

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC**

**PROJETO DE PESQUISA**

**AVALIAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO EXERCIDA PELA PROTEÍNA  
NEUROGLOBINA EM CÉREBROS DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS À  
ANÓXIA NEONATAL**

Projeto de Iniciação Científica submetido para avaliação no Edital: 04/2022

Modalidade: voluntário

**SÃO BERNARDO DO CAMPO**

**2022**

## RESUMO

**Introdução:** A hipóxia é definida como uma diminuição da concentração de O<sub>2</sub> tecidual e a isquemia com uma diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido que, por sua vez, impede a distribuição adequada de O<sub>2</sub>, glicose e outros nutrientes. Os insultos hipóxico-isquêmicos se referem a uma reduzida circulação e oxigenação sanguínea no cérebro e podem ser ocasionados por parto prematuro ou por injúrias que ocorrem durante o nascimento como, por exemplo, a asfixia.

**Objetivo:** O presente estudo tem o objetivo de avaliar o efeito neuroprotetor da proteína Neuroglobina (Ngb) em cérebros de ratos *Wistar* submetidos à anóxia neonatal. **Métodos:** Os ratos neonatos com 1 a 2 dias de vida pós-natal (PN1-2), serão submetidos ao modelo descrito por Takada e colaboradores (Takada *et al.*, 2011) onde serão colocados em uma câmara de policarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5 L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente. Os encéfalos dos filhotes machos serão dissecados com PN7 e encaminhados para o estudo imuno-histoquímico e de Western Blotting para análise da proteína Ngb. Todos os dados obtidos neste estudo resultarão em contribuições científicas relevantes para a compreensão dos reais efeitos da anóxia sobre o desenvolvimento cerebral dos filhotes, dentro de um projeto maior desenvolvido no mesmo grupo de pesquisa.

**Palavras-chave:** anóxia, neuroproteção, desenvolvimento, neuroglobina.

**Área do conhecimento do projeto:** Doenças do neurodesenvolvimento.

## 1. INTRODUÇÃO

A hipóxia durante a gravidez, parto, ou no início da vida é um dos principais fatores determinantes de morbidade neurológica e mortalidade no período neonatal. Muitos estudos têm investigado os déficits neurológicos após a hipóxia perinatal, incluindo convulsões, paralisia cerebral, retardo mental, transtorno de déficit de atenção, ansiedade e outras doenças mentais (Volpe, 1995; Golan *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005). A insuficiência das reservas energéticas do tecido ( $O_2$ , nutrientes) para o cérebro em desenvolvimento ameaça a sua função por toda a vida (Nyakas *et al.*, 1996).

A hipóxia é definida como uma diminuição da concentração de  $O_2$  tecidual e a isquemia com uma diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido que, por sua vez, impede a distribuição adequada de  $O_2$ , glicose e outros nutrientes. Os insultos hipóxico-isquêmicos se referem a uma reduzida circulação e oxigenação sanguínea no cérebro e podem ser ocasionados por parto prematuro ou por injúrias que ocorrem durante o nascimento, como asfixia, trabalho de parto prolongado, ressuscitação e oclusão do cordão umbilical e/ou da placenta. O resultado da diminuição da circulação sanguínea e do transporte de  $O_2$  ao cérebro inclui uma queda nos níveis de glicose, um prejuízo no metabolismo energético normal e uma dependência de glicólise anaeróbica como forma exclusiva de produção de energia. Consequentemente há uma queda nos níveis de adenosina-trifosfato (ATP) que desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares, como despolarização da membrana, acúmulo de aminoácidos excitatórios, aumento do cálcio intracelular, geração de radicais livres, inflamação,

ativação de caspases, citocinas, fosfolipases, proteases e nucleases, que levam à injúria neuronal, à neurodegeneração e à morte celular (Choi e Rothman, 1990; Martin *et al.*, 1997; Johnston, 2001; Volpe, 2001, Takada *et al.*, 2011,2015,2016).

A hipóxia pode produzir disfunções cerebrais temporárias ou permanentes, dependendo da duração, da intensidade de privação de O<sub>2</sub> e da idade na qual o feto foi atingido. A hipóxia pré-natal, frequentemente, ocorre durante as convulsões maternas em condições de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Diversas asfixias podem ocorrer no bebê, por volta do nascimento, por distintas razões, incluindo a compressão do cordão umbilical (Lima *et al.*, 2010), a ruptura da placenta, as contrações uterinas anormais e a falha do neonato em respirar. Outro risco para o desenvolvimento do embrião/feto são os agentes estressores que levam a geração excessiva de radicais livres.

A asfixia perinatal aguda é a principal causa de morte e de lesões neurológicas em recém-nascidos. A incidência tem sido estimada em 1-6/1000 nascido vivo e não diminuiu apesar dos avanços e cuidados perinatais e obstétricos. Muitos bebês recém-nascidos asfixiados e 20-30% dos sobreviventes apresentam sequelas neurológicas, incluindo espasticidade, epilepsia e retardo mental (Mach *et al.*, 2009).

A injúria tecidual está frequentemente associada à mobilização de mecanismos moleculares e celulares que promovem reparo. As globinas são pequenas proteínas respiratórias que auxiliam no processo do reparo tecidual. Elas se ligam ao O<sub>2</sub> de maneira reversível por meio de um ferro contido na região central de um anel porfirínico. As globinas estão presentes em bactérias, protistas, fungos, plantas e animais (Hardison, 1996; 1998). Quatro tipos de globinas,

distintas quanto à estrutura, à distribuição tecidual e possivelmente, quanto à função foram descobertas em homens e outros vertebrados: a hemoglobina, a mioglobina, a neuroglobina e a citoglobina. A hemoglobina (Hb) localizada nos glóbulos vermelhos é um tetrâmero ligado a um grupo prostético heme (hemeproteína) e atua no transporte de O<sub>2</sub> no sistema circulatório. A mioglobina (Mb) é uma proteína monomérica que atua na estocagem e transporte de O<sub>2</sub>, principalmente, nos músculos cardíaco e estriado, facilita a remoção do O<sub>2</sub> e está envolvida, também, na remoção do óxido nítrico (NO) (Brunori, 2001; Flögel *et al.*, 2001). A neuroglobina (Ngb), que é expressa predominantemente no SNC (Burmester *et al.*, 2000) e a citoglobina (Cgb), também nomeada histoglobina (Trent e Hargrove, 2002), que está presente em quase todos os tipos de tecidos foram identificadas e adicionadas recentemente à superfamília das globinas.

O presente trabalho irá tratar apenas da globina que é expressa predominantemente no SNC, a Ngb.

A Ngb pode ter uma função semelhante ao da Mb no metabolismo do O<sub>2</sub> facilitando a difusão do O<sub>2</sub> para a mitocôndria (Burmester *et al.*, 2000; Moens e Dewilde, 2000). No caso da Ngb, esta hipótese é apoiada pela habilidade de proteger as células neuronais de insultos hipóxico-isquêmico e pelo aumento de sua expressão em condições de hipóxia *in vitro*, assim como na isquemia cerebral focal *in vivo* (Sun *et al.*, 2001). Além disso, a sua superexpressão tem sido relacionada a um mecanismo de neuroproteção seguido da hipóxia neuronal e isquemia; dados ainda sugerem que ela tenha um importante papel na homeostase tecidual, promovendo a sobrevivência de células neurais, além de regular a expressão de genes e vias de sinalização (Burmester *et al.*, 2000; Sun *et*

*al.*, 2001; 2003a; Mammen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002, Lima *et al.*, 2011).

## 2. OBJETIVO

Analisar possíveis alterações nos níveis proteicos e distribuição da proteína neuroglobina em cérebros de ratos *Wistar* submetidos à anóxia neonatal, que possam corroborar com seu papel neuroprotetor frente à privação de oxigênio.

### 2.1. Objetivo específico:

- Verificar possíveis indicativos de anóxia cerebral e mecanismo neuroprotetor nas regiões do hipocampo e córtex cerebral (duas regiões bastante vulneráveis à privação de oxigênio) por meio da análise da proteína neuroglobina, mediante as técnicas de Imuno-histoquímica (para estudo da distribuição da proteína) e Western Blotting (para análise dos níveis proteicos).

## 3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Em 12 meses	Realização das atividades a serem desenvolvidas.
-1° ao 3° mês	Formação de todos os grupos que serão estudados e processamento do material biológico
-4° ao 6° mês	Análise proteica por imuno-histoquímica

-7° ao 9° mês	Análise dos dados e relatórios
-10° mês 12° mês	Execução do artigo relacionado ao estudo

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Serão utilizadas ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, virgens, pesando entre 200 e 250g, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal do ABC - câmpus São Bernardo do Campo. Durante todo o experimento esses animais terão acesso livre a água e ração e permanecerão em ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19 horas) a uma temperatura constante de 22-24°C. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e serão submetidos à aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA – UFABC, Protocolo nº 3980261118).

### 4.2 Verificação do Ciclo Estral

Todas as ratas serão submetidas à análise do padrão do ciclo estral através do estudo colpocitológico do esfregaço vaginal que será realizado diariamente entre 8:00 e 10:00 da manhã. Cada fase do ciclo estral é facilmente determinada pela análise do tipo de células que descama do epitélio vaginal, tecido altamente responsivo ao estradiol e progesterona.

O conteúdo vaginal será coletado por meio de conta-gotas atraumático, com solução salina e observado em microscópio comum. Apenas as ratas que apresentarem ciclo estral regular com o aparecimento da fase de estro a intervalos de 3 a 4 dias serão acasaladas e acompanhadas durante todo período gestacional.

#### **4.3 Acasalamento e confirmação da prenhez**

O esfregaço vaginal será realizado pela manhã, após o acasalamento; a confirmação da prenhez será verificada pela presença de espermatozoides no epitélio vaginal da rata quando analisado em microscópio óptico. A constatação de espermatozoides determinará o início da prenhez (dia zero) e a retirada do macho da gaiola.

#### **4.4 Formação dos grupos**

O estudo será desenvolvido apenas com filhotes machos com a finalidade de se obterem menor variabilidade dos dados, sem o possível condicionamento de aspectos hormonais inerentes ao sexo. Para o estudo serão necessários um número de 5 filhotes para o grupo experimental e 5 filhotes para o grupo controle.

#### **4.5 Anóxia Neonatal**



Utilizaremos a adaptação do modelo de anóxia neonatal previamente padronizado e validado em ratos com 1 a 2 dias de vida (Takada *et al.*, 2011), idade cujo desenvolvimento encefálico corresponde a um prematuro humano (Semple *et al.*, 2013). As vantagens deste modelo em relação aos demais, são que ele permite a asfixia global, não invasiva, provocando hipoxemia e hipercapnia similar à condição da anóxia neonatal em humanos (Takada *et al.*, 2011). Além disso, promove morte celular em estruturas susceptíveis, como o hipocampo, com posterior diminuição de volume desta estrutura e da neurogênese hipocampal, resultando em déficits de memória de referência espacial, aprendizagem e déficits na memória operacional, com aumento da ansiedade (Takada *et al.*, 2015a, Takada *et al.*, 2015b).

Deste modo, os neonatos com 1 a 2 dias de vida (PN1-2), com peso entre 6 e 8g, serão colocados em uma câmara de polycarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C (Takada *et al.*, 2011). Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), eles serão devolvidos para a mãe e em (PN7) serão decapitados e seus encéfalos removidos para análises de western blot ou então perfundidos transcárdiacamente para processamento do material para técnica de imunoistoquímica.

O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente.

#### **4.6 Análise Proteica: Imuno-histoquímica**

Após perfusão transcardíaca, os encéfalos serão removidos e pós-fixados. Na sequência, os tecidos serão colocados em álcool, xilol e banhados em parafina, sendo posteriormente emblocados. Os cortes serão feitos no micrótomo com uma espessura de 10  $\mu$ m e fixados em lâminas silanizadas. Para o início da imunohistoquímica os cortes serão desparafinizados e em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 3% durante 15 minutos, será efetuado. Os cortes serão lavados com água destilada e submetidos à recuperação antigênica, onde as lâminas serão incubadas em tampão Tris-HCl (50mM pH 9,5), no micro-ondas, na potência máxima (700 Watts), durante um período de 7 minutos. Na sequência, as lâminas serão incubadas em um tampão Tris-Glicina (0,1 glicina, pH 7,4), durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de bloqueio com uma solução contendo 20mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4; 0,45M NaCl; 0,3% Triton X-100 e albumina 5% por 90 minutos à temperatura ambiente.

Os cortes serão incubados por 48 horas com o anticorpo monoclonal primário anti-neuroglobina (1:2500, Sigma) diluído em albumina 2%. Após o período de incubação, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (IgG, Heavy and Light Chain, Biotin Conjugate) (1:200, Calbiochem) diluído em albumina 2% por 90 minutos. Passado o tempo de incubação do anticorpo secundário, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas por 90 minutos em estreptavidina peroxidase – Kit ABC (Vector). O complexo antígeno-anticorpo será revelado com DAB, contendo  $H_2O_2$

1 µl/mL. A seguir, os cortes serão desidratados e cobertos com lamínula. A marcação da Neuroglobina será analisada em microscopia óptica.

#### **4.7 Análise Proteica: Western Blotting**

A técnica de WB será utilizada para a quantificação da proteína VEGF por densitometria óptica nos hipocampus e córtices dos filhotes em PN7. As regiões serão removidas, pesadas e sonicadas por ultrassom (Virsonic 60, Virtis) em tampão de lise contendo Cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M, Tris Hidroclorato (Tris-HCl) 0,01 M pH 7,6, Ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 0,001 M pH 8,0, Nonidet P-40 (NP-40) 1%, glicerol 10%, Fenilmetilsulfonilflorídeo (PMSF) 10 µM, metavanadato de sódio 1 mM, Fluoreto de sódio (NaF) 0,05 M, ácido ocadáico 2 nM, (aprotinina 0,08 mM, leupeptina 2 mM, pepstatina A 1,5 mM, bestatina 4 mM e E64 1,4 mM. Foram então, armazenadas a -80°C e a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951). Logo após a análise da concentração de proteínas, os tecidos homogeneizados foram diluídos em tampão Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, pH 8,3), fervidos por 5 minutos e armazenados a -20°C.

##### **4.7.1 Gel de poliacrilamida e curva padrão**

Uma curva padrão será realizada para verificar o peso molecular da proteína que será estudada no trabalho. Esse dado será necessário para verificarmos a concentração do gel, o tipo de membrana e o tampão de corrida e de transferência a ser utilizado.

## **5. Análise dos resultados**

Para a análise estatística, será empregado o teste T-Student, em caso de amostragem normal, do contrário serão substituídos por testes não paramétricos. Será considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## **6. Descrição da viabilidade da execução do projeto**

O presente projeto é parte de um projeto maior sendo executado pelo grupo e é totalmente exequível dentro do prazo proposto e com o material adquirido.

## **7. Referências Bibliográficas**

BHAT, M.; GRIZENKO, N.; BEN-AMOR, L.; JOOBER, R. Obstetric complications in children with attention deficit/hyperactivity disorder and learning disability. *McGill Journal of Medicine* 8(2):109-113, 2005.

BRIDGETTE, D.S. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, 284, p. 247-259, 2015.

BRUNORI, M. Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem. Sci.* 26(4):209-10, 2001.

BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKELN, T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 407(6803):520-3, 2000.

CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-82, 1990.

FLÖGEL, U.; MERX, M.W.; GODECKE, A.; DECKING, U.K.; SCHRADER, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(2):735-40, 2001.

GOLAN, H.; KASHTUTSKY, I.; HALLAK, M.; SOROKIN, Y.; HULEIHEL, M. Maternal hypoxia during pregnancy delays the development of motor reflexes in newborn mice. *Dev Neurosci*. 26(1):24-9, 2004.

HARDISON, R.C. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93(12):5675-9, 1996.

HARDISON, R.C. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol*. 201(8):1099-117, 1998.

LIMA, D.C.; VALE, T.G.; ARGANÑARAZ, G.A.; VARELLA, P.P.; FRUSSA-FILHO, R.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, MDA. G.; AMADO, D. Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. *Epilepsy Behav*. 18(1-2):45-9, 2010.

LIMA, D.C.; COSSA, A.C.; PEROSA, S.R.; DE OLIVEIRA, E.M.; DA SILVA JÚNIOR, J.A.; FERNANDES, M.J.S.; DA SILVA, I.R.; HIGA, E.M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, MDA. G.; CAVALHEIRO, E.A.; AMADO, D. Neuroglobin is up-regulated in the cerebellum of offspring exposed to maternal epileptic seizures. *Submitted to International Journal Developmental Neuroscience*, 2011.

JOHNSTON, M.V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev*. 7(4):229-34, 2001.

MACH, M.; DUBOVICKÝ, M.; NAVAROVÁ, J.; BRUCKNEROVÁ, I.; UJHÁZY, E. Experimental modeling of hypoxia in pregnancy and early postnatal life. *Interdiscip. Toxicol*. 2(1):28-32, 2009.

MAMMEN, P.P.A., SHELTON, J.M., GOCTSCH, S.C., WILLIAMS, S.C., RICHARDSON, J.A., GARRY, M.G., GARRY, D.J. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in local regions of the brain. *J. Histochem. Cytochem*. 50:1591-1598, 2002.

MARTIN, L.J.; BRAMBRINK, A.; KOEHLER, R.C.; TRAYSTMAN, R.J. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J. Comp. Neurol*. 377(2):262-85, 1997.

- MOENS, L.; DEWILDE, S. Globins in the brain. *Nature*. 407(6803):461-2, 2000.
- NYAKAS, C.; BUWALDA, B.; LUITEN, P.G. Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol*. 49(1):1-51, 1996.
- SUN, Y.; JIN, K.; MAO, X.O.; ZHU, Y.; GREENBERG, D.A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(26):15306-11, 2001.
- SUN, Y.; JIN, K.; PEEL, A.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(6):3497-500, 2003a.
- TAKADA, S. H.; SAMPAIO, C. A.; ALLEMANDI, W.; ITO, P. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods*, 198, n. 1, p. 62-69, May 15 2011.
- TAKADA, S. H.; DOS SANTOS HAEMMERLE, C. A.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V. et al. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience*, 284, p. 247-259, Jan 22 2015.
- TAKADA, S. H.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V.; LEE, V. Y. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res*, 296, p. 331-338, Jan 1 2016.
- TRENT, J.T.; 3RD, HARGROVE MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem*. 277(22):19538-45, 2002
- VOLPE J.J. Hypoxic-ischemic encephalopathy; in *Neurology of the Newborn*, Volpe, J.J., ed., Philadelphia, Saunders, pp.211-369, 1995.
- VOLPE, J.J.. *Neurology of the newborn*. Philadelphia: *Saunders*, 912 p., 2001.
- ZHANG, C.; WANG, C.; DENG, M.; LI, L.; WANG, H.; FAN, M.; XU, W.; MENG, F.; QIAN, L.; HE, F. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 290(5):1411-9, 2002.

