

ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM NEUROCIÊNCIAS

PAMELLA NUNES AZEVEDO

**CARACTERIZAÇÃO LONGITUDINAL IN VIVO DO METABOLISMO CEREBRAL NO
MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUEMIA NEONATAL**

**PORTO ALEGRE
2018**

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM NEUROCIÊNCIAS

PAMELLA NUNES AZEVEDO

CARACTERIZAÇÃO LONGITUDINAL *IN VIVO* DO METABOLISMO CEREBRAL
NO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUEMIA NEONATAL

PORTO ALEGRE

2018

PAMELLA NUNES AZEVEDO

CARACTERIZAÇÃO LONGITUDINAL *IN VIVO* DO METABOLISMO CEREBRAL
NO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUEMIA NEONATAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
e Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Doutora em
Ciências da Saúde.

ORIENTADOR: PROF. DR. JADERSON COSTA DA COSTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. SAMUEL GREGGIO

PORTO ALEGRE

2018

Ficha Catalográfica

A994c Azevedo, Pamella Nunes

Caracterização longitudinal in vivo do metabolismo cerebral no modelo de hipóxia-isquemia neonatal / Pamella Nunes Azevedo . – 2018.
130.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Da Costa.

Co-orientador: Prof. Dr. Samuel Greggio.

1. Hipóxia-isquemia neonatal. 2. metabolismo cerebral. 3. microPET-FDG. 4. rede metabólica cerebral. I. Da Costa, Jaderson Costa. II. Greggio, Samuel. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

PAMELLA NUNES AZEVEDO

CARACTERIZAÇÃO LONGITUDINAL *IN VIVO* DO METABOLISMO CEREBRAL
NO MODELO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA ISQUEMIA NEONATAL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
e Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul, como parte dos requisitos necessários
à obtenção do título de Doutora em
Ciências da Saúde.

Aprovada em 31 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Fiori - PUCRS

Profa. Dra. Simone de Paula - Feevale

Dra. Paula Feltes - Universitair Groningen

Dr. Eduardo Sanches - UFRGS

Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado – PUCRS (suplente)

Ao meu querido pai, in memoriam. Meu maior incentivador. Obrigado por todo amor e dedicação. Fazes muita falta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa pela oportunidade de realizar minha pós-graduação sob sua orientação. Muito obrigada pela acolhida ao longo desses anos, pelo incentivo e confiança depositada, bem como pela compreensão durante os momentos difíceis que passei ao longo do doutorado. Seus ensinamentos e orientações foram sempre valiosos e nortearam meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Samuel Greggio, amigo, mentor e consultor científico, agradeço pela confiança depositada, pelos ensinamentos e orientações ao longo destes anos. Obrigada por sempre me fazer seguir em frente. Teu apoio e amizade foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. A ti toda a minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto, e demais colaboradores do Laboratório de Isquemia da UFRGS, por permitir que grande parte deste estudo fosse possível. Agradeço em especial ao Felipe Odorcyk e Luz Elena Duran-Caraballi.

Ao Prof. Dr. Eduardo Zimmer, muito obrigada por permitir que outra grande parte deste estudo fosse realizada. Agradeço pela amizade e ensinamentos valiosos ao longo deste período de colaboração. Agradeço aos demais amigos do Laboratório de Neuroimagem da UFRGS, em especial ao Guilherme Schu e Yuri Rodrigues.

Ao Prof. Dr. Iván Izquierdo e aos amigos do Centro de Memória, obrigada por serem sempre tão solícitos e permitirem a realização de parte deste trabalho. Em especial, às professoras Jociane Carvalho e Cristiane Furini.

À Prof. Dra. Denise Cantarelli, agradeço pela amizade e por sempre ter estado ao meu lado nos inúmeros incidentes que acompanharam este doutorado. Teu apoio foi de grande importância pra mim ao longo destes anos, a ti o meu muito obrigado. Agradeço também a todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do InsCer.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências do InsCer. Todos vocês participaram de forma direta ou indireta, e contribuíram para a realização deste trabalho. Ao Ricardo Breda, Dani Abreu, Dani Vieira e a Zaquer, obrigada pela convivência sempre muito agradável. À Simone Salamoni, muito obrigada por todo o carinho ao longo destes anos. Aos amigos Ismael Plentz, Felipe Rodrigues, Alessandra Sebben e mais recentemente à Ângela Zanatta, obrigada por toda força e parceria. Ao amigo Daniel obrigado pela companhia, conversas e colaborações sempre muito produtivas. À minha querida amiga Gianina Venturin, obrigada por toda amizade e os conselhos sempre muito bem vindos, tanto pessoais quanto científicos, saibas que tiveste um papel fundamental nesta trajetória. Em especial, agradeço a minha querida amiga Gabriele Zanirati, que me acompanha desde a faculdade, obrigada por todos estes anos de amizade e parceria, tanto pessoal quanto profissional. Teu apoio constante foi sempre muito importante em todos os âmbitos da minha vida. Espero que possamos sempre caminhar juntas. Aos alunos de iniciação científica, obrigada por toda a disponibilidade e vontade em ajudar. Em especial agradeço a Isadora Ghilard e Paula Santos, por serem sempre tão dedicadas. A amizade de todos vocês, a convivência e as risadas compartilhadas tornaram esta trajetória mais leve e alegre de se trilhar.

Às secretárias Nelcy Arndt e Ana Paula Rabaldo, obrigada por toda disponibilidade e solicitude em ajudar sempre quando necessário. Da mesma forma, agradeço a secretaria do PPG em Medicina e Ciências da Saúde, em especial à Bruna Remedio, pela atenção e disponibilidade.

À minha grande família, meu maior exemplo de resiliência, e amigos queridos, obrigada por todo apoio e torcida, bem como pela compreensão pelos momentos em que não pude me fazer presente. Quero agradecer especialmente a minha dinda, Anahi, pela incansável torcida pelo meu sucesso, o teu amor é muito importante pra mim. A minha querida avó, Elaci, obrigada por todo amor e apoio durante toda a minha vida. Ao meu amado afilhado, Arthur, meu maior presente, que mesmo com os seus dois anos e meio de vida me deu toda a força que eu precisava desde que chegou em minha vidas. A minha querida irmã, Bárbara, tu és o meu orgulho e meu porto seguro. Obrigada por toda torcida, amor e apoio incondicional. Te amo muito.

Aos meus pais, Marcelo (*in memorian*) e Tânia, minha gratidão eterna. Obrigada pelo amor, pelo exemplo e pelos sacrifícios. Vocês são minha base para tudo. Mãe, obrigada por toda dedicação e amor incondicional, tu és tudo para mim, te amo muito. Pai, meu maior exemplo de vida, obrigada por todo amor e incentivo na busca dos meus objetivos, a sua ausência será para sempre sentida, mas seus ensinamentos, sua alegria e valores serão também para sempre lembrados por todos que tiveram o privilégio de te conhecer.

Ao Adriano, obrigada por todo amor e companheirismo. Tua paciência e compreensão foram muito importantes ao longo deste período.

À PUCRS e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

À CAPES, pelas bolsas concedidas ao longo de minha pós-graduação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo esquemático da fisiopatologia da HI.....	5
Figura 2. Representação do delineamento experimental.....	9
Figura 3. Representação esquemática para o princípio do microPET.....	14
Figura 4. Versão espacial do labirinto aquático de Morris.....	18
Figura 5. Imagens representativas da análise longitudinal do metabolismo cerebral de glicose no modelo de HI neonatal	21
Figura 6. Mensuração do peso entre os grupos experimentais nos períodos de escaneamento	22
Figura 7. Gráficos referentes à análise longitudinal do metabolismo cerebral de glicose por SUVr.	25
Figura 8. Metabolismo cerebral de glicose em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida por SUVr.....	31
Figura 9. Metabolismo cerebral regional de glicose em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida por SUVr.....	37
Figura 10. Regiões cerebrais em que não apresentaram alterações no metabolismo cerebral de glicose por SUVr.	44
Figura 11. Representação gráfica das matrizes de correlação da rede metabólica aos 36 dias de vida.	47
Figura 12. Representação gráfica das matrizes de correlação da rede metabólica aos 60 dias de vida.	53
Figura 13. Curva de aprendizado do LAM.....	58
Figura 14. Avaliação da retenção da memória espacial no LAM.	59
Figura 15. Análise da volumetria cerebral.....	61
Figura 16. Correlação entre o metabolismo do hemisfério cerebral direito e a área sob a curva (AUC) da curva de aprendizagem do LAM	61
Figura 17. Correlação entre o metabolismo de FDG das regiões cerebrais no hemisfério direito e a área sob a curva (AUC) da curva de aprendizagem do LAM	65
Figura 18. Correlação entre o metabolismo de FDG de regiões cerebrais e correspondente volumetria.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	26
Tabela 2.....	28
Tabela 3.....	38
Tabela 4.....	40
Tabela 5.....	43
Tabela 6.....	48
Tabela 7.....	49
Tabela 8.....	50
Tabela 9.....	54
Tabela 10.....	55
Tabela 11.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato (do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>)
AUC	Área sob a curva (do inglês <i>Area under the curve</i>)
ANOVA	Análise de variância
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPN	Dia pós-natal
EEG	Eletroencefalograma
EN	Encéfalopatias neonatais
FDR	False Discovery Rate
F-FDG	Fluorodeoxiglicose (do inglês <i>Fluorodeoxyglucose</i>)
Fmri	Imagem por ressonância magnética funcional (do inglês <i>Functional Magnetic Ressonance Imaging</i>)
GEE	Equações de Estimações Generalizadas (do inglês <i>Generalized Estimating Equation</i>)
HI	Hipóxia-isquemia

i.p.	Intraperitoneal
LAM	Labirinto Aquático de Morris
MBN	Rede metabólica cerebral (do inglês <i>Metabolic Brain Network</i>)
MICROPET	Micro-tomografia por emissão de pósitrons (do inglês <i>Micro-Positron Emission Tomography</i>)
MPF	Córtex Pré-frontal medial (do inglês <i>Medial Prefrontal Cortex</i>)
PC	Paralisia Cerebral
PET	Tomografia por emissão de pósitrons (do inglês <i>Positron Emission Tomography</i>)
PFA	Paraformoladeído
RM	Ressonância Magnética
RN	Recém-nascido
SNC	Sistema nervoso central
SUV	Valor padronizado de captação (do inglês <i>Standardized Uptake Value</i>)
SUVr	Valor padronizado de captação relativo (do inglês <i>Relative Standardized Uptake ratio</i>)
TC	Tomografia Computadorizada
VOI	Voxel de interesse (do inglês <i>Voxel of Interest</i>)
VTA	Área tegmental ventral (do inglês <i>Ventral Tegmental Area</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características clínicas da Hipóxia-isquemia neonatal.....	1
1.2 Epidemiologia.....	3
1.3 Fisiopatologia.....	4
1.4 Modelos animais de HI.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 Aspectos éticos e de biossegurança.....	8
3.2 Animais.....	8
3.3 Delineamento do estudo e grupos experimentais.....	8
3.4 Indução do modelo de HI neonatal.....	10
3.5 Imagem molecular por MicroPET.....	10
3.5.1 Produção de Flúor-18.....	11
3.5.2 Síntese de ¹⁸ F-FDG.....	11
3.5.3 Escaneamento por microPET.....	12
3.5.4 Reconstrução das imagens.....	14
3.6 Rede metabólica cerebral.....	16
3.7 Avaliação da memória espacial no Labirinto aquático de Morris.....	17
3.8 Volumetria cerebral.....	18
3.9 Análise estatística.....	18
4. RESULTADOS.....	20
4.1 Grupos experimentais.....	20
4.2 Avaliação longitudinal do metabolismo de FDG de animais submetidos ao modelo de HI neonatal.....	20
4.3 Avaliação do metabolismo cerebral de FDG por SUVr para os DPNs 36 e 60.....	30

4.3.1	O metabolismo cerebral de glicose medido por FDG está alterado em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida	30
4.4	Alterações do metabolismo cerebral regional de glicose em animais previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.....	31
4.4.1	O metabolismo de glicose está alterado no núcleo accumbens, amígdala e estriado em animais HI no hemisfério contralateral ao insulto hipóxico-isquêmico aos 36 dias de vida	32
4.4.1	O metabolismo cerebral regional de glicose de animais HI está alterado no hemisfério ipsilateral à lesão hipóxico-isquêmica aos 60 dias de vida	39
4.4.2	Metabolismo de glicose não está alterado nos córtices frontal, medial pré-frontal e orbitofrontal e no cerebelo de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.....	42
4.5	Rede metabólica cerebral	45
4.5.1	Rede metabólica cerebral aos 36 dias de vida de ratos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.....	45
4.5.2	Rede metabólica cerebral aos 60 dias de vida de ratos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal.....	52
4.6	Animais adultos submetidos ao modelo de HI neonatal têm a capacidade de aprendizado prejudicada	58
4.7	Perda de volume cerebral na HI está restrito ao hemisfério ipsilateral ao insulto hipóxico isquêmico.....	60
4.8	Correlação entre o metabolismo cerebral de glicose, aos 60 dias de vida, e o desempenho cognitivo no LAM de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI	61
4.9	Correlação entre o metabolismo de glicose cerebral aos 60 dias de vida e a volumetria cerebral em animais submetidos ao modelo de HI neonatal	65
5.	DISCUSSÃO	67
6.	CONCLUSÃO.....	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8.	ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL	90

RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica (HI) é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade neurológica em recém-nascidos a termos e prematuros. A HI neonatal pode levar a diferentes graus de incapacidade neurológica em neonatos acometidos, tais como paralisia cerebral, autismo, epilepsia. Apesar dos consideráveis avanços no cuidado neonatal, o manejo clínico de crianças asfixiadas limita-se a medidas de suporte e poucas alternativas dirigem-se à prevenção ou interrupção dos mecanismos de lesão cerebral. A severidade da lesão HI é variável e está ligada a diversos fatores, tais como a natureza e a duração do insulto e background genético, por exemplo. Devido à importância clínica e ao impacto socioeconômico gerado por essa patologia, novas estratégias têm sido estudadas. Sistemas de imagem não invasivos podem ajudar a elucidar os mecanismos de lesão da HI e contribuir na pesquisa de estratégias terapêuticas efetivas. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar in vivo, longitudinalmente, possíveis alterações no metabolismo da glicose cerebral em ratos previamente submetidos ao modelo neonatal de HI por escaneamentos por microPET. O metabolismo cerebral obtidos na imagem funcional foi correlacionado com os parâmetros anatômicos e cognitivos. Ratos Wistar machos no sétimo dia pós-natal (DPN 7) foram submetidos a um modelo HI por oclusão permanente da artéria carótida comum direita e hipóxia sistêmica por 1 h. MicroPET associado a [18]fluor-deoxiglicose (^{18}F -FDG) foi utilizado para investigar o metabolismo cerebral in vivo de ratos aos 8, 10, 15, 36 e 60 dias de idade. Adicionalmente, a memória de orientação espacial foi avaliada através do labirinto aquático de Morris e a perda de volume cerebral foi através de análise histológica. Nossos resultados demonstraram um hipometabolismo transitório no córtex, hipocampo e estriado do hemisfério contralateral a lesão hipóxico-isquêmica aos 10 e 15 dias de vida. No hemisfério direito, ipsilateral à lesão, observou-se hipometabolismo aos 36 e 60 dias de vida dos animais hipóxico-isquêmicos para a maioria das regiões avaliadas. Além disso, a HI neonatal alterou a conformação da rede metabólica cerebral em animais adolescentes/adultos previamente submetidos ao modelo quando comparado aos animais controles. Por fim, os prejuízos cognitivos e a perda de volume cerebral em animais HI correlacionaram-se com as alterações no

metabolismo cerebral na idade adulta. Assim, concluímos que o microPET-FDG foi eficaz na detecção e quantificação de alterações metabólicas, precoces e tardias, correlacionando o metabolismo cerebral com as lesões cerebrais e déficit cognitivo da HI neonatal.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia neonatal, metabolismo cerebral, microPET-FDG, rede metabólica cerebral.

ABSTRACT

Hypoxia-ischemic encephalopathy (HI) is one of the leading causes of mortality and neurological morbidity on term and preterm newborns. Neonatal HI can lead to several degrees of neurological impairment in affected neonates, such as cerebral palsy, autism, and epilepsy. Despite considerable in neonatal care advances, the clinical management of children is limited to support measures are developed to prevent or halt brain damaging mechanisms new technologies aimed at preventing or disrupting brain injury mechanisms. Damage severity is related to factors, such as nature and duration of the insult and the genetic background, for example. Due to the clinical significance and the socioeconomic impact caused by this pathology, new strategies have been studied. Noninvasive imaging systems could elucidate the mechanisms of HI injury and contribute to the research for effective therapy strategies. Therefore the aim of the present study was to verify *in vivo*, longitudinally, possible alterations in the cerebral glucose metabolism in rats subjected to the neonatal HI model, by microPET scanning. The obtained uptake was correlated the results of the functional imaging with the anatomical, motor and cognitive parameters. Male Wistar rats at postnatal day 7 (P7) were subjected to an HI model by permanent occlusion of right common carotid artery and placed in hypoxia environment for 1 h. MicroPET associated with [18]fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) was used to investigate the cerebral metabolism *in vivo* of rats at 8, 10, 15, 36 and 60 days of age. Additionally, the spatial orientation memory was evaluated through the Morris Water Maze (MWM) and later, the brain volume was analyzed by histological evaluations. Our results demonstrated transient hypometabolism in the cortex, hippocampus, and striatum of the hemisphere contralateral to the hypoxic-ischemic lesion at 10 and 15 days of life. In the right hemisphere, ipsilateral to the lesion, hypometabolism was observed only at 36 and 60 days of life of hypoxic-ischemic animals for the most of the evaluated brain regions. In addition, neonatal HI altered the conformation of the cerebral metabolic network in adolescent / adult animals previously submitted to the model when compared to control animals. Finally, cognitive impairments and loss of brain volume in HI animals were correlated with changes in brain metabolism in adulthood. Thus, we conclude that microPET-FDG was effective in

the detection and quantification of early and late metabolic abnormalities, correlating cerebral metabolism with brain lesions and cognitive deficits in neonatal HI.

Key-words: neonatal hypoxia-ischemia, brain metabolism, microPET-FDG, metabolic brain network

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Características clínicas da Hipóxia-isquemia neonatal*

A asfixia neonatal, caracterizada pela redução da oferta de oxigênio ao recém-nascido (RN) próximo à hora do parto (intra-útero ou durante o nascimento), pode resultar em dano cerebral por hipóxia-isquemia (HI). A encefalopatia hipóxico-isquêmica é considerada uma das principais causas de mortalidade e morbidade neurológica em RNs a termos e prematuros (Vannucci 2000, Perlman 2004)

A HI é mais frequentemente associada à asfixia intra-uterina, que por sua vez ocorre devido à diminuição da perfusão ou troca gasosa placentária, ou pela interrupção do fluxo sanguíneo no cordão umbilical, o que pode diminuir o débito cardíaco fetal e uma consequente redução do fluxo sanguíneo cerebral. Uma variedade de fatores pode levar a este desfecho, incluindo descolamento placentário, prolapso do cordão umbilical ou ruptura uterina. RNs acometidos apresentam escore de Apgar de 0-3 por mais de 5 minutos após o nascimento, pH do cordão umbilical inferior a 7, acidose metabólica, evidências de prejuízos neurológicos, crises convulsivas e coma.

A HI neonatal pode levar a diferentes graus de incapacidade neurológica em neonatos, sendo a classificação de Sarnat e Sarnat, de 1976, considerada o padrão para a classificação da severidade da encefalopatia HI neonatal (Sarnat and Sarnat 1976, Douglas-Escobar and Weiss 2015). RNs que sofrem os graus mais graves da encefalopatia (moderada, Sarnat II e severa, Sarnat III) apresentam letargia, respiração irregular, hipotonia parcial ou generalizada, reflexos diminuídos ou ausentes, crises convulsivas nas primeiras 24h de vida e geralmente estresse sistêmico. Cerca de 90% das crianças com HI severa apresentam incapacidades neuropsicológicas permanentes durante o desenvolvimento, tais como retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, autismo, atrasos no desenvolvimento neuropsicomotor, déficits cognitivos e déficits visual e/ou auditivo. Da mesma forma, 30-50% dos acometidos pela HI moderada desenvolvem algum déficit neurológico grave. Por outro lado, crianças acometidas pelo grau mais leve da HI (Sarnat I) geralmente apresentam hipotonia leve e alterações comportamentais transitórias que se solucionam nas primeiras 24h de vida e não apresentam desfechos desfavoráveis durante o

desenvolvimento (Perlman 2006). A presença, a severidade e a distribuição das lesões neuropatológicas consequentes da HI estão diretamente relacionadas a fatores como a natureza e a duração do insulto, a idade gestacional ou do recém-nascido e a presença ou ausência de estresse sistêmico (Volpe 2000).

Apesar dos consideráveis avanços do cuidado neonatal, o manejo clínico de crianças asfíxiadas limita-se a medidas de suporte e poucas alternativas dirigem-se à prevenção ou interrupção dos mecanismos de lesão cerebral. A hipotermia, como uma estratégia de neuroproteção, é atualmente utilizada na tentativa de interromper a cascata de eventos prejudiciais iniciada pelo insulto hipóxico-isquêmico. O resfriamento da cabeça antes de 6 h após asfixia mostrou-se eficaz em melhorar o prognóstico de neonatos com HI diminuindo a morte neuronal e a incidência de paralisia cerebral e outras deficiências neurológicas (Johnston, Fatemi et al. 2011, Shankaran 2012). Alternativas complementares que se somem ao tratamento com hipotermia em conjunto ou após, tais como a terapia celular, vêm sendo amplamente estudadas (de Paula, Vitola et al. 2009, de Paula, Greggio et al. 2012, Dalous, Pansiot et al. 2013, Greggio, de Paula et al. 2014, Davidson, Wassink et al. 2015). Além disso, ferramentas que proporcionem bases teóricas para o diagnóstico precoce de crianças afetadas e permitam a busca pela janela e tratamento mais adequados para os diferentes graus de lesão se torna cada vez mais necessário (Davidson, Wassink et al. 2015).

Eletroencefalograma (EEG) e exames de imagem por tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) em crianças asfíxiadas são amplamente utilizados para avaliar a extensão do dano cerebral e acompanhar o desenvolvimento neurológico por alterações anatômicas após o insulto por HI (Douglas-Escobar and Weiss 2015). Um estudo que reuniu exames de RM de crianças acometidas pela HI demonstrou que lesão nos núcleos da base e no tálamo estão presentes em 40-80% dos casos e anormalidades no córtex cerebral e substância branca estão presentes em 40-60% (Volpe 2012). Lesões em áreas específicas do córtex cerebral e núcleos da base durante a fase inicial da HI estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de déficit de linguagem e motor na infância (Steinman, Gorno-Tempini et al. 2009, Martinez-Biarge, Diez-Sebastian et al. 2011). Lesões envolvendo núcleos da base e tálamo tentem a desenvolver paralisia cerebral e

epilepsia e lesões no córtex e na substância branca predispõe a déficits cognitivos (Steinman, Gorno-Tempini et al. 2009, Groenendaal and de Vries 2017, Millar, Shi et al. 2017)

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é uma ferramenta de imagem funcional capaz de identificar anormalidades em diferentes órgãos, relacionadas, por exemplo, ao metabolismo de glicose do tecido. A imagem de PET com o emprego do radiofármaco [18]fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG), uma análogo da molécula de glicose, fornece informações importantes sobre o desenvolvimento e maturação do cérebro neonatal quanto ao metabolismo de glicose e auxilia no entendimento da evolução de lesões cerebrais precoces como a HI (Kannan and Chugani 2010). De fato, a ressonância magnética convencional foi incapaz de detectar qualquer anormalidade estrutural em 17% dos pacientes com PC após HI neonatal. Técnicas de imagem funcional como PET, podem ser úteis na detecção de anormalidades metabólicas e alterações no fluxo sanguíneo cerebral em uma fase muito anterior ao desenvolvimento de anormalidades estruturais e morfológicas (Altman and Volpe 1991, Kannan and Chugani 2010). Apesar de ainda pouco utilizado, o PET pode se tornar uma fonte de informação prognóstica importante, mostrando anormalidades metabólicas mesmo antes que as alterações morfológicas se desenvolvam no cérebro de RNs acometidos pela HI e assim determinar a evolução da lesão hipóxico-isquêmica e o tratamento mais adequado para cada caso (Groenendaal and de Vries 2017).

1.2 Epidemiologia

A incidência de encefalopatias neonatais (EM) é estimada entre 2,5-3,5 por 1000 nascidos vivos, dos quais 30% dos casos de EM nos países desenvolvidos e 60% dos casos nos países em desenvolvimento estão associados a evidências de HI intraparto. Ou seja, a HI atinge 1,5 por 1000 nascidos vivos (Kurinczuk, White-Koning et al. 2010).

Estima-se ainda hoje que cerca de quatro milhões de RNs morram no período neonatal a cada ano, sendo que 23% dessas mortes devido à asfixia neonatal. No entanto,

com o avanço da medicina preventiva, do manejo da gestante de alto risco e do neonato no período pré e pós-natal observa-se também uma importante diminuição da taxa de mortalidade de RNs a cerca 27-50%, aonde antes chegava a 75%. Em decorrência dessa maior taxa de sobrevivência de crianças acometidas pela HI, um aumento na prevalência de sequelas neurológicas como resultado dessa encefalopatia foi observado nas últimas décadas, onde metade dos sobreviventes irão apresentar algum prejuízo neurológico permanente, tais como paralisia cerebral, retardo mental, epilepsia e transtornos de aprendizagem. Essas evidências fazem com que estudos que visem à busca por estratégias para minimizar os efeitos danosos da HI em crianças acometidas tornem-se cada vez mais necessários (Vannucci and Hagberg 2004, Millar, Shi et al. 2017)

1.3 Fisiopatologia

A diminuição da oferta de oxigênio e glicose ao tecido é o principal mecanismo atribuído à neuropatologia da HI neonatal, onde a redução do fluxo sanguíneo cerebral leva a uma cascata de efeitos nocivos ao cérebro do RN trazendo prejuízos irreparáveis.

Atualmente, entende-se a lesão por HI com uma síndrome que evolui ao longo de dias e meses. O cérebro é o órgão mais susceptível ao dano hipóxico isquêmico, onde apesar do cérebro neonatal utilizar preferencialmente outras fontes de energia no início do desenvolvimento, tais como lactato e corpos cetônicos, a glicose é um substrato essencial para a manutenção da integridade cerebral (Brekke, Berger et al. 2017). A falha energética leva a alterações no metabolismo celular, diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) inibindo a fosforilação oxidativa mitocondrial desencadeando eventos excitotóxicos responsáveis pelo dano e morte neuronal, tais como despolarização da membrana, aumento do cálcio intracelular, liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e acúmulo de radicais livres, contribuindo para o estresse oxidativo (Vexler and Ferriero 2001, Berger, Garnier et al. 2002, Douglas-Escobar and Weiss 2015).

A redução da síntese de ATP resultante da hipóxia acentuada altera o equilíbrio iônico através da membrana celular (Perlman 2006). Imediatamente após, ocorre a morte

celular por necrose devido a intensa agressão às células, com inibição total das mitocôndrias, falência completa das bombas iônicas, edema e lise celular, ruptura das organelas, extravasamento do citoplasma no meio extracelular e presença de resposta inflamatória intensa. Após este processo, dá-se início a uma fase tardia de dano tecidual (em 6-12h) podendo durar até cerca de três dias após o acometimento pela HI, caracterizada pela morte celular por apoptose. A apoptose decorre da agressão lenta à célula, com inibição parcial da fosforilação oxidativa, redução do tamanho da célula e ruptura do DNA. Nesta fase também começa a remodelação sináptica e tecidual e a tentativa de reparo do dano, que se prolonga por meses (Berger, Garnier et al. 2002, Douglas-Escobar and Weiss 2015) (Figura 1).

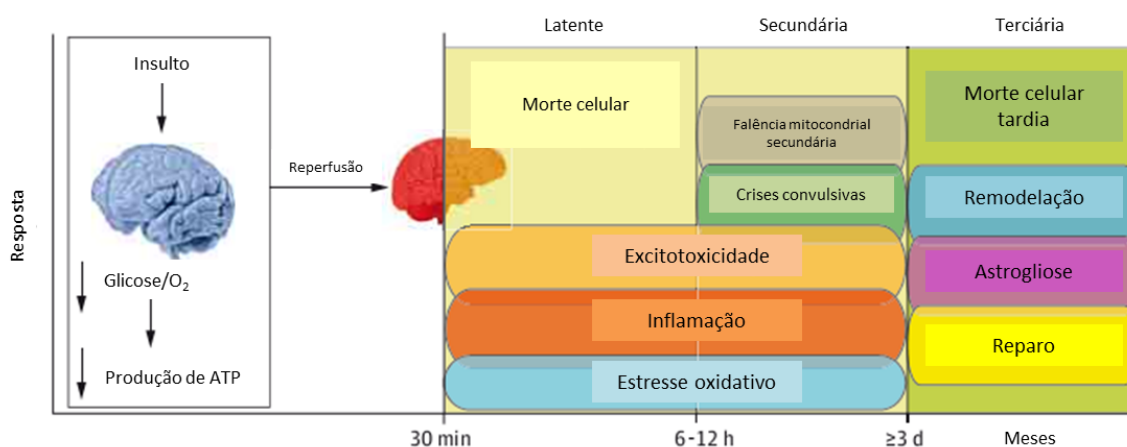


Figura 1. Resumo esquemático da fisiopatologia da HI (Adaptado de Douglas-Escobar e Weiss, 2015) (Douglas-Escobar and Weiss 2015).

1.4 Modelos animais de HI

A HI neonatal é representada em uma grande variedade de modelos experimentais, no entanto o mais utilizado na investigação do insulto hipóxico isquêmico é o modelo proposto por Rice e colaboradores em ratos neonatos (Levine 1960, Rice, Vannucci et al. 1981). O modelo consiste na oclusão da artéria carótida direita de ratos aos 7 dias de vida,

associado a um período de hipóxia sistêmica. O dano cerebral pode ser encontradas no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida nas regiões do córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (núcleos da base) e hipocampo (Vannucci and Vannucci 2005).

O cérebro de ratos de 7 dias de vida tem sido histologicamente comparado ao desenvolvimento cerebral de fetos com 32-34 semanas de idade gestacional, ou seja, a camada cortical está completa, a matriz germinativa está regredindo e há pouca mielinização na substância branca (Vannucci and Vannucci 2005). Os parâmetros fisiológicos do modelo têm mostrado que durante o insulto, o filhote de rato torna-se hipóxico e hipocapnéico como resultado da hiperventilação. A ligadura da artéria carótida comum leva a uma rápida redução do fluxo sanguíneo cerebral tanto para o ipsilateral (reduzido em aproximadamente 20%) quanto sobre o hemisfério contralateral (reduzido em aproximadamente 5%) e a associação à hipóxia leva ao dano cerebral permanente. Assim, o hemisfério ipsilateral à ligadura é submetido à isquemia e hipóxia, enquanto o hemisfério contralateral é submetido apenas a hipóxia (Vannucci and Vannucci 2005, Brekke, Berger et al. 2017).

Uma ferramenta interessante para o estudo pré-clínico de diversas patologias em animais de pequeno porte seria a microtomografia por emissão de pósitrons (microPET). Inicialmente desenvolvido pelo Dr. Simon Cherry e colaboradores (Cherry, 2001), o sistema de microPET, assim como o seu equivalente clínico, possui a capacidade de determinar a distribuição espacial e temporal *in vivo* de compostos marcados com um dado radionuclídeo, a exemplo do ^{18}F -FDG. A imagem funcional para investigação molecular e permite analisar processos bioquímicos, fisiológicos, patológicos ou farmacológicos *in vivo* (Phelps, 2000; Xi et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Caracterizar *in vivo*, de forma longitudinal, a detectabilidade e a progressão da lesão cerebral em ratos submetidos ao modelo experimental de hipóxia isquemia neonatal através da quantificação do metabolismo cerebral de glicose.

2.2 *Objetivos específicos*

- Verificar longitudinalmente, *in vivo*, a detectabilidade de alterações no metabolismo cerebral de glicose em ratos submetidos ao modelo de HI neonatal;
- Avaliar a correlação do metabolismo de glicose entre as regiões cerebrais quanto a formação de rede metabólica cerebral em animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal;
- Avaliar a correlação entre o metabolismo cerebral de glicose e a capacidade de aprendizagem e memória de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal;
- Avaliar a correlação do metabolismo cerebral de glicose e a volumetria *post-mortem* de estruturas cerebrais afetadas na HI neonatal experimental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e de biossegurança

Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelas Comissões de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFRGS sob o número de protocolo 31939. Todas as práticas experimentais seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório e foram realizadas tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados e seu sofrimento.

O radiofármaco ^{18}F -FDG foi fornecido pelo Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) e os procedimentos com emprego de material radioativo foram realizados por profissionais qualificados sob os cuidados do supervisor de proteção radiológica do InsCer.

3.2 Animais

Foram utilizados 35 ratos Wistar machos para os procedimentos experimentais deste estudo. Estes foram obtidos a partir de fêmeas prenhas, com idade superior a 90 dias, do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS. As ninhadas foram padronizadas em 10 neonatos e mantidas em condições controladas de luz – ciclo 12/12h de claro-escuro – e temperatura – $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ – com água e ração ad libitum. O dia de nascimento foi considerado dia pós-natal zero (DPN 0). Após o desmame foram mantidos um máximo de quatro animais por caixa-moradia. As fêmeas-mães utilizadas para manter as ninhadas ou fêmeas frutos dos acasalamentos foram doadas a outros pesquisadores quando possível.

3.3 Delineamento do estudo e grupos experimentais

Para este estudo, 35 ratos Wistar machos com sete dias de vida foram submetidos ao modelo de HI neonatal no Departamento de Bioquímica da UFRGS, estabelecendo-se dois

grupos experimentais: grupo HI, animais que foram submetidos ao modelo de HI neonatal (n = 22) e grupo Sham, animais saudáveis submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, exceto oclusão arterial e hipóxia sistêmica (n = 12). Após a indução de HI, os animais foram acompanhados por exames de imagem funcional de forma longitudinal, aos 8, 10, 15, 36 e 60 dias de vida, por microPET, com o emprego do radiofármaco ^{18}F -FDG, no Centro de Pesquisa Pré-Clínica do InsCer. Após o último dia das aquisições de imagem, os animais foram submetidos à avaliação cognitiva. Ao término dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para análise histológica (Figura 2).

Antes do início das análises, o grupo HI foi subdividido de acordo com o metabolismo de FDG do hipocampo direito. Levando em consideração a média do metabolismo do hipocampo direito do grupo Sham (1,2 SUVr) foram estabelecido dois grupos experimentais para os animais HI: HI sem hipometabolismo (HI s/h), animais que apresentaram o metabolismo de FDG do hipocampo direito igual ou superior a 1,2 SUVr (n = 9) e HI hipometabólico (HI h), animais que apresentaram um hipometabolismo no hipocampo direito, com SUVr inferior a 1,2 (n = 12).

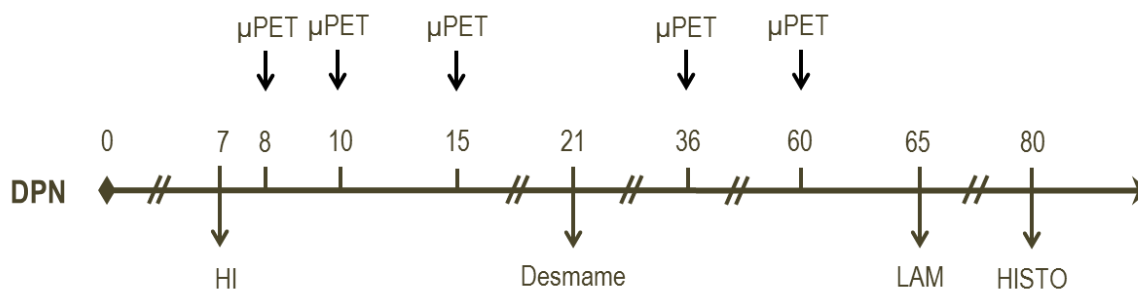


Figura 2. Representação do delineamento experimental. μPET , microPET; LAM, labirinto aquático de Morris e HISTO, análise histológica.

3.4 *Indução do modelo de HI neonatal*

Para a indução do modelo de HI foi utilizado o modelo experimental descrito por Levine e, posteriormente, modificado por Rice e colaboradores (1981) para ratos neonatos (Levine 1960, Rice, Vannucci et al. 1981). Ratos com 7 dias de vida, com peso variando de 12 a 15g, foram anestesiados com isoflurano através de uma máscara facial. A artéria carótida comum direita foi identificada através de uma incisão transversal na linha média da face anterior do pescoço, isolando o nervo vago, e ocluindo permanentemente em dois locais com linha cirúrgica de seda 7.0, utilizando-se do microscópio cirúrgico durante os procedimentos. O procedimento cirúrgico ao todo foi concluído dentro de 15 min. Após, os animais ficaram em observação sob luz aquecida até a recuperação da anestesia, quando então foram devolvidos para recuperação em suas caixas moradias juntamente com suas mães.

Após o período de recuperação e de alimentação (2 horas após procedimento cirúrgico), os filhotes foram expostos a um ambiente a 8 % de oxigênio e 92 % nitrogênio dentro de uma câmara feita de acrílico transparente (1500 mL, White Martins®) por 1 hora. A câmara permaneceu em banho-maria, parcialmente imersa em água morna (36°C) para manter a temperatura constante dentro dos limites fisiológicos. Animais do grupo Sham foram anestesiados, tiveram a carótida exposta, mas não sofreram a oclusão da artéria e não foram submetidos ao ambiente hipóxico (Greggio, de Paula et al. 2014, Odorcyk, Kolling et al. 2018).

3.5 *Imagem molecular por MicroPET*

No Centro de Pesquisa Pré-Clínica do InsCer da PUCRS há um sistema de imagem molecular de MicroPET/CT (Triumph™, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA). Além disso, o InsCer também dispõe de uma equipe de profissionais responsáveis pelos laboratórios de radiofarmácia e pelo ciclotron, acelerador de partículas de íons negativos para irradiação e produção de ^{18}F e, posteriormente, dos radiofármacos.

3.5.1 *Produção de Flúor-18*

O Flúor-18 é um radioisótopo de meia-vida curta (109,8 minutos), e foi produzido através de um acelerador circular de partículas. O InsCer conta com um ciclotron de 8 MeV (PETTrace, GE®). O ciclotron é formado por três componentes principais: campo eletromagnético, um par de eletrodos de cobre em formato de semicírculo localizados entre os polos de um imã, chamados de Dees, e uma fonte de íons capaz de gerar íons negativos de alta intensidade. Além disso, toda sua estrutura é mantida sob vácuo (maior que 10^{-7} torr). Após a ionização do gás hidrogênio na fonte de íons, os íons H^- são injetados em uma lacuna localizada entre os Dees. Quando uma radiofrequência de potencial alternado for aplicada aos Dees, os íons negativos aceleraram em direção ao Dee de potencial positivo. Devido ao campo magnético ser perpendicular aos Dees e ao movimento das partículas, os íons negativos se movimentam de forma circular e ganham energia, velocidade e raio à medida que os Dees alternam seu potencial de positivo para negativo, e vice-versa. Quando a energia cinética ideal das partículas aceleradas é alcançada, os íons carregados negativamente passam através de uma folha de carbono ultrafina (stripper), que extrai seus elétrons. Carregados positivamente, os íons mudam de direção e atingem o alvo, que é bombardeado. O alvo é líquido, composto de água enriquecida com oxigênio 18 ($[^{18}O]H_2O$) que, através da reação nuclear $^{18}O(p,n)^{18}F$, produz o flúor nucleofílico ($^{18}F^-$). O corpo do alvo é de nióbio. A água enriquecida proveniente do ciclotron contendo o ^{18}F produzido na irradiação passa através de uma coluna de troca iônica (Waters Accel plus QMA cartrige) onde o radioisótopo fica retido. Em seguida, o ^{18}F é eluído por meio de uma solução aquosa de acetonitrila contendo carbonato de potássio (K_2CO_3) e Kryptofix 2.2.2, obtendo o fluoreto de potássio complexado com o Kryptofix 2.2.2. A água residual é removida através de aquecimento ou utilizando-se acetonitrila anidra e fluxo de nitrogênio (Hamacher et al. 1986, Hartmann, 2013).

3.5.2 *Síntese de ^{18}F -FDG*

O FDG, um análogo a molécula da glicose, é um dos radiofármacos mais utilizados em exames de PET, onde há uma substituição no grupo hidroxila do carbono 2 da glicose por um átomo de flúor. A síntese de ^{18}F -FDG foi realizada através de substituição nucleofílica. A pureza radionuclídica foi avaliada por um espectrômetro de raios gama analisador multicanal com detector de NaI, pela determinação da energia dos fótons γ (gama). Também foi realizado o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) com auxílio de um curiômetro. O critério de aceitação segue as exigências da farmacopéia. O $t_{1/2}$ deve estar entre 105-115 minutos. A energia do pico principal encontrado deve ser $0.511 \pm 5\%$ MeV, representando no mínimo 96% da radioatividade total. A pureza radioquímica foi determinada por técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ambas as técnicas comparam o perfil da amostra com o perfil do composto padrão.

A pureza Química (presença de Kryptofix 2.2.2) também foi determinada. O Kryptofix é um catalisador comumente utilizado para a síntese de radiofármacos com flúor-18, por meio de substituição nucleofílica. Por se tratar de um composto extremamente tóxico, sua presença do produto final deve estar dentro dos limites estabelecidos nos compêndios oficiais. A metodologia empregada foi a cromatografia em camada delgada, comparando a amostra com a solução padrão. Como a maioria dos agentes para imagem molecular são compostos orgânicos, é necessário utilizar solventes orgânicos durante as sínteses. Após a síntese e após a purificação, o produto final ainda pode conter pequenas quantidades destes compostos. A técnica utilizada para sua detecção foi a cromatografia gasosa. Adicionalmente, o produto foi esterilizado antes de ser injetado nos animais. Foi aplicado o método de esterilização por membrana filtrante (filtro Millipore GS 0,22 μm).

3.5.3 Escaneamento por microPET

Para as investigações do metabolismo cerebral de glicose animais controles e induzidos ao modelo de HI neonatal estes foram submetidos a exames de imagem molecular, desde a indução do modelo até a fase adulta. Os exames foram realizados utilizando o equipamento de microPET, no CPPC do InsCer, em 5 períodos de distintos -

nos DPNs 8, 10, 15, 36 e 60 correspondentes a 1, 3, 7, 29 e 53 dias após a indução da HI, respectivamente. Os animais foram transferidos ao alojamento do CPPC em pelo menos 24 h antes do primeiro dia de escaneamento e permaneceram no mesmo alojamento até o último dia. Nos escaneamentos após o desmame, os animais passaram por um período de jejum pré-scan de 12 h a fim de intensificar a captação cerebral de ^{18}F -FDG.

Para os escaneamentos, os animais foram colocados sobre uma placa de aquecimento para manter a temperatura fisiológica corporal ($36.5 \pm 1^\circ\text{C}$) durante todo o procedimento. Além disso, para os dias de escaneamentos que antecederam o desmame dos animais, estes passaram por um período de pré-aquecimento de uma hora antes do início dos escaneamentos. Os animais foram individualmente anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio (4% para indução e 2-3% para manutenção da anestesia) e foi administrada uma dose de ^{18}F -FDG de 250 μCi para escaneamentos anteriores ao desmame, 500 μCi para os escaneamentos aos 36 dias de vida ou 1 mCi quando os animais foram escaneados aos 60 dias de vida, por via intraperitoneal (i.p). Em seguida, os animais foram devolvidos às caixas-moradia e permaneceram conscientes durante um período de 40 minutos para metabolização do radiofármaco. Após o período de captação, os ratos foram mais uma vez anestesiados e, individualmente, colocados em posição supinada sobre a cama apropriada na câmara de imageamento para a aquisição da imagem, a qual também permaneceu aquecida para a manutenção da temperatura corporal. A aquisição estática ocorreu por 10 minutos com o campo de visão (FOV: 3,75 cm) centrado na cabeça do rato. Ao término dos escaneamentos, o rato retornou a sua caixa após completa recuperação da anestesia (Figura 3).

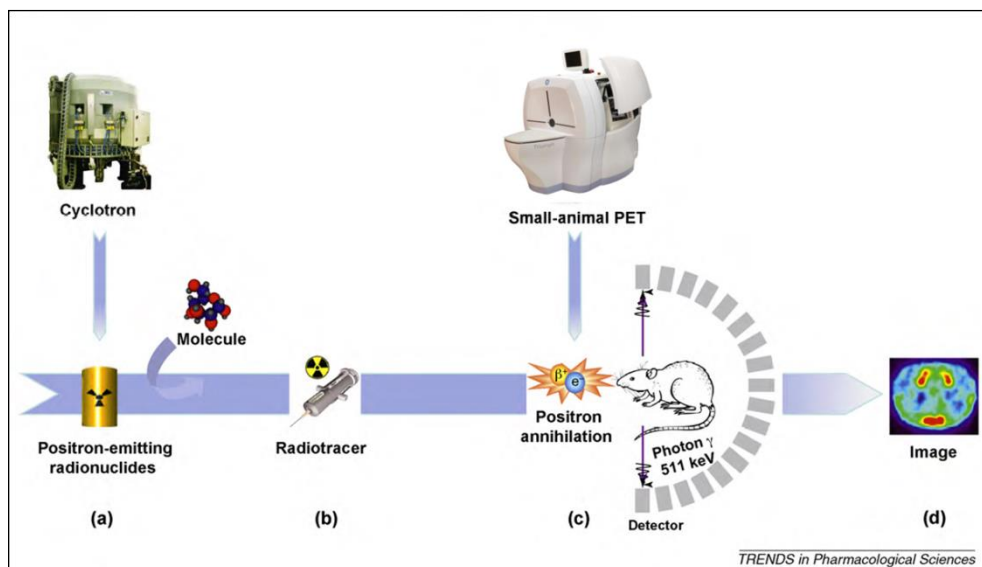


Figura 3. Representação esquemática para o princípio do microPET. (a) O ciclotron gera radionuclídeos emissores de pósitrons. Estes compostos são geralmente isótopos tais como oxigênio-15 (^{15}O), nitrogênio-13 (^{13}N), carbono-11 (^{11}C) e flúor-18 (^{18}F) com tempo de meia-vida de 2, 10, 20 e 110 minutos, respectivamente. (b) Estes radionuclídeos são incorporados em moléculas durante uma etapa de radiosíntese, gerando um “radiotraçador” específico (^{18}F -FDG). (c) Exames de microPET são obtidos após a administração intravenosa ou intraperitoneal deste radiotraçador. O marcador acumula-se no tecido em estudo e o seu radionuclídeo decai através da emissão de um pósitron. Após percorrer alguns poucos milímetros, o pósitron colide com um elétron e libera, simultaneamente, dois raios gama (fótons) com energia de 511 KeV em direções opostas. Estes fótons são detectados por uma câmara PET e simultaneamente localizados dentro de um período fixo de tempo por uma série de detectores opostos, que corresponde a múltiplos anéis constituídos por cristais de cintilação. (d) Através de um número significativo de eventos radioativos, algoritmos matemáticos reconstróem tridimensionalmente uma imagem que demonstrará a distribuição de moléculas emissoras de pósitron em determinado tecido corporal (Lancelot and Zimmer 2010).

3.5.4 Reconstrução das imagens

Após as aquisições de imagem no microPET, todos os dados foram reconstruídos usando um algoritmo de expectativa-maximização de subconjuntos (3D-MLEM) com 20 iterações e sem correção de atenuação. Cada imagem reconstruída do microPET foi normalizada espacialmente em um modelo cerebral de ^{18}F -FDG utilizando a normalização cerebral com o auxílio do software PMOD 3.5 e a caixa de ferramentas Fusion (PMOD Technologies, Zurique, Suíça).

Para a análise dos volumes de interesse (VOIs, do inglês *volume of interest*) nas imagens obtidas nos escaneamentos do DPN 8 ao 15 utilizou-se a ferramenta MINC (www.bic.mni.mcgill.ca/ServicesSoftware) onde cada imagem foi co-resgistrada a um atlas digitalizado de RM de cérebro de rato Wistar correspondente a idade de cada período avaliado. Após, as imagens foram co-localizadas sobre um template de microPET (Zimmer, Parent et al. 2017). Para a análise das imagens nos dois últimos tempos de escaneamento, em DPN 36 e 60, utilizou-se da mesma forma um atlas digitalizado de cérebro de rato Wistar, este contendo 57 volumes de interesse de RM e co-localizados sobre um template de microPET-FDG (Schiffer WK et al. 2006, Baptista et al. 2015).

Para a análise longitudinal, do DPN 8 ao 60, os valores do metabolismo cerebral foram expressos em SUV (*standardized uptake value*) através da seguinte equação:

$$\text{SUV} = \frac{C_{\text{ROI}}}{A_{\text{inj}}} \times m_{\text{subject}} ,$$

onde C_{ROI} (MBq) é concentração de atividade na região de interesse, A_{inj} (MBq) é a atividade injetada e m_{subject} (g) é o peso corpóreo do animal. O SUV foi obtido do cérebro, hemisférios cerebrais e para as seguintes regiões bilaterais: amígdala, estriado, córtex e hipocampo para análises semiquantitativas.

Para uma análise independente, nos últimos dois dias de escaneamento (DPN 36 e 60), o metabolismo de FDG para cada animal foi normalizado individualmente pela ponte como região de pseudoreferência e expresso como SUVr (*standardized uptake value ratio*) de acordo com a equação:

$$SUVR = \frac{SUV_{ROI}}{SUV_{REF}} = \frac{\frac{C_{ROI}}{A_{inj}/m_{subject}}}{\frac{C_{REF}}{A_{inj}/m_{subject}}} = \frac{C_{ROI}}{C_{REF}},$$

onde C_{REF} é a concentração de atividade região de pseudoreferência. O SUVR foi obtido dos seguintes VOIs pré definidos por um atlas de RM para ratos: cérebro, hemisférios cerebrais e para as seguintes regiões bilaterais: núcleo accumbens, amígdala, estriado, hipocampo, hipotálamo, tálamo, córtices auditivo, cingulado, entorrinal, frontal, insular, córtex pré-frontal medial (MPF, do inglês *medial prefrontal cortex*), motor, orbitofrontal, parietal, retrosplenial, somatosensorial e visual, olfatório, cóliculo superior, mesencéfalo, área tegmental ventral (VTA, do inglês *ventral tegmental area*) e cóliculo inferior

3.6 Rede metabólica cerebral

Rede metabólica cerebral (MBN, do inglês *brain metabolic network*) é um mapa de atividade cerebral obtido a partir de uma análise de PET-FDG. Sendo o consumo de glicose cerebral medido por PET considerado uma medida estática, a rede metabólica tem um papel complementar na compreensão da conectividade funcional do cérebro, através do acoplamento entre a atividade e o metabolismo cerebral (Choi, Kim et al. 2014, Zimmer, Parent et al. 2017, Zanirati, Azevedo et al. 2018).

Para a análise da rede metabólica, utilizamos o metabolismo de FDG normalizado pela intensidade nos VOIs dos animais. Foram selecionadas 12 VOIs para a análise (amígdala, estriado, córtices auditivo, entorrinal, insular, parietal, retrosplenial e somatosensorial, hipocampo, olfatório, VTA e tálamo), os quais podem estar desempenhando um papel na fisiopatologia da HI, e obtivemos uma matriz de correlação (24 x 24) com o auxílio do software Matlab. Coeficientes de correlação estatísticos entre os

níveis metabólicos médios de cada grupo para os VOIs foram obtidos para cada matriz (Zanirati, Azevedo et al. 2018).

3.7 Avaliação da memória espacial no Labirinto aquático de Morris

Os animais foram testados quanto à capacidade de memória espacial na versão espacial do labirinto aquático de Morris (LAM). O labirinto consiste em um tanque circular preto (200 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade) conceitualmente dividido em quatro quadrantes iguais imaginários, com água a uma altura de 25 cm e temperatura mantida em $\pm 23^{\circ}\text{C}$. Em um dos quadrantes existe uma plataforma circular (10 cm de diâmetro), 2 cm abaixo da superfície da água, invisível ao animal. O labirinto é localizado em uma sala iluminada, com dicas e estímulos visuais nas paredes variando em formatos e cores para fornecer pistas espaciais (Figura 4). A trajetória do nado dos animais é registrada através de uma câmara de vídeo com vista superior ao e conectada a um computador contendo um software de análise específico, ANY-MAZE.

Durante cinco dias consecutivos, os animais foram treinados nesta tarefa. Em cada dia os ratos realizaram quatro ensaios (*trials*) consecutivos de treinamento durante os quais a plataforma foi mantida em um local constante. Cada animal foi solto na piscina nos diferentes quadrantes (norte, sul, leste e oeste) para avaliação da memória de referência. Ao colocar o animal na piscina, o fora permitido nadar livremente até encontrar a plataforma submersa por no máximo 60 s, após o animal permaneceu por 30 s em cima da plataforma. Caso o animal não encontrasse a plataforma, cabia ao experimentador conduzi-lo. Ao final, a latência para encontrar a plataforma ao longo dos 5 dias de treino foram utilizadas para se obter a curva de aprendizagem dos animais nesta tarefa (Sanches, Arteni et al. 2013, Greggio, de Paula et al. 2014).

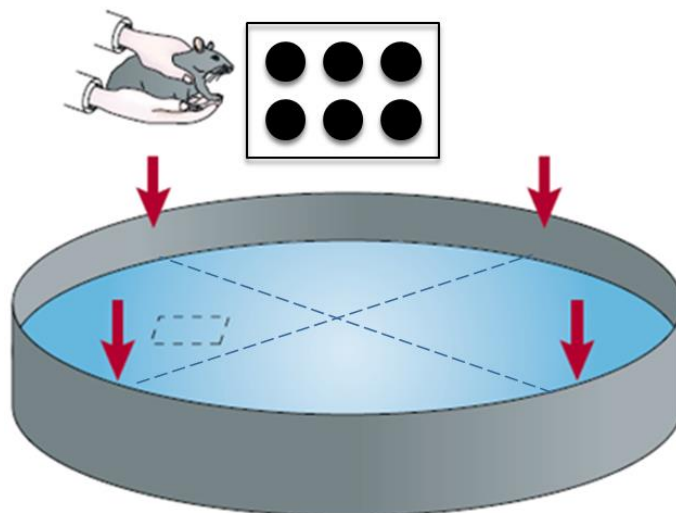


Figura 4. Versão espacial do labirinto aquático de Morris (Adaptado de Eichenbaum, 2000).

3.8 Volumetria cerebral

A análise volumétrica foi realizada pelo método de Cavalieri. Foram feitos cortes coronais em criostato (CM1850, Leica, São Paulo-SP, Brazil) de 20 μ m com um intervalo de 200 μ m e corados com violeta de cresil. As áreas de interesse (córtex, hipocampo e estriado) foram delineadas segundo atlas de Paxinos & Watson (1997) e o volume das estruturas de interesse foi calculado através da soma das áreas multiplicado pelo intervalo da secção dos cortes. As imagens das áreas foram capturadas com uma câmera de vídeo acoplada a um microscópio (Nikon) utilizando-se o software Image-J (Sanches, Arteni et al. 2013, Greggio, de Paula et al. 2014).

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística da avaliação do metabolismo cerebral foi o modelo de Equações de Estimação Generalizada (GEE) gerados para contabilizar medidas repetidas no desenho longitudinal com a utilização de uma matriz AR1, através do software IBM SPSS

Statistics 20 (IBM Corp, Nova Iorque, EUA). Foi aplicado individualmente para cada região do cérebro, incluindo as variáveis "grupo", "dia do scan" e a interação "grupo x dia de scan". Os dados foram ainda explorados através de comparação *pairwise* de "grupo × dia de scan" em cada região do cérebro para todos os períodos de scan combinados. Os valores de p foram corrigidos por *false discovery rate* (FDR).

As análises estatísticas para os testes comportamentais foram realizadas através do software PrismGraph 6.0 (Graph-Pad Software, San Diego, CA). Para análise da curva de aprendizagem do LAM foi utilizado análise de variância (ANOVA) de duas vias e para a análise da área sob a curva foi utilizado ANOVA de uma via, ambas corrigidas pelo post-hoc de Bonferroni. Para as análises de correlações foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r).

Todos os dados foram expressos em média e desvio ou erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1 *Grupos experimentais*

A média do metabolismo do hipocampo direito nos animais do grupo Sham no DPN 60 foi de 1,2 SUVr. Um total de 22 animais foi submetido ao modelo de HI neonatal. Desses, 59% apresentaram um metabolismo inferior 1,2 SUVr caracterizando um hipometabolismo no hipocampo direito em relação aos animais controles. Os demais (41%) apresentaram um metabolismo igual ou superior a 1,2 SUVr. Assim, dividiu-se em grupo HI s/h, animais que não apresentaram hipometabolismo no hipocampo direito (n= 9) e HI h, animais que apresentaram hipometabolismo no hipocampo direito (n= 13).

4.2 *Avaliação longitudinal do metabolismo de FDG de animais submetidos ao modelo de HI neonatal*

Para este estudo, os animais foram submetidos a exames de imagem metabólica medido por microPET-FDG, nos DPNs 8, 10, 15, 36 e 60, ou seja, em 1, 3, 7, 29 e 53 dias após a indução da HI neonatal. Esta foi uma avaliação longitudinal, *in vivo*, do metabolismo cerebral de glicose (Figura 5).

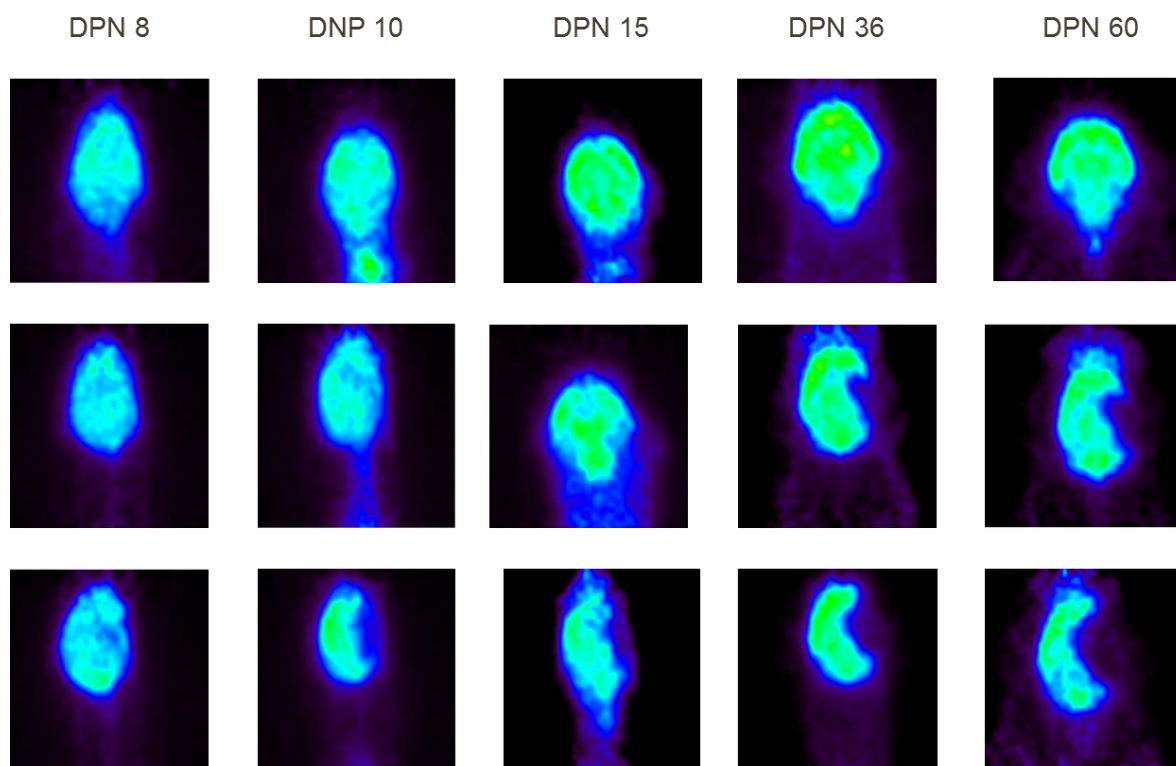


Figura 5. Imagens representativas da análise longitudinal do metabolismo cerebral de glicose no modelo de HI neonatal. Cortes transversais do metabolismo cerebral de ratos previamente submetidos à HI neonatal em 8, 10, 15, 36 e 60 dias de vida. A) Grupo Sham, animais controles, não apresentaram volume hipometabólico visível em nenhum dos períodos avaliados, B) e C) representantes do grupo HI, animais submetidos ao modelo de HI neonatal que desenvolveram alterações no metabolismo cerebral visíveis no exame. Imagens não normalizadas.

Para cada período de escaneamento o peso dos animais foi medido. Não houve variação significativa do peso entre os grupos experimentais em todos os períodos avaliados (Figura 6).

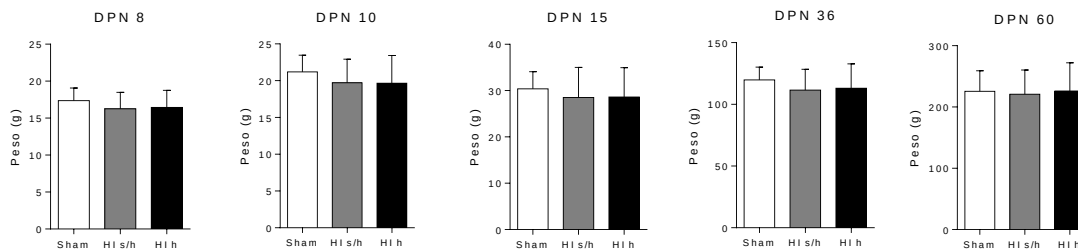


Figura 6. Mensuração do peso entre os grupos experimentais nos períodos de escaneamento.

Regiões de interesse foram destacadas para a análise longitudinal do metabolismo cerebral por SUV, tais como cérebro total (*whole brain*), hemisférios cerebrais e regiões bilaterais córtex, amígdala, estriado e hipocampo (Figura 7).

Quando se avaliou o metabolismo de glicose no cérebro total não foi possível identificar diferenças entre os grupos experimentais nos primeiros dias de escaneamento, DPNs 8, 10 e 15. O grupo HI h apresentou uma diminuição no metabolismo cerebral em relação ao grupo controle aos 36 dias de vida e aos 60 dias de vida em relação ao grupo HI s/h (Figura 7A).

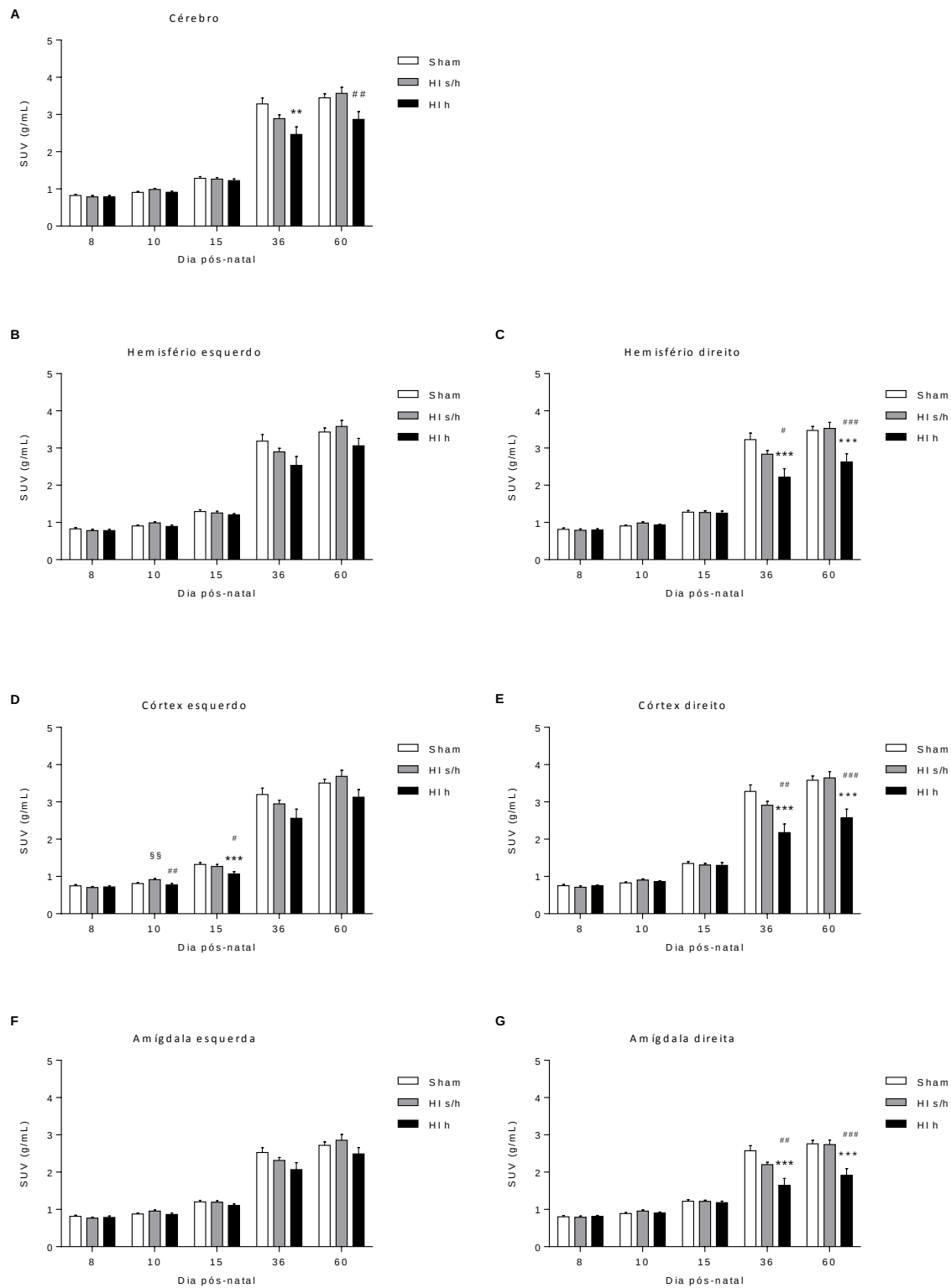
Quando a análise do metabolismo de glicose foi realizada entre os hemisférios cerebrais, da mesma forma, não houve diferenças de metabolismo entre os grupos experimentais aos 8, 10 e 15 dias de vida. A partir do DPN 36 dias se identificou um hipometabolismo limitado ao hemisfério direito (ipsilateral) para o grupo HI h em relação aos grupos Sham e HI s/h (Figura 7B). No hemisfério esquerdo (contralateral) não houve diferenças significativas (Figura 7C).

Entretanto, quando foi avaliado o metabolismo cerebral regional, observou-se um padrão de hipometabolismo no córtex, hipocampo e estriado esquerdo, hemisfério contralateral a lesão hipóxico-isquêmica, para o grupo HI h em 10 e 15 dias de vida. No DPN 10 (3 dias após a indução do modelo de HI), existe um metabolismo aumentado para

o grupo HI s/h em relação ao grupo sham no córtex esquerdo e um hipometabolismo no grupo HI h em relação ao grupo HI s/h no córtex, estriado e hipocampo esquerdo. No DPN 15, existe um hipometabolismo para o grupo HI h no córtex, estriado e hipocampo esquerdo em relação a ambos os grupos, sham e HI s/h (Figura 7D, H e J). No hemisfério direito não foi observado alteração no metabolismo cerebral nos primeiros dias de escaneamento para todas as regiões avaliadas (Figura 7E, G, I e K).

A partir do DPN 36 existe uma recuperação do metabolismo destas regiões no hemisfério contralateral a lesão HI, e nas demais regiões avaliadas sem diferenças entre os grupos experimentais. Tanto aos 36 quanto aos 60 dias de vida, o grupo HI h apresentou um hipometabolismo restrito ao hemisfério ipsilateral (direito) para todas as regiões avaliadas (DPN 36, córtex, amígdala, e hipocampo vs. sham e HI s/h e estriado vs. sham; DPN 60, córtex, amígdala, estriado e hipocampo vs. sham e HI s/h). Não houve diferenças entre o metabolismo de glicose cerebral entre os grupos Sham e HI s/h (Figura 7).

Temporalmente, o metabolismo de FDG aumentou ao longo do desenvolvimento dos animais em todos os grupos experimentais. Os valores de p, média e desvio padrão para a análise entre os grupos e temporal estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.



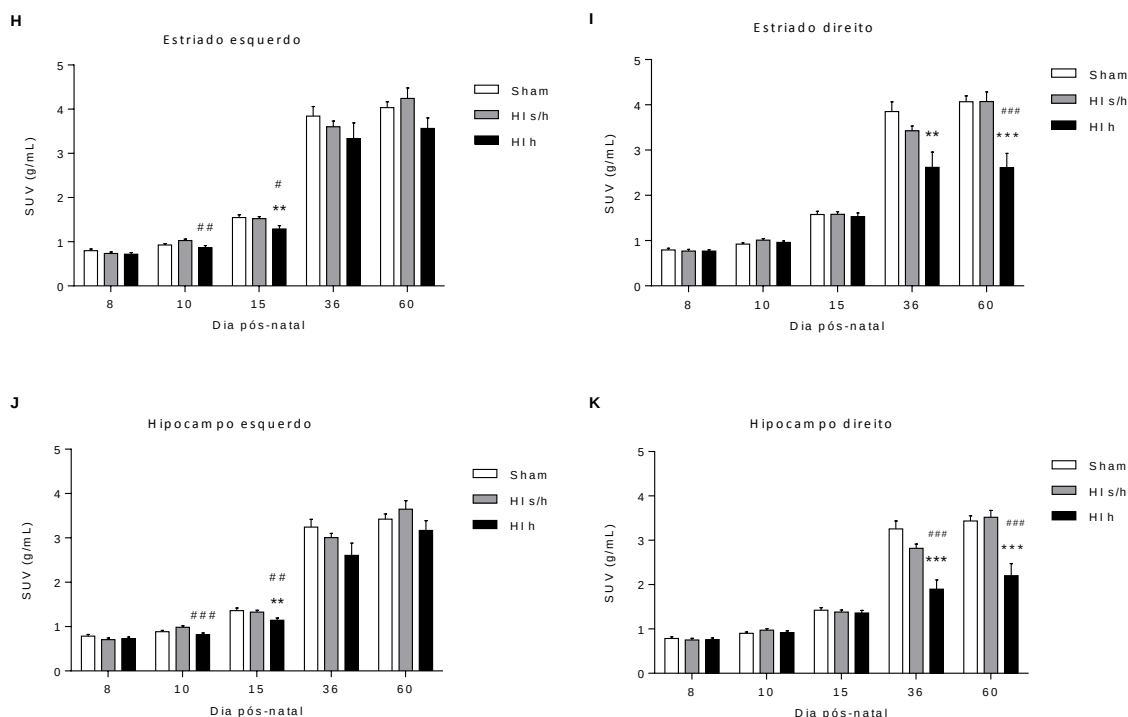


Figura 7. Gráficos referentes à análise longitudinal do metabolismo cerebral de glicose por SUV. Os gráficos representam a média e desvio padrão de ^{18}F -FDG SUV dos grupos experimentais (Sham, HI s/h e HI h) em 8, 10, 15, 36 e 60 dias de vida para o A) cérebro total, B) hemisfério esquerdo e C) direito, D) córtex esquerdo e E) direito, F) amígdala esquerda e G) direita, H) estriado esquerdo e I) direito e J) hipocampo esquerdo e K) direito. DPN 8, grupos sham n= 13, HI s/h n= 8 e HI h n= 13, DPN 10 grupos sham n= 13, HI s/h n= 8 e HI h n= 13, DPN 15 grupos sham n= 13, HI s/h n= 8 e HI h n= 11, DPN 36 grupos sham n= 12, HI s/h n= 7 e HI h n= 10 e DPN 60 grupos sham n= 12, HI s/h n= 9 e HI h n= 13. Significâncias referentes à ** p< 0,01 e *** p< 0,001 vs. Sham e # p< 0,01, ## p< 0,01 e ###p< 0,001 vs. HI s/h.

Tabela 1. Valores de média $\pm$ desvio padrão do metabolismo cerebral de glicose por SUV em 8, 10, 15, 36 e 60 dias de vida para o cérebro total, hemisférios cerebrais e regiões bilaterais amígdala, estriado e hipocampo.

8 Dias									
Regiões	Média $\pm$ SD			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 8)	HI 2 (n = 13)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR
Cérebro	0,82 $\pm$ 0,034	0,78 $\pm$ 0,036	0,78 $\pm$ 0,033	0,469	F	0,501	F	0,933	F
Hemisfério E	0,82 $\pm$ 0,033	0,78 $\pm$ 0,034	0,78 $\pm$ 0,033	0,336	F	0,345	F	0,977	F
Hemisfério D	0,81 $\pm$ 0,035	0,78 $\pm$ 0,039	0,79 $\pm$ 0,032	0,614	F	0,687	F	0,889	F
Córtex E	0,74 $\pm$ 0,033	0,70 $\pm$ 0,028	0,71 $\pm$ 0,028	0,283	F	0,455	F	0,725	F
Córtex D	0,75 $\pm$ 0,034	0,71 $\pm$ 0,035	0,74 $\pm$ 0,027	0,405	F	0,853	F	0,466	F
Amígdala E	0,81 $\pm$ 0,032	0,76 $\pm$ 0,031	0,78 $\pm$ 0,035	0,281	F	0,579	F	0,638	F
Amígdala D	0,80 $\pm$ 0,033	0,78 $\pm$ 0,036	0,80 $\pm$ 0,028	0,766	F	0,868	F	0,957	F
Estriado E	0,79 $\pm$ 0,038	0,73 $\pm$ 0,032	0,72 $\pm$ 0,035	0,209	F	0,139	F	0,764	F
Estriado D	0,79 $\pm$ 0,039	0,76 $\pm$ 0,040	0,76 $\pm$ 0,028	0,661	F	0,649	F	0,957	F
Hipocampo E	0,78 $\pm$ 0,035	0,70 $\pm$ 0,033	0,72 $\pm$ 0,039	0,108	F	0,242	F	0,742	F
Hipocampo D	0,78 $\pm$ 0,037	0,75 $\pm$ 0,037	0,76 $\pm$ 0,037	0,511	F	0,624	F	0,866	F

DPN 10 Dias									
Regiões	Média $\pm$ SEM			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 8)	HI 2 (n = 13)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/hvs. HI 2	FDR
Cérebro	0,90 $\pm$ 0,025	0,98 $\pm$ 0,028	0,91 $\pm$ 0,028	0,032	F	0,906	F	0,055	F
Hemisfério E	0,90 $\pm$ 0,024	0,98 $\pm$ 0,027	0,89 $\pm$ 0,031	0,026	F	0,768	F	0,025	F
Hemisfério D	0,90 $\pm$ 0,026	0,98 $\pm$ 0,028	0,92 $\pm$ 0,030	0,041	F	0,593	F	0,160	F
Córtex E	0,80 $\pm$ 0,024	0,91 $\pm$ 0,026	0,77 $\pm$ 0,040	0,003	V	0,443	F	0,003	V
Córtex D	0,80 $\pm$ 0,026	0,90 $\pm$ 0,031	0,85 $\pm$ 0,030	0,063	F	0,493	F	0,270	F
Amígdala E	0,87 $\pm$ 0,025	0,95 $\pm$ 0,027	0,86 $\pm$ 0,037	0,027	F	0,802	F	0,043	F
Amígdala D	0,88 $\pm$ 0,028	0,95 $\pm$ 0,026	0,90 $\pm$ 0,026	0,076	F	0,669	F	0,285	F
Estriado E	0,92 $\pm$ 0,030	1,02 $\pm$ 0,033	0,86 $\pm$ 0,050	0,026	F	0,303	F	0,007	V
Estriado D	0,92 $\pm$ 0,029	1,01 $\pm$ 0,032	0,95 $\pm$ 0,036	0,043	F	0,436	F	0,285	F
Hipocampo E	0,88 $\pm$ 0,028	0,98 $\pm$ 0,032	0,81 $\pm$ 0,041	0,019	F	0,160	F	0,001	V
Hipocampo D	0,90 $\pm$ 0,028	0,97 $\pm$ 0,033	0,92 $\pm$ 0,035	0,105	F	0,694	F	0,271	F

DPN 15									
Regiões	Média $\pm$ SEM			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 8)	HI 2 (n = 11)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR
Cérebro	1,28 $\pm$ 0,044	1,26 $\pm$ 0,043	1,22 $\pm$ 0,042	0,737	F	0,351	F	0,552	F
Hemisfério E	1,29 $\pm$ 0,047	1,25 $\pm$ 0,045	1,20 $\pm$ 0,032	0,587	F	0,112	F	0,323	F
Hemisfério D	1,27 $\pm$ 0,044	1,26 $\pm$ 0,043	1,24 $\pm$ 0,058	0,908	F	0,690	F	0,762	F
Córtex E	1,32 $\pm$ 0,051	1,27 $\pm$ 0,051	1,06 $\pm$ 0,059	0,484	F	0,001	V	0,010	V
Córtex D	1,34 $\pm$ 0,051	1,30 $\pm$ 0,048	1,29 $\pm$ 0,071	0,546	F	0,588	F	0,950	F
Amígdala E	1,20 $\pm$ 0,041	1,19 $\pm$ 0,036	1,10 $\pm$ 0,044	0,919	F	0,105	F	0,108	F
Amígdala D	1,21 $\pm$ 0,044	1,21 $\pm$ 0,033	1,17 $\pm$ 0,044	0,957	F	0,540	F	0,624	F
Estriado D	1,57 $\pm$ 0,068	1,57 $\pm$ 0,061	1,52 $\pm$ 0,083	0,993	F	0,643	F	0,624	F
Estriado E	1,54 $\pm$ 0,060	1,52 $\pm$ 0,047	1,28 $\pm$ 0,077	0,727	F	0,008	V	0,010	V

Hipocampo E	1,36±0,056	1,32±0,040	1,14±0,052	0,632	F	0,004	V	0,005	V
Hipocampo D	1,42±0,057	1,38±0,043	1,36±0,057	0,575	F	0,443	F	0,759	F

DPN 36									
Regiões	Média±SD			Valor P					
	Sham (n = 12)	HI s/h (n = 7)	HI 2 (n = 10)	Sham vs. HI 1	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR
Cérebro	3,28±0,159	2,88±0,098	2,46±0,200	0,077	F	0,016	F	0,150	F
Hemisfério E	3,30±0,157	2,92±0,099	2,59±0,218	0,042	F	0,009	F	0,174	F
Hemisfério D	3,26±0,162	2,85±0,098	2,33±0,185	0,028	F	0,000	V	0,013	F
Córtex E	3,19±0,171	2,94±0,102	2,56±0,247	0,212	F	0,035	F	0,149	F
Córtex D	3,27±0,176	2,90±0,107	2,17±0,229	0,072	F	0,000	V	0,004	V
Amígdala E	2,52±0,130	2,31±0,077	2,06±0,187	0,163	F	0,045	F	0,224	F
Amígdala D	2,57±0,138	2,20±0,062	1,64±0,183	0,016	F	0,000	V	0,022	F
Estriado D	3,85±0,213	3,42±0,104	2,61±0,338	0,072	F	0,002	F	0,022	F
Estriado E	3,84±0,214	3,60±0,127	3,33±0,352	0,330	F	0,218	F	0,479	F
Hipocampo E	3,25±0,177	2,81±0,095	1,89±0,209	0,030	F	0,000	V	0,000	V
Hipocampo D	3,24±0,172	3,00±0,098	2,60±0,273	0,230	F	0,049	F	0,170	F

DPN 60									
Regiões	Média±SD			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 9)	HI 2 (n = 13)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR
Cérebro	3,44±0,110	3,56±0,162	2,86±0,205	0,413	F	0,562	F	0,113	F
Hemisfério E	3,43±0,107	3,59±0,164	3,06±0,203	0,422	F	0,108	F	0,044	F
Hemisfério D	3,46±0,113	3,54±0,160	2,67±0,217	0,669	F	0,001	V	0,001	V
Córtex E	3,50±0,102	3,68±0,161	3,12±0,202	0,355	F	0,095	F	0,032	F
Córtex D	3,57±0,115	3,64±0,166	2,57±0,233	0,757	F	0,000	V	0,000	V
Amígdala E	2,71±0,091	2,85±0,154	2,48±0,172	0,444	F	0,238	F	0,112	F
Amígdala D	2,76±0,089	2,74±0,120	1,91±0,179	0,884	F	0,000	V	0,000	V
Estriado D	4,06±0,130	4,07±0,212	2,60±0,317	0,993	F	0,000	V	0,000	V
Estriado E	4,03±0,133	4,24±0,238	3,56±0,240	0,445	F	0,087	F	0,099	F
Hipocampo E	3,42±0,114	3,64±0,190	3,16±0,220	0,312	F	0,303	F	0,099	F
Hipocampo D	3,43±0,117	3,51±0,154	2,20±0,271	0,672	F	0,000	V	0,000	V

Estriado D	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,016	F
Hipocampo E	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,006	V
Hipocampo D	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,001	V

HI 2

Regiões	8D vs. 10D	FDR	8D vs. 15D	FDR	8D vs. 36D	FDR	8D vs. 60D	FDR	10D vs. 15D	FDR	10D vs. 36D	FDR	10D vs. 60D	FDR	15D vs. 36D	FDR	15D vs. 60D	FDR	36D vs. 60D	FDR
Cérebro	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,192	F
Hemisfério E	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,124	F
Hemisfério D	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,173	F
Córtex E	0,208	F	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,098	F
Córtex D	0,003	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,001	V	0,000	V	0,179	F
Amígdala E	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,138	F
Amígdala D	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,210	F
Estriado E	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,660	F
Estriado D	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,002	V	0,001	V	0,983	F
Hipocampo E	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,144	F
Hipocampo D	0,001	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,000	V	0,021	F	0,003	V	0,261	F

4.3 Avaliação do metabolismo cerebral de FDG por SUVr para os DPNs 36 e 60

Após a avaliação longitudinal do metabolismo cerebral de glicose separou-se, para uma análise individual, os dois últimos períodos de escaneamento. Para os DPNs 36 e 60 considerou-se realizar uma nova análise utilizando os valores de SUVs relativos à ponte (SUVr), a fim de normalizar os valores de SUVs individualmente.

4.3.1 *O metabolismo cerebral de glicose medido por FDG está alterado em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida*

Quando a quantificação do metabolismo cerebral foi realizada para o cérebro total (whole brain), por SUVr, ao separarmos os grupos HI em HI s/h e HI h, observamos um hipometabolismo significativo aos 60 dias de vida somente para o grupo HI h em relação aos grupos Sham e HI s/h (Figura 9A). Não foram observadas diferenças no metabolismo dos grupos Sham e HI s/h.

Quando esta análise foi realizada para os hemisférios cerebrais separadamente, aos 36 dias de vida, o grupo HI h apresentou um hipometabolismo no hemisfério direito, ipsilateral a lesão, em relação ao grupo HI s/h. Aos 60 dias de vida, da mesma forma, existe um hipometabolismo para o grupo HI h em relação ao grupo HI s/h no hemisfério direito e em relação ao grupo controle em ambos os hemisférios (Figuras 9B e C). Não existiram variações do metabolismo entre os dois períodos avaliados, de 36 a 60 dias de vida.

Os valores de p, média e desvio padrão para a análise entre os grupos e temporal estão descritas nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

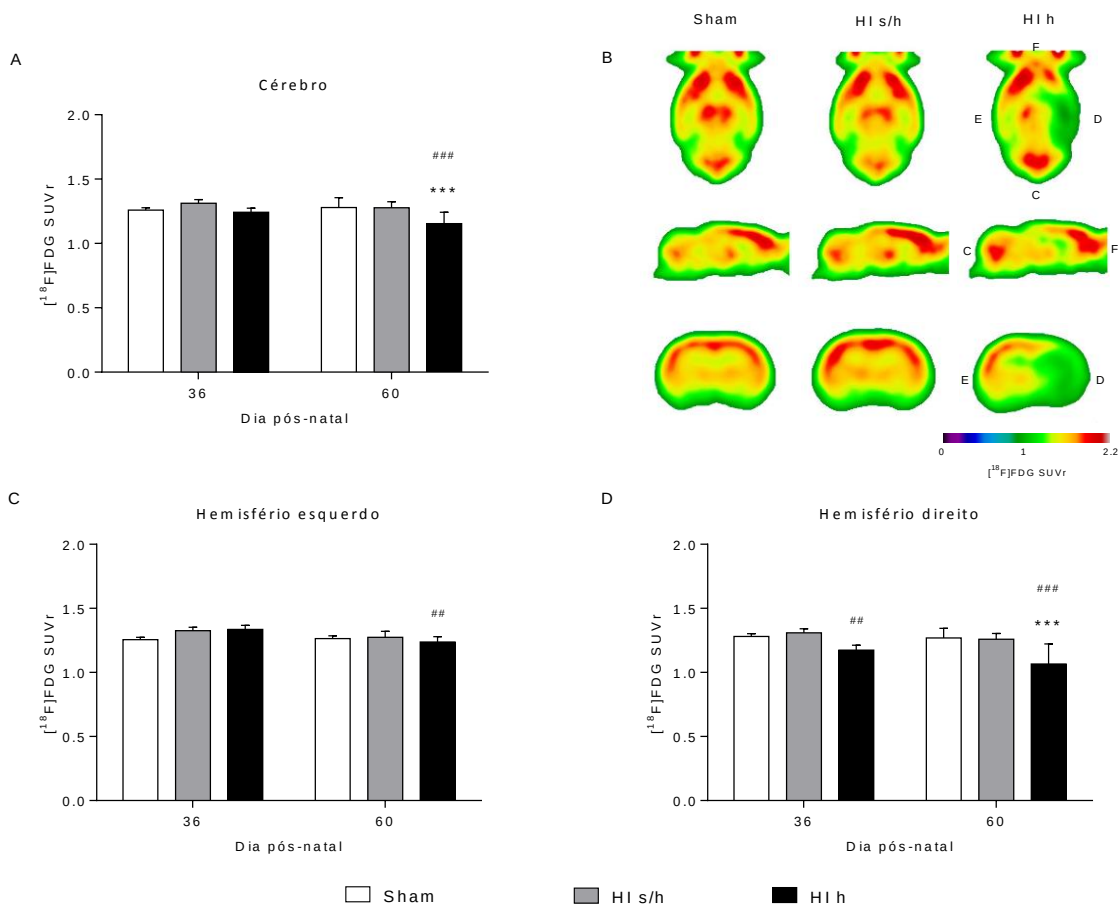


Figura 8. Metabolismo cerebral de glicose em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida por SUVR. A) cérebro total (*whole brain*), B) representação do metabolismo de FDG no DPN 60 para o grupo Sham, HI s/h e HI h, cortes coronais, sagitais e transversais (da esquerda para a direita). Cores mais indicam região com maior captação de ^{18}F -FDG e cores mais frias regiões com menor captação. C) Hemisfério cerebral esquerdo e D) direito. Significâncias referentes a ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs. Sham e ## p < 0,01 e ### p < 0,001 vs. HI s/h. F, frontal; C, caudal; E, esquerdo; e D, direito.

4.4 Alterações do metabolismo cerebral regional de glicose em animais previamente submetidos ao modelo de HI neonatal

Foi realizada a análise exploratória do metabolismo de glicose em 24 regiões cerebrais bilateralmente aos 36 e 60 dias de vida. Foi avaliado o metabolismo cerebral de glicose para as regiões: córtices auditivo, cingulado, entorinal, frontal, insular, MPF, motor, orbitofrontal, parietal, retrosplenial, somatosensorial, visual e olfatório, núcleo accumbens, amígdala, estriado, hipocampo, hipotálamo, tálamo, cóliculo superior, mesencéfalo, VTA e colículo inferior.

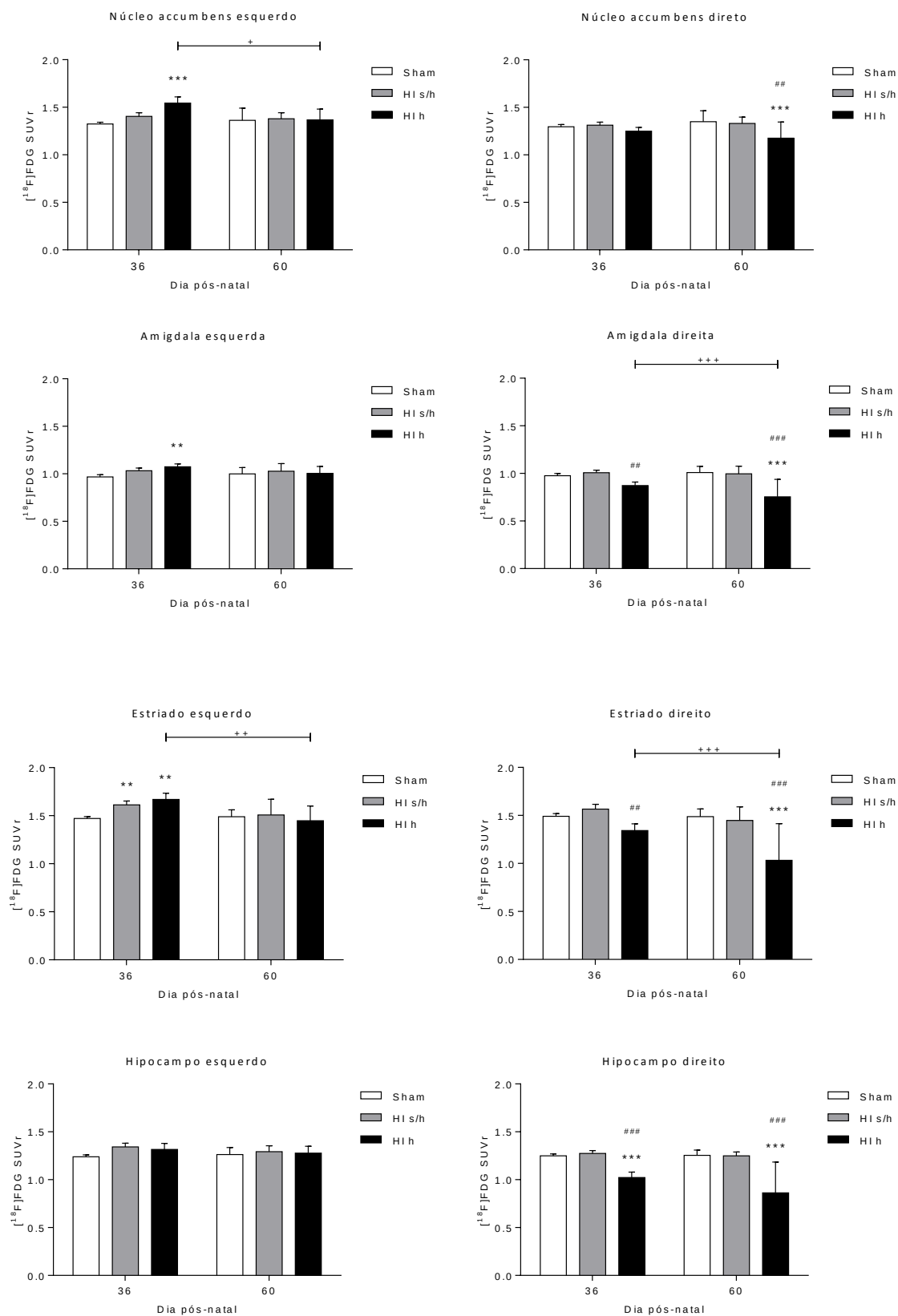
4.4.1 O metabolismo de glicose está alterado no núcleo accumbens, amígdala e estriado em animais HI no hemisfério contralateral ao insulto hipóxico-isquêmico aos 36 dias de vida

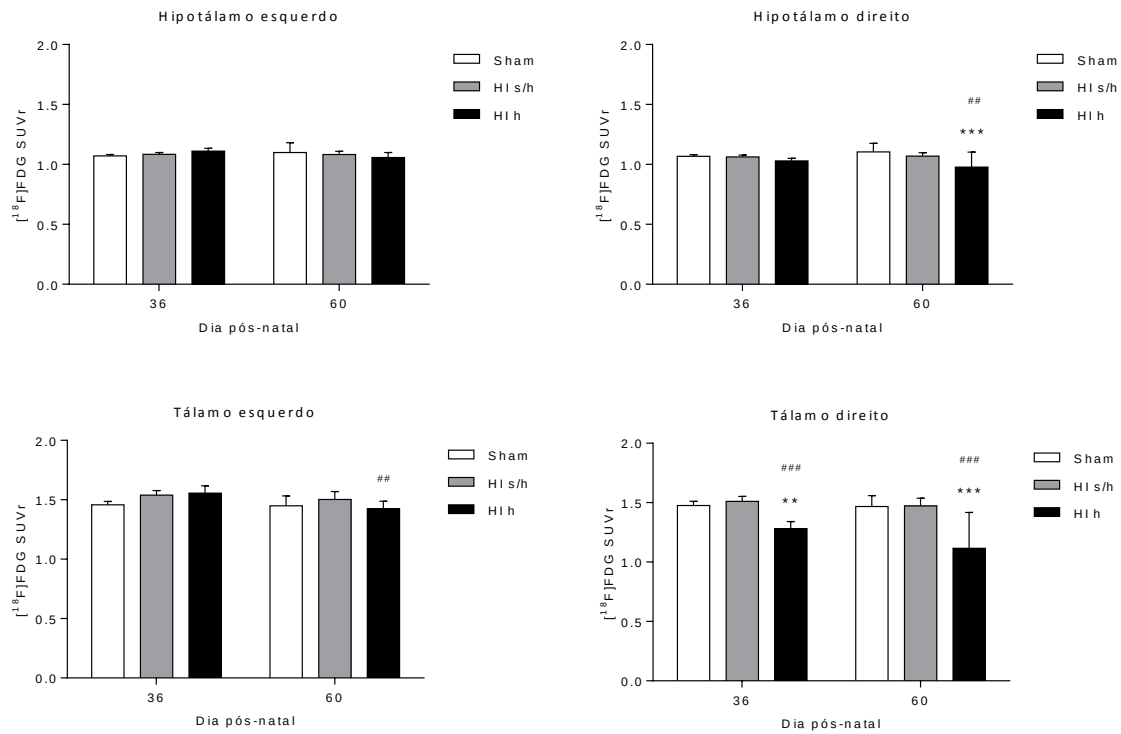
No DPN 36, um metabolismo de glicose aumentado foi observado para grupo HI 2 relação ao grupo sham no hemisfério contralateral para as seguintes regiões: núcleo accumbens esquerdo, amígdala esquerda e estriado esquerdo (Figura 9A). No estriado esquerdo e no córtex somatossensorial esquerdo o metabolismo do grupo HI s/h estava aumentado em relação ao grupo Sham (Figura 9A e B). Nas demais regiões avaliadas no hemisfério contralateral à lesão por HI, apesar de se observar a mesma tendência ao aumento do metabolismo para a maioria das regiões para o grupo HI s/h, não houve diferenças significativas no metabolismo de glicose entre os grupos experimentais.

No mesmo período, o grupo HI h apresentou um hipometabolismo de glicose no hemisfério direito, quando comparado ao grupo Sham e ao grupo HI s/h, para as seguintes regiões: hipocampo direito e tálamo direito (Figura 9A) e córtices auditivo direito, parietal direito, somatossensorial direito e visual direito. Além disso, o grupo HI h também apresentou um metabolismo diminuído em relação somente ao grupo HI s/h na amígdala direita e no estriado direito (Figura 9A). No hemisfério ipsilateral não houve diferenças no metabolismo de glicose entre os grupos Sham e HI s/h nas regiões avaliadas (Figura 10).

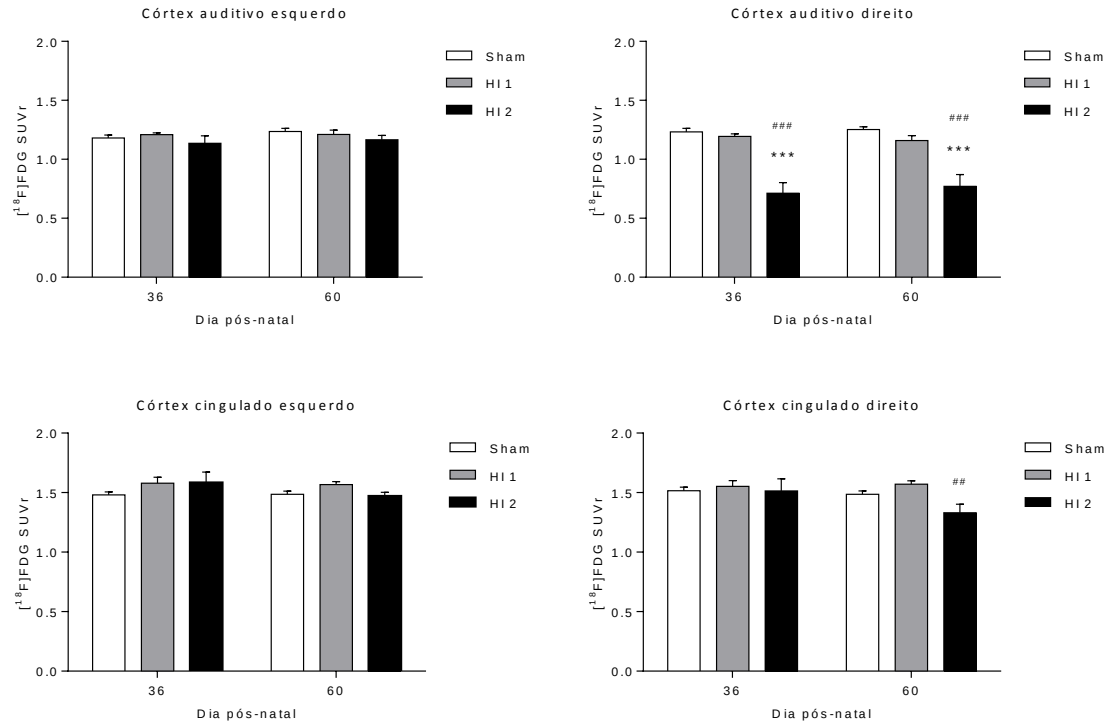
Os valores de p, média e desvio padrão pra todas as análises estão descritos na tabela 3.

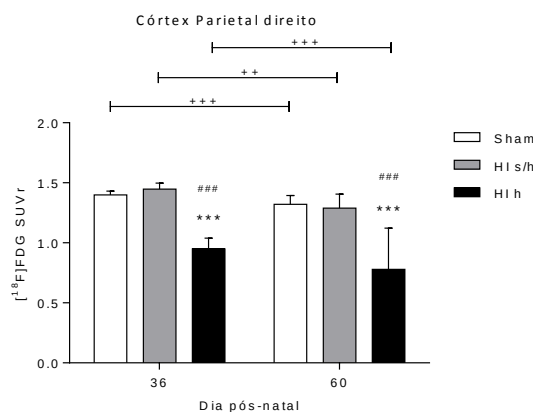
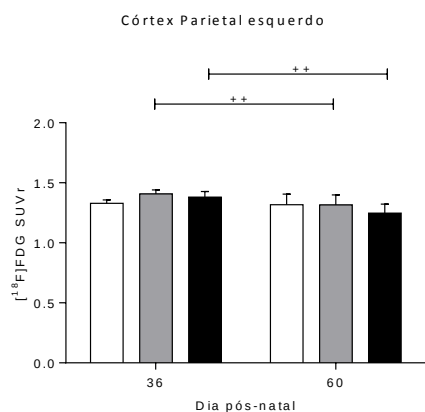
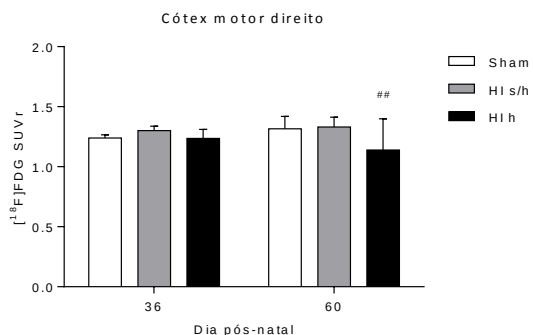
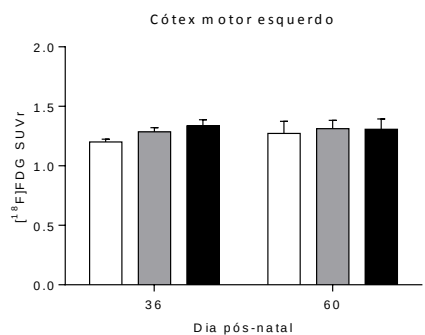
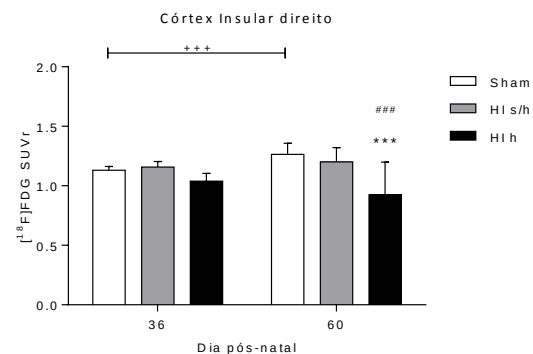
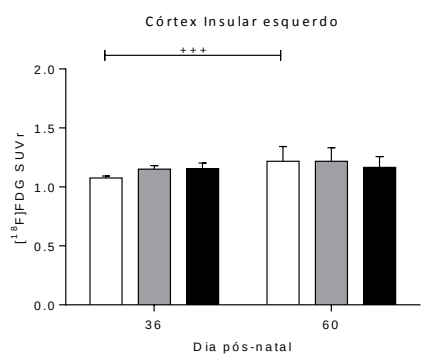
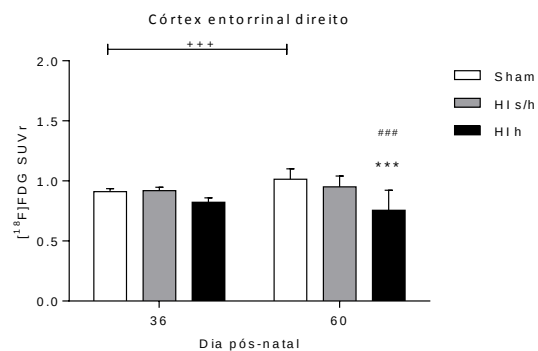
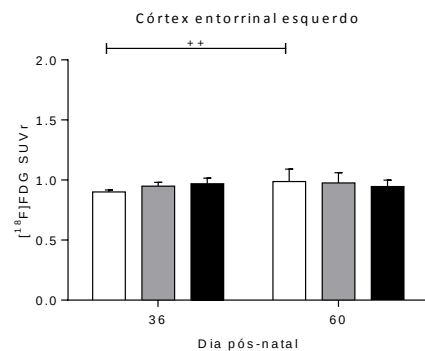
A

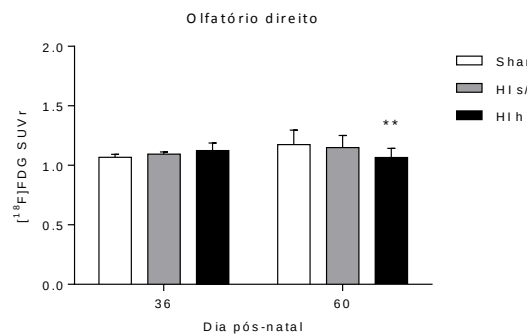
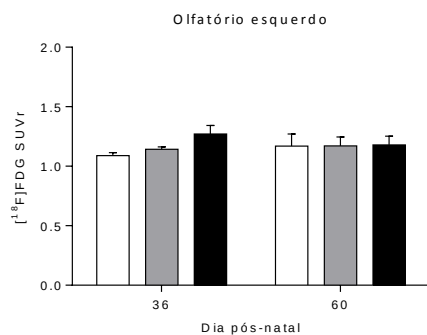
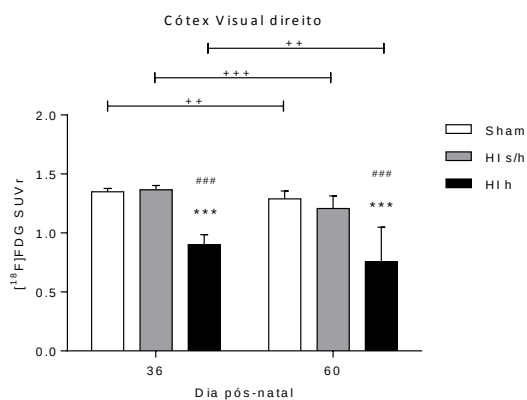
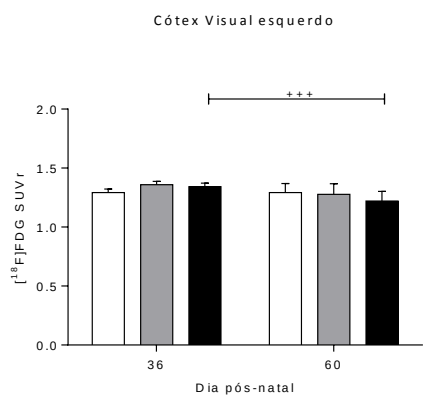
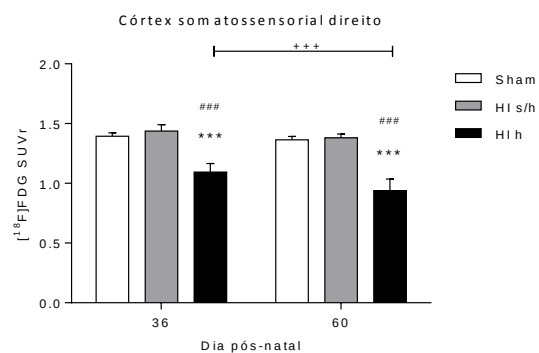
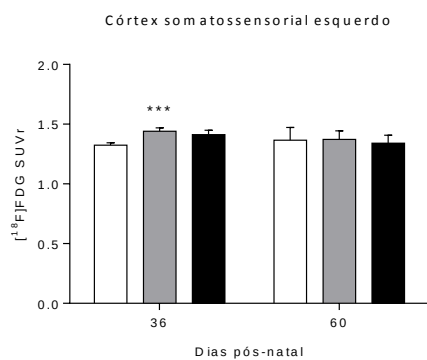
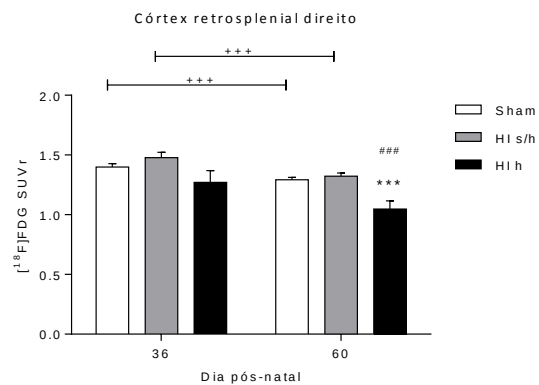
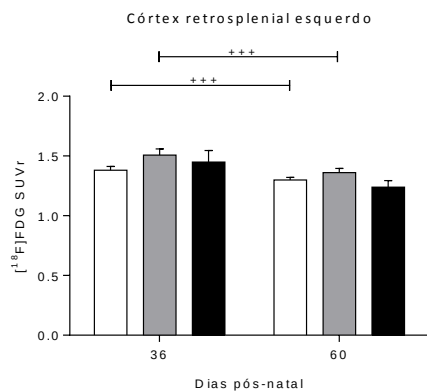




B







C

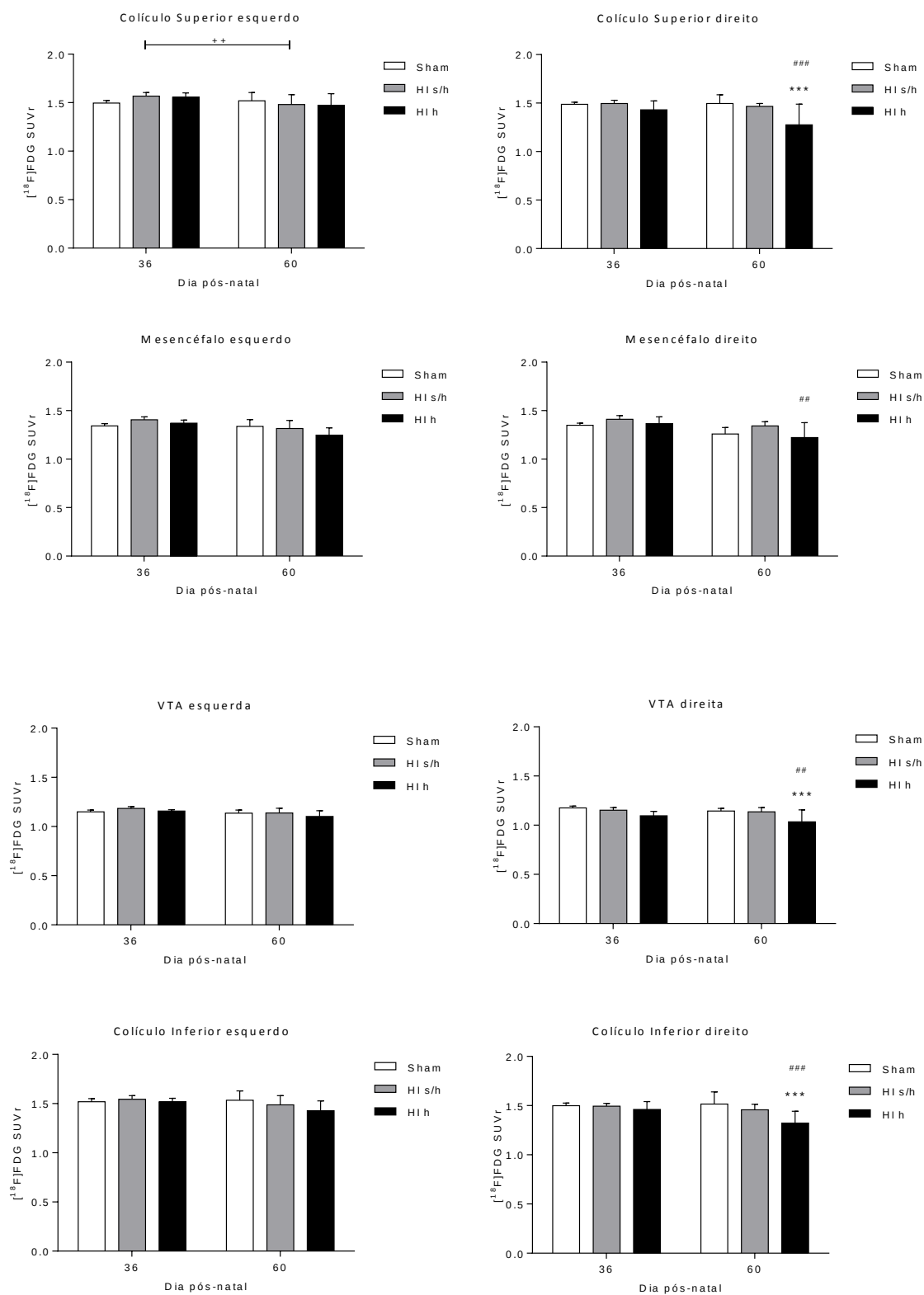


Figura 9. Metabolismo cerebral regional de glicose em animais submetidos ao modelo de HI neonatal aos 36 e 60 dias de vida por SUVR. Os gráficos mostram a média e desvio

padrão de ^{18}F -FDG SUVr dos grupos experimentais (Sham, HI s/h e HI h) para cada região avaliada nos períodos 36 e 60 dias de vida. A) Regiões subcorticais bilaterais (esquerdo e direito): núcleo accumbens, amígdala, estriado, hipocampo, hipotálamo e tálamo. B) Regiões corticais bilaterais: córtices auditório, cingulado, entorrinal, insular, motor, parietal, retrosplenial, somatossensorial, visual e olfatório. C) Regiões do tronco encefálico colículo inferior, mesencéfalo, VTA, colículo superior. Significâncias referentes à ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. Sham, ## $p < 0,01$ e $p < 0,01$ vs. HI s/h. Significâncias referentes à análise temporal dos grupos experimentais onde ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$.

Tabela 3. Valores de média $\pm$ desvio padrão do metabolismo cerebral regional de glicose por SUVr no DPN 36. E, esquerdo e D, direito.

Regiões	DPN 36								
	Média $\pm$ SEM			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 11)	HI 2 (n = 9)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR
Cérebro	1,25 $\pm$ 0,018	1,31 $\pm$ 0,027	1,24 $\pm$ 0,032	0,110	F	0,664	F	0,101	F
Hemisfério E	1,25 $\pm$ 0,017	1,32 $\pm$ 0,026	1,33 $\pm$ 0,031	0,026	F	0,030	F	0,837	F
Hemisfério D	1,28 $\pm$ 0,020	1,30 $\pm$ 0,030	1,17 $\pm$ 0,037	0,441	F	0,013	F	0,005	V
Núcleo Accumbens E	1,32 $\pm$ 0,017	1,40 $\pm$ 0,037	1,54 $\pm$ 0,065	0,054	F	0,001	V	0,063	F
Núcleo Accumbens D	1,29 $\pm$ 0,023	1,31 $\pm$ 0,031	1,24 $\pm$ 0,038	0,666	F	0,311	F	0,205	F
Amígdala E	0,96 $\pm$ 0,023	1,03 $\pm$ 0,027	1,07 $\pm$ 0,030	0,068	F	0,006	V	0,327	F
Amígdala D	0,97 $\pm$ 0,023	1,00 $\pm$ 0,025	0,87 $\pm$ 0,036	0,353	F	0,019	F	0,010	V
Estriado E	1,09 $\pm$ 0,022	1,15 $\pm$ 0,029	1,14 $\pm$ 0,039	0,137	F	0,331	F	0,830	F
Estriado D	1,49 $\pm$ 0,027	1,56 $\pm$ 0,050	1,34 $\pm$ 0,069	0,194	F	0,047	F	0,010	V
Córtex Auditório E	1,20 $\pm$ 0,016	1,13 $\pm$ 0,063	1,23 $\pm$ 0,027	0,350	F	0,507	F	0,268	F
Córtex Auditório D	1,23 $\pm$ 0,030	1,19 $\pm$ 0,020	0,71 $\pm$ 0,090	0,305	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Cingulado E	1,48 $\pm$ 0,024	1,57 $\pm$ 0,048	1,58 $\pm$ 0,088	0,069	F	0,261	F	0,970	F
Córtex Cingulado D	1,55 $\pm$ 0,048	1,51 $\pm$ 0,101	1,48 $\pm$ 0,028	0,520	F	0,994	F	0,736	F
Córtex Entorrinal E	0,94 $\pm$ 0,031	0,96 $\pm$ 0,047	0,98 $\pm$ 0,026	0,172	F	0,178	F	0,741	F
Córtex Entorrinal D	0,91 $\pm$ 0,023	0,91 $\pm$ 0,027	0,82 $\pm$ 0,037	0,835	F	0,043	F	0,037	F
Córtex Frontal E	0,85 $\pm$ 0,021	0,91 $\pm$ 0,034	0,98 $\pm$ 0,050	0,187	F	0,021	F	0,228	F
Córtex Frontal D	0,90 $\pm$ 0,030	0,95 $\pm$ 0,031	1,08 $\pm$ 0,029	0,430	F	0,073	F	0,274	F
Córtex Insular E	1,15 $\pm$ 0,031	1,15 $\pm$ 0,050	1,21 $\pm$ 0,032	0,037	F	0,154	F	0,978	F
Córtex Insular D	1,13 $\pm$ 0,031	1,15 $\pm$ 0,046	1,03 $\pm$ 0,064	0,648	F	0,202	F	0,141	F
Córtex Pré-frontal medial E	1,61 $\pm$ 0,058	1,72 $\pm$ 0,092	1,60 $\pm$ 0,034	0,053	F	0,018	F	0,343	F
Córtex Pré-frontal medial D	1,61 $\pm$ 0,060	1,65 $\pm$ 0,064	1,30 $\pm$ 0,022	0,104	F	0,049	F	0,726	F

Córtex Motor E	1,20±0,023	1,28±0,035	1,33±0,051	0,049	F	0,017	F	0,417	F
Córtex Motor D	1,23±0,026	1,30±0,037	1,23±0,074	0,177	F	0,968	F	0,438	F
Córtex Orbitofrontal E	1,26±0,027	1,33±0,053	1,35±0,037	0,100	F	0,027	F	0,240	F
Córtex Orbitofrontal D	1,26±0,026	1,36±0,064	1,37±0,032	0,068	F	0,020	F	0,186	F
Córtex Parietal E	1,40±0,032	1,38±0,046	1,38±0,046	0,061	F	0,348	F	0,623	F
Córtex Parietal D	1,39±0,030	1,44±0,049	0,94±0,091	0,410	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Retrosplenial E	1,38±0,030	1,50±0,051	1,44±0,097	0,035	F	0,510	F	0,590	F
Córtex Retrosplenial D	1,39±0,028	1,47±0,044	1,27±0,097	0,139	F	0,206	F	0,053	F
Córtex Somatossensorial E	1,32±0,020	1,44±0,029	1,41±0,036	0,001	V	0,030	F	0,556	V
Córtex Somatossensorial D	1,39±0,027	1,43±0,053	1,09±0,071	0,486	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Visual E	1,35±0,029	1,34±0,030	1,28±0,019	0,114	F	0,234	F	0,708	V
Córtex Visual D	1,34±0,029	1,36±0,037	0,90±0,084	0,731	F	0,000	V	0,000	V
Hipocampo E	1,23±0,018	1,34±0,037	1,31±0,062	0,013	F	0,248	F	0,708	F
Hipocampo D	1,24±0,021	1,27±0,030	1,02±0,055	0,479	F	0,000	V	0,000	V
Hipotálamo E	1,08±0,013	1,11±0,023	1,09±0,020	0,432	F	0,114	F	0,320	F
Hipotálamo D	1,06±0,013	1,06±0,015	1,02±0,022	0,839	F	0,143	F	0,207	F
Olfatório E	1,08±0,024	1,14±0,019	1,27±0,070	0,090	F	0,015	F	0,079	F
Olfatório D	1,09±0,019	1,12±0,062	1,17±0,030	0,432	F	0,409	F	0,642	F
Colículo Superior E	1,56±0,036	1,55±0,045	1,49±0,023	0,108	F	0,259	F	0,831	F
Colículo Superior D	1,48±0,022	1,49±0,033	1,43±0,091	0,829	F	0,548	F	0,503	F
Mesencéfalo E	1,40±0,030	1,37±0,031	1,32±0,018	0,104	F	0,477	F	0,434	F
Mesencéfalo D	1,41±0,039	1,36±0,070	1,32±0,016	0,176	F	0,823	F	0,578	F
VTA E	1,18±0,017	1,15±0,012	1,13±0,008	0,164	F	0,680	F	0,226	V
VTA D	1,17±0,018	1,15±0,027	1,09±0,046	0,476	F	0,108	F	0,295	F
Cerebelo E	1,09±0,022	1,15±0,029	1,14±0,039	0,137	F	0,331	F	0,830	F
Cerebelo D	1,09±0,022	1,15±0,029	1,14±0,039	0,137	F	0,331	F	0,830	F
Colículo Inferior E	1,54±0,037	1,51±0,036	1,50±0,025	0,620	F	0,957	F	0,612	F
Colículo Inferior D	1,49±0,026	1,49±0,029	1,46±0,079	0,890	F	0,648	F	0,699	F
Tálamo E	1,45±0,028	1,53±0,039	1,55±0,061	0,095	F	0,150	F	0,817	F
Tálamo D	1,47±0,033	1,51±0,041	1,28±0,058	0,521	F	0,004	V	0,001	V

4.4.1 *O metabolismo cerebral regional de glicose de animais HI está alterado no hemisfério ipsilateral à lesão hipóxico-isquêmica aos 60 dias de vida*

Aos 60 dias de vida, 53 dias após o insulto HI, não existem mais diferenças no metabolismo de glicose no hemisfério contralateral a lesão por HI entre os grupos experimentais para as regiões avaliadas (Figura 9).

Em contrapartida, no hemisfério direito neste mesmo período, o grupo HI h apresentou um hipometabolismo em relação aos grupos Sham e HI s/h para a maioria das regiões avaliadas, tais como: núcleo accumbens direito, amígdala direita, estriado direito, hipocampo direito, hipotálamo direito, tálamo direito, córtices auditivo direito, entorinal direito, insular direito, parietal direito, retrosplenial direito, somatosensorial direito e visual direito, cóliculo superior direito, VTA direita, cóliculo inferior direito (Figura 9). No olfatório direito o grupo HI h apresentou um hipometabolismo somente em relação ao grupo Sham e no córtex cingulado, córtex motor e no mesencéfalo somente em relação ao grupo HI s/h (Figura 9B). Não houve diferenças entre o metabolismo cerebral das regiões avaliadas entre o grupo Sham e HI s/h (Figura 9).

Temporalmente, houve um significativo aumento do metabolismo, de 36 para 60 dias de vida, no grupo Sham para as seguintes regiões: córtices entorrinal bilateralmente, frontal bilateralmente, orbitofrontal bilateralmente e insular bilateralmente e cerebelo esquerdo. Além disso, houve uma diminuição do metabolismo nos córtices parietal direito, retrosplenial bilateralmente e visual direito no grupo Sham. Para o grupo HI s/h o metabolismo diminuiu temporalmente para os córtices parietal bilateralmente, retrosplenial bilateralmente, visual direito e cóliculo superior esquerdo e aumentou no córtex frontal bilateralmente. Também houve variações no metabolismo no grupo HI h diminuindo no núcleo accumbens esquerdo, amígdala direita, estriado bilateralmente, córtices parietal bilateralmente, MPF esquerdo, somatossensorial direito e visual bilateralmente e aumentou no córtex frontal esquerdo.

Os valores de p, média e desvio padrão para as análises entre os grupos e temporais estão descritos nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Valores de média $\pm$ desvio padrão do metabolismo regional cerebral de glicose no DPN 60 por SUVr. E, esquerdo e D, direito.

60 Dias									
Regiões	Média $\pm$ SEM			Valor P					
	Sham (n = 13)	HI s/h (n = 11)	HI 2 (n = 9)	Sham vs. HI s/h	FDR	Sham vs. HI 2	FDR	HI s/h vs. HI 2	FDR

Cérebro	1,30±0,020	1,30±0,015	1,16±0,026	0,969	F	0,000	V	0,000	V
Hemisfério E	1,30±0,021	1,31±0,015	1,26±0,012	0,725	F	0,079	F	0,008	V
Hemisfério D	1,30±0,020	1,29±0,015	1,07±0,047	0,796	F	0,000	V	0,000	V
Núcleo Accumbens E	1,36±0,033	1,37±0,019	1,36±0,029	0,790	F	0,971	F	0,738	F
Núcleo Accumbens D	1,34±0,029	1,37±0,019	1,36±0,029	0,615	F	0,001	V	0,002	V
Amígdala E	0,98±0,017	1,01±0,021	1,00±0,019	0,391	F	0,507	F	0,820	F
Amígdala D	0,98±0,019	0,97±0,014	0,75±0,049	0,705	F	0,000	V	0,000	V
Estriado E	1,19±0,021	1,21±0,017	1,17±0,020	0,376	F	0,360	F	0,047	F
Estriado D	1,45±0,024	1,44±0,044	1,03±0,101	0,807	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Auditório E	1,21±0,037	1,16±0,035	1,16±0,035	0,591	F	0,127	F	0,390	F
Córtex Auditório D	1,25±0,023	1,15±0,040	0,77±0,100	0,048	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Cingulado E	1,48±0,025	1,56±0,024	1,47±0,032	0,022	F	0,706	F	0,016	F
Córtex Cingulado D	1,57±0,028	1,33±0,071	1,33±0,071	0,036	F	0,044	F	0,002	V
Córtex Entorrinal E	0,97±0,026	0,94±0,013	0,94±0,014	0,876	F	0,234	F	0,330	F
Córtex Entorrinal D	1,01±0,022	0,95±0,028	0,75±0,044	0,089	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Frontal E	1,04±0,031	1,09±0,037	1,14±0,030	0,345	F	0,027	F	0,882	F
Córtex Frontal D	1,10±0,030	1,06±0,041	1,06±0,041	0,494	F	0,698	F	0,010	V
Córtex Insular E	1,21±0,036	1,16±0,024	1,16±0,024	0,909	F	0,258	F	0,859	F
Córtex Insular D	1,25±0,024	1,19±0,038	0,92±0,073	0,245	F	0,000	V	0,098	F
Córtex Pré-frontal medial E	1,61±0,026	1,55±0,019	1,55±0,020	0,820	F	0,181	F	0,056	F
Córtex Pré-frontal medial D	1,61±0,022	1,48±0,046	1,49±0,047	0,448	F	0,097	F	0,015	F
Córtex Motor E	1,25±0,025	1,31±0,021	1,30±0,023	0,101	F	0,144	F	0,039	F
Córtex Motor D	1,29±0,027	1,33±0,025	1,13±0,069	0,324	F	0,039	F	0,000	V
Córtex Orbitofrontal E	1,39±0,028	1,38±0,023	1,38±0,023	0,474	F	0,539	F	0,859	F
Córtex Orbitofrontal D	1,39±0,027	1,31±0,035	1,31±0,035	0,663	F	0,248	F	0,098	F
Córtex Parietal E	1,31±0,026	1,24±0,019	1,25±0,020	0,767	F	0,055	F	0,039	F
Córtex Parietal D	1,29±0,024	1,28±0,036	0,77±0,091	0,859	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Retrosplenial E	1,29±0,021	1,36±0,034	1,23±0,055	0,133	F	0,307	F	0,063	F
Córtex Retrosplenial D	1,29±0,020	1,32±0,026	1,04±0,068	0,373	F	0,001	V	0,000	V
Córtex Somatossensorial E	1,36±0,027	1,37±0,022	1,34±0,017	0,747	F	0,533	F	0,270	F
Córtex Somatossensorial D	1,36±0,028	1,38±0,032	0,93±0,095	0,710	F	0,000	V	0,000	V
Córtex Visual E	1,27±0,028	1,21±0,022	1,22±0,022	0,760	F	0,020	F	0,105	F
Córtex Visual D	1,27±0,022	1,20±0,033	0,75±0,077	0,122	F	0,000	V	0,000	V
Hipocampo E	1,25±0,019	1,29±0,019	1,27±0,019	0,128	F	0,341	F	0,566	F
Hipocampo D	1,23±0,017	1,24±0,012	0,86±0,085	0,379	F	0,000	V	0,000	V
Hipotálamo E	1,08±0,008	1,05±0,011	1,06±0,011	0,452	F	0,076	F	0,080	F
Hipotálamo D	1,10±0,018	1,06±0,008	0,97±0,033	0,119	F	0,001	V	0,008	V
Olfatório E	1,16±0,026	1,17±0,023	1,17±0,019	0,912	F	0,692	F	0,767	F
Olfatório D	1,14±0,032	1,06±0,020	1,06±0,020	0,602	F	0,004	V	0,028	F
Colículo Superior E	1,48±0,031	1,47±0,032	1,47±0,032	0,657	F	0,497	F	0,833	F
Colículo Superior D	1,48±0,022	1,46±0,009	1,27±0,056	0,388	F	0,001	V	0,001	V
Mesencéfalo E	1,34±0,016	1,29±0,013	1,30±0,014	0,537	F	0,173	F	0,030	F
Mesencéfalo D	1,34±0,013	1,22±0,040	1,22±0,040	0,363	F	0,024	F	0,006	V

VTA E	1,13±0,015	1,10±0,015	1,10±0,015	0,975	F	0,040	F	0,101	F
VTA D	1,15±0,008	1,13±0,013	1,03±0,032	0,359	F	0,001	V	0,004	V
Cerebelo E	1,19±0,021	1,21±0,017	1,17±0,020	0,376	F	0,360	F	0,047	F
Cerebelo D	1,19±0,021	1,21±0,017	1,17±0,020	0,376	F	0,360	F	0,047	F
Colículo Inferior E	1,48±0,029	1,42±0,026	1,47±0,026	0,583	F	0,028	F	0,126	F
Colículo Inferior D	1,52±0,032	1,45±0,017	1,32±0,032	0,074	F	0,000	V	0,000	V
Tálamo E	1,44±0,021	1,50±0,020	1,42±0,016	0,062	F	0,384	F	0,003	V
Tálamo D	1,45±0,023	1,47±0,020	1,11±0,080	0,607	F	0,000	V	0,000	V

4.4.2 Metabolismo de glicose não está alterado nos córtices frontal, medial pré-frontal e orbitofrontal e no cerebelo de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal

O metabolismo de glicose não está alterado nos córtices frontal, medial pré-frontal e orbitofrontal, no cerebelo e no septo aos 36 ou 60 dias de animais submetidos previamente ao modelo de HI neonatal (Figura 10).

Valores de p, média e desvio padrão estão descritos nas tabelas 3 e 4.

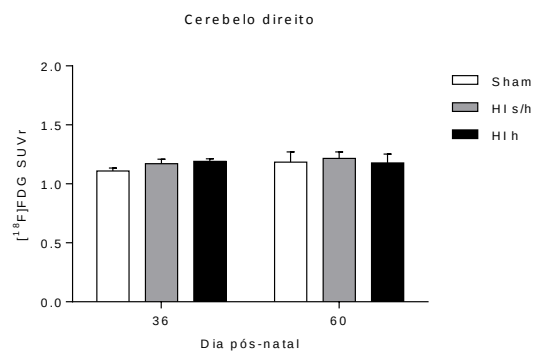
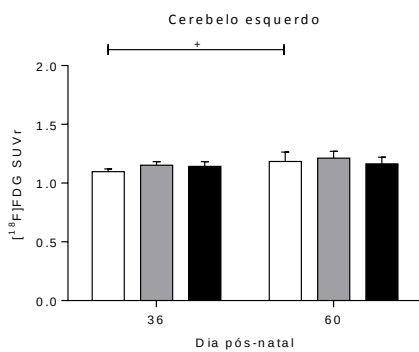
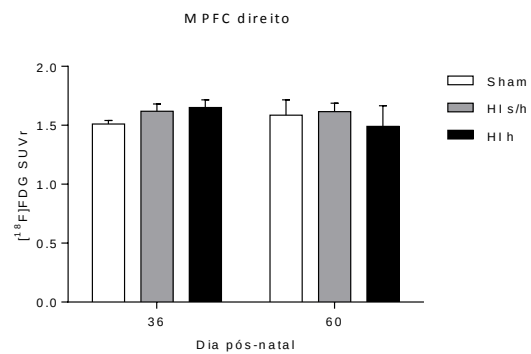
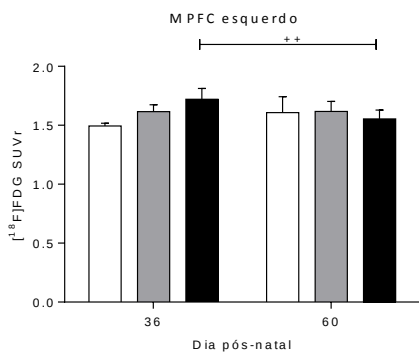
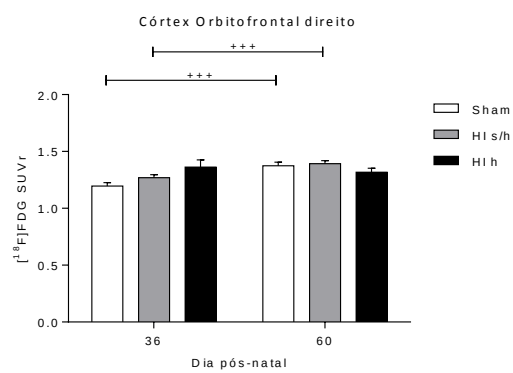
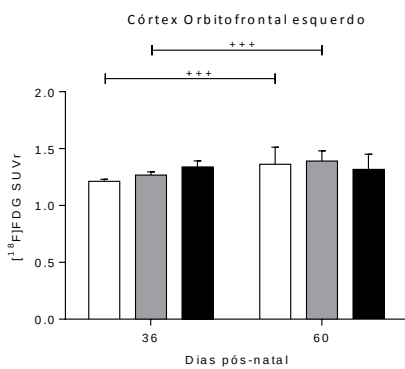
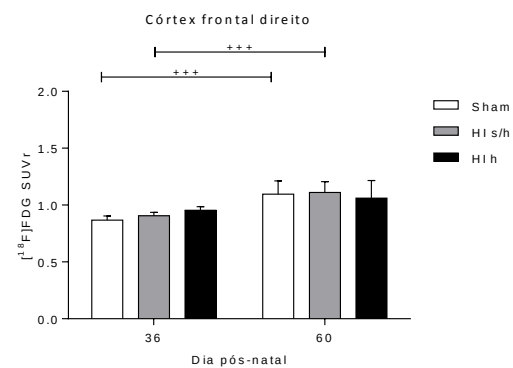
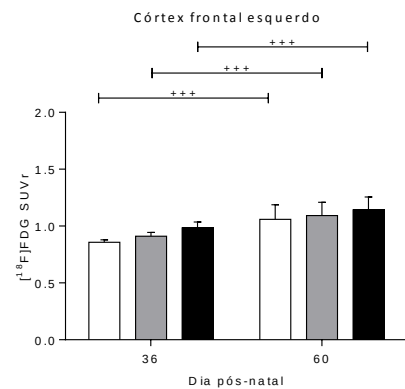


Figura 10. Regiões cerebrais em que não apresentaram alterações no metabolismo cerebral de glicose por SUVr. Córtices frontal, medial pré-frontal e orbitofrontal e cerebello.

Tabela 5. Valores de p da análise temporal do metabolismo cerebral regional de glicose por SUVr. Variação temporal do metabolismo cerebral do DPN 36 ao 60. E, esquerdo e D, direito.

Regiões	Sham		HI s/h		HI 2	
	36D vs. 60D	FDR	36D vs. 60D	FDR	36D vs. 60D	FDR
Cérebro	0,099	F	0,686	F	0,013	F
Hemisfério E	0,076	F	0,629	F	0,011	V
Hemisfério D	0,321	F	0,628	F	0,057	F
Núcleo Accumbens E	0,248	F	0,510	F	0,041	F
Núcleo Accumbens D	0,193	F	0,603	F	0,079	F
Amígdala E	0,356	F	0,334	F	0,109	F
Amígdala D	0,512	F	0,153	F	0,001	V
Estriado E	0,537	F	0,140	F	0,585	F
Estriado D	0,176	F	0,064	F	0,029	F
Córtex Auditório E	0,101	F	0,965	F	0,001	V
Córtex Auditório D	0,563	F	0,483	F	0,001	V
Córtex Cingulado E	0,830	F	0,805	F	0,001	V
Córtex Cingulado D	0,280	F	0,679	F	0,001	V
Córtex Entorrinal E	0,002	V	0,524	F	0,001	V
Córtex Entorrinal D	0,001	V	0,529	F	0,001	V
Córtex Frontal E	0,000	V	0,000	V	0,001	V
Córtex Frontal D	0,000	V	0,000	V	0,001	V
Córtex Insular E	0,000	V	0,155	F	0,001	V
Córtex Insular D	0,000	V	0,423	F	0,001	V
Córtex Pré-frontal medial E	0,005	V	0,975	F	0,001	V
Córtex Pré-frontal medial D	0,086	F	0,943	F	0,001	V
Córtex Motor E	0,033	F	0,466	F	0,001	V
Córtex Motor D	0,016	F	0,395	F	0,001	V
Córtex Orbitofrontal E	0,000	V	0,000	V	0,001	V
Córtex Orbitofrontal D	0,000	V	0,001	V	0,001	V

Córtex Parietal E	0,395	F	0,008	V	0,001	V
Córtex Parietal D	0,000	V	0,003	V	0,001	V
Córtex Retrosplenial E	0,000	V	0,000	V	0,001	V
Córtex Retrosplenial D	0,000	V	0,000	V	0,001	V
Córtex Somatossensorial E	0,205	F	0,053	F	0,001	V
Córtex Somatossensorial D	0,209	F	0,203	F	0,001	V
Córtex Visual E	0,902	F	0,023	F	0,001	V
Córtex Visual D	0,002	V	0,000	V	0,001	V
Hipocampo E	0,665	F	0,075	F	0,357	F
Hipocampo D	0,290	F	0,404	F	0,051	F
Hipotálamo E	0,274	F	0,866	F	0,044	F
Hipotálamo D	0,073	F	0,668	F	0,138	F
Olfatório E	0,021	F	0,452	F	0,178	F
Olfatório D	0,013	F	0,128	F	0,150	F
Colículo Superior E	0,910	F	0,003	F	0,079	F
Colículo Superior D	0,990	F	0,406	F	0,057	F
Mesencéfalo E	0,582	F	0,015	F	0,045	F
Mesencéfalo D	0,271	F	0,046	F	0,018	F
VTA E	0,564	F	0,062	F	0,054	F
VTA D	0,220	F	0,481	F	0,120	F
Cerebelo E	0,011	V	0,140	F	0,585	F
Cerebelo D	0,021	F	0,140	F	0,585	F
Colículo Inferior E	0,695	F	0,016	F	0,054	F
Colículo Inferior D	0,557	F	0,243	F	0,011	V
Tálamo E	0,739	F	0,290	F	0,008	V
Tálamo D	0,497	F	0,380	F	0,056	F

4.5 Rede metabólica cerebral

Outro aspecto importante deste estudo foi avaliação o metabolismo de glicose cerebral quanto à formação de uma rede metabólica cerebral. Para esta análise utilizamos os últimos dois dias de aquisição de imagens por microPET-FDG, DPNs 36 e 60.

4.5.1 Rede metabólica cerebral aos 36 dias de vida de ratos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal

No DPN 36, o grupo HI h apresentou uma rede hiposincrônica, com poucas correlações entre as regiões avaliadas, quando comparado aos grupos Sham, HI s/h e HI h (Figura 11). Diferentemente do observado quanto ao metabolismo cerebral de glicose, o grupo HI s/h também apresentou uma rede metabólica cerebral com menos conexões quando comparado ao grupo controle (Figura 11A e B).

Os valores de p para as correlações das redes metabólicas cerebrais dos grupos Sham, HI s/h e HI h para o DPN 36 estão descritos nas tabelas 5, 6 e 7 respectivamente.

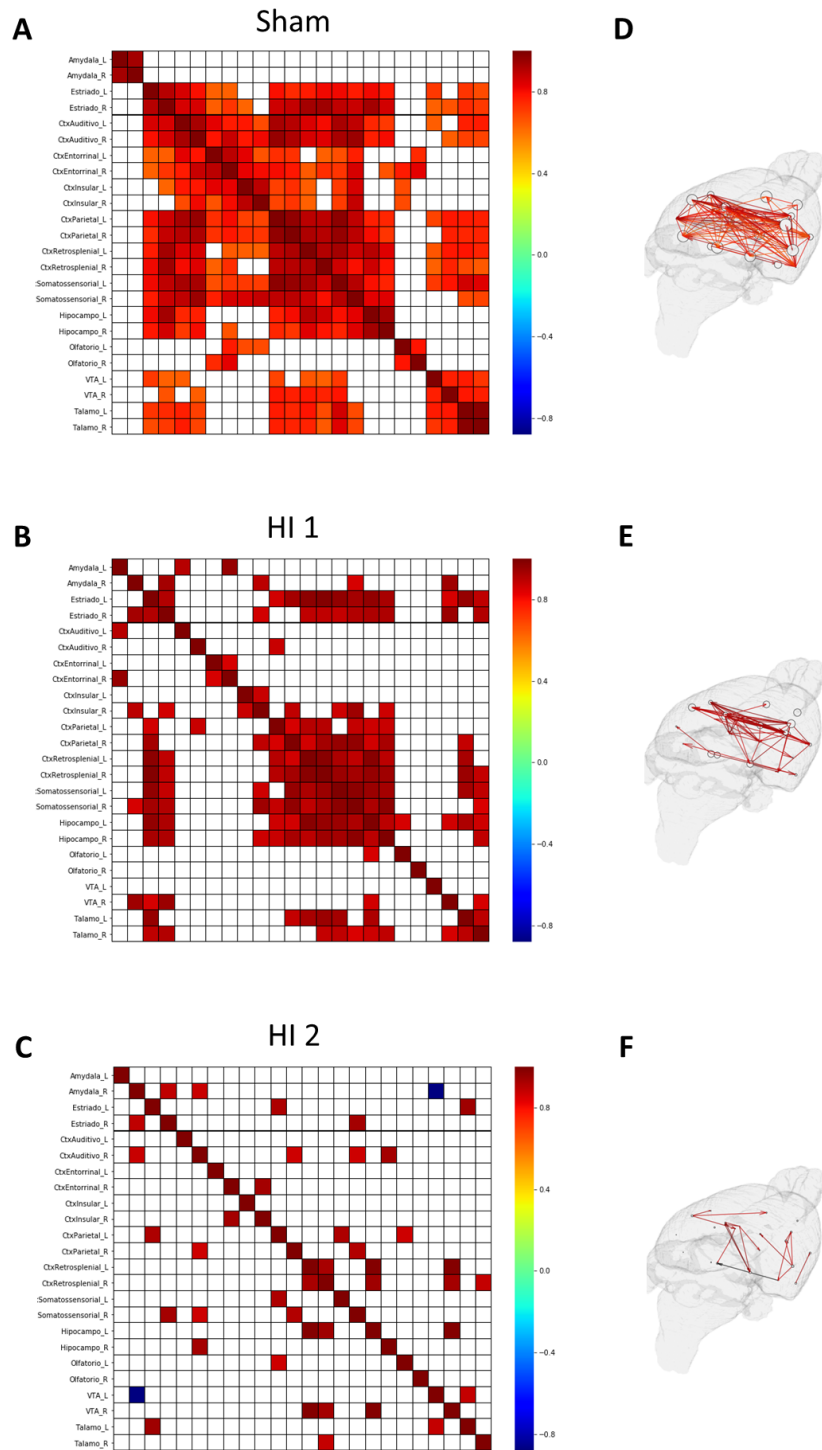


Figura 11. Representação gráfica das matrizes de correlação da rede metabólica aos 36 dias de vida. A barra de cores mostra a força das correlações. Cores mais quentes indicam correlações positivas (valores de r positivos) e cores mais frias correlações negativas (valores de r negativos), correlações não significativas ($p > 0,05$) estão

representadas em branco ($r = 0$), threshold $r = -0,8$. A) matriz de correlação do grupo Sham aos 36 dias de vida ($n = 13$), B) matriz de correlação do grupo HI s/h aos 36 dias de vida ($n = 9$) e C) matriz de correlação do grupo HI h aos 36 dias de vida. Representação em 3D da rede metabólica para os grupos D) Sham, E) HI s/h e F) HI h.

Tabela 6. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo Sham no DPN 36.

	Amig. E	Amig. D	Estr. D	Estr. E	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Entor. E	C.Entor. D	C.Ins. D	C.Ins. E	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro E	C.Retro D	C.Somato E	C.Somato D	Hip. E	Hip. D	Offt. E	Offt. D	VTA E	VTA D	Tálamo E	Tálamo D
Amig. E	0	0,000	0,470	0,394	0,339	0,140	0,114	0,058	0,294	0,192	0,202	0,227	0,395	0,303	0,370	0,156	0,251	0,124	0,394	0,091	0,586	0,715	0,713	0,740
Amig. D		0	0,525	0,394	0,278	0,153	0,073	0,062	0,207	0,136	0,227	0,197	0,395	0,333	0,394	0,128	0,215	0,148	0,511	0,192	0,727	0,751	0,766	0,938
Estr. E			0	0,000	0,002	0,007	0,046	0,046	0,119	0,210	0,007	0,012	0,009	0,005	0,005	0,009	0,005	0,008	0,344	0,252	0,019	0,135	0,017	0,029
Estr. D			0,394	0,000	0	0,002	0,045	0,018	0,048	0,066	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,002	0,172	0,174	0,046	0,036	0,013	0,019
C.Audit. E			0,339	0,278	0,002	0,002	0,003	0,008	0,008	0,029	0,000	0,000	0,002	0,006	0,000	0,001	0,011	0,018	0,207	0,120	0,044	0,051	0,009	0,008
C.Audit. D			0,140	0,153	0,007	0,002	0	0,008	0,001	0,008	0,005	0,000	0,002	0,003	0,000	0,000	0,010	0,006	0,075	0,056	0,085	0,043	0,024	0,025
C.Entor. E			0,114	0,073	0,045	0,003	0,008	0	0,003	0,035	0,015	0,017	0,066	0,046	0,033	0,009	0,094	0,092	0,069	0,013	0,324	0,258	0,304	0,227
C.Entor. D			0,058	0,062	0,046	0,018	0,008	0,001	0,000	0,006	0,006	0,008	0,040	0,015	0,017	0,002	0,057	0,035	0,008	0,003	0,376	0,172	0,280	0,237
C.Ins. E			0,294	0,207	0,119	0,048	0,008	0,003	0	0,001	0,024	0,015	0,043	0,103	0,018	0,002	0,114	0,121	0,030	0,051	0,418	0,186	0,159	0,119
C.Ins. D			0,192	0,136	0,210	0,066	0,029	0,005	0,006	0,024	0,024	0,017	0,047	0,119	0,020	0,001	0,103	0,062	0,029	0,092	0,586	0,186	0,158	0,113
C.Parie. E			0,202	0,227	0,007	0,001	0,000	0,000	0,006	0,024	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,010	0,012	0,115	0,058	0,024	0,008	0,008	0,010
C.Parie. D			0,227	0,197	0,012	0,001	0,000	0,000	0,008	0,015	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,017	0,147	0,084	0,050	0,009	0,012	0,011
C.Retro E			0,395	0,395	0,009	0,000	0,002	0,066	0,040	0,043	0,047	0,000	0	0,000	0,000	0,001	0,000	0,003	0,211	0,195	0,038	0,008	0,008	0,010
C.Retro D			0,303	0,333	0,005	0,000	0,046	0,015	0,103	0,119	0,000	0,000	0,001	0	0,001	0,007	0,001	0,007	0,137	0,103	0,047	0,010	0,029	0,040
C.Somato E			0,370	0,394	0,005	0,001	0,000	0,033	0,017	0,018	0,020	0,000	0,000	0,001	0	0,000	0,007	0,010	0,141	0,111	0,018	0,008	0,002	0,003
C.Somato D			0,156	0,128	0,009	0,001	0,000	0,009	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,007	0,000	0	0,003	0,403	0,073	0,084	0,128	0,071	0,030	0,025
Hip. E			0,251	0,215	0,005	0,000	0,011	0,010	0,094	0,057	0,114	0,103	0,006	0,001	0,007	0,003	0	0,000	0,403	0,321	0,109	0,106	0,055	0,066
Hip. D			0,124	0,148	0,008	0,002	0,018	0,006	0,092	0,035	0,012	0,017	0,003	0,007	0,010	0,003	0,000	0	0,278	0,223	0,153	0,173	0,104	0,125
Offt. E			0,394	0,511	0,344	0,172	0,207	0,075	0,069	0,008	0,030	0,115	0,147	0,211	0,137	0,141	0,073	0,403	0,278	0	0,007	0,607	0,139	0,441
Offt. D			0,091	0,192	0,252	0,174	0,120	0,056	0,013	0,003	0,051	0,092	0,195	0,103	0,111	0,084	0,321	0,223	0,007	0	0,579	0,291	0,725	0,706
VTA E			0,586	0,727	0,019	0,046	0,044	0,085	0,324	0,376	0,418	0,586	0,038	0,047	0,018	0,128	0,109	0,153	0,607	0,579	0	0,009	0,008	0,017
VTA D			0,715	0,751	0,135	0,036	0,051	0,043	0,258	0,172	0,186	0,186	0,008	0,010	0,008	0,071	0,106	0,173	0,139	0,291	0,009	0	0,008	0,009
Tálamo E			0,713	0,766	0,017	0,013	0,009	0,024	0,304	0,280	0,159	0,158	0,008	0,012	0,002	0,030	0,055	0,104	0,441	0,725	0,008	0,008	0	0,000
Tálamo D			0,740	0,938	0,029	0,019	0,008	0,025	0,227	0,237	0,119	0,113	0,010	0,011	0,003	0,025	0,066	0,125	0,390	0,706	0,017	0,009	0,000	0

Tabela 7. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo HI s/h no DPN 36.

	Amig. E	Amig. D	Estr. E	Estr. D	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Entor. E	C.Entor. D	C.Ins. E	C.Ins. D	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro. E	C.Retro. D	C.Somato. E	C.Somato. D	Hip. E	Hip. D	Ofit. E	Ofit. D	VTA. E	VTA. D	Tálamo. E	Tálamo. D
Amig. E	0,000																							
Amig. D	0,092	0,000	0,137	0,130	0,027	0,170	0,051	0,007	0,245	0,137	0,192	0,150	0,189	0,170	0,252	0,177	0,232	0,189	0,620	0,903	0,095	0,116	0,262	0,314
Estr. E	0,137	0,051	0,000	0,015	0,263	0,170	0,233	0,088	0,177	0,027	0,182	0,085	0,091	0,091	0,062	0,047	0,053	0,084	0,241	0,559	0,263	0,013	0,116	0,088
Estr. D	0,130	0,015	0,021	0,000	0,325	0,182	0,412	0,107	0,233	0,043	0,103	0,056	0,033	0,032	0,034	0,023	0,020	0,019	0,092	0,302	0,283	0,009	0,064	0,024
C.Audit. E	0,027	0,263	0,241	0,325	0,000	0,137	0,095	0,064	0,567	0,412	0,269	0,315	0,257	0,267	0,430	0,404	0,333	0,423	0,757	0,980	0,115	0,244	0,325	0,562
C.Audit. D	0,170	0,170	0,083	0,182	0,137	0,000	0,182	0,115	0,357	0,170	0,037	0,119	0,055	0,087	0,111	0,115	0,067	0,176	0,266	0,851	0,679	0,219	0,137	0,357
C.Entor. E	0,051	0,233	0,372	0,412	0,095	0,182	0,000	0,046	0,174	0,177	0,303	0,263	0,470	0,423	0,430	0,314	0,484	0,430	0,850	0,430	0,406	0,423	0,577	0,799
C.Entor. D	0,007	0,088	0,125	0,107	0,064	0,115	0,046	0,000	0,187	0,085	0,103	0,119	0,153	0,136	0,198	0,114	0,177	0,125	0,487	0,980	0,233	0,133	0,276	0,317
C.Ins. E	0,245	0,177	0,199	0,233	0,567	0,357	0,174	0,187	0,000	0,037	0,238	0,051	0,333	0,219	0,125	0,084	0,293	0,130	0,804	0,896	0,719	0,390	0,276	0,274
C.Ins. D	0,137	0,027	0,070	0,043	0,412	0,170	0,177	0,085	0,037	0,000	0,108	0,033	0,121	0,091	0,043	0,014	0,086	0,043	0,323	0,739	0,558	0,109	0,159	0,125
C.Parie. E	0,192	0,182	0,043	0,103	0,269	0,037	0,303	0,103	0,238	0,108	0,000	0,049	0,027	0,027	0,051	0,035	0,043	0,037	0,147	0,560	0,728	0,218	0,103	0,185
C.Parie. D	0,150	0,085	0,015	0,056	0,315	0,119	0,263	0,119	0,051	0,033	0,049	0,000	0,045	0,015	0,008	0,006	0,045	0,016	0,275	0,379	0,470	0,134	0,084	0,064
C.Retro. E	0,189	0,091	0,004	0,033	0,257	0,055	0,470	0,153	0,333	0,121	0,027	0,045	0,000	0,002	0,019	0,032	0,002	0,028	0,055	0,244	0,430	0,062	0,017	0,051
C.Retro. D	0,170	0,091	0,000	0,032	0,267	0,087	0,423	0,136	0,219	0,091	0,027	0,015	0,002	0,000	0,009	0,015	0,008	0,011	0,103	0,226	0,406	0,081	0,009	0,035
C.Somato. E	0,252	0,062	0,006	0,034	0,430	0,111	0,430	0,198	0,125	0,043	0,051	0,008	0,019	0,009	0,000	0,004	0,009	0,015	0,127	0,267	0,570	0,091	0,015	0,033
C.Somato. D	0,177	0,047	0,015	0,023	0,404	0,115	0,314	0,114	0,084	0,014	0,035	0,006	0,032	0,015	0,004	0,000	0,020	0,004	0,153	0,406	0,561	0,091	0,050	0,050
Hip. E	0,232	0,053	0,005	0,020	0,333	0,067	0,484	0,177	0,293	0,086	0,043	0,045	0,002	0,008	0,009	0,020	0,000	0,028	0,049	0,263	0,498	0,045	0,020	0,043
Hip. D	0,189	0,084	0,018	0,019	0,423	0,176	0,430	0,125	0,130	0,043	0,037	0,016	0,028	0,011	0,015	0,004	0,028	0,000	0,115	0,276	0,481	0,091	0,051	0,032
Ofit. E	0,620	0,241	0,116	0,092	0,757	0,266	0,850	0,487	0,804	0,323	0,147	0,275	0,055	0,103	0,127	0,153	0,049	0,115	0,000	0,178	0,791	0,131	0,134	0,095
Ofit. D	0,903	0,559	0,244	0,302	0,980	0,851	0,430	0,980	0,896	0,739	0,560	0,379	0,244	0,226	0,267	0,406	0,263	0,276	0,178	0,000	0,481	0,314	0,125	0,084
VTA. E	0,095	0,263	0,342	0,283	0,115	0,679	0,406	0,233	0,719	0,558	0,728	0,470	0,430	0,406	0,570	0,561	0,498	0,481	0,791	0,481	0,000	0,162	0,372	0,329
VTA. D	0,116	0,013	0,046	0,009	0,244	0,219	0,423	0,133	0,390	0,109	0,218	0,134	0,062	0,081	0,091	0,091	0,045	0,091	0,131	0,314	0,162	0,000	0,088	0,049
Tálamo. E	0,262	0,116	0,006	0,064	0,325	0,137	0,577	0,276	0,276	0,125	0,103	0,034	0,017	0,009	0,015	0,050	0,020	0,051	0,134	0,125	0,372	0,088	0,000	0,027
Tálamo. D	0,314	0,088	0,032	0,024	0,562	0,357	0,799	0,317	0,274	0,125	0,185	0,064	0,051	0,035	0,033	0,050	0,043	0,032	0,095	0,084	0,329	0,049	0,027	0,000

Tabela 8. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo HI h no DPN 36.

	Amig. E	Amig. D	Estr. E	Estr. D	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Entor. E	C.Entor. D	C.Ins. E	C.Ins. D	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro E	C.Retro D	C.Somato E	C.Somato D	Hip. E	Hip. D	Ofit. E	Ofit. D	VTA E	VTA D	Tálamo E	Tálamo D
Amig. E	0.000																							
Amig. D	0.925	0.000	0.644	0.531	0.553	0.905	0.081	0.375	0.303	0.484	0.419	0.308	0.274	0.364	0.257	0.372	0.462	0.395	0.189	0.736	0.838	0.303	0.978	0.197
Estr. E	0.644	0.274	0.000	0.362	0.508	0.613	0.993	0.746	0.797	0.471	0.013	0.978	0.344	0.609	0.978	0.595	0.096	0.654	0.232	0.265	0.038	0.613	0.210	0.699
Estr. D	0.531	0.028	0.362	0.000	0.532	0.096	0.978	0.613	0.746	0.428	0.303	0.152	0.978	0.664	0.664	0.542	0.009	0.993	0.101	0.069	0.069	0.408	0.008	0.925
C.Audit. E	0.553	0.287	0.508	0.532	0.000	0.664	0.152	0.160	0.274	0.081	0.746	0.978	0.122	0.269	0.959	0.959	0.838	0.128	0.746	0.408	0.286	0.095	0.312	0.613
C.Audit. D	0.905	0.042	0.613	0.096	0.664	0.000	0.757	0.223	0.595	0.223	0.664	0.042	0.925	0.752	0.769	0.769	0.042	0.934	0.508	0.680	0.257	0.917	0.508	0.531
C.Entor. E	0.081	0.654	0.993	0.978	0.152	0.757	0.000	0.054	0.081	0.122	0.805	0.924	0.217	0.232	0.595	0.824	0.873	0.209	0.838	0.627	0.978	0.699	0.146	0.699
C.Entor. D	0.375	0.214	0.746	0.613	0.160	0.223	0.054	0.000	0.122	0.009	0.978	0.647	0.302	0.508	0.824	0.824	0.664	0.278	0.978	0.822	0.408	0.232	0.475	0.699
C.Ins. E	0.303	0.482	0.797	0.746	0.274	0.595	0.081	0.122	0.000	0.214	0.756	0.746	0.685	0.792	0.414	0.414	0.780	0.699	0.792	0.925	0.746	0.613	0.993	0.883
C.Ins. D	0.484	0.094	0.471	0.428	0.081	0.223	0.122	0.009	0.214	0.000	0.699	0.709	0.152	0.408	0.952	0.952	0.613	0.162	0.223	0.757	0.447	0.197	0.131	0.226
C.Parie. E	0.419	0.308	0.013	0.303	0.746	0.664	0.805	0.978	0.756	0.699	0.000	0.934	0.664	0.925	0.013	0.013	0.528	0.699	0.042	0.122	0.081	0.713	0.092	0.884
C.Parie. D	0.664	0.274	0.978	0.152	0.978	0.042	0.924	0.647	0.746	0.709	0.934	0.000	0.583	0.246	0.978	0.978	0.017	0.566	0.101	0.654	0.993	0.644	0.613	0.168
C.Retro E	0.364	0.609	0.344	0.978	0.122	0.925	0.217	0.302	0.685	0.152	0.664	0.583	0.000	0.011	0.797	0.797	0.746	0.000	0.812	0.925	0.319	0.428	0.000	0.160
C.Retro D	0.257	0.978	0.632	0.664	0.269	0.752	0.232	0.508	0.792	0.408	0.925	0.246	0.797	0.993	0.993	0.000	0.352	0.007	0.838	0.800	0.657	0.792	0.009	0.408
C.Somato	0.372	0.595	0.069	0.542	0.959	0.769	0.595	0.824	0.414	0.952	0.013	0.978	0.797	0.993	0.000	0.664	0.664	0.838	0.792	0.152	0.260	0.233	0.881	0.914
C.Somato E	0.462	0.096	0.644	0.009	0.838	0.042	0.873	0.664	0.780	0.613	0.528	0.017	0.746	0.352	0.664	0.664	0.000	0.713	0.092	0.232	0.654	0.278	0.746	0.696
C.Somato D	0.395	0.654	0.353	0.993	0.128	0.934	0.209	0.278	0.699	0.162	0.699	0.566	0.000	0.007	0.838	0.838	0.713	0.000	0.860	0.959	0.408	0.482	0.000	0.170
Hip. E	0.952	0.054	0.613	0.102	0.613	0.009	0.838	0.303	0.680	0.223	0.699	0.101	0.812	0.838	0.792	0.792	0.092	0.860	0.000	0.475	0.478	0.313	0.838	0.506
Hip. D	0.189	0.232	0.101	0.101	0.746	0.508	0.627	0.978	0.792	0.757	0.042	0.654	0.925	0.800	0.152	0.152	0.232	0.959	0.475	0.000	0.092	0.162	0.978	0.285
Ofit. E	0.736	0.265	0.069	0.319	0.408	0.680	0.978	0.822	0.925	0.447	0.122	0.993	0.319	0.657	0.260	0.260	0.654	0.408	0.232	0.092	0.000	0.197	0.447	0.131
Ofit. D	0.189	0.232	0.101	0.101	0.746	0.508	0.627	0.978	0.792	0.757	0.042	0.654	0.925	0.800	0.152	0.152	0.232	0.959	0.475	0.000	0.092	0.162	0.978	0.285
VTA E	0.838	0.038	0.069	0.102	0.286	0.257	0.699	0.408	0.746	0.197	0.081	0.644	0.428	0.792	0.233	0.233	0.278	0.482	0.162	0.197	0.000	0.428	0.036	0.978
VTA D	0.303	0.613	0.408	0.978	0.095	0.917	0.146	0.232	0.613	0.131	0.713	0.613	0.000	0.009	0.881	0.881	0.746	0.000	0.838	0.447	0.428	0.000	0.175	0.152
Tálamo E	0.978	0.210	0.008	0.414	0.312	0.508	0.699	0.475	0.993	0.226	0.092	0.978	0.160	0.408	0.160	0.160	0.696	0.170	0.285	0.131	0.036	0.175	0.000	0.699
Tálamo D	0.197	0.699	0.925	0.313	0.613	0.531	0.274	0.699	0.883	0.738	0.884	0.168	0.197	0.034	0.914	0.914	0.152	0.152	0.428	0.925	0.978	0.152	0.699	0.000

4.5.2 Rede metabólica cerebral aos 60 dias de vida de ratos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal

Aos 60 dias de vida, 53 dias após a indução do modelo de HI, o grupo Sham permaneceu apresentando uma rede metabólica hipersincrônica, com mais associações entre as regiões avaliadas quando comparado aos grupos HI s/h e HI h (Figura 12), e um visível aumento de interações entre as regiões de 36 para 60 dias de vida (Figura 11A). O grupo HI s/h apresentou uma diminuição das conexões de 36 para os 60 dias de vida (Figura 11B e 12B). No entanto, os animais do grupo HI h apresentaram um aumento das correlações do DNP 36 ao 60 (Figura 11C e 12C). Este aumento de correlações positivas pontuais se deu com regiões do hemisfério direito devido a diminuição acentuada do metabolismo de FDG nessas regiões em conjunto e um consequente aumento de correlações negativas com regiões do hemisfério esquerdo que não apresentaram alterações metabólicas (Figura 12C).

Os valores p para as correlações das redes metabólicas cerebrais dos grupos Sham, HI s/h e HI h para o DPN 60 estão descritos nas tabelas 8, 9 e 10 respectivamente.

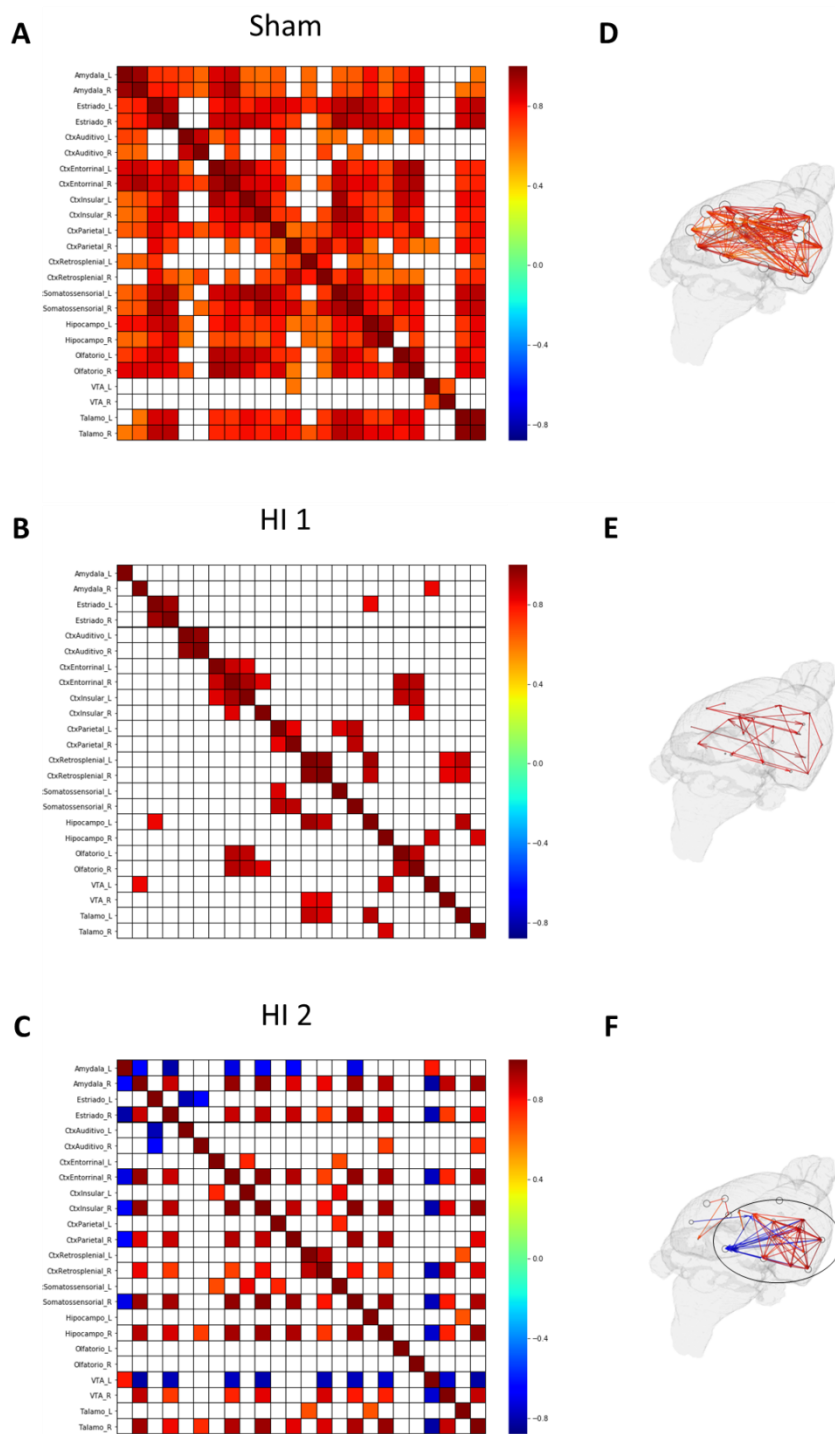


Figura 12. Representação gráfica das matrizes de correlação da rede metabólica aos 60 dias de vida. A barra de cores mostra a força das correlações. Cores mais quentes indicam correlações positivas (valores de r positivos) e cores mais frias correlações negativas (valores de r negativos), correlações não significativas ($p > 0,05$) estão representadas em branco ($r = 0$), threshold $r = -0,8$. A) matriz de correlação do grupo Sham

aos 60 dias de vida, B) matriz de correlação do grupo HI s/h aos 60 dias de vida e C) matriz de correlação do grupo HI h aos 60 dias de vida. Representação em 3D da rede metabólica para os grupos D) Sham, E) HI s/h e F) HI h.

Tabela 9. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo Sham no DPN 60.

Amig. E	Amig. D	Estr. E	Estr. D	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Entor. E	C.Entor. D	C.Ins. E	C.Ins. D	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro. E	C.Retro. D	C.Somato. E	C.Somato. D	Hip. E	Hip. D	Offr. E	Offr. D	VTA. E	VTA. D	Tálamo. E	Tálamo. D
Amig. E	0	0,000	0,009	0,011	0,014	0,033	0,001	0,000	0,034	0,027	0,133	0,036	0,076	0,031	0,027	0,003	0,034	0,013	0,002	0,945	0,446	0,069	0,048
Amig. D	0,009	0,005	0	0,004	0,017	0,034	0,001	0,000	0,021	0,018	0,083	0,030	0,075	0,016	0,021	0,003	0,004	0,001	0,001	0,907	0,573	0,044	0,029
Estr. E	0,009	0,005	0	0,000	0,053	0,063	0,003	0,001	0,007	0,001	0,002	0,009	0,002	0,000	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,277	0,608	0,001	0,000
Estr. D	0,011	0,004	0,000	0	0,067	0,081	0,001	0,000	0,000	0,005	0,013	0,069	0,023	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002	0,002	0,229	0,757	0,001	0,000
C.Audit. E	0,014	0,017	0,053	0,067	0	0,000	0,029	0,007	0,086	0,005	0,290	0,081	0,047	0,040	0,052	0,032	0,048	0,118	0,023	0,873	0,378	0,290	0,118
C.Audit. D	0,033	0,034	0,063	0,081	0,000	0	0,100	0,015	0,218	0,024	0,092	0,054	0,014	0,060	0,034	0,073	0,100	0,201	0,089	0,563	0,378	0,331	0,172
C.Entor. E	0,001	0,001	0,003	0,001	0,029	0,100	0	0,000	0,000	0,007	0,079	0,190	0,091	0,001	0,008	0,004	0,019	0,000	0,000	0,288	0,669	0,007	0,006
C.Entor. D	0,000	0,000	0,001	0,000	0,007	0,015	0,000	0,001	0,001	0,002	0,031	0,056	0,025	0,000	0,002	0,002	0,015	0,000	0,000	0,405	0,775	0,009	0,005
C.Ins. E	0,034	0,021	0,007	0,000	0,086	0,218	0,000	0	0,000	0,009	0,068	0,446	0,095	0,000	0,005	0,012	0,021	0,000	0,001	0,086	0,888	0,002	0,003
C.Ins. D	0,040	0,029	0,002	0,001	0,068	0,073	0,002	0,001	0,000	0	0,040	0,298	0,016	0,000	0,000	0,008	0,034	0,001	0,005	0,058	0,875	0,004	0,005
C.Parie. E	0,027	0,018	0,001	0,005	0,005	0,024	0,007	0,002	0,009	0,009	0	0,023	0,014	0,001	0,002	0,003	0,005	0,008	0,001	0,573	0,269	0,012	0,002
C.Parie. D	0,113	0,083	0,002	0,013	0,290	0,092	0,079	0,031	0,088	0,011	0	0,015	0,004	0,008	0,001	0,044	0,060	0,030	0,048	0,044	0,321	0,003	0,005
C.Retro. E	0,036	0,030	0,009	0,069	0,081	0,054	0,190	0,056	0,446	0,023	0,015	0,004	0	0,110	0,033	0,026	0,036	0,118	0,054	0,884	0,379	0,054	0,023
C.Retro. D	0,076	0,075	0,002	0,023	0,047	0,014	0,091	0,025	0,095	0,016	0,000	0,004	0,004	0,101	0,000	0,001	0,038	0,048	0,031	0,044	0,117	0,883	0,011
C.Somato. E	0,031	0,016	0,000	0,000	0,040	0,060	0,001	0,000	0,000	0,001	0,008	0,033	0,001	0	0,000	0,002	0,004	0,000	0,001	0,097	0,884	0,000	0,000
C.Somato. D	0,027	0,021	0,000	0,000	0,052	0,034	0,004	0,002	0,005	0,000	0,001	0,033	0,001	0,000	0,002	0	0,002	0,003	0,002	0,095	0,976	0,001	0,000
Hip. E	0,003	0,003	0,001	0,000	0,032	0,073	0,004	0,002	0,012	0,008	0,044	0,026	0,038	0,002	0,002	0	0,002	0,014	0,002	0,875	0,291	0,001	0,000
Hip. D	0,034	0,034	0,005	0,001	0,048	0,100	0,019	0,015	0,218	0,005	0,060	0,036	0,048	0,004	0,013	0,000	0	0,060	0,015	0,800	0,291	0,013	0,002
Offr. E	0,013	0,004	0,001	0,002	0,118	0,201	0,000	0,000	0,000	0,001	0,008	0,118	0,031	0,000	0,002	0,014	0,060	0	0,000	0,121	0,941	0,001	0,003
Offr. D	0,002	0,001	0,001	0,002	0,023	0,089	0,000	0,000	0,001	0,005	0,048	0,054	0,044	0,001	0,003	0,002	0,015	0,000	0	0,415	0,563	0,002	0,001
VTA. E	0,945	0,907	0,277	0,229	0,873	0,563	0,288	0,405	0,086	0,573	0,044	0,884	0,117	0,097	0,095	0,975	0,800	0,121	0,415	0	0,021	0,084	0,199
VTA. D	0,446	0,573	0,608	0,757	0,373	0,978	0,669	0,775	0,898	0,975	0,269	0,321	0,579	0,884	0,976	0,269	0,291	0,941	0,563	0,021	0	0,842	0,841
Tálamo. E	0,069	0,044	0,001	0,001	0,290	0,331	0,007	0,009	0,002	0,004	0,012	0,063	0,054	0,000	0,001	0,009	0,013	0,001	0,002	0,084	0,842	0	0,000
Tálamo. D	0,048	0,029	0,000	0,000	0,118	0,172	0,006	0,005	0,003	0,002	0,005	0,023	0,007	0,000	0,000	0,002	0,002	0,003	0,001	0,199	0,841	0,000	0

Tabela 10. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo HI s/h no DPN 60.

	Amig. E	Amig. D	Estr. E	Estr. D	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Éntor. E	C.Éntor. D	C.Ins. E	C.Ins. D	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro. E	C.Retro. D	C.Somato. E	C.Somato. D	Hip. E	Hip. D	Ofit. E	Ofit. D	VTA E	VTAD	Tálamo E	Tálamo D
Amig. E	0	0,206	0,550	0,570	0,288	0,311	0,617	0,905	0,799	0,693	0,204	0,204	0,101	0,128	0,431	0,102	0,105	0,146	0,676	0,747	0,208	0,140	0,150	0,204
Amig. D	0,206	0	0,860	0,766	0,250	0,207	0,444	0,249	0,550	0,104	0,436	0,550	0,409	0,491	0,625	0,339	0,575	0,094	0,448	0,304	0,047	0,254	0,459	0,287
Estr. E	0,550	0,860	0	0,002	0	0,411	0,799	0,726	0,854	0,799	0,329	0,566	0,119	0,204	0,431	0,293	0,047	0,443	0,617	0,673	0,330	0,456	0,651	0,339
Estr. D	0,570	0,766	0,002	0	0,352	0,436	0,979	0,979	0,895	0,625	0,276	0,489	0,156	0,249	0,409	0,260	0,097	0,301	0,753	0,947	0,287	0,540	0,118	0,205
C.Audit. E	0,288	0,250	0,550	0,288	0	0,000	0,204	0,279	0,579	0,443	0,279	0,489	0,197	0,575	0,617	0,283	0,995	0,414	0,542	0,579	0,335	0,570	0,826	0,606
C.Audit. D	0,311	0,411	0,002	0	0,339	0,436	0,979	0,979	0,895	0,625	0,279	0,489	0,197	0,575	0,617	0,283	0,995	0,414	0,542	0,579	0,335	0,570	0,826	0,606
C.Éntor. E	0,617	0,444	0,799	0,799	0,204	0,339	0	0,018	0,037	0,249	0,431	0,279	0,860	0,923	0,137	0,389	0,753	0,279	0,126	0,204	0,308	0,741	0,947	0,491
C.Éntor. D	0,905	0,249	0,726	0,799	0,279	0,339	0,339	0,018	0	0,037	0,431	0,279	0,860	0,923	0,137	0,389	0,753	0,279	0,126	0,204	0,308	0,741	0,947	0,491
C.Ins. E	0,799	0,550	0,854	0,895	0,579	0,725	0,037	0,005	0	0,104	0,753	0,726	0,549	0,542	0,301	0,719	0,489	0,456	0,013	0,013	0,451	0,498	0,801	0,570
C.Ins. D	0,693	0,104	0,799	0,625	0,443	0,448	0,249	0,038	0,104	0	0,530	0,610	0,753	0,842	0,370	0,375	0,935	0,140	0,104	0,038	0,105	0,606	0,575	0,204
C.Parie. E	0,204	0,436	0,339	0,276	0,339	0,550	0,431	0,617	0,753	0,530	0	0,044	0,094	0,094	0,094	0,012	0,180	0,249	0,947	0,988	0,069	0,443	0,105	0,324
C.Parie. D	0,204	0,550	0,566	0,489	0,197	0,311	0,279	0,550	0,726	0,610	0,044	0,206	0,206	0,108	0,104	0,012	0,308	0,180	0,993	0,977	0,196	0,412	0,249	0,249
C.Retro. E	0,128	0,491	0,119	0,196	0,673	0,725	0,923	0,753	0,549	0,753	0,094	0,206	0	0,000	0,566	0,069	0,002	0,249	0,444	0,550	0,172	0,044	0,015	0,234
C.Retro. D	0,128	0,491	0,119	0,196	0,673	0,725	0,923	0,753	0,549	0,753	0,094	0,206	0	0,000	0,566	0,069	0,002	0,249	0,444	0,550	0,172	0,044	0,015	0,234
C.Somato. E	0,431	0,625	0,431	0,409	0,378	0,617	0,137	0,334	0,301	0,370	0,036	0,104	0,456	0,454	0	0,054	0,498	0,301	0,549	0,652	0,204	0,920	0,301	0,301
C.Somato. D	0,102	0,339	0,293	0,260	0,283	0,429	0,389	0,555	0,719	0,375	0,012	0,012	0,069	0,054	0,054	0	0,122	0,090	0,999	0,935	0,069	0,249	0,069	0,065
Hip. E	0,146	0,575	0,047	0,097	0,995	0,947	0,753	0,579	0,489	0,935	0,180	0,308	0,002	0,013	0,098	0,122	0	0,284	0,315	0,435	0,287	0,104	0,011	0,204
Hip. D	0,146	0,575	0,047	0,097	0,995	0,947	0,753	0,579	0,489	0,935	0,180	0,308	0,002	0,013	0,098	0,122	0	0,284	0,315	0,435	0,287	0,104	0,011	0,204
Ofit. E	0,676	0,448	0,617	0,753	0,542	0,579	0,126	0,011	0,013	0,104	0,947	0,993	0,444	0,435	0,419	0,999	0,315	0,579	0	0,013	0,489	0,017	0,204	0,031
Ofit. D	0,747	0,304	0,673	0,947	0,579	0,586	0,104	0,010	0,013	0,038	0,988	0,977	0,550	0,502	0,652	0,935	0,435	0,489	0,013	0	0,444	0,709	0,721	0,920
VTA E	0,208	0,447	0,330	0,287	0,335	0,436	0,108	0,250	0,451	0,105	0,069	0,196	0,172	0,204	0,204	0,069	0,287	0,017	0,489	0,444	0	0,260	0,136	0,165
VTA D	0,140	0,254	0,456	0,540	0,570	0,456	0,741	0,860	0,498	0,606	0,443	0,412	0,044	0,044	0,020	0,249	0,104	0,204	0,570	0,709	0,260	0	0,097	0,234
Tálamo E	0,150	0,459	0,051	0,118	0,626	0,923	0,947	0,947	0,801	0,575	0,105	0,249	0,015	0,033	0,301	0,069	0,011	0,147	0,721	0,673	0,136	0,097	0	0,160
Tálamo D	0,204	0,287	0,339	0,205	0,606	0,625	0,491	0,489	0,570	0,204	0,324	0,249	0,234	0,250	0,301	0,065	0,204	0,031	0,920	0,610	0,165	0,234	0,160	0

Tabela 11. Valores de p para as correlações da rede metabólica cerebral do grupo HI h no DPN 60.

Amlig. E	Amlig. D	Estr. E	Estr. D	C.Audit. E	C.Audit. D	C.Entor. E	C.Entor. D	C.lins. E	C.lins. D	C.Parie. E	C.Parie. D	C.Retro. E	C.Retro. D	C.Somato. E	C.Somato. D	Hip. E	Hip. D	Ofit. E	Ofit. D	VTA. E	VTA. D	Tálamo E	Tálamo D
0	0,043	0,748	0,005	0,487	0,784	0,829	0,023	0,660	0,038	0,155	0,043	0,663	0,277	0,700	0,026	0,058	0,058	0,154	0,256	0,007	0,290	0,470	0,083
Amlig. D	0,643	0	0,888	0,001	0,891	0,952	0,000	0,490	0,000	0,166	0,002	0,169	0,004	0,783	0,000	0,502	0,000	0,243	0,119	0,004	0,000	0,746	0,000
Estr. E	0,748	0,888	0	0,439	0,007	0,048	0,660	0,937	0,908	0,992	0,822	0,884	0,891	0,522	0,868	0,776	0,891	0,941	0,831	0,891	0,778	0,752	0,683
Estr. D	0,005	0,001	0,439	0	0,479	0,470	0,908	0,001	0,522	0,000	0,300	0,001	0,282	0,024	0,986	0,000	0,308	0,001	0,192	0,007	0,023	0,982	0,004
C.Audit. E	0,487	0,891	0,007	0,479	0	0,146	0,986	0,914	0,860	0,927	0,885	0,776	0,277	0,507	0,986	0,868	0,374	0,903	0,921	0,999	0,999	0,660	0,174
C.Audit. D	0,784	0,058	0,048	0,470	0,146	0	0,905	0,052	0,490	0,075	0,336	0,089	0,350	0,129	0,888	0,101	0,999	0,027	0,885	0,642	0,314	0,689	0,445
C.Entor. E	0,829	0,902	0,660	0,908	0,986	0,905	0	0,847	0,011	0,884	0,746	0,822	0,896	0,038	0,829	0,831	0,937	0,778	0,661	0,903	0,588	0,480	0,911
C.Entor. D	0,023	0,000	0,937	0,001	0,914	0,052	0,827	0	0,315	0,000	0,169	0,000	0,358	0,028	0,888	0,000	0,394	0,000	0,365	0,128	0,009	0,011	0,896
C.lins. E	0,660	0,480	0,908	0,522	0,860	0,480	0,011	0,315	0	0,249	0,365	0,277	0,195	0,277	0,004	0,865	0,453	0,480	0,070	0,588	0,776	0,116	0,379
C.lins. D	0,058	0,000	0,952	0,000	0,927	0,075	0,884	0,000	0,249	0	0,296	0,000	0,172	0,005	0,981	0,000	0,577	0,000	0,439	0,064	0,005	0,033	0,658
C.Parie. E	0,155	0,166	0,452	0,300	0,885	0,336	0,418	0,169	0,965	0,296	0	0,336	0,663	0,829	0,011	0,318	0,172	0,128	0,311	0,896	0,287	0,318	0,335
C.Parie. D	0,043	0,002	0,822	0,001	0,776	0,089	0,746	0,000	0,277	0,000	0,336	0	0,371	0,058	0,941	0,000	0,318	0,000	0,439	0,261	0,073	0,891	0,002
C.Retro. E	0,663	0,169	0,894	0,282	0,277	0,350	0,822	0,358	0,195	0,172	0,663	0,371	0	0,000	0,282	0,177	0,323	0,308	0,588	0,187	0,079	0,070	0,044
C.Retro. D	0,277	0,004	0,891	0,024	0,507	0,129	0,896	0,028	0,277	0,005	0,829	0,058	0,000	0,679	0,006	0,775	0,023	0,348	0,112	0,007	0,001	0,145	0,001
C.Somato. E	0,700	0,783	0,522	0,896	0,986	0,888	0,038	0,888	0,004	0,981	0,011	0,941	0,382	0,679	0,000	0,949	0,774	0,857	0,195	0,358	0,868	0,784	0,069
C.Somato. D	0,026	0,000	0,868	0,000	0,868	0,101	0,829	0,000	0,261	0,000	0,318	0,000	0,177	0,006	0,949	0,000	0,453	0,000	0,353	0,101	0,008	0,007	0,748
Hip. E	0,058	0,502	0,776	0,308	0,374	0,999	0,831	0,294	0,885	0,777	0,172	0,318	0,323	0,775	0,274	0,453	0,000	0,508	0,196	0,868	0,619	0,884	0,046
Hip. D	0,058	0,000	0,891	0,001	0,903	0,027	0,937	0,000	0,453	0,000	0,128	0,000	0,308	0,023	0,857	0,000	0,508	0,000	0,439	0,237	0,014	0,011	0,872
Ofit. E	0,154	0,243	0,941	0,192	0,921	0,885	0,778	0,365	0,480	0,439	0,311	0,439	0,588	0,348	0,195	0,353	0,196	0,439	0,000	0,169	0,470	0,533	0,445
Ofit. D	0,256	0,119	0,831	0,126	0,999	0,642	0,661	0,128	0,070	0,064	0,896	0,261	0,187	0,112	0,358	0,101	0,868	0,237	0,660	0,000	0,122	0,076	0,453
VTA. E	0,007	0,004	0,891	0,007	0,999	0,314	0,903	0,009	0,588	0,005	0,287	0,073	0,079	0,007	0,868	0,008	0,619	0,014	0,169	0,122	0,000	0,015	0,999
VTA. D	0,290	0,000	0,778	0,023	0,660	0,089	0,598	0,011	0,776	0,003	0,318	0,076	0,070	0,001	0,784	0,007	0,841	0,011	0,470	0,076	0,015	0,000	0,413
Tálamo E	0,470	0,746	0,752	0,982	0,174	0,445	0,480	0,896	0,116	0,658	0,335	0,891	0,044	0,145	0,069	0,748	0,046	0,872	0,533	0,999	0,413	0,000	0,522
Tálamo D	0,083	0,000	0,683	0,004	0,829	0,014	0,911	0,000	0,379	0,000	0,191	0,002	0,095	0,001	0,905	0,000	0,862	0,000	0,445	0,116	0,004	0,000	0,522

4.6 Animais adultos submetidos ao modelo de HI neonatal têm a capacidade de aprendizado prejudicada

A partir do DPN 65 os animais do foram testados quanto à capacidade cognitiva de memória e aprendizado na versão espacial do labirinto de Morris. Durante 5 dias consecutivos os animais foram treinados nesta tarefa conforme descrito acima. A análise da curva de aprendizagem mostrou que, ao longo dos dias de treino, os animais do grupo controle Sham apresentaram um melhor desempenho quando comparado tanto ao grupo HI s/h quanto ao grupo HI h nos dias 3, 4 e 5 de treino (Figura 13 A). Da mesma forma, a análise da área sob a curva (do inglês *area under the curve*, AUC) também demonstrou que ambos os grupos HI não apresentaram uma capacidade de aprendizado adequada na tarefa, não havendo diferenças entre os grupos (Figura 13 B).

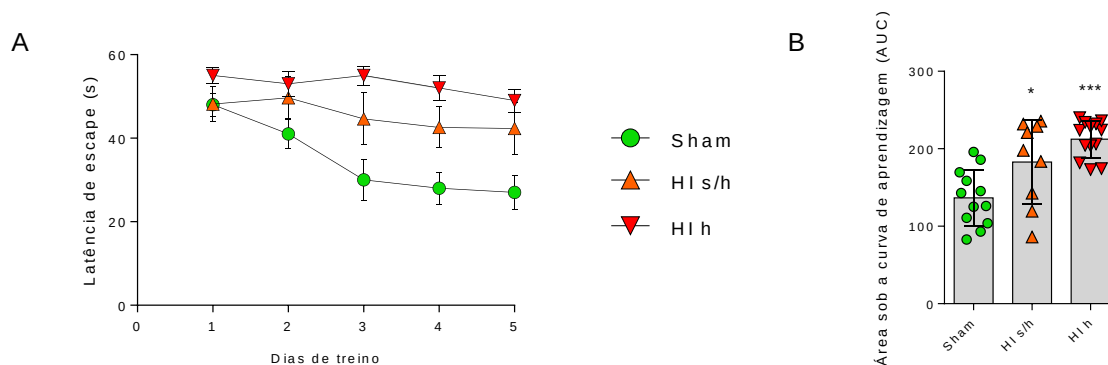


Figura 13. Curva de aprendizado do LAM. A) Gráfico referente à curva de aprendizagem ao longo dos dias de treino no LAM e B) gráfico referente à análise da área sob a curva da curva de aprendizagem do LAM. Valores representados em média $\pm$ desvio padrão. Significâncias referente à * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ para Sham vs. HI s/h ou HI h. Não houve diferenças entre os grupos HI s/h vs. HI h.

Após o período de treinamento, os animais foram submetidos à avaliação da retenção da memória espacial no 6º dia. Corroborando com a avaliação da capacidade de aprendizagem, os animais do grupo Sham também apresentaram uma retenção de memória no LAM superior a ambos os grupos HI, tanto em relação à latência de escape ao local exato da plataforma quanto ao tempo que os animais permaneceram no quadrante alvo (Figura 14 A, B e C). Não houve diferença significativa entre os grupos HI na avaliação da

retenção de memória espacial. Adicionalmente, não houve diferenças entre os grupos experimentais na avaliação da distância percorrida, sendo este um indicativo de ausência de alterações motoras que poderiam interferir na capacidade de natação dos animais (Figura 14 D).

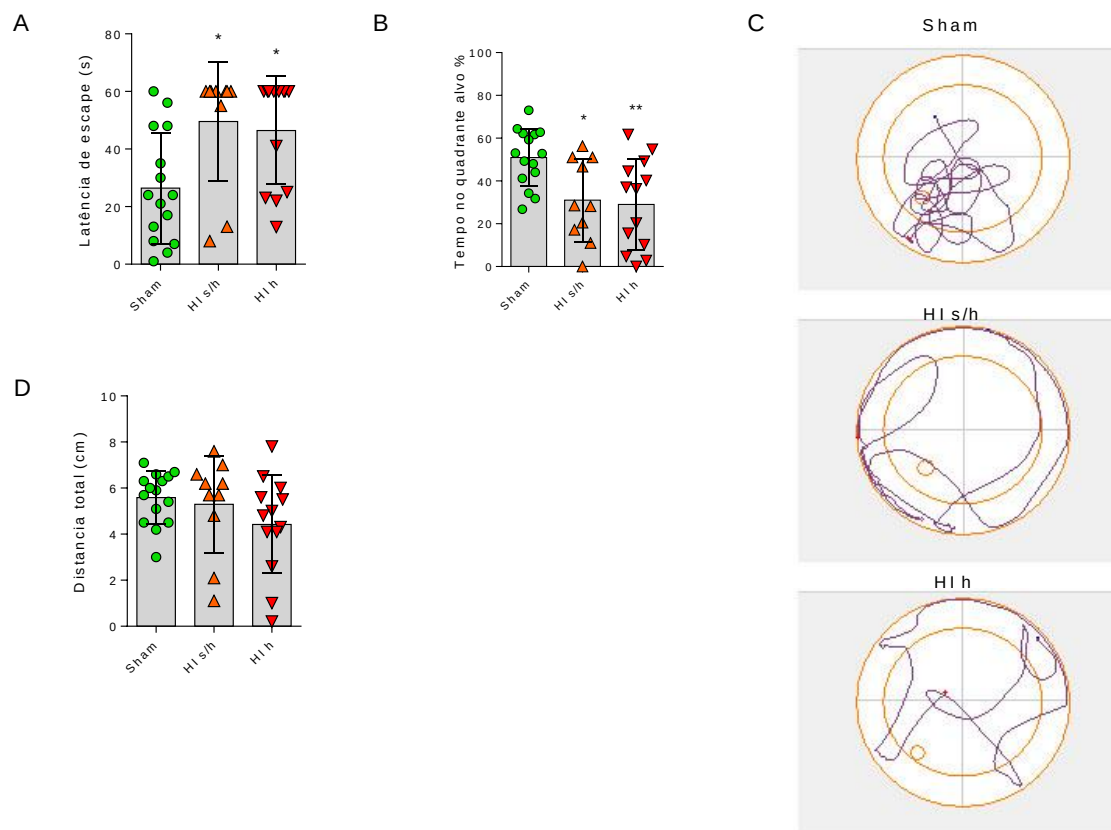


Figura 14. Avaliação da retenção da memória espacial no LAM. A) Gráfico referente à latência de escape ao local da plataforma na avaliação da retenção da memória espacial e B) gráfico referente a porcentagem do tempo de permanência no quadrante alvo. C) Imagens ilustrativas do percurso percorrido por um representante de cada grupo no LAM. D) Gráfico referente à distância total percorrida durante a realização do teste da retenção da memória espacial. Significâncias referente à * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para Sham vs. HI s/h ou HI h. Não houve diferenças entre os grupos HI s/h vs. HI h.

4.7 Perda de volume cerebral na HI está restrito ao hemisfério ipsilateral ao insulto hipóxico isquêmico

Após as avaliações comportamentais os animais foram eutanasiados para a quantificação do volume cerebral. A análise histológica *post-mortem* dos animais submetidos à HI neonatal foi realizada após o termino dos testes comportamentais. Da mesma forma que o metabolismo cerebral aos 60 dias de vida, a perda do volume cerebral ficou restrita ao hemisfério direito, ipsilateral ao insulto hipóxico-isquêmico, para o grupo HI h em todas as regiões avaliadas - estriado, hipocampo e córtex. Não houve diferenças entre os volumes cerebrais dos grupos Sham e HI s/h (Figura 15).

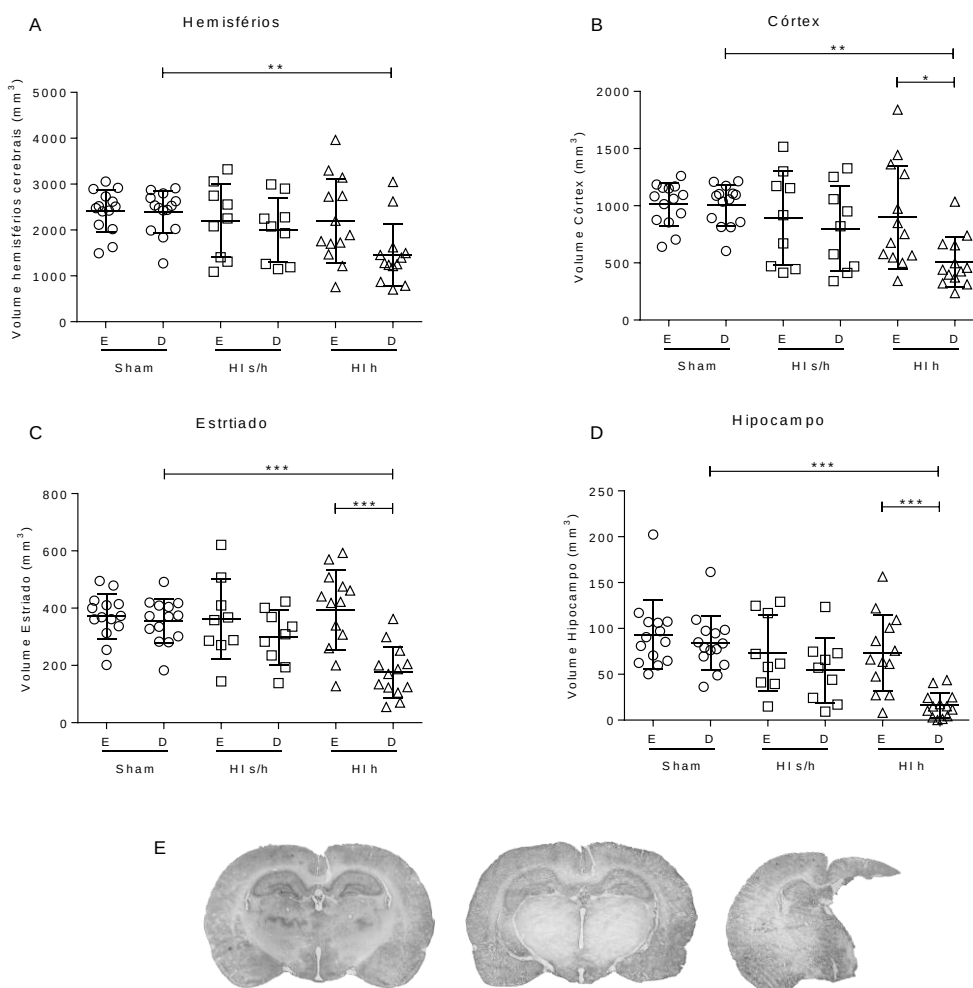


Figura 15. Análise da volumetria cerebral. A volumetria cerebral foi quantificada para os A) hemisférios cerebrais, B) córtex, C) estriado e D) hipocampo bilateralmente de animais submetidos ao modelo de HI neonatal. E) Pannel com cortes coronais histológicas para o grupo Sham, HI s/h e HI2 da esquerda para adireita. Significância referente à * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. E, esquerdo; D, direito.

4.8 Correlação entre o metabolismo cerebral de glicose, aos 60 dias de vida, e o desempenho cognitivo no LAM de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI

Para avaliar se as alterações no metabolismo cerebral de glicose estão correlacionadas ao déficit cognitivo dos animais HI, foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson. Ao aplicarmos o teste de correlação entre a AUC da curva de aprendizagem no LAM e o metabolismo de glicose do hemisfério direito de todos os grupos experimentais verificou-se uma correlação negativa significativa (Pearson $r = -0,3996$ e $P = 0,0212^*$). Ou seja, quanto menor a captação de FDG pelo hemisfério cerebral direito, maior foi a latência de escape até a plataforma no LAM (Figura 16).

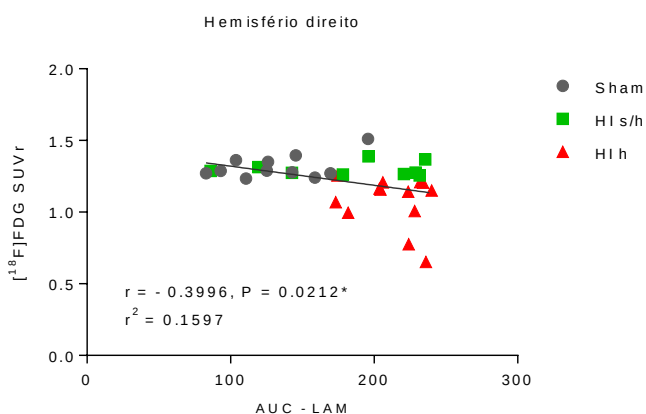
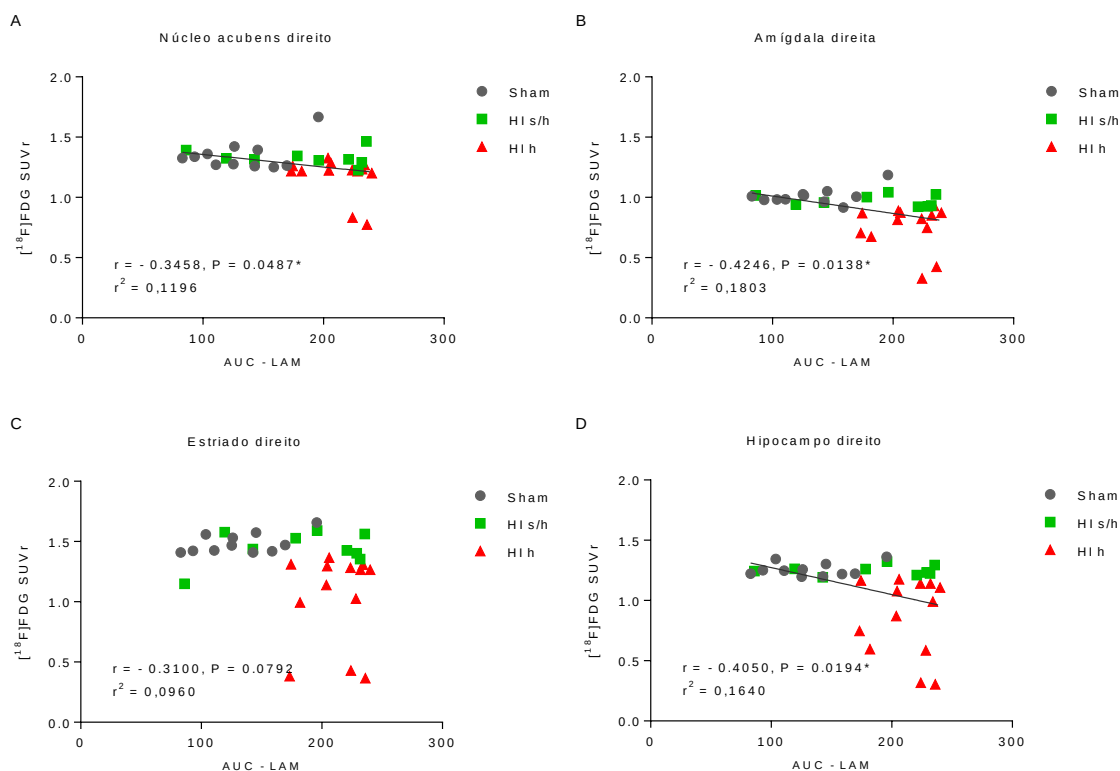
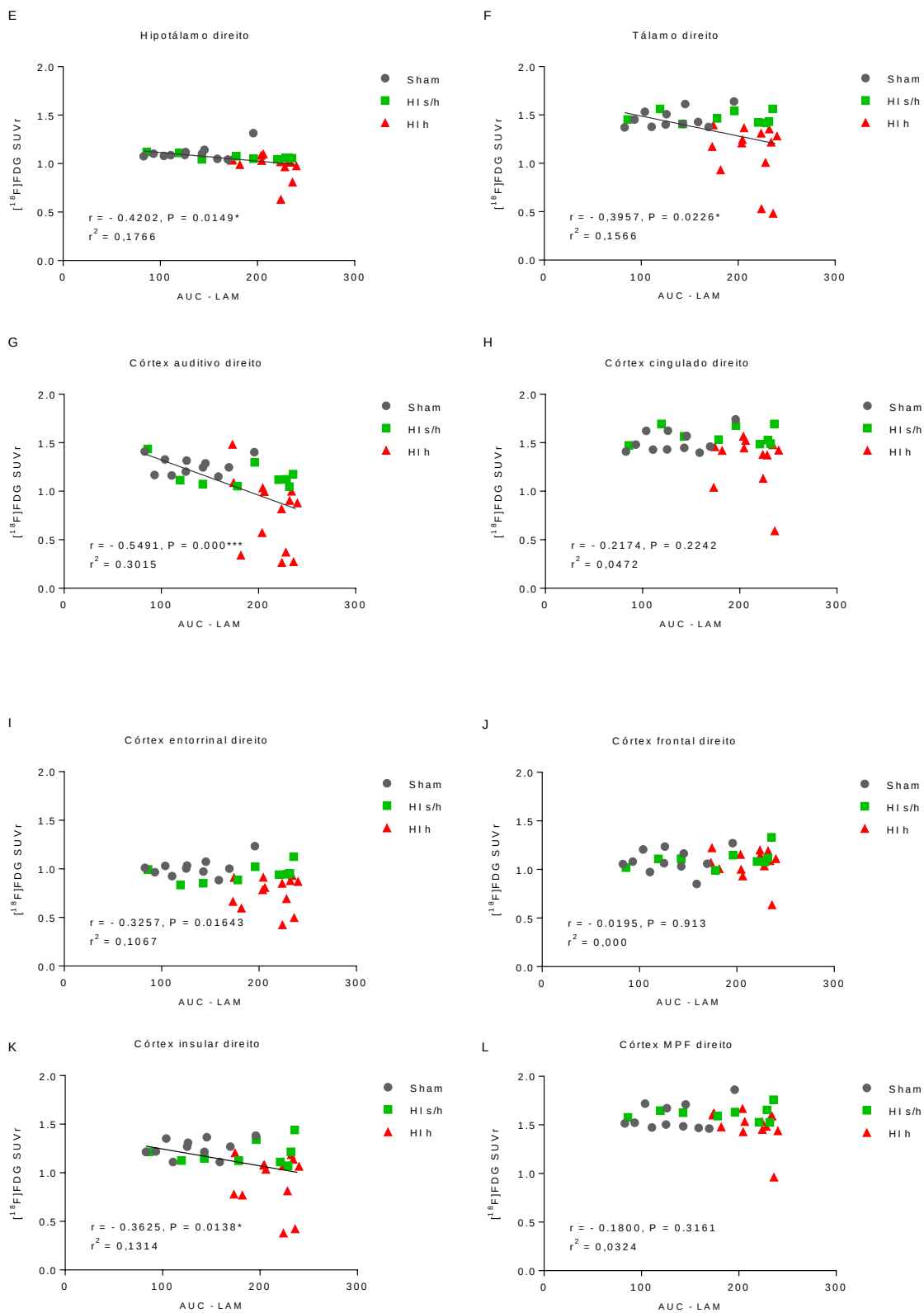


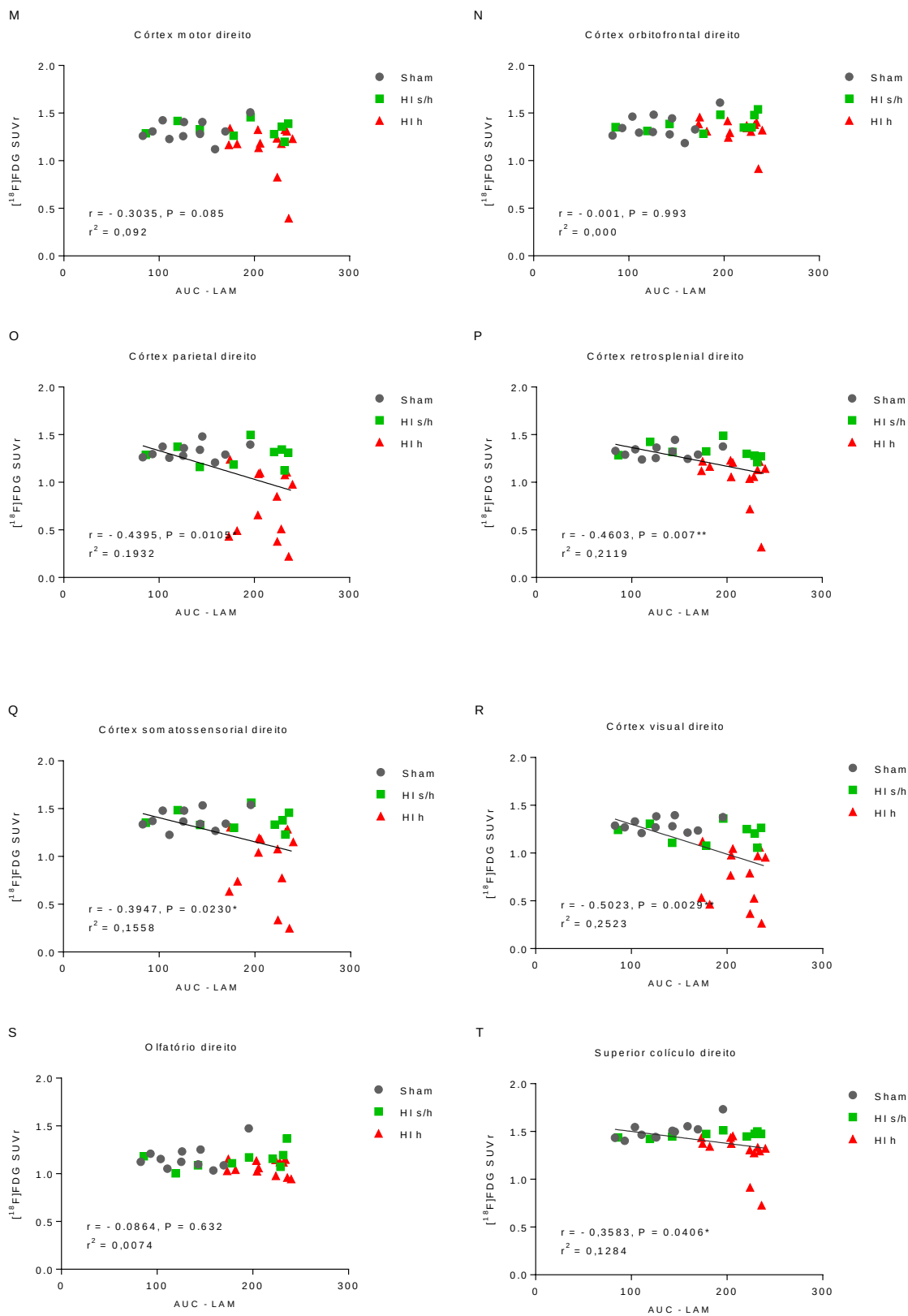
Figura 16. Correlação entre o metabolismo do hemisfério cerebral direito e a área sob a curva (AUC) da curva de aprendizagem do LAM. Representação gráfica do teste do coeficiente de correlação de Pearson e linha de regressão linear. Valor de $P = 0,0276$, $r = -0,3834$ e $r^2 = 0,1470$. Significância referente à * $p < 0,05$.

Da mesma forma, quando avaliamos a correlação do déficit de aprendizagem no LAM e o metabolismo das regiões cerebrais no hemisfério direito observamos uma correlação negativa fraca, porém significativa, para o núcleo accumbens, córtex insular, colículo superior, colículo inferior e medula e moderada com amígdala, córtices auditivo, parietal, retrosplenial, somatossensorial e visual, hipocampo, hipotálamo, VTA e tálamo (Figura 16).

Não existe correlação entre a capacidade de aprendizagem e o metabolismo de glicose para as seguintes regiões: estriado, córtices cingulado, entorrinal, frontal, MPF, motor, orbitofrontal, olfatório, mesencéfalo, cerebelo (Figura 17).







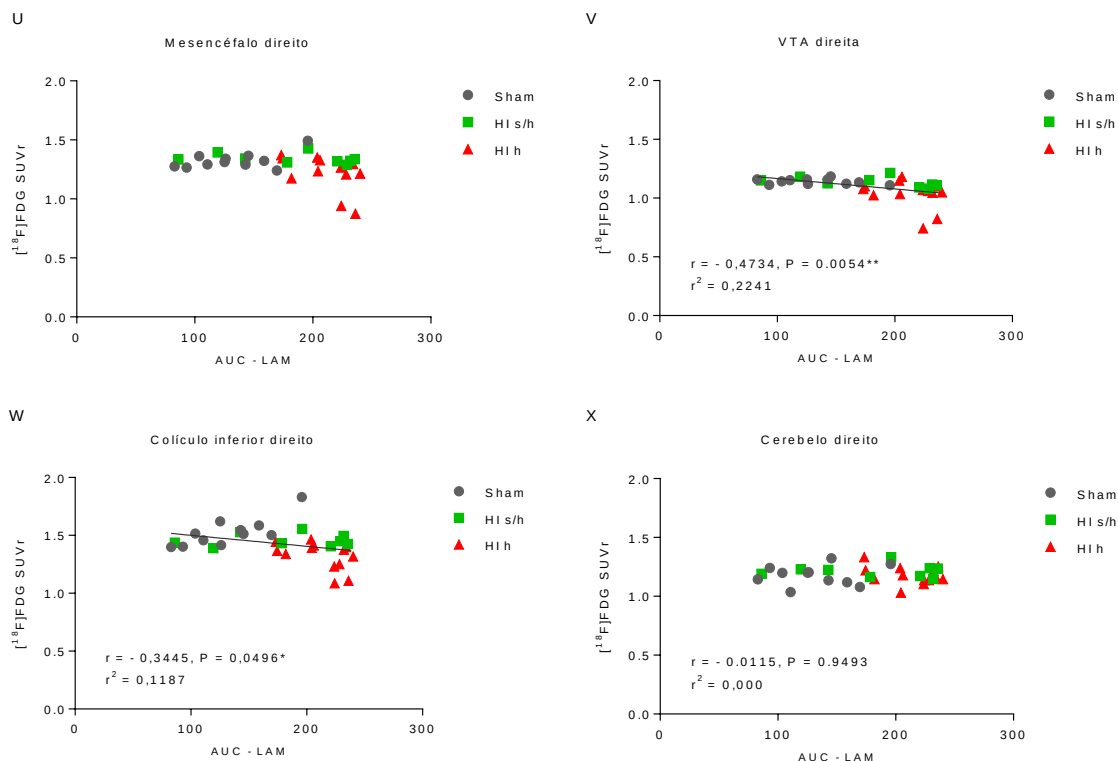


Figura 17. Correlação entre o metabolismo de FDG das regiões cerebrais no hemisfério direito e a área sob a curva (AUC) da curva de aprendizagem do LAM. Representação gráfica do teste do coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear. Significância referente à * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.9 Correlação entre o metabolismo de glicose cerebral aos 60 dias de vida e a volumetria cerebral em animais submetidos ao modelo de HI neonatal

Para comprovar a relação entre as alterações metabólicas e a perda de volume cerebral na análise histológica foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson. A partir desta análise encontramos uma correlação positiva moderada entre o hipometabolismo e perda de volume cerebral para todas as regiões avaliadas: hemisfério direito, córtex direito, hipocampo direito e estriado direito (Figura 18).

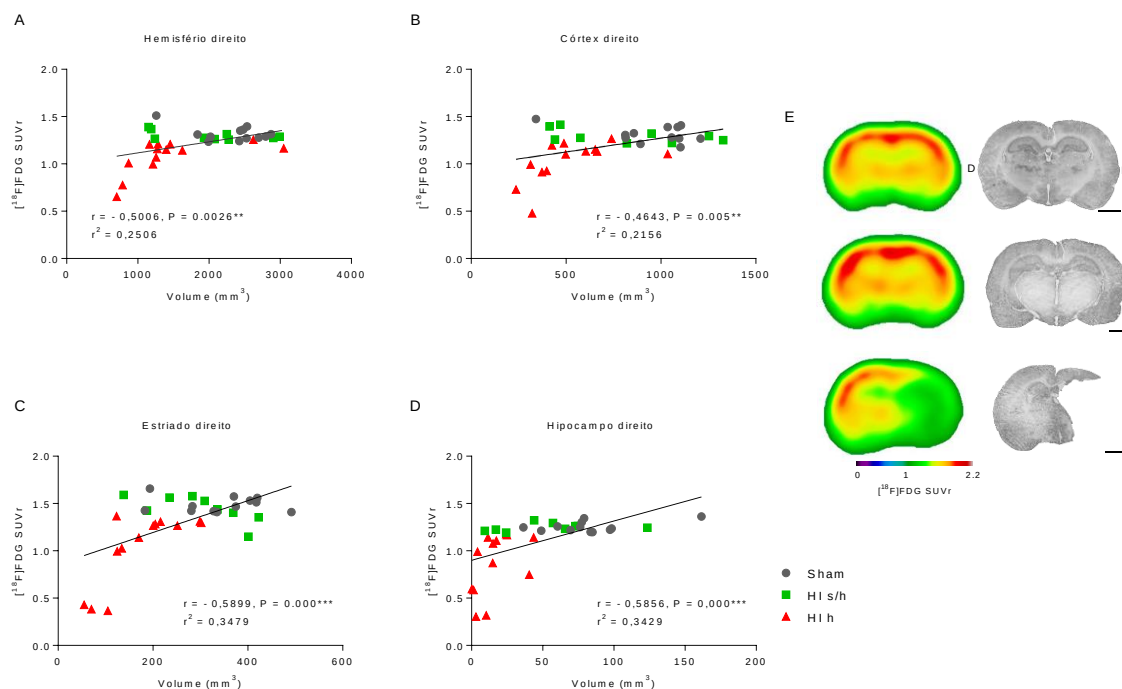


Figura 18. Correlação entre o metabolismo de FDG de regiões cerebrais e correspondente volumetria. Representação gráfica do teste do coeficiente de correlação de Pearson e regressão linear entre o metabolismo cerebral de glicose e correspondente volumetria cerebral para A) hemisfério direito, B) córtex direito, C) estriado direito e D) hipocampo direito. E) Painel acima contém cortes coronais referente à representação do metabolismo cerebral (à esquerda) e correspondente corte histológico (à direita) para os grupos Sham, HI s/h e HI h (de cima para baixo). Significância referente a * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal acompanhar de forma longitudinal, *in vivo*, o metabolismo cerebral de glicose de animais submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal, desde a indução do modelo até a idade adulta. Assim, o delineamento deste estudo previu a avaliação destes animais por imagem molecular, utilizando a técnica de microPET e o emprego do radiofármaco ^{18}F -FDG, em 1, 3, 8, 29 e 53 dias após a indução do modelo de HI neonatal. Nossos resultados em SUV demonstraram hipometabolismo transitório no córtex, hipocampo e estriado do hemisfério contralateral a lesão hipóxico-isquêmica aos 10 e 15 dias de vida. Já no hemisfério direito, ipsilateral à lesão, observou-se hipometabolismo apenas aos 36 e 60 dias de vida dos animais hipóxico-isquêmicos. Em uma análise adicional do metabolismo cerebral de glicose, pela análise de SUVr dos escaneamentos em 36 e 60 dias de vida, foi observado um hipermetabolismo transitório para algumas regiões do hemisfério contralateral apenas no DPN 36. Em contrapartida, verificou-se um hipometabolismo no hemisfério ipsilateral de animais hipóxico-isquêmicos aos 36 e 60 dias de vida. Além disso, a HI neonatal alterou a conformação da rede metabólica cerebral em animais adolescentes/adultos previamente submetidos ao modelo quando comparado a animais controles. Por fim, os prejuízos cognitivos e a perda de volume cerebral em animais HI correlacionam-se com as alterações no metabolismo cerebral na idade adulta.

No contexto clínico, a presença, severidade e distribuição das lesões neuropatológicas dependem de diversos fatores, tais como a natureza e a duração do insulto, a idade gestacional do recém-nascido, background genético, entre outros (Thorngren-Jerneck, Ohlsson et al. 2001, Shi, Zhao et al. 2012, Volpe 2012, Millar, Shi et al. 2017). Apesar das condições controladas na HI experimental, como a oclusão carotídea unilateral e o tempo fixo de hipóxia sistêmica, a variabilidade das lesões cerebrais acarreta em discrepâncias nos estudos pré-clínicos. Tal inconsistência também é observada na presença ou ausência de déficit motor e cognitivo, em virtude do potencial de neuroplasticidade dos animais hipóxico-isquêmicos (Balduini, De Angelis et al. 2000, de Paula, Greggio et al. 2012, Greggio, de Paula et al. 2014, Jung, Im et al. 2016, Duran-Carabali, Sanches et al. 2017). Na tentativa de contornar a variabilidade nos desfechos de

imagem molecular, danos histológicos e cognitivos entre os animais submetidos ao modelo de HI neonatal, optamos por estratificar estes animais em dois grupos (HI s/h e HI h) conforme o grau de metabolismo de glicose no hipocampo direito na fase adulta. O hipocampo ipsilateral à oclusão da carótida sofre um grande dano celular, tanto por necrose quanto por apoptose, nas regiões de CA1 e giro dentado (DG) com grande perda de volume tecidual (Liu, Siesjo et al. 2004, Alexander, Garbus et al. 2014). Assim, utilizamos o valor médio do metabolismo hipocampal de glicose do grupo controle como referência (1,2 SUVr). Os animais HI com valor igual ou superior a 1,2 SUVr foram incluídos no grupo HI s/h (40%), os ratos com valor inferior a 1,2 SUVr compuseram o grupo HI h (59%).

Este é o primeiro estudo que propôs acompanhar a progressão da lesão hipóxico-isquêmica *in vivo* em relação ao metabolismo cerebral, utilizando a técnica de imageamento por microPET-FDG. O evento hipóxico-isquêmico neonatal ocasiona uma série de alterações fisiológicas cerebrais agudas, incluindo uma rápida falha energética, seguida por um período transitório de normalização e posterior falha energética secundária resultando na morte celular (Douglas-Escobar and Weiss 2015, McKenna, Scafidi et al. 2015). Escaneamentos por PET-FDG já mostraram ser eficazes em detectar alterações metabólicas cerebrais em recém-nascidos (Batista, Chugani et al. 2007, Shi, Zhao et al. 2012, Luo, Li et al. 2014) com HI e em animais de médio porte, como porcos (de Lange, Malinen et al. 2012) e cordeiros neonatos (Thorngren-Jerneck, Ley et al. 2001). Além disso, o metabolismo de FDG já foi investigado por microPET em ratos adultos no modelo de acidente vascular cerebral (Fu, Chang et al. 2009, Gao, Wang et al. 2010, Lin, Ko et al. 2011, Sobrado, Delgado et al. 2011, Wang, Chao et al. 2013). No presente estudo, não identificamos diferenças quanto ao metabolismo cerebral de FDG entre os grupos experimentais no primeiro período avaliado, 24h após a indução da HI (DPN 8). Aos 10 e 15 dias de vida – 3 e 8 dias pós-HI neonatal, respectivamente – nossos resultados mostraram um padrão de hipometabolismo transitório no córtex, estriado e hipocampo esquerdo, hemisfério contralateral à lesão, para os animais do grupo HI h. Nos DPNs 36 e 60, observou-se um hipometabolismo limitado ao hemisfério direito para este mesmo grupo experimental.

Um fenômeno que voltou a ser amplamente discutido para o entendimento da lesão cerebral é a diáskise. Este termo foi sugerido por von Monakow, em 1914, para descrever uma depressão transitória de funções neurofisiológicas que ocorrem distantes de uma lesão

cerebral focal (Carrera and Tononi 2014). Tanto na clínica quanto em modelos animais de lesões cerebrais foi demonstrado um hipometabolismo transitório em regiões no hemisfério contralateral ou distantes à lesão, geralmente associado a uma depressão metabólica cerebelar (Carmichael, Tatsukawa et al. 2004, Carrera and Tononi 2014, Silasi and Murphy 2014, Huang, Chang et al. 2018). Carmichael e colaboradores (2004) demonstraram que derrames corticais em um modelo de acidente vascular cerebral (AVC) produziram uma rede de hipometabolismo, medido por microPET-FDG, em regiões do córtex, no estriado e tálamo adjacentes à lesão que perdurou por pelo menos 8 dias após a indução do modelo (Carmichael, Tatsukawa et al. 2004). Um estudo recente demonstrou que uma diásguise eletrofisiológica existente no córtex contralateral de animais submetidos à isquemia cerebral perdurou por pelo menos 21 dias após a indução do modelo (Huang, Chang et al. 2018). Além disso, pacientes que apresentaram diásguise cerebelar cruzada (contralateral) após hemorragia intracerebral tiveram uma recuperação motora reduzida 6 meses após a lesão (Sin, Kim et al. 2018). O metabolismo cerebral através da via das pentoses-fosfato (PPP) está reduzido também no hemisfério contralateral em animais HI (Brekke, Morken et al. 2014, McKenna, Scafidi et al. 2015). Acredita-se que a perda de entrada sináptica no local da lesão possa provocar uma depressão funcional em locais não lesionados conectados, ocasionando a diásguise (Huang, Chang et al. 2018). Anormalidades no metabolismo da glicose que se estendem além do local da lesão estrutural podem ajudar a determinar a extensão real do prejuízo. Assim, estudos têm proposto que um tratamento direcionado em alterações fisiológicas remotas à lesão cerebral poderia melhorar o desfecho clínico a curto e longo prazo (Kannan and Chugani 2010, Silasi and Murphy 2014, Huang, Chang et al. 2018). No nosso estudo, o padrão de hipometabolismo no hemisfério contralateral observado em 3 e 8 dias após a indução do modelo, atinge somente o grupo HI h. Este resultado é compatível à diásguise encontrada em outras condições neuropatológicas, podendo servir como um indicador da severidade das futuras alterações metabólicas por HI neonatal.

Uma das limitações de se avaliar o metabolismo cerebral de ratos neonatos por microPET-FDG é em decorrência da neurofisiologia do cérebro imaturo *per se*. Nos estágios iniciais do neurodesenvolvimento pós-natal, a principal fonte de energia cerebral não é a glicose, mas sim outras moléculas, tais como lactato e corpos cetônicos. Isto se deve ao fato de que no cérebro imaturo há expressão reduzida de receptores GLUT1 e

GLUT3, principais canais de transporte intracelular de glicose, quando comparado ao cérebro adulto. Os níveis de expressão desses receptores vão aumentando gradualmente até atingir os níveis cerebrais de um rato adulto por volta dos 30 dias de vida para o GLUT1 e entre 21-30 dias para GLUT3 (Brekke, Morken et al. 2015, Brekke, Berger et al. 2017). Isto significa que o metabolismo cerebral da glicose pode estar limitado pela capacidade de transporte nesta fase de desenvolvimento.

Além disso, dentro das limitações da técnica, filhotes de ratos são mais susceptíveis a hipotermia do que os ratos adultos, devido à imaturidade de mecanismos de termo regulação (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e tecido de gordura marrom) (Symonds 2013). Para os escaneamentos que ocorreram antes do desmame (21 dias de vida), os animais foram submetidos à 1 hora de aquecimento (36-37°C) antes da administração de FDG. Já durante os escaneamentos, os animais, independentemente da idade, estavam sob aquecimento contínuo na plataforma de imageamento do microPET. Tais medidas foram implementadas com o objetivo manter a temperatura corporal basal destes animais, redução da ativação da gordura marrom e, conseqüentemente, otimizar a captação de FDG cerebral com redução da sua metabolização pela gordura marrom.

Outro desafio deste projeto foi a ausência de escaneamentos anatômicos que fossem complementares às imagens de microPET nos animais com 8, 10 e 15 dias de vida. Geralmente, os equipamentos pré-clínicos de imagem molecular são multimodais, a fim de oferecer dados funcionais (microPET ou microSPECT) juntamente um referencial estrutural (microCT ou microRMN) (James and Gambhir 2012). Para contornarmos esta dificuldade, cada imagem de microPET-FDG foi corregistrada a um atlas digital de microRMN de cérebro de rato, correspondente às idades de cada período avaliado. Para os tempos de escaneamento de DPN 8, 10 e 15, utilizou-se a ferramenta MINC (Zimmer, Parent et al. 2017). Já para as imagens cerebrais dos animais com 36 e 60 dias de vida, estas puderam ser corregistradas ao atlas digital do software PMOD (Zanirati, Azevedo et al. 2018) (Schiffer WK et al 2006).

O sistema de microPET apresenta uma resolução espacial de aproximadamente 1 mm, superior à resolução de cerca de 5 mm do PET clínico. Este nível de detalhamento é suficientemente adequado para identificar inúmeras subunidades estruturais no cérebro de ratos e camundongos adultos (Kornblum, Araujo et al. 2000, Fu, Chang et al. 2009).

Considerando o tamanho diminuto do cérebro de roedores neonatos e jovens e por outras limitações metodológicas, ainda não havia sido investigado o metabolismo cerebral nesta fase do neurodesenvolvimento por imageamento molecular. No presente trabalho, optamos por utilizar SUV, e não SUVr, na análise preliminar dos cinco *timepoints*, devido à impossibilidade de identificação de regiões cerebrais menores que 1 mm. Sendo assim, a análise por SUVr somente foi possível nas imagens de DPNs 36 e 60. Adicionalmente, não houve diferença do peso corporal entre os grupos experimentais em todos os períodos avaliados, o que poderia ser um possível fator de confusão nas análises de SUV.

Considerou-se realizar uma análise independente para os DPNs 36 e 60, utilizando os valores de SUVs normalizados em relação à ponte (SUVr). Nós avaliamos de forma exploratória o metabolismo cerebral de FDG para 24 regiões cerebrais bilateralmente, conforme descrito previamente. No cérebro total observou-se um hipometabolismo significativo para o grupo HI h em relação aos grupos sham e HI s/h somente aos 60 dias de vida. Contudo, aos 36 dias de vida, o grupo HI h já apresenta um hipometabolismo em relação ao grupo HI s/h no hemisfério direito. A partir dos 60 dias de vida, o hipometabolismo para o grupo HI h foi observado em relação a ambos os grupos, Sham e HI s/h, no hemisfério ipsilateral e em relação somente ao grupo HI s/h no hemisfério contralateral.

Curiosamente, a análise regional demonstrou um hipermetabolismo do grupo HI h, em relação ao grupo controle, em algumas regiões cerebrais no hemisfério contralateral a lesão hipóxico-isquêmica. Aos 36 dias de vida, o grupo HI h apresentou um metabolismo aumentado nas regiões do núcleo accumbens esquerdo, amígdala esquerda e estriado esquerdo em relação ao grupo controle e também em relação ao grupo HI s/h no estriado esquerdo. Esse comportamento semelhante entre as regiões pode ser devido as suas proximidades anatomofisiológicas. Além disso, o grupo HI s/h apresentou um hipermetabolismo em relação ao grupo sham no córtex somatossensorial esquerdo também aos 36 dias de vida. Com a intensificação gradual do hipometabolismo no hemisfério ipsilateral a lesão a partir de 36 dias de vida, o hemisfério contralateral poderia estar sofrendo um aumento do metabolismo nessas regiões em função de mecanismos compensatórios. Evidências clínicas e experimentais indicam que os mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, desempenham um papel importante na patogênese da lesão cerebral por HI (Ivacko, Sun et al. 1996, Silverstein, Barks et al.

1997, Yoon, Jun et al. 1997, Bona, Andersson et al. 1999, Hedtjarn, Leverin et al. 2002). Embora a grande maioria dos estudos demonstre uma ativação inflamatória intensificada no período mais agudo da HI, Bona e colaboradores (1999) demonstraram que ativação de microglia persistiu em até 35 dias após o insulto hipóxico-isquêmico em ratos, implicando em um componente crônico de ativação imunoinflamatória (Bona, Andersson et al. 1999). Estudos recentes demonstraram a ativação de componentes inflamatórios no hemisfério contralateral somente durante a fase aguda de isquemia cerebral focal em ratos adultos (Nonose, Gewehr et al. 2018). No entanto, Hughes e colaboradores (2012) demonstraram um aumento da neuroinflamação – utilizando microPET e o radiofármaco ^{11}C -PK11195 – na lesão cerebral isquêmica de ratos e, também, em estruturas adjacentes por pelo menos 14 dias pós-insulto (Hughes, Jones et al. 2012). Diversos estudos demonstram que um aumento do metabolismo de FDG pode estar relacionado a processos inflamatórios (Love, Tomas et al. 2005, Matsui, Nakata et al. 2009, Pomykala, Ganz et al. 2013). Em nosso estudo, porém, há necessidade de testes adicionais para verificar se a neuroinflamação contribuiu efetivamente para o hipermetabolismo observado no hemisfério contralateral 29 dias após a indução do modelo de HI neonatal.

Em contrapartida, no hemisfério direito, existe um hipometabolismo significativo para o grupo HI h, que se inicia no DNP 36 para algumas regiões cerebrais e se intensificado aos 60 dias de vida, atingindo o cérebro total e a grande maioria das regiões avaliadas. O metabolismo do grupo HI s/h não está alterado, comportando-se similar ao grupo controle, em ambos os períodos. Sabe-se que algumas regiões cerebrais são mais susceptíveis ao dano tecidual frente ao insulto hipóxico-isquêmico, tais como córtex cerebral, hipocampo, estriado e tálamo (Liu, Siesjo et al. 2004, Vannucci and Vannucci 2005, de Paula, Vitola et al. 2009, Greggio, de Paula et al. 2014). Corroborando tais dados, nós encontramos um hipometabolismo acentuado no hemisfério ipsilateral para o estriado, hipocampo, tálamo e córtices auditivo, insular, parietal, retrosplenial, somatossensorial e visual. Além disso, observamos um hipometabolismo acentuado também nas regiões do núcleo accumbens direito, amígdala direita, hipolátamo direito, colículo superior direito, VTA direita, colículo inferior direito. Em menor proporção, o metabolismo também está alterado para o córtex cingulado direito, córtex motor e mesencéfalo. Essas últimas regiões citadas não são usualmente relacionadas ao dano cerebral pela hipóxia-isquemia na literatura. Estudos clínicos demonstraram que um hipermetabolismo transitório seguido de

hipometabolismo no estriado e no tálamo parece estar relacionado ao desenvolvimento de PC em RNs acometidos pela HI (Batista, Chugani et al. 2007). Tem sido proposto que este hipermetabolismo transitório nos núcleos basais pode ser devido a um aumento transitório da vascularização nessa região ou da demanda de energia celular na tentativa de restabelecer a homeostase após a lesão por asfixia. Posteriormente, processos secundários tardios, que levam à perda neuronal, resultam em hipometabolismo grave nessas regiões, observado em uma idade mais avançada (Kannan and Chugani 2010).

Nós também observamos um hipometabolismo bilateral no tálamo no grupo HI h aos 60 dias de vida, o que na clínica predispõe ao desenvolvimento de PC diplégica espástica em crianças acometidas por HI sem alterações cerebrais no exame de RM. No entanto, RNs que apresentam um padrão predominantemente unilateral de hipometabolismo no PET-FDG estão predispostos a desenvolver PC hemiplégica (Kerrigan, Chugani et al. 1991, Kannan and Chugani 2010). Os núcleos da base, particularmente o estriado, são um componente importante na modulação da função cortical e a ruptura das vias cortico-estriato-talâmicas têm um grande impacto negativo nas funções neurocomportamentais (Aylward 2005, Volpe 1998). Adicionalmente, um hipometabolismo cerebral total foi correlacionado com a gravidade de crianças acometidas pela HI neonatal, onde quanto menor o metabolismo cerebral maior foi a chance de desenvolver PC e outras complicações (Thorngren-Jerneck, Ohlsson et al. 2001). Em um estudo pré-clínico, animais HI mostraram déficits persistentes em tarefas de processamento auditivo até a vida adulta (Alexander, Garbus et al. 2014). Em concordância, nós também observamos uma drástica redução do metabolismo do córtex auditivo direito, contribuindo com hipótese de que sistemas neurais críticos para o processamento auditivo podem ser vulneráveis ao dano hipóxico-isquêmico.

Já foi demonstrado que o córtex frontal apresentou um aumento da neuroinflamação e diminuição do fluxo sanguíneo cerebral em modelos de HI neonatal (Vannucci, Lyons et al. 1988, Wixey, Reinebrant et al. 2011). Apesar disso, não observamos alterações metabólicas para os córtices frontal, orbitofrontal e MPF nos períodos avaliados. O cerebelo parece ser altamente susceptível ao dano hipóxico-isquêmico devido a vulnerabilidade das células de Purkinje à estas condições. A perda de células de Purkinje no cerebelo foi observado em pelo menos 20 dias após a lesão cerebral por HI (Biran, Verney et al. 2012). Contudo, neste estudo, tanto em 29 quanto em 53 dias após a indução do modelo, o cerebelo não esteve implicado em alterações metabólicas. Durante a indução da

isquemia cerebral, pela ligação da carótida comum direita, regiões mais frontais ou mais posteriores são poupadas devido a sua localização anatômica, possuindo uma vascularização independente. Assim, as regiões citadas sofrem o impacto principalmente da hipóxia sistêmica e não da isquemia cerebral. Neste estudo o protocolo é compatível com a indução de uma lesão cerebral moderada por HI, e o tempo de 1 h em ambiente de hipóxia pode não ter sido suficiente para produzir alterações no metabolismo dessas regiões.

Outro aspecto importante abordado neste estudo foi a rede metabólica cerebral como uma avaliação complementar aos resultados do metabolismo cerebral de FDG para os ratos com 36 e 60 dias de vida. Para o grupo Sham, observamos uma rede metabólica hipsincrônica, tanto aos 36 quanto aos 60 dias de vida, com um grande número de associação entre as regiões avaliadas. De maneira interessante, apesar de não haver diferenças entre o metabolismo cerebral de FDG dos animais dos grupos Sham e HI s/h, a rede metabólica do grupo HI s/h mostrou-se alterada, apresentando um padrão hiposincrônico, com poucas correlações entre as regiões quando comparada visualmente ao grupo Sham, em ambos os períodos avaliados. Considerando o padrão hipometabólico para o hemisfério ipsilateral do grupo HI h, aos 36 dias de vida, evidenciamos também uma rede metabólica cerebral pouco sincronizada comparado ao grupo controle. No entanto, quando avaliamos a rede metabólica aos 60 dias de vida, identificamos um aumento de correlações aberrantes entre as regiões avaliadas. Houve um aumento de correlações positivas entre as regiões do hemisfério direito e um consequente aumento das correlações negativas entre as regiões do hemisfério esquerdo com o direito. Sendo assim, as regiões do hemisfério direito correlacionam positivamente entre si devido à drástica diminuição do metabolismo em sincronia entre essas regiões. Enquanto o aumento de correlações negativas ocorre devido à preservação do metabolismo no hemisfério esquerdo e a intensificação do hipometabolismo no direito, evidenciando a diferença do metabolismo entre os hemisférios contra e ipsilateral para o modelo de HI. Como resultado, o grupo HI h apresentou uma rede metabólica desconexa entre os hemisférios cerebrais.

Redes metabólicas cerebrais vêm sendo amplamente utilizadas no estudo de circuitos cerebrais anormais de pacientes com doenças neurodegenerativas, tais como doença de Parkinson (DP) (Eidelberg 2009), de Huntington, doença de Alzheimer (DA) (Yao, Hu et al. 2018) e epilepsia (Vaessen, Jansen et al. 2012, Stretton, Winston et al. 2013) e AVC (Siegel, Seitzman et al. 2018). Possivelmente os padrões encontrados nas

redes metabólicas possam servir como biomarcadores para determinar a progressão do comprometimento cerebral e ser alvo de novas abordagens terapêuticas (Eidelberg 2009). O cérebro é altamente ligado por redes e processos isquêmicos podem alterar amplamente a rede cerebral global (Jung, Im et al. 2016, Siegel, Seitzman et al. 2018). Nosso estudo permitiu demonstrar alterações na rede metabólica cerebral em ratos adolescentes e adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal. Além disso, demonstramos uma variação da rede metabólica do grupo HI h, de 36 aos 60 dias de vida, com um aumento da sincronicidade da rede metabólica acompanhando um hipometabolismo cerebral mais difuso no hemisfério ipsilateral no último período avaliado o que pode estar relacionado à progressão da lesão cerebral por HI. Partindo da premissa de que regiões com nível metabólico sincrônico estão funcionalmente interconectadas (Yao, Hu et al. 2018), os padrões aberrantes decorrentes do hipometabolismo cerebral traduzem a influência da HI neonatal sobre as regiões conectadas. Recentemente, nosso grupo demonstrou que animais epiléticos com depressão que apresentam uma diminuição do metabolismo regional cerebral também apresentam uma rede hipsincrônica, com maior número de associações aberrantes entre as regiões (Zanirati, Azevedo et al. 2018). Tanto para o grupo HI s/h quanto para o grupo HI h identificamos a perda da comunicação inter-hemisférica na rede metabólica cerebral. No grupo HI s/h ocorre a ausência de correlações entre os hemisférios cerebrais e no grupo HI h ocorre o aumento de correlações negativas entre as regiões dos hemisférios. Esses resultados estão de acordo com Siegel e colaboradores (2018) que identificaram que padrões de disfunção específicos de rede cerebral e a perda de comunicação inter-hemisférica estão associados ao comprometimento de domínios cerebrais comportamentais em pacientes após AVC (Siegel, Seitzman et al. 2018).

A HI neonatal apresenta um desfecho desfavorável em relação à capacidade cognitiva em diversos estudos pré-clínicos e relatos clínicos. Em estudos prévios, o déficit de memória espacial e aversiva, por exemplo, persiste até a vida adulta de ratos submetidos ao modelo de HI neonatal, o que de fato também é visto na clínica dependendo do grau de lesão cerebral (Aylward 2005, Alexander, Garbus et al. 2014, Greggio, de Paula et al. 2014). Os RNs acometidos pela HI mostraram disfunção de memória e processamento espacial devido a rupturas da comunicação do hipocampo e projeções corticais (Aylward 2005). No presente estudo, ambos os grupos HI tiveram a capacidade de aprendizado prejudicada quando avaliados quanto à memória espacial no LAM,

apresentando prejuízos cognitivos importantes em relação ao grupo controle. Adicionalmente, identificamos correlações entre a capacidade de aprendizado e o metabolismo cerebral de FDG para o hemisfério direito. Observamos uma correlação negativa fraca para o núcleo accumbens, córtex insular, colículo superior e colículo inferior e moderada com amígdala, córtices auditivo, parietal, retrosplenial, somatossensorial e visual, hipocampo, hipotálamo, VTA e tálamo. Concluímos que os valores de SUVr aos 60 dias de vida são inversamente proporcionais ao desempenho na tarefa do LAM.

Em consenso com as alterações do metabolismo cerebral, a perda de volume cerebral ficou limitada ao hemisfério direito, ipsilateral, para o grupo HI h, correlacionando positivamente com o hipometabolismo cerebral. Os grupos sham e HI s/h não apresentaram alteração no volume cerebral. O dano tecidual foi avaliado histologicamente na totalidade dos hemisférios cerebrais, e no hipocampo, estriado e córtex. A perda de volume cerebral pela HI neonatal é amplamente descrita na literatura. Animais HI apresentam lesões cerebrais generalizadas, incluindo reduções volumétricas no córtex direito, hipocampo, estriado e aumentos do volume ventricular direito em paralelo com déficits comportamentais persistentes (de Paula, Vitola et al. 2009, Alexander, Garbus et al. 2014, Greggio, de Paula et al. 2014). van de Looij e colaboradores (2011) acompanharam longitudinalmente alterações metabólicas e volumétricas em animais HI por microRMN. O grupo demonstrou que um aumento agudo da concentração de lactato se correlacionou com a perda de volume cortical observada 22 dias após a lesão, indicando um paralelo entre a lesão cerebral e alterações precoces do metabolismo cerebral (van de Looij, Chatagner et al. 2011, van de Looij, Dean et al. 2015). Smith e colaboradores observaram que alterações de volume anatômico para diferentes regiões cerebrais não se correlacionaram com nenhuma alteração comportamental para animais HI (Smith, Alexander et al. 2015). Além disso, pacientes com epilepsia que também apresentam alterações na organização da rede da substância branca parecem ser sensíveis ao declínio cognitivo mesmo sem lesões visíveis na ressonância magnética (Vaessen, Jansen et al. 2012). A conectividade funcional está ao mesmo tempo relacionada e dissociada da conectividade anatômica. Redes funcionais possuem propriedades dinâmicas e podem sofrer alterações por vias moleculares que independem de alterações morfológicas. A presença de uma conexão estrutural não necessita de uma conexão funcional e, da mesma forma, a demonstração de uma conexão funcional não implica a presença de uma conexão estrutural (Biswal, Mennes et al. 2010).

Em acordo, o comprometimento cognitivo aqui observado não está relacionado a alterações na integridade cerebral, morfológicas ou metabólicas, e sim com alterações na conformação da arquitetura da rede metabólica para parte dos animais HI.

Considerando as alterações cerebrais que ocorrem logo após o insulto HI, é provável que a técnica de microPET não seja sensível o bastante para captar alterações metabólicas em 24h após a indução do modelo. Atualmente, a ausência de informações precoces que possam antecipar o prognóstico da severidade da lesão por HI é uma das principais preocupações, inclusive em modelos experimentais (Kannan and Chugani 2010, Jung, Im et al. 2016). O padrão de hipometabolismo contralateral à lesão, que observamos em 3 e 8 dias após a HI neonatal no grupo HI h poderá servir como um indicador da severidade das futuras alterações metabólicas.

A consolidação das alterações metabólicas cerebrais na HI neonatal ocorreu aos 60 dias de vida. Observamos que, no início da idade adulta, não existem mais alterações metabólicas no hemisfério cerebral contralateral, dando lugar ao estabelecimento do hipometabolismo no hemisfério direito, ipsilateral à lesão. Adicionalmente, as redes cerebrais metabólicas dos animais hipóxico-isquêmicos se modifica aos 60 dias de vida, aumentando as associações positivas entre as regiões que compartilham o hipometabolismo. Paralelamente, há um aumento de correlações negativas com o hemisfério contralateral, que não apresenta alterações metabólicas, demonstrando uma possível desconexão inter-hemisférica. Na fase adulta, também existe um prejuízo cognitivo e a perda de volume cerebral correlacionado moderadamente ao hipometabolismo do hemisfério ipsilateral à lesão por HI. As alterações do metabolismo regional cerebral e em redes metabólicas descritas nesse estudo podem ser utilizadas como base para futuras discussões acerca do envolvimento dessas regiões nos desfechos neurocomportamentais da HI neonatal.

Neste estudo concluímos, também, que em uma parcela dos animais HI a integridade anatômica e do metabolismo cerebral não se associaram às alterações cognitivas e nas redes metabólicas decorrentes do insulto hipóxico-isquêmico. Assim, demonstramos que existe uma dissociação entre o metabolismo e a volumetria cerebrais com o comportamento e as redes metabólicas de animais adultos previamente submetidos ao modelo de HI neonatal. Adicionalmente, os ratos do grupo HI s/h apresentaram uma

rede metabólica cerebral hipossíncrona, com poucas conexões entre as regiões avaliadas, indicando um funcionamento anormal do cérebro, o que pode estar contribuindo para os déficits cognitivos associados.

Em suma, este é o primeiro estudo que propôs analisar o metabolismo cerebral *in vivo* de ratos neonatos submetidos à HI pela técnica de microPET-FDG. Além disso, obtivemos uma análise longitudinal do metabolismo cerebral de glicose no modelo animal da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal. O entendimento da fisiopatologia nas primeiras horas do insulto neonatal, bem como o acompanhamento da progressão do dano cerebral, é de grande interesse clínico (Kannan and Chugani 2010, Douglas-Escobar and Weiss 2015). Nós concluímos que o microPET-FDG foi eficaz na detecção e quantificação de alterações metabólicas, precoces e tardias, correlacionando o metabolismo cerebral com as lesões cerebrais e déficit cognitivo da HI neonatal. Destacamos a importância de estudos metabólicos/funcionais para o entendimento da complexidade do funcionamento, plasticidade e recuperação encefálica após a lesão hipóxico-isquêmica.

6. CONCLUSÕES

- 1) O monitoramento *in vivo* do metabolismo cerebral de FDG para animais submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal de forma longitudinal nos períodos de 1, 3, 8, 29 e 53 dias após a indução do modelo mostrou que as alterações no metabolismo cerebral foram observadas aos 10 e 15 dias de vida, com um hipometabolismo transitório no hipocampo e no estriado no hemisfério contralateral a lesão. Após, aos 36 e 60 dias de vida o hipometabolismo mais acentuado ficou limitado ao hemisfério ipsilateral à lesão;
- 2) Em uma análise individual do metabolismo cerebral regional para os DPNs 36 e 60, observamos que aos 36 dias de vida, houve um hipermetabolismo transitório no hemisfério contralateral no núcleo accumbens, amígdala e estriado e no mesmo período um hipometabolismo no hemisfério ipsilateral para a maioria das regiões avaliadas. Aos 60 dias de vida um hipometabolismo restrito ao hemisfério ipsilateral à lesão também foi observado para a maioria das regiões avaliadas.
- 3) Demonstramos que a HI neonatal altera a conformação da rede metabólica cerebral nas fases da adolescência e adulta de ratos previamente submetidos ao modelo de HI;
- 4) Os déficits cognitivos de memória espacial e a perda de volume cerebral foram correlacionados às alterações metabólicas cerebrais;
- 5) Adicionalmente, demonstramos uma dissociação entre a ausência de alterações no metabolismo cerebral de glicose e na morfologia cerebral com a presença de prejuízos cognitivos e alteração na arquitetura da rede metabólica cerebral para uma parcela de animais HI.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, M., H. Garbus, A. L. Smith, T. S. Rosenkrantz and R. H. Fitch (2014). "Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model." Behav Brain Res **259**: 85-96.

Altman, D. I. and J. J. Volpe (1991). "Positron emission tomography in newborn infants." Clin Perinatol **18**(3): 549-562.

Aylward, G. P. (2005). "Neurodevelopmental outcomes of infants born prematurely." J Dev Behav Pediatr **26**(6): 427-440.

Balduini, W., V. De Angelis, E. Mazzoni and M. Cimino (2000). "Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats." Brain Res **859**(2): 318-325.

Batista, C. E., H. T. Chugani, C. Juhasz, M. E. Behen and S. Shankaran (2007). "Transient hypermetabolism of the basal ganglia following perinatal hypoxia." Pediatr Neurol **36**(5): 330-333.

Berger, R., Y. Garnier and A. Jensen (2002). "Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies." J Soc Gynecol Investig **9**(6): 319-328.

Biran, V., C. Verney and D. M. Ferriero (2012). "Perinatal cerebellar injury in human and animal models." Neurol Res Int **2012**: 858929.

Biswal BB, Mennes M, Zuo XN, Gohel S, Kelly C, Smith SM, Beckmann CF, Adelstein JS, Buckner RL, Colcombe S, Dogonowski AM, Ernst M, Fair D, Hampson M, Hoptman MJ, Hyde JS, Kiviniemi VJ, Kötter R, Li SJ, Lin CP, Lowe MJ, Mackay C, Madden DJ, Madsen KH, Margulies DS, Mayberg HS, McMahon K, Monk CS, Mostofsky SH, Nagel BJ, Pekar JJ, Peltier SJ, Petersen SE, Riedl V, Rombouts SA, Rypma B, Schlaggar BL, Schmidt S, Seidler RD, Siegle GJ, Sorg C, Teng GJ, Veijola J, Villringer A, Walter M, Wang L, Weng XC, Whitfield-Gabrieli S, Williamson P, Windischberger C, Zang YF, Zhang HY, Castellanos FX, Milham MP (2010). Toward discovery science of human brain function. Proc Natl Acad Sci U S A. **9**;107(10):4734-9.

Bona, E., A. L. Andersson, K. Blomgren, E. Gilland, M. Puka-Sundvall, K. Gustafson and H. Hagberg (1999). "Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats." Pediatr Res **45**(4 Pt 1): 500-509.

Brekke, E., H. R. Berger, M. Wideroe, U. Sonnewald and T. S. Morken (2017). "Glucose and Intermediary Metabolism and Astrocyte-Neuron Interactions Following Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rat." Neurochem Res **42**(1): 115-132.

Brekke, E., T. S. Morken and U. Sonnewald (2015). "Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain." Neurochem Int **82**: 33-41.

Brekke, E. M., T. S. Morken, M. Wideroe, A. K. Haberg, A. M. Brubakk and U. Sonnewald (2014). "The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **34**(4): 724-734.

Carmichael, S. T., K. Tatsukawa, D. Katsman, N. Tsuyuguchi and H. I. Kornblum (2004). "Evolution of diaschisis in a focal stroke model." Stroke **35**(3): 758-763.

Carrera, E. and G. Tononi (2014). "Diaschisis: past, present, future." Brain **137**(Pt 9): 2408-2422.

Choi, H., Y. K. Kim, H. Kang, H. Lee, H. J. Im, D. W. Hwang, E. E. Kim, J. K. Chung and D. S. Lee (2014). "Abnormal metabolic connectivity in the pilocarpine-induced epilepsy rat model: a multiscale network analysis based on persistent homology." Neuroimage **99**: 226-236.

Dalous, J., J. Pansiot, H. Pham, P. Chatel, C. Nadaradja, I. D'Agostino, G. Vottier, L. Schwendimann, V. Vanneaux, C. Charriaut-Marlangue, L. Titomanlio, P. Gressens, J. Larghero and O. Baud (2013). "Use of human umbilical cord blood mononuclear cells to prevent perinatal brain injury: a preclinical study." Stem Cells Dev **22**(1): 169-179.

Davidson, J. O., G. Wassink, L. G. van den Heuij, L. Bennet and A. J. Gunn (2015). "Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here?" Front Neurol **6**: 198.

de Lange, C., E. Malinen, H. Qu, K. Johnsrud, A. Skretting, O. D. Saugstad and B. H. Munkeby (2012). "Dynamic FDG PET for assessing early effects of cerebral hypoxia and resuscitation in new-born pigs." Eur J Nucl Med Mol Imaging **39**(5): 792-799.

de Paula, S., S. Greggio, D. R. Marinowic, D. C. Machado and J. C. DaCosta (2012). "The dose-response effect of acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells on brain damage and spatial memory deficits in neonatal hypoxia-ischemia." Neuroscience **210**: 431-441.

de Paula, S., A. S. Vitola, S. Greggio, D. de Paula, P. B. Mello, J. M. Lubianca, L. L. Xavier, H. H. Fiori and J. C. Dacosta (2009). "Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells." Pediatr Res **65**(6): 631-635.

Douglas-Escobar, M. and M. D. Weiss (2015). "Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician." JAMA Pediatr **169**(4): 397-403.

Duran-Carabali, L. E., E. F. Sanches, M. R. Marques, D. Aristimunha, A. Pagnussat and C. A. Netto (2017). "Longer hypoxia-ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes." Neuroscience **340**: 291-298.

Eidelberg, D. (2009). "Metabolic brain networks in neurodegenerative disorders: a functional imaging approach." Trends Neurosci **32**(10): 548-557.

Fu, Y. K., C. J. Chang, K. Y. Chen, L. C. Hwang, K. H. Wu, K. W. Chang, M. L. Jan, C. C. Chen and C. H. Chang (2009). "Imaging of regional metabolic activity by (18)F-FDG/PET in rats with transient cerebral ischemia." Appl Radiat Isot **67**(10): 1743-1747.

Fu, Y. K., C. J. Chang, K. Y. Chen, L. C. Hwang, K. H. Wu, K. W. Chang, M. L. Jan, C. C. Chen and C. H. Chang (2009). "Imaging of regional metabolic activity by (18)F-FDG/PET in rats with transient cerebral ischemia." Appl Radiat Isot **67**(10): 1743-1747.

Gao, F., S. Wang, Y. Guo, J. Wang, M. Lou, J. Wu, M. Ding, M. Tian and H. Zhang (2010). "Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of

transient cerebral ischaemia: a microPET study." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37(5): 954-961.

Greggio, S., S. de Paula, P. N. Azevedo, G. T. Venturin and J. C. Dacosta (2014). "Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxic-ischemic rats." *Life Sci* 96(1-2): 33-39.

Groenendaal, F. and L. S. de Vries (2017). "Fifty years of brain imaging in neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia." *Pediatr Res* 81(1-2): 150-155.

Hedtjarn, M., A. L. Leverin, K. Eriksson, K. Blomgren, C. Mallard and H. Hagberg (2002). "Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury." *J Neurosci* 22(14): 5910-5919.

Huang, S. Y., C. H. Chang, H. Y. Hung, Y. W. Lin and E. J. Lee (2018). "Neuroanatomical and electrophysiological recovery in the contralateral intact cortex following transient focal cerebral ischemia in rats." *Neurol Res* 40(2): 130-138.

Hughes, J. L., P. S. Jones, J. S. Beech, D. Wang, D. K. Menon, F. I. Aigbirhio, T. D. Fryer and J. C. Baron (2012). "A microPET study of the regional distribution of [11C]-PK11195 binding following temporary focal cerebral ischemia in the rat. Correlation with post mortem mapping of microglia activation." *Neuroimage* 59(3): 2007-2016.

Ivacko, J. A., R. Sun and F. S. Silverstein (1996). "Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats." *Pediatr Res* 39(1): 39-47.

James, M. L. and S. S. Gambhir (2012). "A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications." *Physiol Rev* 92(2): 897-965.

Johnston, M. V., A. Fatemi, M. A. Wilson and F. Northington (2011). "Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care." *Lancet Neurol* 10(4): 372-382.

Jung, W. B., G. H. Im, J. J. Chung, S. Y. Ahn, T. Y. Jeon, Y. S. Chang, W. S. Park, J. H. Kim, K. S. Kim and J. H. Lee (2016). "Neuroplasticity for spontaneous functional recovery after neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats observed by functional MRI and diffusion tensor imaging." *Neuroimage* 126: 140-150.

Kannan, S. and H. T. Chugani (2010). "Applications of positron emission tomography in the newborn nursery." Semin Perinatol **34**(1): 39-45.

Kerrigan, J. F., H. T. Chugani and M. E. Phelps (1991). "Regional cerebral glucose metabolism in clinical subtypes of cerebral palsy." Pediatr Neurol **7**(6): 415-425.

Kornblum, H. I., D. M. Araujo, A. J. Annala, K. J. Tatsukawa, M. E. Phelps and S. R. Cherry (2000). "In vivo imaging of neuronal activation and plasticity in the rat brain by high resolution positron emission tomography (microPET)." Nat Biotechnol **18**(6): 655-660.

Kurinczuk, J. J., M. White-Koning and N. Badawi (2010). "Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy." Early Hum Dev **86**(6): 329-338.

Levine, S. (1960). "Anoxic-ischemic encephalopathy in rats." Am J Pathol **36**: 1-17.

Lin, Y. C., T. L. Ko, Y. H. Shih, M. Y. Lin, T. W. Fu, H. S. Hsiao, J. Y. Hsu and Y. S. Fu (2011). "Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke." Stroke **42**(7): 2045-2053.

Liu, C. L., B. K. Siesjo and B. R. Hu (2004). "Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development." Neuroscience **127**(1): 113-123.

Love, C., M. B. Tomas, G. G. Tronco and C. J. Palestro (2005). "FDG PET of infection and inflammation." Radiographics **25**(5): 1357-1368.

Luo, M., Q. Li, W. Dong, X. Zhai and L. Kang (2014). "Evaluation of mild hypothermia therapy for neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy on brain energy metabolism using (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission computed tomography." Exp Ther Med **8**(4): 1219-1224.

Martinez-Biarge, M., J. Diez-Sebastian, O. Kapellou, D. Gindner, J. M. Allsop, M. A. Rutherford and F. M. Cowan (2011). "Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy." Neurology **76**(24): 2055-2061.

Matsui, T., N. Nakata, S. Nagai, A. Nakatani, M. Takahashi, T. Momose, K. Ohtomo and S. Koyasu (2009). "Inflammatory cytokines and hypoxia contribute to 18F-FDG uptake by cells involved in pannus formation in rheumatoid arthritis." J Nucl Med **50**(6): 920-926.

McKenna, M. C., S. Scafidi and C. L. Robertson (2015). "Metabolic Alterations in Developing Brain After Injury: Knowns and Unknowns." Neurochem Res **40**(12): 2527-2543.

Millar, L. J., L. Shi, A. Hoerder-Suabedissen and Z. Molnar (2017). "Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges." Front Cell Neurosci **11**: 78.

Nonose, Y., P. E. Gewehr, R. F. Almeida, J. S. da Silva, B. Bellaver, L. A. M. Martins, E. R. Zimmer, S. Greggio, G. T. Venturin, J. C. Da Costa, A. Quincozes-Santos, L. Pellerin, D. O. de Souza and A. M. de Assis (2018). "Cortical Bilateral Adaptations in Rats Submitted to Focal Cerebral Ischemia: Emphasis on Glial Metabolism." Mol Neurobiol **55**(3): 2025-2041.

Odorcyk, F. K., J. Kolling, E. F. Sanches, A. T. S. Wyse and C. A. Netto (2018). "Experimental neonatal hypoxia ischemia causes long lasting changes of oxidative stress parameters in the hippocampus and the spleen." J Perinat Med **46**(4): 433-439.

Perlman, J. M. (2004). "Brain injury in the term infant." Semin Perinatol **28**(6): 415-424.

Perlman, J. M. (2006). "Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury." Clin Ther **28**(9): 1353-1365.

Pomykala, K. L., P. A. Ganz, J. E. Bower, L. Kwan, S. A. Castellon, S. Mallam, I. Cheng, R. Ahn, E. C. Breen, M. R. Irwin and D. H. Silverman (2013). "The association between pro-inflammatory cytokines, regional cerebral metabolism, and cognitive complaints following adjuvant chemotherapy for breast cancer." Brain Imaging Behav **7**(4): 511-523.

Rice, J. E., 3rd, R. C. Vannucci and J. B. Brierley (1981). "The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat." Ann Neurol **9**(2): 131-141.

Sanches, E. F., N. S. Arteni, F. Nicola, L. Boisserand, S. Willborn and C. A. Netto (2013). "Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage." Neuroscience **237**: 208-215.

Sarnat, H. B. and M. S. Sarnat (1976). "Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study." Arch Neurol **33**(10): 696-705.

Shankaran, S. (2012). "Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy." Curr Treat Options Neurol **14**(6): 608-619.

Shi, Y., J. N. Zhao, L. Liu, Z. X. Hu, S. F. Tang, L. Chen and R. B. Jin (2012). "Changes of positron emission tomography in newborn infants at different gestational ages, and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy." Pediatr Neurol **46**(2): 116-123.

Siegel, J. S., B. A. Seitzman, L. E. Ramsey, M. Ortega, E. M. Gordon, N. U. F. Dosenbach, S. E. Petersen, G. L. Shulman and M. Corbetta (2018). "Re-emergence of modular brain networks in stroke recovery." Cortex **101**: 44-59.

Silasi, G. and T. H. Murphy (2014). "Stroke and the connectome: how connectivity guides therapeutic intervention." Neuron **83**(6): 1354-1368.

Silverstein, F. S., J. D. Barks, P. Hagan, X. H. Liu, J. Ivacko and J. Szaflarski (1997). "Cytokines and perinatal brain injury." Neurochem Int **30**(4-5): 375-383.

Sin, D. S., M. H. Kim, S. A. Park, M. C. Joo and M. S. Kim (2018). "Crossed Cerebellar Diaschisis: Risk Factors and Correlation to Functional Recovery in Intracerebral Hemorrhage." Ann Rehabil Med **42**(1): 8-17.

Smith, A. L., M. Alexander, J. J. Chrobak, T. S. Rosenkrantz and R. H. Fitch (2015). "Dissociation in the Effects of Induced Neonatal Hypoxia-Ischemia on Rapid Auditory Processing and Spatial Working Memory in Male Rats." Dev Neurosci **37**(4-5): 440-452.

Sobrado, M., M. Delgado, E. Fernandez-Valle, L. Garcia-Garcia, M. Torres, J. Sanchez-Prieto, J. Vivancos, R. Manzanares, M. A. Moro, M. A. Pozo and I. Lizasoain (2011). "Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats." Neuroimage **57**(1): 45-54.

Steinman, K. J., M. L. Gorno-Tempini, D. V. Glidden, J. H. Kramer, S. P. Miller, A. J. Barkovich and D. M. Ferriero (2009). "Neonatal watershed brain injury on magnetic resonance imaging correlates with verbal IQ at 4 years." Pediatrics **123**(3): 1025-1030.

Stretton, J., G. P. Winston, M. Sidhu, S. Bonelli, M. Centeno, C. Vollmar, R. A. Cleary, E. Williams, M. R. Symms, M. J. Koepp, P. J. Thompson and J. S. Duncan (2013). "Disrupted segregation of working memory networks in temporal lobe epilepsy." Neuroimage Clin **2**: 273-281.

Symonds, M. E. (2013). "Brown adipose tissue growth and development." Scientifica (Cairo) **2013**: 305763.

Thorngren-Jerneck, K., D. Ley, L. Hellstrom-Westas, E. Hernandez-Andrade, G. Lingman, T. Ohlsson, G. Oskarsson, E. Pesonen, A. Sandell, S. E. Strand, O. Werner and K. Marsal (2001). "Reduced postnatal cerebral glucose metabolism measured by PET after asphyxia in near term fetal lambs." J Neurosci Res **66**(5): 844-850.

Thorngren-Jerneck, K., T. Ohlsson, A. Sandell, K. Erlandsson, S. E. Strand, E. Ryding and N. W. Svenningsen (2001). "Cerebral glucose metabolism measured by positron emission tomography in term newborn infants with hypoxic ischemic encephalopathy." Pediatr Res **49**(4): 495-501.

Vaessen, M. J., J. F. Jansen, M. C. Vlooswijk, P. A. Hofman, H. J. Majoie, A. P. Aldenkamp and W. H. Backes (2012). "White matter network abnormalities are associated with cognitive decline in chronic epilepsy." Cereb Cortex **22**(9): 2139-2147.

van de Looij, Y., A. Chatagner, P. S. Huppi, R. Gruetter and S. V. Sizonenko (2011). "Longitudinal MR assessment of hypoxic ischemic injury in the immature rat brain." Magn Reson Med **65**(2): 305-312.

van de Looij, Y., J. M. Dean, A. J. Gunn, P. S. Huppi and S. V. Sizonenko (2015). "Advanced magnetic resonance spectroscopy and imaging techniques applied to brain development and animal models of perinatal injury." Int J Dev Neurosci **45**: 29-38.

Vannucci, R. C. (2000). "Hypoxic-ischemic encephalopathy." Am J Perinatol **17**(3): 113-120.

Vannucci, R. C., D. T. Lyons and F. Vasta (1988). "Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats." Stroke **19**(2): 245-250.

Vannucci, R. C. and S. J. Vannucci (2005). "Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model." Dev Neurosci **27**(2-4): 81-86.

Vannucci, S. J. and H. Hagberg (2004). "Hypoxia-ischemia in the immature brain." J Exp Biol **207**(Pt 18): 3149-3154.

Vexler, Z. S. and D. M. Ferriero (2001). "Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury." Semin Neonatol **6**(2): 99-108.

Volpe, J. J. (2012). "Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy." Ann Neurol **72**(2): 156-166.

Wang, J., F. Chao, F. Han, G. Zhang, Q. Xi, J. Li, H. Jiang, J. Wang, G. Yu, M. Tian and H. Zhang (2013). "PET demonstrates functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat model of cerebral ischemic injury." J Nucl Med **54**(5): 785-792.

Wixey, J. A., H. E. Reinebrant and K. M. Buller (2011). "Inhibition of neuroinflammation prevents injury to the serotonergic network after hypoxia-ischemia in the immature rat brain." J Neuropathol Exp Neurol **70**(1): 23-35.

Yao, Z., B. Hu, X. Chen, Y. Xie, J. Gutknecht and D. Majoe (2018). "Learning Metabolic Brain Networks in MCI and AD by Robustness and Leave-One-Out Analysis: An FDG-PET Study." Am J Alzheimers Dis Other Dement **33**(1): 42-54.

Yoon, B. H., J. K. Jun, R. Romero, K. H. Park, R. Gomez, J. H. Choi and I. O. Kim (1997). "Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy." Am J Obstet Gynecol **177**(1): 19-26.

Zanirati, G., P. N. Azevedo, G. T. Venturin, S. Greggio, A. M. Alcara, E. R. Zimmer, P. K. Feltes and J. C. DaCosta (2018). "Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture." Epilepsia **59**(5): 923-934.

Zimmer, E. R., M. J. Parent, D. G. Souza, A. Leuzy, C. Lecrux, H. I. Kim, S. Gauthier, L. Pellerin and E. Hamel (2017). "[¹⁸F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport." **20**(3): 393-395.

8. ANEXO – ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

Elsevier Editorial System(tm) for
Experimental Neurology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: In vivo microPET-FDG imaging of neuroplasticity in the brains of adult rats subjected to neonatal hypoxia ischemia

Article Type: Research Paper

Section/Category: Regeneration and Plasticity

Keywords: neuronal plasticity; microPET; 18F-FDG; neonatal hypoxia ischemia; metabolic brain network

Corresponding Author: Dr. Samuel Greggio, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Brain Institute

First Author: Pamella N Azevedo

Order of Authors: Pamella N Azevedo; Gabriele G Zanirati; Gianina T Venturin; Guilherme G Schu; Luz E Durán-Carabali; Felipe K Odorcyk; Andrey V Soares; Gabriela O Laguna; Carlos A Netto; Eduardo R Zimmer; Jaderson C DaCosta; Samuel Greggio, Ph.D.

**In vivo microPET-FDG imaging of neuroplasticity in the brains of adult rats
subjected to neonatal hypoxia ischemia**

Pamella Nunes Azevedo^{1,3}, Gabriele Zanirati^{2,3}, Gianina Teribele Venturin⁴, Guilherme Garcia Schu⁵, Luz Elena Durán-Carabali⁵, Felipe Kawa Odorcyk⁵, Andrey Vinicius Soares⁵, Gabriela de Oliveira Laguna², Carlos Alexandre Netto⁵, Eduardo R Zimmer^{5,6,7,8}, Jaderson Costa da Costa^{1,2,3,4} and Samuel Greggio^{4*}

1Graduate Program in Medicine and Health Sciences, 2Graduate Program in Pediatrics and Child Health, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil

3Laboratory of Neuroscience, 4Preclinical Research Center, Brain Institute (BraIns) of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

5Department of Biochemistry, 6Department of Pharmacology, 7Graduate Program in Biological Sciences: Biochemistry, 8Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author: Samuel Greggio. Address: Preclinical Research Center, Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 63, sala 140, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone number: +55 51 3320-5969 E-mail address: samuel.greggio@pucrs.br

Abstract

Background and purpose: Hypoxia and cerebral ischemia (HI) events are capable of triggering important changes in brain metabolism, including glucose metabolism abnormalities, which may be related to the severity of the insult. Using positron emission microtomography (microPET) with [18F]fluorodeoxyglucose (18F-FDG), this study proposes to assess abnormalities of brain glucose metabolism in adult rats previously submitted to the neonatal HI model. We hypothesize that cerebral metabolic outcomes will be associated with cognitive deficits and magnitude of brain injury.

Methods: Seven-day-old rats were subjected to an HI model, induced by permanent occlusion of the right common carotid artery and systemic hypoxia. 18F-FDG-microPET was used to assess regional and whole brain glucose metabolism in rats at 60 postnatal days (PND 60). An interregional cross-correlation matrix was utilized to construct metabolic brain networks (MBN). Rats were also subjected to the Morris Water Maze (MWM) to evaluate spatial memory and their brains were processed for volumetric evaluation.

Results: Brain glucose metabolism changes were observed in adult rats after neonatal HI insult, limited to the right brain hemisphere. However, not all HI animals exhibited significant cerebral hypometabolism. Hippocampal glucose metabolism was used to stratify HI animals into HI hypometabolic (HI-h) and HI non-hypometabolic (HI non-h) groups.

The HI-h group had drastic MBN disturbance, cognitive deficit, and brain tissue loss, concomitantly. Conversely, HI non-h rats had normal brain glucose metabolism and brain tissue preserved, but also presented MBN changes and spatial memory impairment. Furthermore, data showed that brain glucose metabolism correlated with cognitive deficits and brain volume outcomes.

Conclusions: Our findings provide a novel approach to assessing the neuroplasticity of adult rats subjected to neonatal hypoxic ischemia, using in vivo imaging microPET-FDG. The MBN analyses identified glucose metabolism abnormalities in HI non-h animals, which were not detected by conventional 18F-FDG standardized uptake value (SUVr) measurements. These animals exhibited a metabolic brain signature that may explain the cognitive deficit even with no identifiable brain damage.

Key words: neuronal plasticity, microPET, 18F-FDG, neonatal hypoxia ischemia, metabolic brain network

INTRODUCTION

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HI) is the most common cause of mortality and chronic neurological morbidity in infants. HI affects about 26 out of every 1000 live births, leading to permanent neurological disabilities (Kurinczuk et al., 2010). Despite considerable advances in neonatal care, clinical management of asphyxiated children is limited to supportive measures and there are few options for preventing or interrupting brain injury mechanisms (Johnston et al., 2011; Shankaran, 2012).

In this scenario, experimental models are important tools for investigation of new approaches to obtaining better understanding of the pathophysiological features of children affected by HI. The Rice-Vannucci HI rodent model mimics multiple injury mechanisms and neurological impairments that are reported in affected children (Rice et al., 1981). In humans and in animal models, the severity and distribution of neuropathological injuries are directly related to factors such as duration of insult, age, and genetic background. Despite the controlled conditions for induction of HI in rodents, the literature contains

divergent descriptions of the extent of brain damage and also of presence or absence of motor and cognitive impairments (Millar et al., 2017; Durán-Carabali et al., 2017; Netto et al., 2017; Sanches et al., 2015; De Paula et al., 2009; Lubics et al., 2005). These discrepancies have been attributed to the neuroplasticity of the immature brain leading to spontaneous recovery (Jung et al., 2016).

The main mechanisms attributed to neonatal HI neuropathology are reduced supply of oxygen or glucose to the brain tissue. Drastic reduction of cerebral blood flow leads to a cascade of irreversible harmful effects in the newborn brain (Brekke et al., 2014; McKenna et al., 2015). Cerebral metabolic changes associated with HI brain injury have been reported in animal models of neonatal HI (Malisza et al., 1999; Vial et al., 2004; Sanches et al., 2018). In this context, high-resolution small-animal positron emission microtomography (microPET), with [18F]fluorodeoxyglucose (18F-FDG), provides an interesting tool to investigate in vivo changes in brain glucose metabolism in the HI model. Here, we aimed to evaluate whether neonatal HI causes persistent changes to brain glucose metabolism in adult rats and whether these changes are associated with behavioral and histological outcomes.

MATERIAL AND METHODS

Animals

All experimental procedures were performed with the approval of the Animal Care and Ethics Committee at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil (Protocol number: 31939). All experimental practices comply with international standards for experimentation with laboratory animals and were carried out taking all necessary measures to reduce to the maximum the number of animals used and their suffering. Male Wistar rats were used for the experimental procedures despite the higher vulnerability to HI insult. The litters were standardized to 8-10 neonate rats and kept in standard cages, under controlled environmental conditions – temperature of 23 °C ± 1 °C and 12 h dark-light cycle with food and water ad libitum. Thirty-four rats were randomly allocated to the experimental groups: control group (sham, n = 12) and hypoxic-ischemic group (HI, n = 22). The day of birth was considered postnatal day zero (PND 0).

Neonatal hypoxia-ischemia model

The HI model used in the present study was first described by Levine (1960) and modified by Rice et al. (1981). Seven day-old Wistar rats were anesthetized with isoflurane (3-4% for induction and 2-3% for maintenance) and the right common carotid artery was permanently occluded with 4.0 surgical silk threads. After total recovery from anesthesia, the animals were returned to their home cages for a feeding period for 2 h. At the end of this period, pups were exposed to a hypoxic environment (8% oxygen and 92% nitrogen) for 60 min. The hypoxia chamber was partially immersed in warm water to maintain a constant temperature within physiological limits (at 36-37 °C). Following hypoxic exposure, pups were returned to their home cages. Sham operated rats underwent the same surgical procedure. However, they were not subjected to carotid occlusion or to the hypoxic environment (Greggio et al., 2014; Odorczyk et al., 2018).

¹⁸F-FDG microPET scan

MicroPET scans were conducted at the Preclinical Research Center at the Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns). Rats underwent imaging examination at PND 60, 53 days post-HI induction, after 12-24 h fasting. The animals were anesthetized individually using a mixture of isoflurane and oxygen (3-4% induction and 2-3% maintenance), and 1 mCi of ¹⁸F-FDG was administered intraperitoneally (Zanirati et al., 2018). The animals were returned to the home cage for a 40-minute period of conscious tracer uptake and were placed on a heat plate to maintain the body temperature at 36 ± 1°C. After the uptake period, the rats were placed in a supine position on the heated bed of the equipment (Triumph microPET, LabPET-4, TriFoil Imaging, Northridge, CA, USA). Static acquisition was conducted under inhaled anesthesia for 10 minutes with the field of view (FOV: 3.75 cm) centered on the rat's head (Zanirati et al., 2018).

Image reconstruction and data analysis

An exploratory analysis of glucose metabolism was performed in the whole brain and 24 brain regions bilaterally (auditory, cingulate, entorhinal, frontal, insular, medial prefrontal (MPF), motor, orbitofrontal, parietal, retrosplenial, somatosensory, and visual cortices, nucleus accumbens core shell, amygdala, striatum, hippocampus, olfactory apparatus, hypothalamus, thalamus, superior colliculus, midbrain, ventral tegmental area (VTA), inferior colliculus, and cerebellum). All images were reconstructed using a 3-dimensional maximum likelihood expectation maximization (3D-MLEM) algorithm with 20 iterations. Each reconstructed brain image was spatially normalized using an 18F-FDG brain image template with PMOD 3.5 software and the Fusion toolbox (PMOD Technologies, Zurich, Switzerland). A magnetic resonance imaging (MRI) rat brain voxel of interest (VOI) template was used to overlay the normalized, previously co-rotated images to the microPET imaging database, and 24 VOIs were used. 18F-FDG uptake in whole brain and in all brain regions was normalized by the pons and expressed as relative standardized uptake value (SUVr) (Zanirati et al., 2018).

Metabolic brain network construction

Regional brain SUVr values were used for metabolic brain network (MBN) analyses. Symmetrical matrices were constructed using 12 VOIs (amygdala, striatum, auditory cortex, entorhinal cortex, insular cortex, parietal cortex, motor cortex, retrosplenial cortex, somatosensory cortex, hippocampus, olfactory apparatus, and thalamus; 24/24 matrices). The MBNs were constructed using Pearson's cross-correlation coefficients and corrected by false discovery ratio (FDR) (Zanirati et al., 2018; Zimmer et al., 2017). These MBNs were bootstrapped (10000 bootstrap samples) and for each bootstrap sample, the following graph theoretical measures were calculated to compare the networks' matrices: assortativity coefficient, global efficiency, and average clustering coefficient (Rubinov and Sporns, 2010).

Morris Water Maze learning task

The Morris water maze (MWM) was used to evaluate spatial memory at PND 65, as described previously (Durán-Carabali et al., 2017; Greggio et al., 2014). The spaced training protocol was performed for 5 successive days. On each day, the rats underwent 4 consecutive training trials and a hidden platform was kept in a constant location in the target quadrant. A different starting location was used in each trial, consisting of a swim followed by a 30-s platform sit. The experimenter guided rats that did not find the platform within 60 s. On the sixth day, a probe trial was performed for memory retention evaluation with the platform absent. The following variables were considered and recorded with ANY-MAZE software (Stoelting Co, Wood Dale, IL, USA): total distance travelled, latency to the previous platform location and time spent in the target quadrant.

Histological analysis

At PND 70, the animals were euthanized for histological analyses. Rats were anesthetized with a lethal dose of thiopental sodium (100 mg/kg) and subjected to transcardiac perfusion with 0.9% saline solution followed by 4% formaldehyde solution through the left cardiac ventricle. The brains were removed from the skull and kept in formaldehyde solution for at least 24 h, after which the samples were cryoprotected with sucrose solution (30%). Brains were cut on a cryostat into serial 30- μ m slices. The cortex, striatum, and hippocampus were identified using the rat brain atlas and the Cavalieri method was used for structural volume measurements as previously described (Alles et al., 2010).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using PrismGraph 6.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were analyzed using student's t test with Welch's corrections or 1-way or 2-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction. Data were expressed as mean and standard deviation (SD) or standard error (SEM) and a significance level of $P < 0.05$ was considered statistically significant for all variables.

Pearson's correlation coefficient was used to assess associations within MBN corrected by false discovery rate (FDR) and between brain 18F-FDG metabolism (SUVr values) and cognitive impairments or brain volume.

RESULTS

Glucose hypometabolism is limited to the ipsilateral brain hemisphere in HI rats at 53 days post-HI insult

For quantification of ^{18}F -FDG brain metabolism, the HI and control animals underwent a microPET-FDG scan at PND 60, corresponding to 53 days after HI brain insult. As Figure 1A shows, we identified a subtle decrease in whole-brain glucose metabolism for HI animals compared to the sham group ($p = 0.02$). Additionally, we found a significant decrease in brain glucose metabolism limited to the ipsilateral hemisphere in the HI rats ($p = 0.007$, sham R vs HI R; and $p = 0.005$, HI L vs HI R; Figure 1B). There were no differences between the left hemispheres of sham and HI groups or between left and right brain hemispheres in the sham animals. Figure 1 shows HI rats had reduced right hemisphere ^{18}F -FDG metabolism in the whole cerebral cortex ($p = 0.005$, sham R vs HI R; and $p = 0.005$, HI L vs HI R; Figure 1C), the striatum ($p = 0.0065$, sham R vs HI R; and $p = 0.0017$, HI L vs HI R; Figure 1D), and the hippocampus ($p = 0.005$, sham R vs HI R; and $p < 0.0001$, HI L vs HI R; Figure 1E). There were no differences between sham and HI groups in the contralateral hemisphere for whole brain, whole cortex, striatum, or hippocampus.

Figure 1. Changes in whole brain and regional brain glucose metabolism in hypoxic ischemic adult rats. Graphs illustrate changes in ^{18}F -FDG SUVr in sham and HI animals, at PND 60, 53 days post-HI neonatal insult, for the A) whole brain, B) cerebral hemispheres, C) whole cortex, D) striatum and, E) hippocampus. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs sham R and ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ vs HI L according to Bonferroni's post hoc after 1-way ANOVA. Data are expressed as mean $\pm$ SD, $n = 12$, sham group and $n = 22$, HI group. L, left; and R, right

When the whole cortex was analyzed, we noted significant hypometabolism in the right hemisphere (Figure 1). However, when the individual cortices were studied separately, only auditory, entorhinal, insular, parietal, somatosensory, and visual cortices were hypometabolic in the ipsilateral hemisphere, when compared with the same structures on the contralateral side of the brain. Similarly, the glucose metabolism was decreased in the right hemisphere, when compared to sham animals, for the following structures: auditory core, amygdala, hypothalamus, superior colliculus, inferior colliculus, and thalamus. There were

no changes in ^{18}F -FDG metabolism for cingulate, frontal, MPF, motor, orbitofrontal, retrosplenial, and olfactory cortices, midbrain, VTA, or cerebellum (Supplementary figure 1). Additionally, SUVr means $\pm$ SDs and p values for all brain regions evaluated are described in supplementary tables 1 and 2.

Intrinsic variability of the Rice-Vannucci model: a significant part of HI animals exhibited no changes to brain glucose metabolism

Furthermore, considering the intrinsic variability of the Rice-Vannucci HI model, an additional analysis was conducted. After the microPET imaging analysis, HI animals were divided into two subgroups at PND 60: HI animals that did not exhibit glucose metabolism changes in the right hippocampus (HI non-hypometabolic: HI non-h group; ^{18}F -FDG-SUVr $\geq$ 1.19) and animals that did exhibit hypometabolism in the right hippocampus (HI hypometabolic: HI h group; ^{18}F -FDG-SUVr $<$ 1.19). The cutoff criterion was determined based on SUVr calculated for the right hippocampus of adult sham animals (^{18}F -FDG-SUVr mean $\pm$ SD = 1.24 ± 0.05). We defined the cutoff value as the mean SUVr minus one SD. Glucose metabolism of the hippocampus ipsilateral to the carotid artery occlusion was used as the cutoff criterion since the hippocampi are widely related to HI pathophysiology leading to cognitive impairments (Alexander et al., 2014; Greggio et al., 2014; de Paula et al., 2009).

A significant portion of the adult animals subjected to neonatal HI presented a baseline ^{18}F -FDG uptake in the right hippocampus (40.9%, HI non-h group, n = 9/22) similar to sham animals. However, the remaining HI animals (59.1%, HI h group, n = 13/22), exhibited hippocampal hypometabolism according to the cutoff criterion. There was accentuated whole brain hypometabolism in the HI h group compared to both sham and HI non-h groups (p = 0.0008 and p = 0.002, respectively; Figure 2B and C). Therefore, the whole brain glucose metabolism reanalysis demonstrated that stratification of HI rats was effective for separating the animals that had marked changes in brain metabolism from those that did not.

Once again, glucose hypometabolism was limited to the ipsilateral brain hemisphere in HI h rats, but not in the HI non-h group, 53 days post-HI insult. Additionally, HI h animals also

exhibited glucose hypometabolism in the whole cerebral cortex and striatum ($p < 0.0001$ vs Sham R, HI non-h R, and HI h L; Figure 2E and F). Detailed values for hippocampus ^{18}F -FDG uptakes can be seen in the Figure 2G.

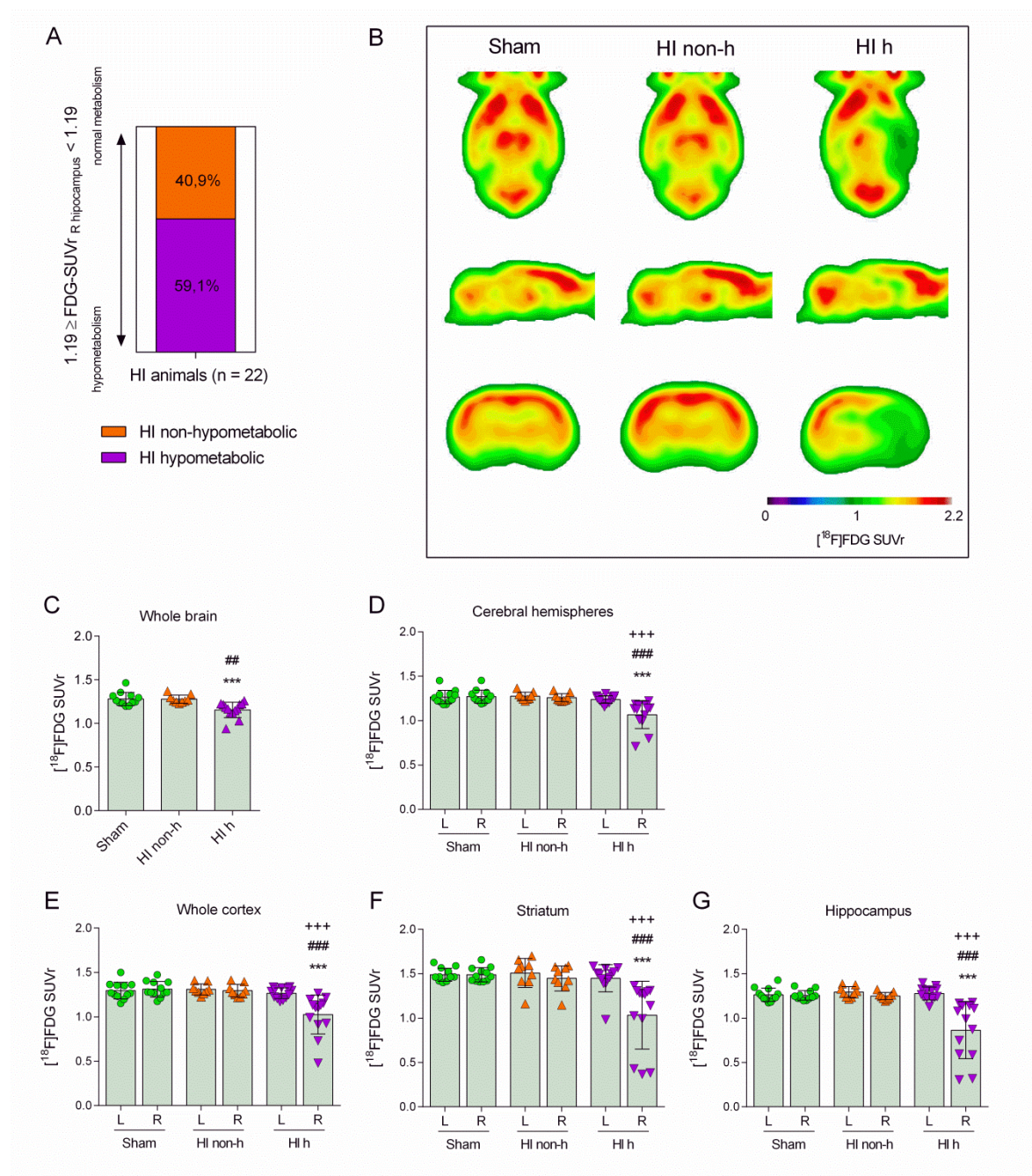


Figure 2. Brain glucose metabolism variability in adult rats after neonatal HI model. A) HI animals were divided into two sub-groups based on a sham ^{18}F -FDG SUVr value of R hippocampus into HI non-hypometabolic or HI hypometabolic. B) The image above shows

mean ^{18}F -FDG uptake in the brain for each experimental group (sham, HI non-h, and HI h) at 53 days post-HI induction. ^{18}F -FDG metabolism is illustrated in transverse (top), sagittal (middle), and coronal (bottom) views. Hot colors (shades of red) indicate higher FDG uptake and cold colors (shades of blue) lower uptake. C) The graphs illustrate brain glucose metabolism differences between groups for the whole brain, D) cerebral hemispheres, E) whole cortex, F) striatum, and G) hippocampus. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs sham R; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, and ### $p < 0.001$ vs HI non-h R; and + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ vs HI h L according to Bonferroni's post hoc after 1-way ANOVA. Data are expressed as mean $\pm$ SD. $n = 12$ to sham, $n = 9$ to HI non-hypometabolic, and $n = 13$ to HI hypometabolic group. HI non-h, HI non-hypometabolic; HI h, hypometabolic; L, left; R, right.

Furthermore, in an exploratory analysis of the right brain hemisphere, there was hypometabolism in the auditory, entorhinal, motor, insular, parietal, somatosensory, retrosplenial, and visual cortices. Glucose metabolism in the right hemisphere was also reduced in the abc core, amygdala, hypothalamus, superior colliculus, and thalamus, when compared to the left hemisphere regions of sham, HI non-h, and HI h groups. To a lesser extent, glucose metabolism was also altered in the cingulate cortex, olfactory cortex, VTA, and inferior colliculus. There were no glucose metabolism changes in the frontal, MPF, orbitofrontal, and olfactory cortices, midbrain, or cerebellum (supplementary Figure 2). For further data, SUVr means $\pm$ SDs and p values for all brain regions evaluated are described in supplementary tables 3 and 4.

The MBN architecture was altered in adult rats previously subjected to neonatal HI

Another important aspect of this study was evaluation of the MBN. The sham group was used to represent an expected MBN (Figure 3A). Interestingly, HI non-h animals exhibited changes to the MBN architecture, with a substantial decrease in the number of connections compared to the sham group (Figure 3B). In contrast, HI h animals had increased correlations compared to the HI non-h group. Specifically in the matrix of HI h group, there was a localized increase in positive correlations between regions in the ipsilateral

hemisphere and an increase in negative correlations between left and right hemisphere regions (Figure 3C). Graph theoretical measures revealed consistent reorganization in the MBN in both HI non-h and HI h groups, with lower global efficiency, assortativity coefficient, and average clustering coefficient, compared to the sham group ($p < 0.0001$ vs sham, Figure 3D, E and F respectively).

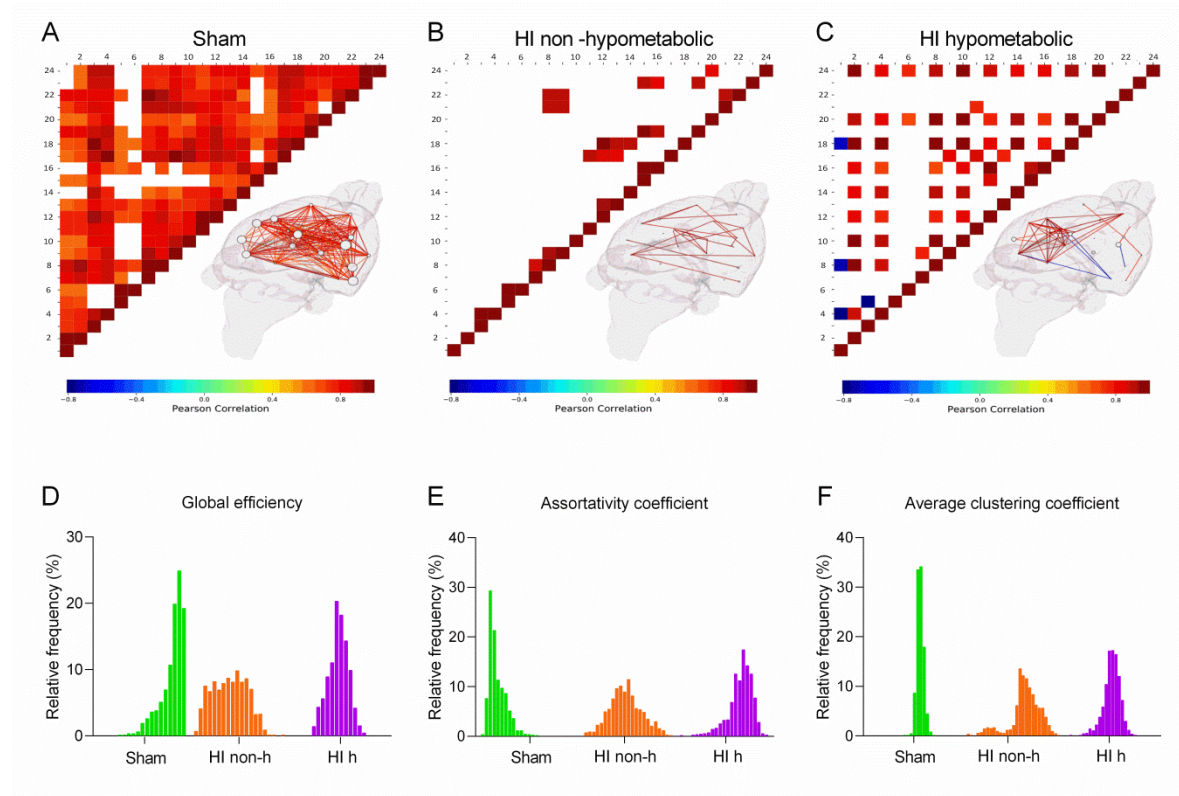


Figure 3. Alterations in MBN architecture in adult rats previously subjected to the neonatal HI model. A) Cross-correlation matrices and 3D brain assessed by Pearson correlation representing the brain metabolic network with brain region associations for sham group, B) HI non-h, and C) HI-h groups for the following regions: 1- L amygdala, 2- R amygdala, 3- L striatum, 4- R striatum, 5- L auditory cortex, 6- R auditory cortex, 7- L entorhinal cortex, 8- R entorhinal cortex, 9- L insular cortex, 10- R insular cortex, 11- L parietal cortex, 12- R parietal cortex, 13- L motor cortex, 14- R motor cortex, 15- L retrosplenial cortex, 16- R retrosplenial cortex, 17- L somatosensory cortex, 18- R somatosensory cortex, 19- L hippocampus, 20- R hippocampus, 21- L olfactory apparatus, 22- R olfactory apparatus, 23- L thalamus, and 24- R thalamus. Hot colors indicate positive correlations (shades of red) and cold colors indicate negative correlations (shades of blue). No correlations are indicated by white color (white= 0). D) Theoretical graph measures of the metabolic brain

network matrices are represented in the graphs related to global efficiency, E) assortativity coefficient, and F) average clustering coefficient. $n = 12$ for sham, $n = 9$ for HI non-hypometabolic, and $n = 13$ for HI hypometabolic group. HI non-h, HI non-hypometabolic; and HI h, HI hypometabolic; L, left; R, right.

Spatial memory acquisition of adult rats previously subjected to neonatal HI is correlated to brain glucose metabolism

At DPN 65, the animals were tested for spatial memory and learning with the MWM. To evaluate long-term spatial memory, animals underwent training sessions on 5 consecutive days. Throughout all of the learning acquisition sessions, sham animals had superior performance when compared to HI non-h and HI h groups. The mean latency for escape to the platform decreased as training progressed and there was a significant difference between the sham and HI groups from the third day of training sessions until the end of training sessions (3rd-day, $p = 0.0321$ vs HI non-h and $p < 0.0001$ vs HI h; 4th-day, $p = 0.0327$ vs HI non-h and $p < 0.0001$ vs HI h; and 5th-day, $p = 0.0230$ vs HI non-h and $p < 0.0001$ vs HI h; Figure 4A). In contrast, neither HI group exhibited significant reductions in escape to the platform latency over the following sessions (Figure 4A). The area under the curve (AUC) of MWM learning acquisition curves demonstrated that HI h and HI non-h groups had poorer performance than sham animals ($p = 0.0294$, sham vs HI non-h; $p < 0.0001$, sham vs HI h; and $p = 0.2540$ HI non-h vs HI h, Figure 4B). There were no differences between HI h and HI non-h groups in the learning acquisition sessions (Figure 4B). Additionally, there were no differences between the experimental groups related to the total distance travelled in the probe trial, revealing that there were no limiting motor impairments (Figure 4C). Both HI h and HI non-h showed increased escape latency ($p = 0.0185$ and $p = 0.0307$, respectively; Figure 4D) and less time spent in the target quadrant ($p = 0.0297$ and $p = 0.0079$; Figure 4E) compared to the sham group. Figure 4F shows a plot illustrating probe trial performance for each experimental group.

The AUC of MWM learning acquisition curves and ^{18}F -FDG uptake values were used to assess whether changes in brain glucose metabolism were correlated with cognitive deficits in HI animals. There were negative correlations between the glucose metabolism and the

cognitive impairments for the experimental groups in most of the brain regions evaluated. There were weak negative correlations for the right hemisphere ($r = -0.3757$, $p = 0.028$; Figure 4G), right cortex ($r = -0.3993$, $p = 0.019$; Figure 4H), and right hippocampus ($r = -0.3979$, $p = 0.019$; Figure 4J). In contrast, there was no correlation between right striatum metabolism and cognitive deficits ($r = -0.3011$, $p = 0.083$; Figure 4I).

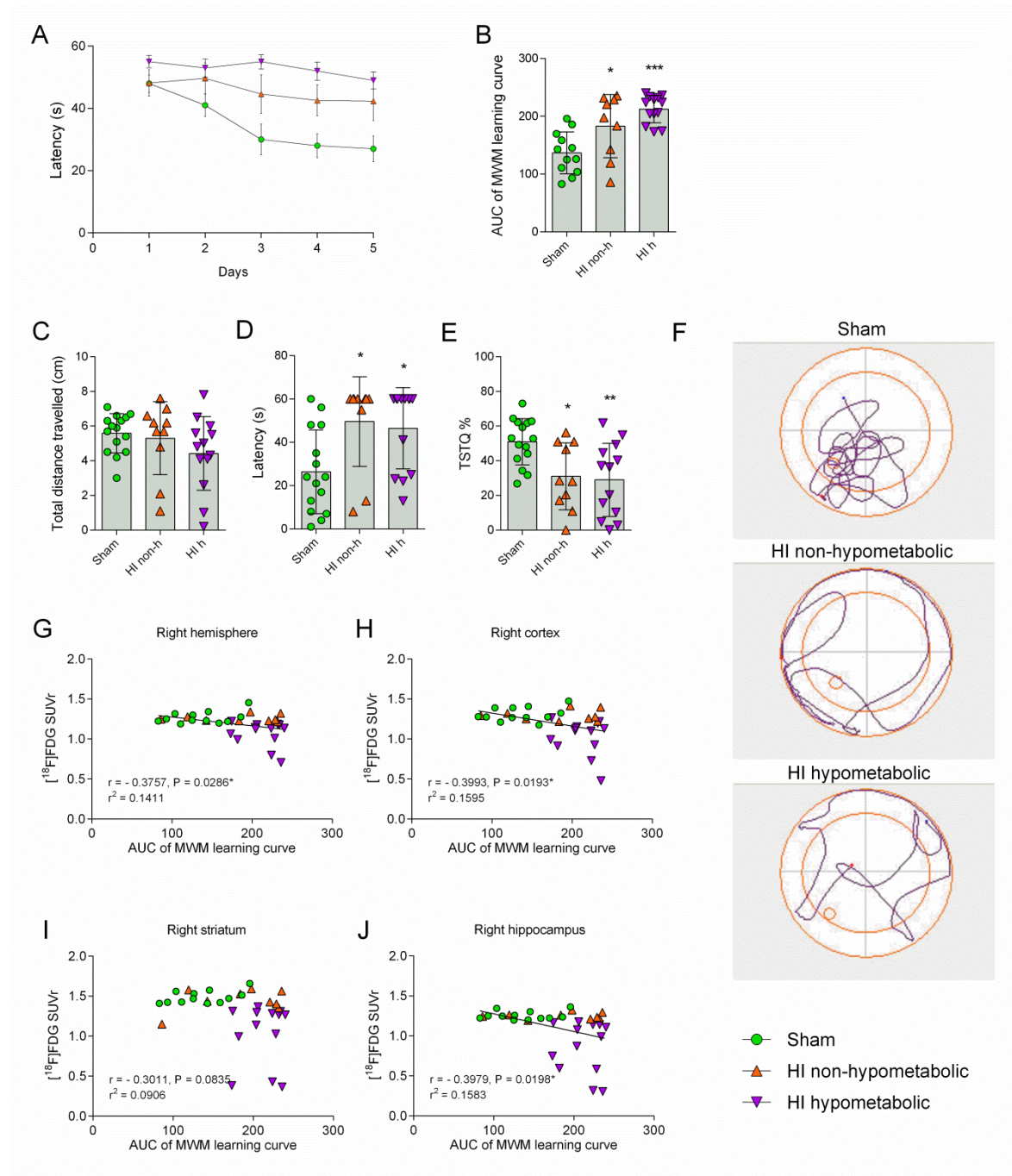


Figure 4. Long-term cognitive impairments in spatial memory task correlated with the brain glucose metabolism of adult HI rats. A) The graphs represent the spatial memory acquisition curve and the respective B) AUC of MWM performance. C) The following graphs are related to the total distance travelled, D) the escape latency and, E) the time spent in the target quadrant in the probe trial. F) Images show a representative plot of probe performance for each experimental group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs sham group according to Bonferroni's post hoc test after 2-way and 1-way ANOVA, respectively. Data are expressed as mean $\pm$ SD. G) Graphs show Pearson's coefficients for correlations between brain glucose metabolism and AUC of MWM learning curve for R hemisphere, H) R cortex, I) R striatum, and J) R hippocampus. $n = 12$ to sham, $n = 9$ to HI non-hypometabolic, and $n = 13$ to HI hypometabolic groups. HI non-h, HI non-hypometabolic and HI h, hypometabolic.

In the supplementary analysis, we found moderate negative Pearson correlation coefficients for the following right hemisphere structures: auditory cortex, parietal cortex, retrosplenial cortex, visual cortex, amygdala, hypothalamus, and VTA, and weak negative correlations for the insular cortex, somatosensory cortex, nucleus accubens, superior colliculus, and inferior colliculus (supplementary figure 3). There was no correlation between spatial learning ability and glucose metabolism for the following right brain regions: cingulate cortex, entorhinal cortex, frontal cortex, MPF cortex, motor cortex, orbitofrontal cortex, olfactory cortex, midbrain, and cerebellum (supplementary figure 3).

Loss of brain volume induced by neonatal HI is restricted to the ipsilateral brain hemisphere and correlates with brain glucose metabolism

Histological brain analysis using the Cavalieri method was conducted after microPET-FDG scans and the MWM task. Morphological examination of rat brain slices showed no change in the cerebral hemisphere volumes for any of the experimental groups (Figure 5A). However, 1-way ANOVA with Bonferroni correction, showed a significant volume decrease in the right hemisphere for the HI h group when compared to sham ($p = 0.010$; Figure 5A). Regional brain analysis of whole cortex, striatum, and hippocampus showed

volume differences between right and left hemisphere only for HI h animals ($p = 0.025$, Figure 5B; $p < 0.0001$, Figure 5C; and $p = 0.001$, Figure 5D respectively). Additionally, there was accentuated brain tissue loss in the right hemisphere volume for these regions in HI h rats in comparison to the sham group ($p = 0.0012$, sham R cortex vs HI h R cortex; $p = 0.0005$, sham R striatum vs HI h R striatum; and $p < 0.0001$, sham R hippocampus vs HI h R hippocampus; Figure 5B, C, and D). There were no significant differences in the right and left hemisphere brain volumes or structures for sham or HI non-h groups or between these two groups (Figure 5A, B, C, and D).

Pearson's correlation coefficient was employed to verify the relationship between brain metabolic changes and loss of brain volume in the HI model. We found moderate positive correlations for all regions evaluated, as follows: right hemisphere ($r = 0.48998$, $p = 0.0038$; Figure 5E), right cortex ($r = 0.4537$, $p = 0.0080$; Figure 5F), right striatum ($r = 0.5900$, $p = 0.0003$; Figure 5G), and right hippocampus ($r = 0.5871$, $p = 0.0003$; Figure 5H). Figure I shows a visual correlation between brain metabolism and brain tissue volume.

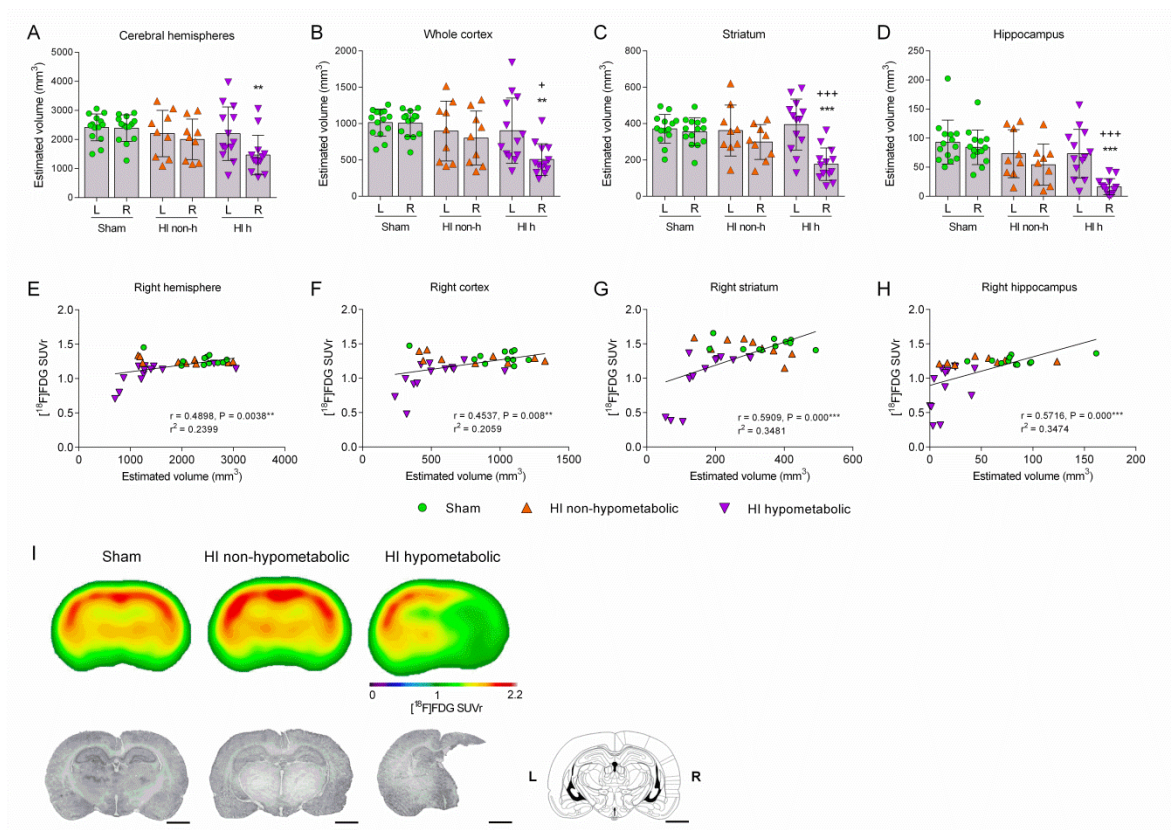


Figure 5. Brain tissue loss in adult rats after neonatal HI model is correlated with cerebral ^{18}F -FDG metabolism. A) Estimated brain volumes of the left and right hemispheres, B) cortex, C) striatum, and D) hippocampus. E) Graphs below show Pearson's coefficients for correlations between brain glucose metabolism and brain volume for hemisphere, F) cortex, G) striatum, and H) hippocampus. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs sham R and + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ and +++ $p < 0.001$ vs HI h L according to Bonferroni's post hoc test after 1-way ANOVA. I) Visual representation of brain metabolism correlation with brain volume. The following columns represents FDG-PET scan means from each group and, below, digitalized images of the rat brains corresponding to the coronal sections from sham, HI non-h, and HI-h groups, respectively. The last column shows a correspondent schematic drawing from Paxinos and Watson's atlas. $n = 12$ for sham, $n = 9$ for HI non-hypometabolic, and $n = 13$ for HI hypometabolic groups. HI non-h, HI non-hypometabolic; HI h, hypometabolic; L, left; R, right.

DISCUSSION

The aim of the present study was to evaluate in vivo changes in the cerebral glucose metabolism and MBN of adult rats after induction of a neonatal HI model. Here, we demonstrated changes in brain glucose metabolism restricted to the hemisphere ipsilateral to carotid artery occlusion. Additionally, confirming the neuroplastic variability of the HI model, we showed that 40.9% of HI rats (HI non-h group) exhibited no changes in brain glucose metabolism or in brain tissue volume by post-mortem histological analysis. However, the remaining 59.1% of HI animals (HI h group) showed a marked brain hypometabolism and reduced brain volume in the ipsilateral hemisphere for most of the brain regions evaluated. Interestingly, all HI animals developed cognitive impairments and showed aberrant MBN architecture in the adult phase after neonatal HI insult.

It is known that some brain regions are more susceptible to HI damage and are widely reported in the pathophysiology of clinical and experimental HI (Biran et al., 2012; Kannan and Chugani, 2010; Wixey et al., 2011; Batista et al., 2007; Liu et al., 2004; Vannucci et al., 1988). It has also been shown that glucose metabolism is significantly lower in severe than in mild and medium hypoxic-ischemic neonates (Shi et al., 2012). Batista et al.

reported that early transitory hypermetabolism followed by permanent hypometabolism in the striatum and thalamus seems to be related to prognosis of cerebral palsy in newborns affected by HI (Batista et al., 2007). Preclinical studies showed acute and chronically persistent hypometabolism in the ipsilateral hemisphere after brain ischemia in adult rats (Li et al., 2013; Hyun et al., 2011; Gao et al., 2010). Furthermore, cellular death in the ipsilateral hippocampus has been associated with both necrosis and apoptosis mechanisms in neonatal HI rats (Liu et al., 2004). We did indeed observe accentuated glucose hypometabolism at 53 days after HI insult, in the right hippocampus, right striatum, right thalamus and right auditory, parietal, insular, retrosplenial, somatosensory, and visual cortices. Additionally, we found severe hypometabolism in other structures in the right hemisphere, such as the acb core, amygdala, hypothalamus, superior colliculus, VTA, and inferior colliculus. To a lesser extent, metabolism was also altered in the right cingulate cortex, motor cortex, and midbrain. Nonetheless, no changes were found in the frontal cortex, MPF cortex, orbitofrontal cortex, or cerebellum. Despite this, in previous studies the frontal cortex has been related with increased neuroinflammation and decreased cerebral blood flow in neonatal HI models (Wixey et al., 2011; Sizonenko et al., 2003; Vannucci et al., 1988). It is possible that the reason that frontal cortices did not exhibit decreased glucose metabolism in the present study is related to their anatomical location, remote from the ischemic area, suffering only the consequences of hypoxia. Hypoxia alone would not be sufficient to cause persistent and significant metabolic changes lasting to adulthood. The cerebellum also appears to be highly susceptible to hypoxic-ischemic damage, because of the vulnerability of Purkinje cells to this condition. Purkinje cell death in the cerebellum was observed at least 20 days after HI brain injury (Biran et al., 2012). However, in the present study, at 53 days after induction of HI brain injury, there was no alteration in cerebellar metabolism.

Additionally, we used microPET analysis to evaluate the MBN of adult HI animals. Functional network associations or dependencies between brain regions indicate neural interactivity and can be measured by EEG, fMRI, or PET, for example. PET-based brain network analysis employs regional variations in metabolic demand in the brain coupling between synaptic activity and energy consumption (reviewed by Choi et al., 2014; Zimmer et al., 2017; Zanirati et al., 2018). In the present study, an interregional cross-correlation method was used for MBN analysis. The regions included in the MBN analysis were

selected due to their importance in the pathophysiology of neonatal HI or in agreement with metabolic changes. The sham group showed a typical pattern of a structured MBN, with a large number of connections between the regions evaluated. Interestingly, although there were no changes to in vivo brain glucose metabolism for the HI non-h group, these animals did have MBN changes. The MBN exhibited a hyposynchronous pattern with a drastic reduction in connections between regions.

In the HI h group, we identified an increase in aberrant correlations between the regions evaluated, compared to the sham group MBN. There was an increase in positive correlations between right hemisphere regions and a consequent increase in negative correlations between contralateral and ipsilateral brain hemispheres. Specifically, right hemisphere regions correlated positively with each other because of the drastic decrease in their metabolism in synchrony. Conversely, the existence of negative correlations between left and right hemispheres was due to the preserved metabolism in the contralateral hemisphere and intensification of hypometabolism in the injured hemisphere. We therefore demonstrated an MBN with disconnection between the cerebral hemispheres in the HI h animals.

The brain is highly connected by networks and ischemia processes can alter the global brain network (Siegel et al., 2018; Jung et al., 2016). Our study was effective in demonstrating that HI insult changes the architecture of the MBN in adult rats previously subjected to the neonatal HI model, regardless of presence or absence of significant brain metabolism changes. Based on the premise that synchronic regions are functionally interconnected, the aberrant pattern of synchronization for some HI animals demonstrates the capacity of neonatal HI insult to disrupt the interhemispheric functional connection between brain regions. Siegel et al. also identified specific brain network dysfunction patterns and loss of interhemispheric communication as being associated with impairment of behavioral brain domains in stroke patients (Siegel et al., 2018). Additionally, both HI groups demonstrated a reduction in global efficiency, assortativity coefficient, and average clustering coefficient in the MBN matrix, in relation to the sham group. Decreased global efficiency has been associated with some neurodegenerative pathologies, which indicate loss of efficiency in regional information exchange (Choi et al., 2014; Seo et al., 2013). Indeed, HI h presented an aberrant hypersynchronous pattern whereas HI non-h presented an aberrant hyposynchronous pattern.

Both clinical and experimental studies have linked neonatal HI to unfavorable outcomes for cognitive ability (Alexander et al., 2014; Aylward, 2014; Greggio et al., 2014). The ability to acquire spatial memory is closely related to the functional integrity of both the hippocampus and the striatum (Pooters et al., 2016; Shah et al., 2018). Controversially, both HI h and HI non-h animals exhibited impaired MWM performance. Even HI animals that did not exhibit hippocampal or striatal changes in either metabolism or morphology showed a significant cognitive impairment compared with the sham group. Additionally, we found a correlation between MWM performance and brain glucose metabolism in most of the regions in the ipsilateral hemisphere, including the right hippocampus but not the right striatum.

In common with the brain metabolism changes, cerebral volume loss was also limited to the ipsilateral hemisphere in the HI h group but not in the HI non-h group. HI animals usually present generalized brain injuries, including volumetric reductions in the ipsilateral cortex, hippocampus, and striatum and increases in ventricular volume associated with persistent behavioral deficits (Alexander et al., 2014; Durán-Carabali et al., 2017; Greggio et al., 2014). However, Smith et al. observed that changes in anatomical volume of different brain regions did not correlate with any behavioral change for HI animals (Smith et al., 2015). In the same manner, we also observed dissociation between cognitive and MBN impairments with an absence of anatomical and metabolic brain changes in the HI non-h animals. Nevertheless, changes in brain volume did correlate positively with the hypometabolism observed in the regions evaluated.

There is consensus that brain ^{18}F -FDG metabolism is proportional to brain energy demand and therefore indicative of synaptic activity (Zimmer et al., 2017; Choi et al., 2014). Furthermore, changes in regional cerebral metabolism are usually associated with brain injuries, such as inflammatory process, cellular death, and tissue loss leading to neurofunctional disabilities (Pomykala et al., 2013; Fu et al., 2009; Matsui et al., 2009; Love et al., 2005). As expected, most of the HI animals that exhibited severe hypometabolism in regions of the ipsilateral hemisphere developed cognitive deficits in spatial memory and had significant loss of volume of brain regions. These animals also had altered MBN, with aberrant connections, promoting interhemispheric disconnection. In contrast, we also demonstrated that a percentage of HI animals preserved normal brain glucose metabolism levels and cerebral tissue anatomy. Notwithstanding, they were unable

to prevent the development of cognitive deficits caused by neonatal HI insult. These animals also had an abnormal MBN, indicative of changes in brain functionality and possibly related to poor cognitive outcomes. Similarly, patients with epilepsy who present changes to the organization of the cerebral white matter network appear to be sensitive to cognitive decline even without injuries visible on magnetic resonance imaging (Vaessen et al., 2012). In agreement with other studies (Balduini et al., 2000; De Paula et al., 2009; Jung et al., 2016), the different degrees of cerebral lesion and outcomes for HI animals observed here may be due to immature brain plasticity providing spontaneous recovery and contributing to anatomical and metabolic maintenance of HI animals. Functional network has dynamic properties and can suffer changes through molecular pathways that do not rely on morphological changes. Similarly, the presence of a structural connection does not prove a functional connection (Biswal et al., 2010). Furthermore, the cognitive impairment seen in the present study was not only related to changes in cerebral integrity, whether morphological or metabolic, but was also related to changes to the conformation of the MBN architecture in HI animals.

Summary/Conclusions

In conclusion, our findings show a dissociation between maintenance of brain metabolism and cognitive deficits in the neonatal HI model, which is possibly related to neuroplasticity mechanisms. Absence of changes in brain glucose metabolism, per se, were not able to predict adequate cerebral function in HI animals. However, MBN based on microPET-FDG has been shown to be sensitive in revealing changes in brain functionality. Considering the intrinsic variability of HI cerebral damage outcomes, our results highlight an important role for microPET-FDG based MBN in elucidation of whole brain metabolic function in the neonatal HI model. The present study demonstrates for the first time a new approach to assess the neuroplasticity of adult rats subjected to neonatal hypoxic ischemia by in vivo microPET-FDG imaging.

Acknowledgements

This study was supported by research grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil; Chamada Universal MCTI/CNPq Nº 01/2016, grant number 405470/2016-9), PUCRS and Pandurata Alimentos Ltda. P. N. Azevedo, and G. Zanirati are recipients of fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). E. R. Zimmer, C A Netto, and J.C. DaCosta are CNPq researchers.

Conflict(s)-of-Interest/Disclosure(s)

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Alexander, M., Garbus, H., Smith, A.L., Rosenkrantz, T.S., Fitch, R.H., 2014. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.038>
- Alles, Y.C.J., Greggio, S., Alles, R.M., Azevedo, P.N., Xavier, L.L., DaCosta, J.C., 2010. A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res.* 1356. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.106>
- Aylward, G.P., 2014. Neurodevelopmental outcomes of infants born prematurely. *J. Dev. Behav. Pediatr.* <https://doi.org/10.1097/01.DBP.0000452240.39511.d4>
- Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., Cimino, M., 2000. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res.* 859, 318–325. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)01997-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)01997-1)
- Batista, C.E.A., Chugani, H.T., Juhász, C., Behen, M.E., Shankaran, S., 2007. Transient Hypermetabolism of the Basal Ganglia Following Perinatal Hypoxia. *Pediatr. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.01.004>

Biran, V., Verney, C., Ferriero, D.M., 2012. Perinatal cerebellar injury in human and animal models. *Neurol. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2012/858929>

Biswal, B.B., Mennes, M., Zuo, X.-N., Gohel, S., Kelly, C., Smith, S.M., Beckmann, C.F., Adelstein, J.S., Buckner, R.L., Colcombe, S., Dogonowski, A.-M., Ernst, M., Fair, D., Hampson, M., Hoptman, M.J., Hyde, J.S., Kiviniemi, V.J., Kotter, R., Li, S.-J., Lin, C.-P., Lowe, M.J., Mackay, C., Madden, D.J., Madsen, K.H., Margulies, D.S., Mayberg, H.S., McMahon, K., Monk, C.S., Mostofsky, S.H., Nagel, B.J., Pekar, J.J., Peltier, S.J., Petersen, S.E., Riedl, V., Rombouts, S.A.R.B., Rypma, B., Schlaggar, B.L., Schmidt, S., Seidler, R.D., Siegle, G.J., Sorg, C., Teng, G.-J., Veijola, J., Villringer, A., Walter, M., Wang, L., Weng, X.-C., Whitfield-Gabrieli, S., Williamson, P., Windischberger, C., Zang, Y.-F., Zhang, H.-Y., Castellanos, F.X., Milham, M.P., 2010. Toward discovery science of human brain function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0911855107>

Brekke, E.M.F., Morken, T.S., Widerøe, M., Håberg, A.K., Brubakk, A.M., Sonnewald, U., 2014. The pentose phosphate pathway and pyruvate carboxylation after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.8>

Choi, H., Kim, Y.K., Kang, H., Lee, H., Im, H.J., Hwang, D.W., Kim, E.E., Chung, J.K., Lee, D.S., 2014. Abnormal metabolic connectivity in the pilocarpine-induced epilepsy rat model: A multiscale network analysis based on persistent homology. *Neuroimage.* <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.05.039>

De Paula, S., Vitola, A.S., Greggio, S., De Paula, D., Mello, P.B., Lubianca, J.M., Xavier, L.L., Fiori, H.H., Dacosta, J.C., 2009. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr. Res.* <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819ed5c8>

Durán-Carabali, L.E., Sanches, E.F., Marques, M.R., Aristimunha, D., Pagnussat, A., Netto, C.A., 2017. Longer hypoxia–ischemia periods to neonatal rats causes motor impairments and muscular changes. *Neuroscience.* <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.068>

- Fu, Y.-K., Chang, C.-J., Chen, K.-Y., Hwang, L.-C., Wu, K.-H., Chang, K.-W., Jan, M.-L., Chen, C.-C., Chang, C.-H., 2009. Imaging of regional metabolic activity by (18)F-FDG/PET in rats with transient cerebral ischemia. *Appl. Radiat. Isot. Incl. data, Instrum. methods use Agric. Ind. Med.* 67, 1743–1747. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2009.03.002>
- Gao, F., Wang, S., Guo, Y., Wang, J., Lou, M., Wu, J., Ding, M., Tian, M., Zhang, H., 2010. Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischaemia: A microPET study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* <https://doi.org/10.1007/s00259-009-1342-3>
- Greggio, S., De Paula, S., Azevedo, P.N., Venturin, G.T., Dacosta, J.C., 2014. Intra-arterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. *Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.10.017>
- Hyun, H., Lee, Jiyoung, Hwang, D.W., Kim, S., Hyun, D.K., Choi, J.S., Lee, Ja kyeong, Lee, M., 2011. Combinational therapy of ischemic brain stroke by delivery of heme oxygenase-1 gene and dexamethasone. *Biomaterials.* <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.116>
- Johnston, M. V., Fatemi, A., Wilson, M.A., Northington, F., 2011. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70016-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70016-3)
- Jung, W.B., Im, G.H., Chung, J.J., Ahn, S.Y., Jeon, T.Y., Chang, Y.S., Park, W.S., Kim, J.H., Kim, K.S., Lee, J.H., 2016. Neuroplasticity for spontaneous functional recovery after neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats observed by functional MRI and diffusion tensor imaging. *Neuroimage.* <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2015.11.032>
- Kannan, S., Chugani, H.T., 2010. Applications of Positron Emission Tomography in the Newborn Nursery. *Semin. Perinatol.* <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2009.10.004>
- Kurinczuk, J.J., White-Koning, M., Badawi, N., 2010. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum. Dev.* <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010>

- Li, J.H., Lu, J., Zhang, H., 2013. Functional recovery after scutellarin treatment in transient cerebral ischemic rats: A pilot study with 18F-fluorodeoxyglucose MicroPET. Evidence-based Complement. Altern. Med. <https://doi.org/10.1155/2013/507091>
- Liu, C.L., Siesjö, B.K., Hu, B.R., 2004. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. Neuroscience. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.062>
- Love, C., Tomas, M.B., Tronco, G.G., Palestro, C.J., 2005. FDG PET of Infection and Inflammation. RadioGraphics. <https://doi.org/10.1148/rg.255045122>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., Lengvári, I., 2005. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. Behav. Brain Res. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
- Malisza, K.L., Kozłowski, P., Ning, G., Bascaramurty, S., Tuor, U.I., 1999. Metabolite changes in neonatal rat brain during and after cerebral hypoxia-ischemia: A magnetic resonance spectroscopic imaging study. NMR Biomed. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1492\(199902\)12:1<31::AID-NBM544>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1492(199902)12:1<31::AID-NBM544>3.0.CO;2-M)
- Matsui, T., Nakata, N., Nagai, S., Nakatani, A., Takahashi, M., Momose, T., Ohtomo, K., Koyasu, S., 2009. Inflammatory Cytokines and Hypoxia Contribute to 18F-FDG Uptake by Cells Involved in Pannus Formation in Rheumatoid Arthritis. J. Nucl. Med. <https://doi.org/10.2967/jnumed.108.060103>
- McKenna, M.C., Scafidi, S., Robertson, C.L., 2015. Metabolic Alterations in Developing Brain After Injury: Knowns and Unknowns. Neurochem. Res. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1600-7>
- Millar, L.J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., Molnár, Z., 2017. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. Front. Cell. Neurosci. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
- Netto, C.A., Sanches, E., Odorcyk, F.K., Duran-Carabali, L.E., Weis, S.N., 2017. Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. J. Neurosci. Res. <https://doi.org/10.1002/jnr.23828>

Odorcyk, F.K., Kolling, J., Sanches, E.F., Wyse, A.T.S., Netto, C.A., 2018. Experimental neonatal hypoxia ischemia causes long lasting changes of oxidative stress parameters in the hippocampus and the spleen. *J. Perinat. Med.* <https://doi.org/10.1515/jpm-2017-0070>

Pomykala, K.L., Ganz, P.A., Bower, J.E., Kwan, L., Castellon, S.A., Mallam, S., Cheng, I., Ahn, R., Breen, E.C., Irwin, M.R., Silverman, D.H.S., 2013. The association between pro-inflammatory cytokines, regional cerebral metabolism, and cognitive complaints following adjuvant chemotherapy for breast cancer. *Brain Imaging Behav.* <https://doi.org/10.1007/s11682-013-9243-2>

Pooters, T., Gantois, I., Vermaercke, B., D'Hooge, R., 2016. Inability to acquire spatial information and deploy spatial search strategies in mice with lesions in dorsomedial striatum. *Behav. Brain Res.* <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.001>

Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>

Rubinov, M., Sporns, O., 2010. Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *Neuroimage.* <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.003>

Sanches, E.F., Arteni, N., Nicola, F., Aristimunha, D., Netto, C.A., 2015. Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience.*

Sanches, E.F., Van de Looij, Y., Toulotte, A., da Silva, A.R., Romero, J., Sizonenko, S. V., 2018. Brain metabolism alterations induced by pregnancy swimming decreases neurological impairments following neonatal hypoxia-ischemia in very immature rats. *Front. Neurol.* <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00480>

Seo, E.H., Lee, D.Y., Lee, J.M., Park, J.S., Sohn, B.K., Lee, D.S., Choe, Y.M., Woo, J.I., 2013. Whole-brain Functional Networks in Cognitively Normal, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053922>

Shah, D., Verhoye, M., Van der Linden, A., D'Hooge, R., 2018. Acquisition of Spatial Search Strategies and Reversal Learning in the Morris Water Maze Depend on Disparate

Brain Functional Connectivity in Mice. *Cereb. Cortex.*
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhy329>

Shankaran, S., 2012. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin. Perinatol.* <https://doi.org/10.1016/j.clp.2012.09.008>

Shi, Y., Zhao, J.N., Liu, L., Hu, Z.X., Tang, S.F., Chen, L., Jin, R. Bin, 2012. Changes of positron emission tomography in newborn infants at different gestational ages, and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr. Neurol.*
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.11.005>

Siegel, J.S., Seitzman, B.A., Ramsey, L.E., Ortega, M., Gordon, E.M., Dosenbach, N.U.F., Petersen, S.E., Shulman, G.L., Corbetta, M., 2018. Re-emergence of modular brain networks in stroke recovery. *Cortex.* <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.12.019>

Sizonenko, S. V., Sirimanne, E., Mayall, Y., Gluckman, P.D., Inder, T., Williams, C., 2003. Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatr. Res.* <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000072517.01207.87>

Smith, A.L., Alexander, M., Chrobak, J.J., Rosenkrantz, T.S., Fitch, H.H., 2015. Dissociation in the Effects of Induced Neonatal Hypoxia-Ischemia on Rapid Auditory Processing and Spatial Working Memory in Male Rats. *Dev. Neurosci.*
<https://doi.org/10.1159/000375487>

Vaessen, M.J., Jansen, J.F.A., Vlooswijk, M.C.G., Hofman, P.A.M., Majoie, H.J.M., Aldenkamp, A.P., Backes, W.H., 2012. White matter network abnormalities are associated with cognitive decline in chronic epilepsy. *Cereb. Cortex.*
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhr298>

Vannucci, R.C., Lyons, D.T., Vasta, F., 1988. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke.* <https://doi.org/10.1161/01.STR.19.2.245>

Vial, F., Serriere, S., Barantin, L., Montharu, J., Nadal-Desbarats, L., Pourcelot, L., Seguin, F., 2004. A newborn piglet study of moderate hypoxic-ischemic brain injury by 1H-MRS and MRI. *Magn. Reson. Imaging.* <https://doi.org/10.1016/j.mri.2004.01.036>

Wixey, J.A., Reinebrant, H.E., Buller, K.M., 2011. Inhibition of neuroinflammation prevents injury to the serotonergic network after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182020b7b>

Zanirati, G., Azevedo, P.N., Venturin, G.T., Greggio, S., Alcará, A.M., Zimmer, E.R., Feltes, P.K., DaCosta, J.C., 2018. Depression comorbidity in epileptic rats is related to brain glucose hypometabolism and hypersynchronicity in the metabolic network architecture. *Epilepsia* 59. <https://doi.org/10.1111/epi.14057>

Zimmer, E.R., Parent, M.J., Souza, D.G., Leuzy, A., Lecrux, C., Kim, H.-I., Gauthier, S., Pellerin, L., Hamel, E., Rosa-Neto, P., 2017. [(18)F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat. Neurosci.* 20, 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.4492>