapêutica, mas também pela própria lesão HI, a administração de doses que se consideravam ser adequadas ao recém-nascido, calculadas a partir das doses já utilizadas em indivíduos adultos, levou à obtenção de concentrações séricas supra-terapêuticas (acima de $1\mu\text{g/L}$) com efeitos cardiovasculares adversos, nomeadamente hipotensão, bradicardia, hipertensão e paragem cardíaca¹³.

A metabolização da dexmedetomidina é hepática, pelas vias de glucoronidação (5-difosfoglucoronosil-transferase (UGT)) e por enzimas do citocromo P450 (CYP450)¹³, ambos potencialmente imaturos no recém-nascido. Em combinação com a possível disfunção multiorgânica decorrente da EHI, principalmente se houver disfunção hepática e diminuição do débito cardíaco, e com a influência da hipotermia na redução da atividade da UGT e CYP450, o impacto destas alterações da *clearance* pode vir a ser superior em recém-nascidos humanos¹³.

Assim sendo, apesar do apelo deste fármaco, são necessários mais estudos para conhecer qual a dose a administrar¹³. Estima-se que um bólus de 2µg/kg em 20 minutos seguido de perfusão de 0.028µg/kg/h durante a hipotermia levará a concentração plasmática terapêutica de 0.5-0.6 µg/L¹³.

A sua associação com Xe em ratos recém-nascidos mostrou uma significativa redução da lesão cerebral e melhoria da função neurológica 30 dias após a lesão comparável à observada nos controlos saudáveis^{7,14}.

Condicionamento

O condicionamento consiste na indução de tolerância à isquémia através de diferentes estímulos *stressores* subletais para os neurónios^{4,9,14,24}, nomeadamente hipertermia, hipóxia hipobárica/normobárica ligeira, vários episódios de isquémia cerebral breve ou fármacos⁹. Se feito antes da lesão HI, é conhecido como pré-condicionamento; contrariamente, após o insulto passa a designar-se pós-condicionamento^{4,9}. Atualmente não têm ainda aplicabilidade clínica, encontrando-se em estudo⁹.

Quanto ao pré-condicionamento, uma opção de pré-condicionamento tem base na indução da produção de quantidades subletais de espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species* (ROS)) através da hipóxia^{5,24}. O estímulo hipóxico é insuficiente para lesar os

neurónios, mas ativa a SOD e a GPx e aumenta a expressão de HIF-1 α , de EPO e dos seus recetores, que impedem a apoptose ou necrose neuronais^{4,24}.

Dentro das opções farmacológicas, a memantina e o (+)MK-801, ambos antagonistas não-competitivos dos recetores NMDA, revelaram induzir tolerância em modelos *in vitro* de isquémia cerebral⁹. A memantina é um antagonista de baixa-afinidade utilizado no tratamento da demência na Doença de Alzheimer moderada/grave e em testes clínicos em crianças com alterações do desenvolvimento incluindo autismo, o que nos permite ter dados quanto à sua segurança no humano⁹. O (+)MK-801 é um antagonista de alta afinidade⁹. O estudo da sua aplicabilidade *in vivo* num modelo animal de asfixia perinatal mostrou que uma administração única intra-peritoneal de 5mg/kg de memantina (dose terapêutica) ou 3mg/kg de (+)MK-801 (alta dose) às 48, 72 ou 96 horas pré-insulto induz tolerância à HI em ratos neonatais com efeitos neuroprotetores semelhantes à hipóxia normobárica ligeira⁹. A hipóxia normobárica ligeira e a memantina administrados 24 horas antes não foram eficazes, mas o (+)MK-801 já mostrava efeito neuroprotetor significativo⁹. Estas diferenças temporais permitem inferir que o pré-condicionamento obtido é tardio (*delayed preconditioning*), ou seja, é necessário um intervalo de tempo no qual se induz a síntese de proteínas envolvidas na neuroproteção⁹. O grande travão à utilização prática destes fármacos prende-se com a sua neurotoxicidade no cérebro em desenvolvimento através da indução de apoptose constitucional⁹. *In vivo*, (+)MK-801 potencia significativamente a apoptose constitucional, sendo este efeito menos pronunciado com a memantina, mas ambos têm igual e importante capacidade inibitória da apoptose induzida por isquémia, o que leva a crer que a memantina tem maior potencial prático⁹.

O Xe também tem aplicabilidade no pré-condicionamento, uma vez que atravessa rapidamente a placenta¹⁶ e altera a atividade de poros permeáveis a nível mitocondrial^{7,11}: quando aplicado 4 horas antes da indução de asfixia fetal em ratos gestantes, houve redução da apoptose neuronal⁷.

Para já, o pré-condicionamento tem utilidade limitada⁹, uma vez que é difícil antever quando ocorrerá a lesão, ou seja, prever quando se deve iniciar a terapêutica¹⁴.

Assim, o pós-condicionamento parece ser, pelo menos em teoria, mais vantajoso. O condicionamento hipóxico tardio tem sido estudado como potencial agente não invasivo^{14,24}. O seu principal mecanismo de ação é semelhante ao do pré-condicionamento. A hipóxia pode ser obtida através da substituição de O₂ por azoto na mistura gasosa do ventilador, de modo a obter concentrações de O₂ inferiores ($\leq 8\%$) – hipóxia normobárica, ou através da diminuição da pressão de ar de modo a obter o equivalente a 5% ou 10% do oxigénio normobárico – hipóxia hipobárica severa (0,21-0,23 atm) ou moderada (0,47 atm), respetivamente²⁴.

Um estudo em modelo animal de asfixia neonatal (rato), com indução de hipóxia às 1, 3 e 6 horas após a lesão HI, repetido nos 2 dias seguintes a intervalos de 24 horas²⁴, mostrou efeito neuroprotetor significativo, com menor produção de ROS e aumento da atividade de SOD e GPx, obtendo-se concentrações de glutatona semelhantes aos controlos saudáveis, com melhores resultados quanto mais precoce for a terapêutica (1 hora após insulto)²⁴. A repetição das administrações permite atuar não só na fase aguda da resposta à lesão HI, mas também na fase secundária²⁴.

Também tem sido estudada a possibilidade de submeter um órgão não vital à distância (por exemplo, um membro) a períodos intermitentes de hipóxia de forma a desencadear o mesmo tipo de resposta neuroprotetora, no chamado pós-condicionamento remoto^{4,14}. A isquémia transitória age como estímulo à formação de mediadores humorais endógenos que se disseminam de forma sistémica, atingindo o cérebro e exercendo aí a sua ação neuroprotetora: aumento do fluxo sanguíneo cerebral, atenuação da neuroinflamação, redução das necessidades metabólicas, ativação de vias pró-sobrevivência celular e promoção de mecanismos de reparação⁴. Os estudos realizados em modelos animais roedores e porcinos mostram uma janela

terapêutica grande de até cerca de 24 horas com melhoria dos resultados funcionais a longo prazo, o que lhe confere uma grande vantagem⁴. Em humanos, o seu uso é seguro e bem tolerado, mas falta ainda perceber a sua aplicabilidade na população neonatal, os mecanismos exatos de atuação, a sua interação com a hipotermia e a sua “dose” (quantos ciclos de isquemia transitória e qual a duração da terapêutica)^{4,14}.

Glucocorticóides

Os glucocorticóides desempenham um papel de destaque na resposta do organismo ao *stress*, sendo também importantes para o desenvolvimento cerebral¹⁹. São-lhes atribuídos efeitos neurodegenerativos e neuroprotetores, que variam consoante a concentração e duração do tratamento¹⁹. A sua ação é mediada através de recetores de glucocorticóides, cuja expressão está aumentada no cérebro em desenvolvimento¹⁹.

Um estudo que pretendia avaliar o efeito do *stress* hipóxico fetal na vulnerabilidade à lesão HI no recém-nascido mostrou que em ratos recém-nascidos ocorre diminuição da expressão destes recetores, aumentando a vulnerabilidade¹⁹. A administração de dexametasona, um glucocorticóide sintético, 1µl/min a nível cerebral (via intraventricular) antes do tratamento da EHI reduziu a lesão cerebral de forma dependente da concentração, ou seja, a ativação dos recetores é neuroprotetora¹⁹.

Estes fármacos já são utilizados nesta população em variadas situações clínicas, pelo que se tornam atrativos na terapêutica neuroprotetora da EHI.

Ácidos gordos

Os efeitos antioxidantes dos ácidos gordos ricos em ómega-3 são largamente conhecidos, sendo atualmente considerados parte integrante de uma alimentação saudável. Tendo em conta que um dos principais mecanismos lesivos da lesão HI passa pela produção de ROS, colocou-se a hipótese de que estes compostos poderiam influenciar a sua evolução.

O ácido docosahexanóico (*docosohexanoic acid* (DHA)) é um ácido gordo polinsaturado de cadeia longa rico em ómega-3 proveniente da dieta, com efeitos neuroprotetores conhecidos, nomeadamente na modulação da neuroinflamação, *stress* oxidativo e apoptose³⁵. É capaz de atravessar a BHE, é seguro e pode ser administrado por via parentérica³⁵.

Sabe-se que o pré-tratamento com DHA é neuroprotetor em modelo roedor neonatal de HI e que uma injeção única pré-insulto melhora a função sensoriomotora e reduz o dano cerebral³⁵. Sabe-se também que filhos de mães com suplementação dietética crónica de DHA ou óleo de peixe enriquecido em DHA no período pré-natal e de lactação têm menos lesões cerebrais³⁵. No entanto, no caso específico da EHI, causada por asfixia intraparto (usualmente esporádica e imprevisível), estas abordagens são limitadas³⁵. Quando administrado após a lesão em monoterapia, embora melhore a função neurológica, não reduz o dano tecidual³⁵.

Assim, estudou-se a associação de DHA (2,5mg/kg) e hipotermia em modelo neonatal de rato de asfixia³⁵, com melhoria marcada da função sensoriomotora e redução modesta do dano tecidual quando comparada com hipotermia, sem reações adversas de nota³⁵. Através da redução da peroxidação não enzimática da DHA e/ou da sua conversão enzimática preferencial via 15-lipooxigenase no metabolito neuroprotetor 10,17S-docosatrieno (neuroprotetina D1), a hipotermia parece aumentar a eficácia do DHA³⁵. A discrepância entre os resultados funcionais e o dano cerebral parece sugerir que o DHA promove mecanismos neuroplásticos (por exemplo, aumento da produção de neurotrofinas e/ou estimulação da neurogénese) que permitem a recuperação de função³⁵.

São ainda necessários mais estudos em modelos animais maiores, pré-clínicos, de forma a perceber se esta terapêutica combinada tem de facto efeito aditivo ou sinérgico e determinar a dose e via de administração ótimas³⁵.

Etil-piruvato

O etil-piruvato (EP) é um derivado lipofílico estável do piruvato com efeitos neuroprotetores demonstrados *in vitro* e *in vivo*¹⁷. Considera-se que a sua ação protetora decorre de duas vertentes: proteção direta dos neurónios através da inibição da ativação da calpain (cisteína-protease dependente de Ca^{2+} reguladora de vias de morte celular) e proteção indireta através da supressão da resposta inflamatória mediada pela microglia¹⁷.

Um estudo em modelo animal de asfixia neonatal (ratos) revelou alguns factos que favorecem o seu uso como fármaco neuroprotetor¹⁷. Em primeiro lugar, a injeção intraperitoneal de EP em diferentes doses (30, 50, 100, 250 e 500mg/kg) uma hora após a lesão HI e 30 minutos antes da hipotermia resulta em neuroproteção prolongada, com eficácia máxima na dose de 50mg/kg¹⁷. Em seguida, a injeção de 50mg/kg 10, 30, 60 ou 90 minutos após a lesão mostrou melhores resultados aos 10 ou 30 minutos, sendo ineficaz após os 60 minutos, o que leva a especular que a sua administração deve ser feita antes ou imediatamente após a ocorrência da lesão¹⁷. Houve também diminuição da lesão com menor perda tecidual cerebral e melhores resultados funcionais até aos dois meses¹⁷.

A nível molecular, apresenta ação multifatorial: inibição da ativação da caspase-3 e do AIF; menor ativação de calpain, promotor da atividade da caspase-3, que por sua vez cliva a calpastatina, o inibidor endógeno da calpain; correção da desregulação da homeostasia do Ca^{2+} ; aumento da produção de Akt e reforço da via PI3-K/Akt de forma indireta; atenuação do aumento de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , COX-2 e iNOS, restaurando-os a níveis inferiores ou iguais aos indivíduos saudáveis e supressão da ativação da microglia com grande capacidade de sequestro de ROS intracelular¹⁷.

Assim, uma vez que o cérebro imaturo beneficia grandemente de terapêuticas anti-apoptóticas¹⁷, a EP parece ser uma boa alternativa para estudos futuros em modelos animais maiores e eventualmente humanos.

Creatina-monohidrato

A creatina e a PCr são compostos moleculares importantes na transmissão e armazenamento de energia ligada a fosfato³⁸. A creatina tem efeito neuroprotetor *in vivo* com diminuição do *stress* oxidativo, melhoria da função cerebral e redução da desintegração neuronal³⁸. Dado que 98% da creatina corporal total provém da alimentação (abundante em carne e verduras), colocou-se a hipótese de fazer suplementação alimentar para exacerbar a sua neuroproteção³⁸.

A suplementação dietética com creatina-monohidrato (Cr) a 2% em ratinhos após asfixia neonatal levou a um aumento gradual da concentração de IL-6 sérica, tanto mais elevada quanto maior a duração do tratamento, bem como da IL-18. Estas citocinas têm ações aparentemente opostas³⁸. A IL-6 é uma citocina derivada de células T que regula o crescimento e diferenciação de células B com efeito neurotrófico e neuroprotetor, estando envolvida em variadas reações inflamatórias, contribuindo para a reparação celular e inibição da morte celular após lesão HI³⁸. A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória com efeito ativador de células T e *natural killer*, estando envolvida em fenómenos neuroinflamatórios e neurodegenerativos, nomeadamente na lesão HI tardia³⁸. É um fator negativo na recuperação cerebral após asfixia, dado o atraso da resposta inflamatória por ele motivado³⁸.

Assim sendo, são necessários mais estudos que permitam perceber qual o equilíbrio entre as ações destas duas citocinas, que idealmente será no sentido de neutralizar a lesão cerebral³⁸.

Transplante de células estaminais

O transplante de células estaminais tem sido estudado enquanto terapêutica regenerativa. A sua ação neuroprotetora é multifatorial, através de imunomodulação^{5,39}, substituição de células danificadas por células exógenas^{14,39}, indução de mecanismos reparadores endógenos pela libertação de fatores tróficos^{5,14,15,39} e ativação de mecanismos anti-

apoptóticos^{5,14}. Parece ser vantajosa em relação à administração de fatores de crescimento^{16,14}, como a EPO, uma vez que tem efeitos a longo prazo através de uma administração única: a secreção de fatores de crescimento ocorre durante toda a vida útil da célula transplantada e as células estaminais tendem a migrar para locais de lesão onde há maior necessidade destes fatores¹⁴.

Têm sido estudadas células estaminais neuronais, mesenquimatosas e hematopoiéticas em modelos de roedores¹⁴. As células estaminais neuronais renovam-se e diferenciam-se em qualquer linhagem celular da glia ou neuronal¹⁵. Por outro lado, as células mesenquimatosas são facilmente recolhidas a partir da medula óssea, tecido placentar ou estroma do cordão umbilical^{15,39}, disponíveis no contexto clínico⁵. Em ratos, a sua administração intracraniana 3 a 10 dias após HI resultou numa diminuição do dano cerebral e melhoria funcional¹⁵.

Para além das diferentes fontes, também se coloca a hipótese de usar células autólogas ou alogénicas^{16,39}: enquanto as autólogas têm menor risco de rejeição de enxerto, as alogénicas podem ser vantajosas uma vez que o sistema imune do hospedeiro é imaturo, diminuindo a probabilidade desta reação adversa, e são capazes de segregar fatores anti-inflamatórios³⁹.

Assim, esta parece ser uma boa opção de futuro, tanto a nível de neuroproteção como de regeneração, mas ainda há muito a descobrir antes de as introduzir na clínica¹⁴. São necessários mais estudos de segurança, eficácia que determinem o seu mecanismo de ação, via, dose e tempo de administração após o diagnóstico de EHI e o impacto da associação com hipotermia³⁹.

Discussão

A maioria dos estudos de novos agentes neuroprotetores é desenhada para avaliar a eficácia das terapêuticas na EN, não sendo específicos para diferentes etiologias, nomeadamente para a asfixia. Embora seja prioritário o seu tratamento no geral, o facto de

haver diminuição da eficácia da hipotermia quando ocorre infecção (por exemplo, corioamniotite)^{3,4,13} faz com que se questione a adequabilidade e eficácia de diferentes fármacos de acordo com a etiologia.

Apesar do crescente recrutamento de novos agentes com potencial benefício no tratamento da EHI, nenhum deles é atualmente utilizado na prática clínica, com exceção da hipotermia. As grandes limitações éticas subjacentes aos estudos clínicos em recém-nascidos e a baixa incidência de EHI em países desenvolvidos fazem com que a maioria dos estudos seja limitada por um reduzido número de participantes, sem atingir conclusões significativas que permitam a translação destes fármacos para a prática clínica. Há também grande dificuldade em diagnosticar com precisão um quadro hipóxico^{3,11,18}, uma vez que muitos dos marcadores de asfixia utilizados são inespecíficos, tais como: presença de mecônio no líquido amniótico, bradicardia fetal abaixo de 100 batimentos por minuto, padrões anormais de frequência cardíaca, acidose da artéria umbilical, déficit de bases, anomalias em estudos do fluxo sanguíneo ou neuroimagem e índice de Apgar baixo³, embora possam estar presentes, não são exclusivos deste contexto. A baixa diferenciação clínica entre EHI e outras causas de EN nos primeiros minutos a horas de vida constitui outro obstáculo³. A monitorização fetal eletrônica, que se esperava vir a ultrapassar estes fatores, tem baixo valor preditivo positivo no diagnóstico de asfixia intraparto^{3,11}.

O processo de translação da fase experimental para a clínica é lento, tendo demorado cerca de 15 anos no caso da hipotermia¹⁴. A melatonina, a eritropoietina e o alopurinol parecem ser os mais próximos de uma eventual passagem à prática clínica, uma vez que já estão a ser estudados em recém-nascidos humanos. Os gases nobres, em particular o xénon e o árgon, apesar de ainda estarem a ser estudados em modelos animais, têm mostrado resultados promissores no que diz respeito à eficácia e perfil de segurança. De todos os tratamentos abordados, a melatonina foi considerada como o agente de mais provável aplicabilidade clínica.

Adicionalmente, vários fármacos são em teoria bons candidatos para terapêutica combinada com a hipotermia, o que dificulta a seleção dos agentes a submeter a ensaios clínicos^{11,35}, pois não há recursos para avaliar todos¹¹.

Uma vez que, até agora, nenhum agente confere proteção absoluta, o uso de adjuvantes permitiria atuar em mais do que uma via de lesão, com potenciais benefícios^{7,15}, mas são necessários mais estudos no sentido de aprovar os agentes já em estudo, bem como estudos de farmacocinética para determinar a influência da hipotermia sobre eles, antes de avançar para estudos pré clínicos e clínicos^{5,11,13,14}.

Em suma, apesar dos grandes avanços verificados nos últimos 5 anos, ainda não foi possível acrescentar mais nenhuma abordagem terapêutica contra a EHI para além da hipotermia. Para todas as outras, são necessários ainda mais estudos que permitam determinar a sua eficácia e segurança, a posologia, tempos e vias de administração mais eficazes, bem como a sua farmacocinética e a interação com a hipotermia.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Dr. Gustavo Januário e à Dr^a. Gabriela Mimoso por me colocarem no caminho certo. Agradeço à Dr^a. Cristina Resende e à Dr^a Guiomar Oliveira por todo o apoio, dedicação e paciência na orientação deste trabalho. Deixo um especial agradecimento à minha família e aos meus amigos que me acompanharam nesta caminhada à conquista do sonho de um dia me tornar médica.

Referências bibliográficas

1. Rennie JM, Huertas-Ceballos A, Boylan GB, Shah DK, Robertson NJ, Groenendaal F, et al. Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology. 5th ed. Elsevier; 2012. 1114-1155 p.
2. Graça A, Pinto F, Vilan A, Dinis A, Sampaio I, Matos C, et al. Hipotermia Induzida No Tratamento Da Encefalopatia Hipoxico-Isquémica Neonatal - Consenso Nacional. 2012;1-26.
3. Nelson KB, Leviton A. How much of neonatal encephalopathy is due to birth asphyxia?. Am J Dis Child. 1991;145(11):1325-31.
4. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2015 Nov;100(6):F541-52.
5. Johnston M V, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. Lancet Neurol. 2011;10:372-82.
6. Oláh O, Péter T, Bari F. Delayed Neurovascular Dysfunction Is Alleviated by Hydrogen in Asphyxiated. Neonatology. 2013;(104):79-86.
7. Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and Xenon : Novel Noble Guardians in Hypoxic – Ischemic Encephalopathy Journal of Neuroscience Research 2013;91:473-478.
8. Sampaio I, Graça AM, Moniz C, Machado MDC. Hipotermia induzida na encefalopatia hipóxico-isquémica : experiência do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria. Acta Pediatr Port. 2012;43(5):183-9.
9. Makarewicz D, Sulejczak D, Duszczyk M, Malek M, Słomka M, Lazarewicz JW.

- Delayed preconditioning with NMDA receptor antagonists in a rat model of perinatal asphyxia. *Folia Neuropathol.* 2014;52(3):270–84.
10. Tagin M, Abdel-hady H, Rahman S. Neuroprotection for Perinatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Low- and Middle-Income Countries. *J Pediatr.* Elsevier Inc; 2015;167(1):10–3.
 11. Robertson NJ, Tan S, Groenendaal F, Bel F van. Which Neuroprotective Agents are Ready for Bench to Bedside Translation in the Newborn Infant? *J Pediatr.* Elsevier Inc. 2012;544–52
 12. Aly H, Elmahdy H, Rowisha M, Awany M, Elbatch M, Hamisa M. Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia : a randomized controlled pilot study. *J Perinatol.* Nature Publishing Group; 2014;(August):1–6.
 13. Ezzati M, Broad K, Kawano G, Faulkner S, Hassell J, Fleiss B, et al. Pharmacokinetics of dexmedetomidine combined with therapeutic hypothermia in a piglet asphyxia model. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2014 Jul;58(6):733–42.
 14. Kelen D, Robertson NJ. Experimental treatments for hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* Elsevier Ltd; 2010;86(6):369–77.
 15. Perrone S, Stazzoni G, Tataranno ML, Buonocore G. New pharmacologic and therapeutic approaches for hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. *J. Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(1):83–8.
 16. Van Bel F, Groenendaal F. Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia. *Semin Perinatol.* Elsevier; 2015;(2015):1–8.
 17. Shen H, Hu X, Liu C, Wang S, Zhang W, Gao H, et al. Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms.

- Neurobiol Dis. 2010 Mar;37(3):711–22.
18. Alonso-Alconada D, Álvarez A, Álvarez-Granda L, Hilario E. Potencial terapéutico del sistema endocannabinoide en la asfixia perinatal. *Rev Neurol*. 2011;53(12):758–64.
 19. Gonzalez-Rodriguez PJ, Xiong F, Li Y, Zhou J, Zhang L. Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of glucocorticoid receptors. *Neurobiol Dis*. Elsevier B.V.; 2014;65(2014):172–9.
 20. Zhuang L, Yang T, Zhao H, Fidalgo AR, Vizcaychipi MP. The protective profile of argon, helium, and xenon in a model of neonatal asphyxia in rats. *Crit Care Med* 2012;40(6): 1724-1730.
 21. Levene MI. Cool treatment for birth asphyxia , but what’ s next ? *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2010;95(3):F154-F157.
 22. Sarkar S, Barks JD, Bapuraj JR, Bhagat I, Dechert RE, Schumacher RE, et al. Does phenobarbital improve the effectiveness of therapeutic hypothermia in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy? *J Perinatol*. Nature Publishing Group; 2011;32(1):15–20.
 23. Kaandorp JJ, Bel F Van, Veen S, Derks JB, Groenendaal F, Rijken M, et al. Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 2012;97:F162-F166.
 24. Gamdzyk M, Makarewicz D, Słomka M, Ziembowicz A, Salinska E. Hypobaric hypoxia postconditioning reduces brain damage and improves antioxidative defense in the model of birth asphyxia in 7-day-old rats. *Neurochem Res*. 2014;39:68-75.25. Enclave M. Effect of High-dose Phenobarbital on Oxidative Stress in Perinatal Asphyxia: 2011;
 26. Drury PP, Bennet L, Gunn AJ. Mechanisms of hypothermic neuroprotection. *Semin*

- Fetal Neonatal Med. Elsevier Ltd; 2010;15(5):287–92.
27. Robertson NJ, Faulkner S, Fleiss B, Bainbridge A, Andorka C, Price D et al. Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model. *Brain* 2013; 136;90-105.
 28. Shankaran S, Pappas A, Laptook AR, McDonald S a, a R, Tyson JE, et al. Outcome of safety and effectiveness in a Multicenter Randomized , Controlled Trial of whole-body hypothermia for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2008;122:791–8.
 29. Hoque N, Liu X, Chakkarapani E, Thoresen M. Minimal systemic hypothermia combined with selective head cooling evaluated in a pig model of hypoxia-ischemia. *Pediatr Res*. IOP Publishing; 2015;77(5):674–80.
 30. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, et al. Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1574–84.
 31. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: Multicentre randomised trial. *Lancet*. 2005;365(9460):663–70.
 32. Azzopardi D V, Strohm B, Edwards a D, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med*. 2009;361(14):1349–58.
 33. Shah PS. Hypothermia: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Semin Fetal Neonatal Med*. Elsevier Ltd; 2010;15(5):238–46.
 34. Sousa S, Vilan A. Hipotermia terapêutica na encefalopatia hipóxico -isquémica. *Nascer*

- e Crescer Rev do Hosp Crianças Maria Pia. 2011;XX(4):248–54.
35. Berman DR, Mozurkewich E, Liu Y, Shangguan Y, Barks JD, Silverstein FS. Docosahexaenoic acid augments hypothermic neuroprotection in a neonatal rat asphyxia model. *Neonatology*. 2013 Jan;104(1):71–8.
 36. Alderliesten T, Favie LMA, Neijzen RW, Auwärter V, Nijboer CHA, Marges REJ, et al. Neuroprotection by argon ventilation after perinatal asphyxia: a safety study in newborn piglets. *PLoS One*. 2014 Jan;9(12):e113575.
 37. Broad KD, Fierens I, Fleiss B, Rocha-Ferreira E, Ezzati M, Hassell J, et al. Inhaled 45-50% argon augments hypothermic brain protection in a piglet model of perinatal asphyxia. *Neurobiol Dis*. 2016;87:29–38.
 38. Iqbal S, Ali M, Iqbal F. Effect of creatine monohydrate supplementation on relative serum level of IL-6 and IL-18 following neonatal hypoxia ischemia in male albino mouse. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2015(6):2141-2145.
 39. Gonzales-Portillo GS, Reyes S, Aguirre D, Pabon MM, Borlongan C V. Stem cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Front Neurol*. 2014;5 AUG(August):1–11.