

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Camila Aparecida Martins

**Efeito neuroprotetor do ACTH em
modelo de hemorragia peri-
intraventricular em ratos neonatos**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2019

Camila Aparecida Martins

Efeito neuroprotetor do ACTH em modelo de hemorragia peri- intraventricular em ratos neonatos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Antônio Rasia Filho
Coorientador: Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

Porto Alegre
2019

Catalogação na Publicação

Martins, Camila Aparecida

Efeito neuroprotetor do ACTH em modelo de hemorragia peri-intraventricular em ratos neonatos / Camila Aparecida Martins. -- 2019.

98 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2019.

Orientador(a): Alberto Antônio Rasia-Filho ;
coorientador(a): Régis Gemerasca Mestriner.

1. Neuroproteção. 2. Melanocortinas. 3. Prematuridade.
I. Título.

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

INSTITUIÇÃO E FONTE PAGADORA

Este estudo foi realizado e financiado com recursos dos seguintes laboratórios:

1. Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA.

2. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC/RS.

3. Laboratório Central de Microscopia e Microanálise da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC/RS.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, meu exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de coração, ao meu mestre e exemplo de pessoa e cientista, Professor Alberto, por ter me acolhido e escutado os meus “devaneios” de enfermeira neonatologista. Por todo o conhecimento compartilhado e por todas as vezes que, literalmente, dançou comigo no laboratório e, da maneira mais delicada, me disse: “Eu estou aqui pra te conduzir...” Pessoas assim são raras e eu sou muito grata pela vida ter te colocado no meu caminho nos momentos mais importantes da minha carreira profissional.

Aos Professores Régis e Léder da PUCRS, por todos os ensinamentos e por auxiliarem na construção do meu pensamento científico. Vocês são exemplos a serem seguidos! Tive muita sorte em ter mestres tão excepcionais na minha trajetória.

Aos meus colegas e amigos da UFCSPA, Fernando e Mariana, que foram essenciais para tornar essa trajetória mais leve.

Às funcionárias da UFCSPA, que foram primordiais para a realização deste trabalho, Joana e Dani do Biotério, Alexandra e Carmem do Laboratório de Fisiologia.

Às colegas e amigas que fiz na PUCRS, Raquel, Marina, Laura e Rafaela, que nunca mediram esforços em me ajudar.

Às minhas colegas e amigas, Catiane e Cíndia, que são as melhores parceiras de trabalho que alguém poderia ter.

Ao meu amor desde sempre, Fernando, que me incentivou a continuar, mesmo naqueles momentos em que quase desisti.

Aos meus pais, Armando e Ivani, que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida acadêmica e profissional.

A todos os envolvidos, direta ou indiretamente neste trabalho, foram dois anos árduos, mas prazerosos. Muito obrigada!

*“O segredo, Alice, é cercar-se de
pessoas que façam sorrir teu coração.
E então, só então, encontrará o País
das Maravilhas”.*

Chapeleiro Maluco – Alice no País das
Maravilhas

RESUMO

Complicações relacionadas à prematuridade causam, aproximadamente, um milhão de mortes por ano no mundo e são responsáveis por cerca de 40% das deficiências neurológicas em crianças. A hemorragia peri-intraventricular (HPIV) é uma das principais complicações relacionadas ao nascimento prematuro, sendo considerada um evento multifatorial, definida pela ruptura dos frágeis e imaturos vasos sanguíneos da matriz germinativa, com entrada subsequente de sangue no sistema ventricular, causada, principalmente, por mudanças na pressão e fluxo sanguíneo cerebral. Atualmente não existem tratamentos neuroprotetores para HPIV. As melanocortinas, incluindo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) tem propriedades anti-inflamatórias e já demonstraram efeito neuroprotetor em diversas lesões do SNC e doenças neurodegenerativas, fazendo do ACTH um potente candidato para fornecer neuroproteção após HPIV. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito neuroprotetor do ACTH em modelo de HPIV induzido pela microinjeção de collagenase intracerebroventricular em ratos neonatos. Com um dia de vida, os animais receberam microinjeções na região periventricular, que continham collagenase tipo VII ou PBS. Doze horas após a microinjeção, todos os animais com HPIV ou Sham (total de 8 grupos com 6 animais/cada) receberam uma dose de 0,048 mg/kg de ACTH₁₋₂₄ e/ou 0,06 nmol de SHU9119 (antagonista dos receptores de melanocortinas MCR3/MCR4). Com 7 dias de vida os animais foram eutanasiados e, para investigar o efeito neuroprotetor do ACTH, foram utilizados como principais desfechos a extensão de lesão, densidade neuronal/glial e gliose reativa, utilizando como parâmetros para gliose reativa a expressão dos biomarcadores imunohistoquímicos GFAP, S100 β e NG2. Os resultados mostraram que a os animais lesados que receberam a dose de ACTH₁₋₂₄, apresentaram neuroproteção evidenciada pela redução da extensão de lesão, expressão de GFAP, S100 β e NG2 e perda neuronal no tecido periventricular. Além disso, a infusão do SHU9119 não reverteu a neuroproteção do ACTH. Esses achados indicam que o ACTH demonstrou efeito neuroprotetor no modelo estudado e pode ser um tratamento promissor para os em recém-nascidos prematuros com HPIV.

Palavras-chave: hemorragia peri-intraventricular; melanocortinas; ACTH; gliose reativa; GFAP; S100 β ; NG2.

ABSTRACT

Complications due to prematurity account for approximately one million deaths per year in the world and corresponds for 40% of the neurologically impaired children. Peri-intraventricular hemorrhage (PIVH) is one of the most severe premature-related complications and is a multifactorial event, defined as the rupture of thin, fragile and immature vessels in the subependymal germinal matrix with subsequent leakage of blood into the ventricular system, mainly caused by changes in cerebral blood pressure and flow. Currently, there are no neuroprotective treatments for PIVH. Melanocortins, including adrenocorticotrophic hormone (ACTH), have anti-inflammatory properties and presented a neuroprotective effect on CNS lesions and neurodegenerative diseases, making ACTH a potent candidate to provide neuroprotection after HPIV. Thus, the present study aimed to evaluate the potential neuroprotective effect of ACTH on a PIVH model, induced by the microinjection of collagenase intracerebroventricular, in rats pups. At one day of life, the animals received microinjection in the periventricular region containing collagenase type VII or PBS. Twelve hours later, all animals with HPIV or Sham (total of 8 groups with 6 animals/each) received a dose of 0.048 mg/kg of ACTH₁₋₂₄ and/or 0.06 nmol of SHU9119 (MCR3/MCR4 melanocortins receptor antagonist). After 7 days of birth the animals were euthanized and, to investigate the neuroprotective effect of ACTH, injury extension, neuronal/glial density and reactive gliosis (expression of GFAP, S100 β and NG2) were used as the main. Results showed injured animals that received ACTH₁₋₂₄ experienced neuroprotection evidenced by reduction of injury extension, GFAP, S100 β and NG2 expression and neuronal loss in the periventricular tissue. In addition, SHU9119 did not reverse the neuroprotection of ACTH. These findings indicate that ACTH demonstrated a neuroprotective effect in the model studied and can be a promising treatment for premature newborns with HPIV.

Key-Words: peri-intraventricular-hemorrhage; melanocortins; ACTH; reactive gliosis; GFAP, S100 β ; NG2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores relacionados na patogenia da hemorragia na matriz germinativa em recém-nascidos humanos pré-termos..... 23

Tabela 2. Receptores de melanocortinas: suas afinidades para as diferentes melanocortinas, distribuição tecidual e benefícios experimentais comprovados..... 34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação entre o número de nascimentos prematuros em relação à idade gestacional por área mundial no ano de 2010.....	19
Figura 2. Anatomia periventricular do recém-nascido prematuro e representação da matriz germinativa de ratos.....	22
Figura 3. Imagem representativa dos diferentes graus de hemorragia peri-intraventricular em recém-nascidos humanos pré-termos.....	25
Figura 4. Mecanismos e vias moleculares, extracelulares e intracelulares relacionados à lesão do parênquima cerebral na hemorragia peri-intraventricular.....	26
Figura 5. Esquema conceitual para astrogliose: seus mecanismos de reparo ou lesão tecidual.....	31
Figura 6. Diagrama esquemático da pró-opiomelanocortina e seus fragmentos....	33
Figura 7. Ação das melanocortinas na isquemia cerebral – mecanismos de dano tecidual e ação neuroprotetora.....	36

LISTA DE FIGURAS (REFERENTES AO ARTIGO EM INGLÊS ANEXO)

Figure. 1 Schematic representation for cellular quantification. (a) Cellular quantification procedure performed in the striatum adjacent to microinjections in the experimental groups. Numbers represent the place of tissue sampling and counting. (b) The stereological area of interest ($4000 \mu\text{m}^2$) with including and excluding borders. Neurons are indicated by thin arrows and glia by a dashed arrow.....68

Figure. 2 Plate for injury extension. (a) Representative illustration of minimal, intermediary and maximal injury area in the right hemisphere. (b) Number of rats in each experimental group showing minimal, intermediary or maximal injury in the right hemisphere striatum. (c) Values (mean $\pm$ SD in mm^2) for the area of the right hemisphere striatum where microinjections were done in the experimental groups. (d) Corresponding values (mean $\pm$ SD in mm^2) for the contralateral, right hemisphere striatum.69

Figure. 3 Plate for neural/glial densities. Values (median + interquartile ranges) for (a) the density of neurons and (b) glia cells in the right hemisphere striatum of rats. (c) Representative images of the neurons and glia cells observed in each experimental group.....70

Figure 4. Plate for immunofluorescent data. Values (median and interquartile ranges) for the coverage area of GFAP (a) and density of S100 β (c) and NG2 (e) cells in the right striatum adjacent to tested microinjections. (b), (d) and (f) are representative images of the corresponding results in each group studied.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico

AMPk – Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato

Bcl2 – Célula-B de linfoma 2

Bclxl – Célula-B de linfoma extra grande

BHE – Barreira hematoencefálica

CC – Corpo calose

Coag – Coágulo

FSC – Fluxo sanguíneo cerebral

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GFAP – Proteína ácida glial fibrilar

GFAP-AlexD – Mutação no gene da GFAP para a Doença de Alexander

HIPV – Hemorragia peri-intraventricular

HO – Heme-oxigenase

JNK – c-Jun quinase terminal

ICV - Intracerebroventricular

IG – Idade gestacional

IC – Capsula interna

ICAM – Moléculas de adesão celular

IL – Interleucina

IL-1 β – Interleucina-1-beta

iNos – óxido nítrico-sintase induzida

MAPK – Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MC – Melanocortina

MCR – Receptor de melanocortinas

MG – Matriz germinativa

MHtt-HD – Proteína de Huntington mutante para a doença de Huntington

MSH – Hormônio estimulante dos melanócitos

NG2 – Neural-glia1 antígeno 2

NF-K β – Fator nuclear kappa B

Nrf2 – Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPC – Precursores de oligodendrócitos

PC – Pró-hormônio convertase

p38 – Proteína 38

POMC – Pró-opiomelanocortina

RMS – Rota migratória rostral

RN – Recém-nascido

RNPT – Recém-nascido pré-termo

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SNC – Sistema nervoso central

S1PR – Receptor da esfingosina-1-fosfato

S100 β – Proteína ligante de cálcio

SOD-fALS – Esclerose amiotrófica lateral causada pela mutação do gene codificante da superóxido dismutase

SVZ – Zona subventricular

TLR4 – Receptor Toll do tipo 4

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

UNICEF – Fundo internacional de emergência para a infância das Nações Unidas

WHO – World Health Organization/ Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Prematuridade neonatal.....	18
1.2 Hemorragia peri-intraventricular em recém-nascidos humanos prematuros	20
1.3 Modelo animal de hemorragia peri-intraventricular	28
1.3 Biomarcadores para lesão nervosa	29
1.4 ACTH e neuroproteção	32
2.1 Objetivo Geral	38
2.2 Objetivos Específicos.....	38
3. ARTIGO CIENTÍFICO	39
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÕES	77
6. PERSPECTIVAS.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
Anexo 1	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 Prematuridade neonatal

A Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO 2012) define o nascimento prematuro sendo aquele que ocorre antes da 37ª semana de gestação, podendo ser classificado da seguinte maneira:

- Prematuro extremo: abaixo de 28 semanas de gestação;
- Prematuro moderado: entre 29 e 33 semanas de gestação; e,
- Prematuro tardio: entre 34 e 36 semanas de gestação.

O parto prematuro pode ser classificado em espontâneo ou iatrogênico (indicação médica). Aproximadamente, dois terços dos partos prematuros são espontâneos, sendo a ruptura prematura das membranas e o trabalho de parto prematuro sem causa aparente os principais motivos relacionados ao nascimento pré-termo (Purisch e Gyamfi-Bannerman 2017). Por indicação médica, o parto prematuro está relacionado a várias doenças e/ou condições maternas ou fetais, incluindo pré-eclâmpsia, diabetes, restrição do crescimento intrauterino e placenta prévia (Purisch e Gyamfi-Bannerman 2017).

O nascimento prematuro é uma “epidemia” no mundo todo, com uma incidência global de 15 milhões de nascimentos por ano. Segundo a OMS, em 2010, 11,1% de todos os nascimentos do mundo foram de recém-nascidos (RNs) prematuros, situação que parece aumentar na maioria dos países (WHO 2012). Cerca de 60% dos nascimentos prematuros ocorrem na África e no sul da Ásia, como demonstrado na Figura 1 (WHO 2012; Purisch e Gyamfi-Bannerman 2017). No Brasil, a ocorrência de nascimentos prematuros se assemelha a países de baixa renda, cerca de 11,8%, enquanto em países de renda média a taxa gira em torno de 9,4%. Além disso, no Brasil, as regiões mais desenvolvidas (Sul e Sudeste) são as que apresentam maior índice de prematuridade (12% e 12,5%, respectivamente), seguidos pela Região Centro-Oeste (11,5%), Nordeste (10,9%) e Norte (10,8%) (UNICEF 2013).

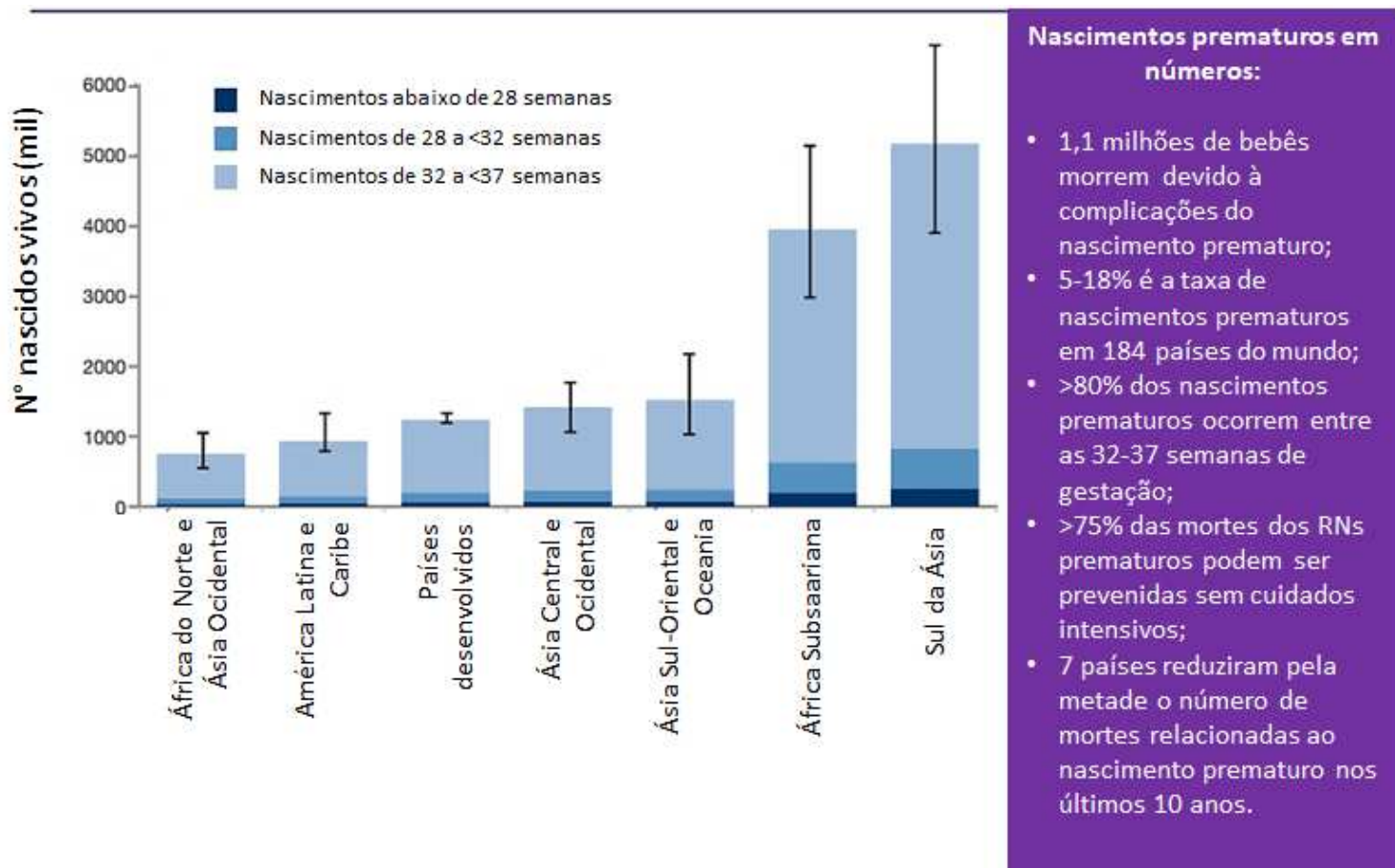


Figura 1. Relação entre o número de nascimentos prematuros em relação à idade gestacional por área mundial no ano de 2010. Adaptado de WHO (2012).

Para o RN, o parto prematuro é um fator de risco que pode impactar de forma negativa direta e/ou indireta sua saúde, bem-estar e desenvolvimento da vida adulta (Vogel 2018). Complicações decorrentes da prematuridade somam cerca de 1 milhão de mortes a cada ano e, além disso, o nascimento prematuro é fator de risco para mais de 75% das mortes neonatais (entre 0 e 28 dias de vida) e cerca de 50% das morbidades perinatais (MacLellan et al. 2010; Andrikopolou et al. 2014). Não obstante, devido aos avanços tecnológicos da medicina neonatal nas últimas décadas e da assistência perinatal com procedimentos terapêuticos mais eficazes, houve redução na mortalidade neonatal e, na América Latina, estima-se em 73% a chance de sobrevivência dos RNs com peso ao nascer abaixo de 1500 g (Alles et al. 2010).

O nascimento prematuro pode resultar em uma série de complicações a curto e longo prazo, com frequência e gravidade de eventos adversos inversamente

proporcionais à idade gestacional (IG) e qualidade dos cuidados prestados (Blencowe et al. 2013). Em estudos recentes, a ocorrência de complicações relacionadas à prematuridade é superior a 50% em todos os casos, o que nos mostra que reduzir a morbimortalidade nessa população ainda é um grande desafio (Marba et al. 2011; Cabral e Velloso 2014).

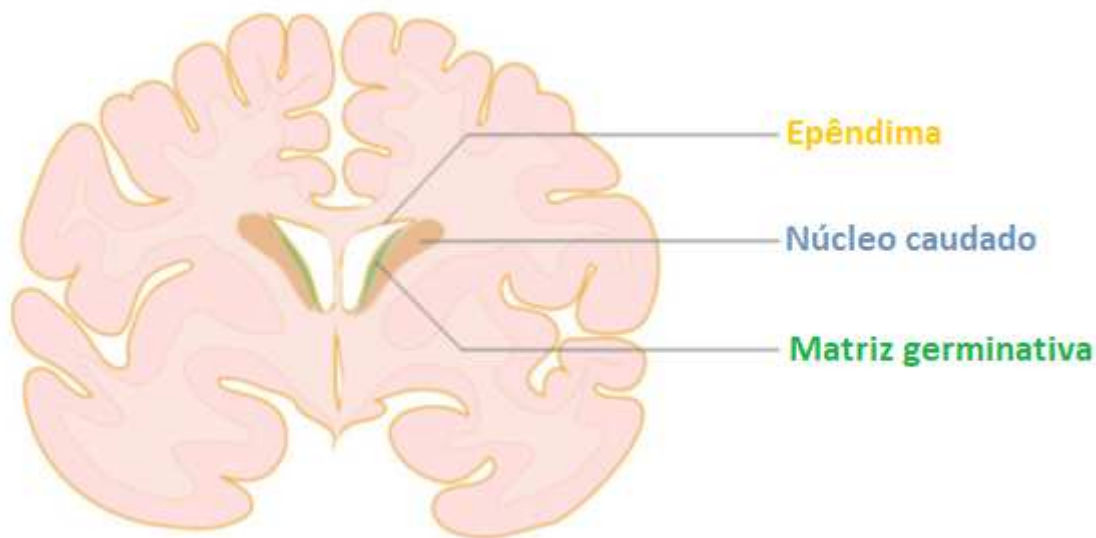
1.2 Hemorragia peri-intraventricular em recém-nascidos humanos prematuros

Uma das principais complicações decorrente da prematuridade é a hemorragia cerebral, e dentre elas, a hemorragia peri-intraventricular (HPIV), descrita a seguir, que, mesmo com os avanços da medicina neonatal, ainda causa sérios impactos no neurodesenvolvimento do RN prematuro (Alles et al. 2010). Sua incidência é inversamente proporcional à IG e ao peso ao nascer, ocorrendo em torno de 50% nos RNs com IG igual ou inferior a 26 semanas, 20 a 45% nos RNs abaixo de 32 semanas e em torno de 20% naqueles com 32 a 34 semanas de IG. Quando relacionado ao peso ao nascer, cerca de 40% dos RNs abaixo de 1500 g desenvolvem algum grau de HPIV. Ainda, o risco de desenvolvimento de HPIV é maior em RNs do sexo masculino quando comparado com o sexo feminino (Neves et al. 2007; Alles et al. 2010; Brasil 2011; Marba et al. 2011; Coskun et al. 2018). Apesar da incidência de HPIV ter diminuído muito nos últimos anos (em torno de 40%), tais dados ainda são graves e podem variar conforme a situação local da unidade de tratamento intensivo onde o RN está sendo atendido e às intervenções de risco a que é submetido (Neves et al. 2007; Alles et al. 2010; Marba et al. 2011).

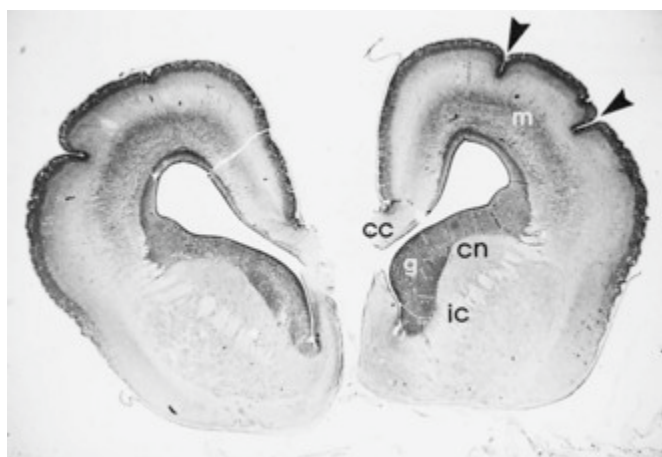
Em seres humanos, a hemorragia intraventricular geralmente ocorre na matriz germinativa (MG) subependimária, com entrada subsequente de sangue no sistema ventricular, podendo causar também lesão na substância branca adjacente, de onde se origina a denominação de HPIV (Airoidi et al. 2009; Alles et al. 2010). A MG é uma área altamente vascularizada, localizada ventro-lateralmente ao ventrículo lateral, em posição superior ao tálamo e medial em relação ao núcleo caudado, na altura do forame interventricular (Figura 2). A MG, entre 10 e 20 semanas de IG serve como origem de células precursoras de neurônios e, no

terceiro trimestre de gestação, provém células precursoras gliais que serão diferenciadas em astrócitos e oligodendrócitos a seguir (Airoidi et al. 2009). A MG, em torno de 23 a 24 semanas de IG possui uma largura de 2,5 mm, regredindo para 1,4 mm na 32^a semana de gestação e involui completamente por volta das 36 semanas de IG, no sentido póstero-anterior (Szymonowicz et al. 1984; Volpe 2001).

A



B



C

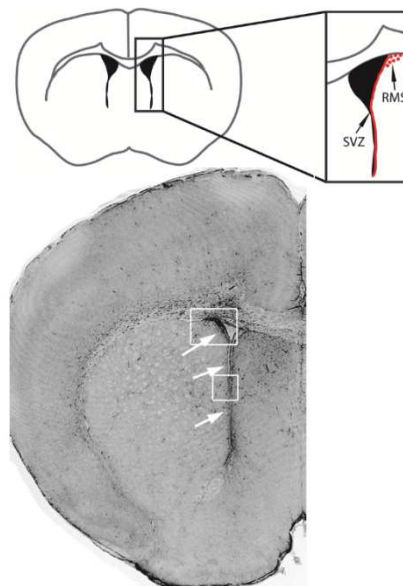


Figura 2. Anatomia periventricular no recém-nascido prematuro e representação da matriz germinativa de ratos. (A) A matriz germinativa (MG) no humano é uma fina camada de massa cinzenta (em verde) localizada logo abaixo do epêndima. Adaptado de Luo et al. (2018). (B) Corte coronal do prosencéfalo de um feto de 16 semanas, onde: g: MG; CC: corpo caloso; CN: núcleo caudado; IC: cápsula interna. Setas indicam os sulcos cerebrais que estão no início do seu desenvolvimento. Adaptado de Sarnat e Flores-Sarnat (<https://neupsykey.com/developmental-disorders-of-the-nervous-system/>). (C) Em ratos, a matriz germinativa é denominada como zona subventricular (SVZ). Imagem superior: ilustração de um corte coronal do cérebro do rato, evidenciando a SVZ (linha vermelha). Imagem inferior: Fotografia de um corte coronal de cérebro de rato contendo a SVZ. As setas indicam a SVZ. RMS: “rota migratória rostral”. Adaptado de Levinson et al. (2001), Lacar et al. (2010) e Sabel (2017).

A rede vascular que nutre a MG é primitiva nas fases iniciais da gestação e possui características que a torna mais vulnerável a sangramento, tais como: diâmetro dos vasos relativamente grande em comparação com paredes ainda finas; ausência de camada muscular, elastina ou colágeno; imaturidade das junções endoteliais e da lâmina basal; e ausência de contato direto com estruturas gliais perivasculares (Alles et al. 2010; Ballabh 2010).

Foi demonstrado que a patogenia da hemorragia na MG no prematuro humano está relacionada com inúmeros fatores de risco, que podem ser divididos em intravasculares, vasculares e extravasculares, conforme tabela a seguir (Cloherty et al. 2005):

Tabela 1. Fatores relacionados na patogenia da hemorragia na matriz germinativa em recém-nascidos humanos pré-termos.

Fatores intravasculares	- Isquemia / Reperfusão (infusão de volume após hipotensão); - Variação do fluxo sanguíneo cerebral (uso de ventilação mecânica, por exemplo); - Aumento do fluxo sanguíneo cerebral (hipertensão arterial sistêmica, hipercapnia); - Aumento da pressão venosa central; - Distúrbios de coagulação e disfunção plaquetária
Fatores vasculares	- Fragilidade dos vasos da matriz germinativa – ausência de camada muscular, pouca camada adventícia, grande diâmetro luminal e paredes finas
Fatores extravasculares	- Suporte extravascular deficiente e atividade fibrinolítica excessiva

Fonte: Adaptado de Cloherty et al. (2005).

Em todos os fatores relacionados com a variação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) arterial e venoso, o papel da circulação cerebral passiva à pressão provavelmente é o que ganha maior destaque, pois o RN pré-termo (RNPT)

apresenta uma capacidade diminuída para regular o FSC em resposta a alterações na pressão sanguínea arterial e venosa (Ballabh 2010). Autorregulação cerebral é a capacidade dos vasos cerebrais em manter o FSC relativamente constante, dentro de limites fisiológicos, apesar da variação da pressão sanguínea (Ballabh 2010). A adequada autorregulação do FSC está intimamente ligada à IG e ao peso ao nascer, fazendo com que o RNPT se torne mais suscetível à ruptura dos frágeis vasos da MG frente a aumentos da pressão arterial e/ou venosa (Cloherty et al. 2005).

Desta forma, a HPIV é considerada um evento patológico multifatorial, definida como a ruptura da rede vascular imatura e delicada da MG, causada, sobretudo, por distúrbios do FSC e aumento da pressão sanguínea dentro dos vasos, sendo o período de maior risco as primeiras 72 horas após o nascimento (Cloherty et al. 2005; Ballabh 2010; Aquilina 2011, Gangoni e Formiga 2012).

O sangramento na MG, quando drenado para os ventrículos cerebrais, pode evoluir para infarto hemorrágico periventricular, leucomalácia periventricular e hidrocefalia pós-hemorrágica (Volpe 2001; Ballabh 2010). Assim, na sua forma mais grave, o sangramento na MG pode progredir para dentro da cavidade ventricular e, em seguida, para o parênquima cerebral, dando origem aos diferentes graus de gravidade e comprometimento estrutural, a saber:

Grau I - hemorragia restrita à MG,

Grau II - hemorragia intraventricular sem dilatação ventricular,

Grau III - hemorragia intraventricular com dilatação ventricular e

Grau IV - comprometimento parenquimatoso que pode significar infarto hemorrágico ou leucomalácia periventricular (Figura 3) (Volpe 2001; Ballabh 2010; Marba et al. 2011; Lekic et al. 2012).

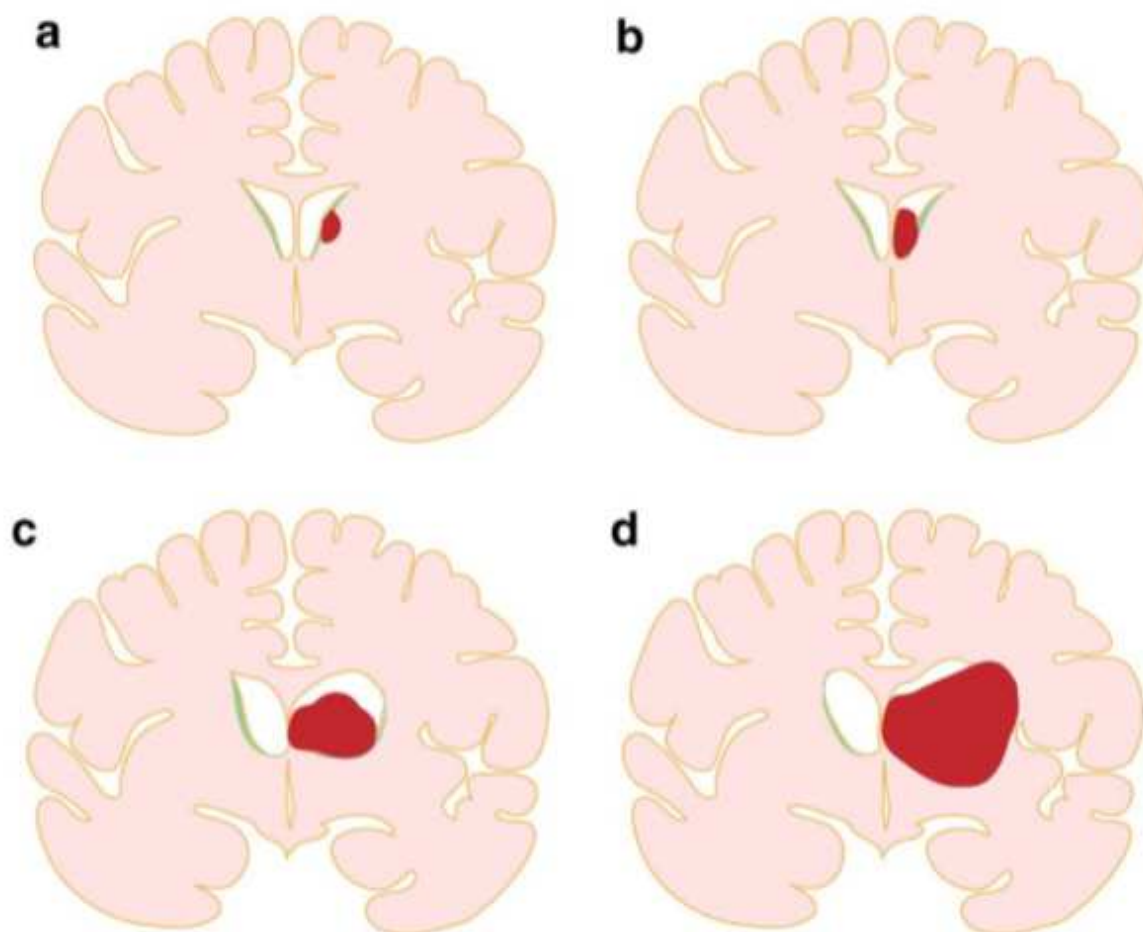


Figura 3. Imagem representativa dos diferentes graus de hemorragia peri-intraventricular em recém-nascidos humanos pré-termos. (a) Grau I; (b) Grau II; (c) Grau III; (d) Grau IV. Adaptado de Luo et al., 2018.

Dessa forma, os principais mecanismos envolvidos na injúria cerebral do prematuro com HPIV são: (1) a hemorragia pode ser antecedida por hipóxia-isquemia; (2) ocorre destruição da MG e de seus precursores gliais e neuronais; (3) a substância branca periventricular é destruída (ou seja, ocorre infarto hemorrágico periventricular); (4) a lesão da substância branca periventricular é resultado da ativação da microglia, dos produtos do sangramento intraventricular com vasoconstrição e geração de radicais livres teciduais (Figura 4); (5) o desenvolvimento dessa porção cerebral passa a ficar comprometido; (6) há aumento expressivo na pressão intracraniana e consequentemente comprometimento da perfusão cerebral, o que pode gerar reflexamente ainda mais aumento da pressão sanguínea; (7) acontece vasoespasmo com isquemia focal; e,

A evolução desse tipo de sangramento é preocupante, pois os graus mais avançados de HPIV estão associados a altos índices de mortalidade e a danos celulares e neurológicos graves, com ocorrência de sequelas motoras e cognitivas devido à redução no número de axônios, dendritos, mielina e sinapses, resultando na limitação do desenvolvimento dessa criança (Neves et al. 2007; Alles et al. 2010; Aquilina 2011; Lekic et al. 2012). De fato, após a HPIV, o desenvolvimento normal deste RN estará comprometido devido à destruição dos precursores gliais locais. A destruição da oligodendroglia resulta em prejuízos no processo de mielinização axonal, e está intimamente associada a déficits motores futuros (Inder 2006). Além disso, com a destruição da MG, o desenvolvimento dos astrócitos destinados à camada cortical do cérebro estará prejudicado, refletindo na perda de volume da substância cinzenta e, consequentemente, em déficits cognitivos (Inder 2006). Estima-se que 40% dos RNs com HPIV apresentarão déficits neurocognitivos, leucomalácia periventricular, hidrocefalia pós-hemorragica e paralisia cerebral, sendo que nos RNs que apresentam hemorragia grau IV a ocorrência de paralisia cerebral aumenta para 80 a 90% (Coskun et al. 2018).

Na maioria das vezes, o quadro inicial da HPIV é assintomático ou inespecífico e os sinais e sintomas dependem da velocidade de instalação da hemorragia, da sua extensão, do local mais acometido e de sua evolução (Alles et al. 2010). Desse modo, na sua apresentação clínica mais grave, o RN apresenta rápida deterioração neurológica, evoluindo em minutos ou horas com estupor, coma profundo, hipoventilação ou apnéia, convulsões, ausência de reação pupilar, postura em descerebração, hipotensão, abaulamento de fontanela e perda do tônus muscular esquelético) com índices de mortalidade de 50 a 60% (Kopelman e Goulart 2004; Douglas-Escobar e Weiss 2013). Na sua forma 'silenciosa', os sinais são discretos, sendo a queda do hematócrito o achado clínico mais importante. O diagnóstico é realizado, principalmente, após exames de imagem de rotina, sendo a ecografia transfontanelar o método principal de escolha, pois trata-se de um exame seguro, de baixo custo, apresenta boa sensibilidade e especificidade e, sobretudo, pode ser realizado à beira do leito (Alles et al. 2010; Marba et al. 2011; Douglas-Escobar e Weiss, 2013).

O tratamento para HPIV consiste principalmente em monitorar a evolução da hemorragia e tratar suas complicações e deve ser direcionado para a manutenção de uma perfusão cerebral estável, mediante a manutenção da pressão arterial e do volume circulante e de um suporte ventilatório adequado (Cloherty et al. 2005). Transfusões de concentrados de hemácias podem ser necessários nos casos de hemorragias maiores para restaurar o hematócrito e volume sanguíneos normais. Além disso, quando o RN apresenta crises convulsivas e aumento da pressão intracraniana e perímetro cefálico, administra-se anticonvulsivantes e são realizadas punções lombares ou ventriculares para drenagem do líquido (Cloherty et al. 2005; Mccrea e Ment 2008).

1.3 Modelo animal de hemorragia peri-intraventricular

Modelos experimentais de hemorragia intracraniana tem sido usados desde a década de 60, valendo-se de injeção intracerebral de sangue autólogo ou collagenase ou por avulsão de vasos sanguíneos cerebrais em diversas espécies (roedores, coelhos, gatos, porcos, babuínos e outros primatas) (Yan et al. 2015).

A collagenase é uma metaloproteinase e, devido a sua capacidade de degradar o colágeno, está envolvida na ruptura das matrizes extracelulares das células animais (Duarte et al. 2016). No sistema nervoso central (SNC), a collagenase hidrolisa o colágeno presente na membrana basal dos capilares, causando sangramento no parênquima cerebral (Alles et al. 2010). Com base nisso, Rosenberg e colaboradores (1990) desenvolveram um modelo experimental utilizando infusão de collagenase em ratos adultos. Mais tarde, outros autores (Alles et al. 2010 e Lekic et al. 2012) desenvolveram um modelo de hemorragia espontânea na MG de ratos neonatos utilizando microinjeção de collagenase tipo VII. Com isso, criou-se um modelo animal para HPIV com consequências neurológicas que evidenciava alterações similares às encontradas em humanos, como déficit motor e cognitivo, dilatação ventricular e redução do volume do encéfalo na região do hemisfério lesionado.

1.4 Biomarcadores para lesão nervosa

Entende-se por biomarcadores as substâncias mensuráveis, em sua maior parte proteínas endógenas, que tem possibilidade ou comprovação como indicadores de presença ou gravidade de lesão tecidual com maior ou menor especificidade (Strimbu e Tavel 2010). Nesse sentido, a correlação entre níveis séricos e líquóricos de proteínas neurogliais, exames de imagem, escores clínicos e avaliação neuropsicológica, indicam que biomarcadores podem ser utilizados para a investigação da fisiopatologia de lesão do SNC (Böhmer et al. 2011). Desse modo, biomarcadores podem ser utilizados para elucidar possíveis mecanismos patogénéticos e atuar como preditores da lesão cerebral nos neonatos prematuros (Douglas-Escobar e Weiss 2013; Andrikopolou et al. 2014), possibilitando que tratamentos e intervenções sejam realizados tão logo sejam detectadas alterações neurogliais relacionadas com hemorragias cerebrais. Alguns biomarcadores potenciais estudados no tecido nervoso, no líquido, urina ou no plasma que podem indicar alterações centrais são a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a proteína S100 β e a NG2 (“neural/glial antígeno 2”) (Böhmer et al. 2011; Douglas-Escobar e Weiss 2013; Andrikopolou et al. 2014).

A GFAP, uma das proteínas que compõe os filamentos intermediários do citoesqueleto dos astrócitos, está intimamente relacionada às modificações na composição, forma e função dessas células e tem sido amplamente utilizada como um biomarcador para lesões cerebrais (Douglas-Escobar e Weiss 2012). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC e estão envolvidos em diversas funções importantes para a homeostase do SNC e sobrevivência neuronal, por exemplo: (1) captação e liberação de diversos gliotransmissores, participando ativamente na formação, função e estabilidade das sinapses (sinapse multipartite); (2) metabolismo de glutamato e GABA; (3) manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular; (4) formação da barreira hematoencefálica; (5) componentes-chaves da gliose reativa; e (6) crescimento de neuritos e secreção de fatores tróficos relacionados à sobrevivência e diferenciação dos neurônios (Chen e Swanson 2003; Privat 2003; Schousboe et al. 2004; Gomes et al. 2013; Neves et al. 2017). Desse modo, a função dos astrócitos pode influenciar criticamente a homeostasia

nervosa e sobrevivência neuronal durante processos isquêmicos e outras lesões SNC (Chen e Swanson 2003).

O astrócito, após trauma, isquemia ou doenças neurodegenerativas, assume um fenótipo reativo, apresentando hipertrofia e aumento na expressão de suas proteínas estruturais, como a GFAP, fenômeno chamado de gliose reativa ou “astrogliose” (Chen e Swanson 2003; Hol e Pekny 2015). Astrogliose é uma resposta adaptativa e complexa do SNC e está envolvida principalmente na proteção e reparo tecidual, porém, em determinadas situações esse fenômeno pode resultar em danos permanentes no tecido cerebral (Mestriner et al. 2015; Sofroniew 2015). O astrócito reativo pode se apresentar com 2 fenótipos, chamados “A1” e “A2” (Liddelow et al. 2017). Os astrócitos do tipo A1 são ativados pela micróglia durante a inflamação e possuem características neurotóxicas, pois perdem a capacidade de desempenhar as funções essenciais para a homeostase do SNC e liberam fatores tóxicos locais capazes de causar a destruição de neurônios e oligodendrócitos (Liddelow e Barres 2017; Clarke et al. 2018). Em contrapartida, o astrócito com o fenótipo do tipo A2 está relacionado com a regulação da maioria dos fatores neurotróficos, os quais promovem sobrevivência e crescimento neuronal e reparo das sinapses (Liddelow e Barres 2017; Liddelow et al. 2017).

Sendo assim, a astrogliose engloba quatro características principais: (1) alterações moleculares, celulares e funcionais nos astrócitos ocorrem em resposta a todas as formas e gravidade de lesão e doenças do SNC; (2) as mudanças sofridas por astrócitos reativos variam com a gravidade da lesão; (3) as alterações associadas à astrogliose são reguladas de maneira específica por várias moléculas de sinalização intracelulares e extracelulares; e (4) as mudanças sofridas durante a astrogliose têm o potencial de alterar as atividades dos astrócitos tanto para ganho como para perda de função, ou seja, a astrogliose pode ser benéfica ou lesiva (Sofroniew 2015), como descrito na Figura 5.

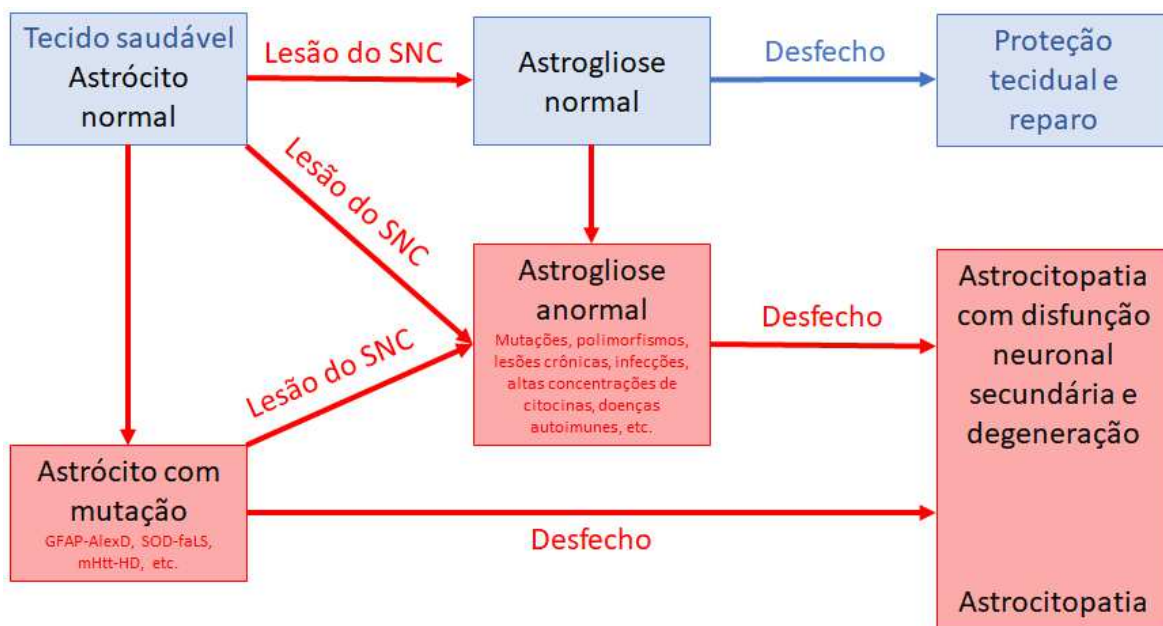


Figura 5. Esquema conceitual para astrogliose: seus mecanismos de reparo ou lesão tecidual. Em azul, processos adaptativos ou benéficos da astrogliose. Em vermelho, mecanismos pelos quais as disfunções da astrogliose podem ser causas primárias ou principais para os distúrbios do SNC. GFAP-AlexD – “mutação no gene da GFAP para a Doença de Alexander”; SOD-fALS – “esclerose amiotrófica lateral causada pela mutação do gene codificante da superóxido dismutase”; mHtt-HD – “proteína de huntington mutante para doença de Huntington”. Adaptado de Sofroniew (2015).

S100 β é uma proteína ligante de cálcio, fisiologicamente produzida e liberada por astrócitos no SNC (Böhmer et al. 2011). A S100 β desempenha duas funções, dependendo da sua concentração local. Ou seja, em concentrações nanomolares a S100 β é neurotrófica, mas quando está superexpressa e em concentrações micromolares pode aumentar a neuroinflamação e a apoptose neuronal (Gazzolo et al. 2009; Florio et al. 2010; Douglas-Escobar e Weiss 2013).

A expressão de NG2 no SNC tem sido utilizada como um critério para identificar células precursoras de oligodendrócitos (OPCs) (Chittajallu et al. 2004). Oligodendrócitos sintetizam e mantêm a bainha de mielina e estão entre as células mais vulneráveis do SNC à danos oxidativos mediados por radicais livres e inflamação (Khawaja e Volpe 2008). Em animais e humanos, após lesões no SNC, que resultam na perda de oligodendrócitos, a capacidade proliferativa das OPCs aumenta rapidamente, consequentemente aumentando a expressão de NG2 (Valny et al. 2017; George e Geller 2018). Além disso, o potencial de diferenciação

das OPCs amplia, podendo se diferenciar em astrócitos ou até mesmo em neurônios (Valny et al. 2017).

Com isso, esses três biomarcadores poderiam ser testados em casos de HPIV e o que ocorre com suas expressões comparativamente a grupos controle. Após isso, poder-se-ia testar se a substância neuroprotetora poderia gerar valores menores desses biomarcadores e esses dados estarem relacionados com menor área de lesão tecidual cerebral. De fato, esses são alguns dos objetivos da presente dissertação.

1.4 ACTH e neuroproteção

O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), igualmente um dos temas principais do presente trabalho, e os hormônios estimulantes de melanócitos (α -, β - e γ -MSH) são peptídeos endógenos produzidos a partir do gene que codifica a proteína maior pró-opiomelanocortina (POMC), coletivamente chamados de melanocortinas (Giuliani et al. 2007, 2011, 2012). A clivagem do POMC pela enzima pró-hormônio convertase 1 na hipófise anterior leva à formação do ACTH, o qual pode ser clivado pela pró-hormônio convertase 2, gerando α -MSH (Figura 6) (Ross et al. 2013). O ACTH é um polipeptídeo de cadeia simples e a sua sequência completa compreende 39 aminoácidos (ACTH₁₋₃₉), da qual o α -MSH corresponde à sequência de aminoácidos 1-13. O ACTH está envolvido com o trofismo, o desenvolvimento e a função do córtex adrenal e, preferentemente, na síntese de glicocorticoides, como o cortisol em humanos e a corticosterona em ratos (Getting 2002; Ghaddhab et al. 2017).

Todas as melanocortinas compartilham uma sequência invariável de 4 aminoácidos (HFRW), o que explica receptores e funções sobrepostas entre si (Getting 2002; Ross et al. 2013), além de possuírem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica em concentrações fisiológicas e farmacológicas relevantes (Giuliani et al. 2011; Spaccapelo et al. 2011).

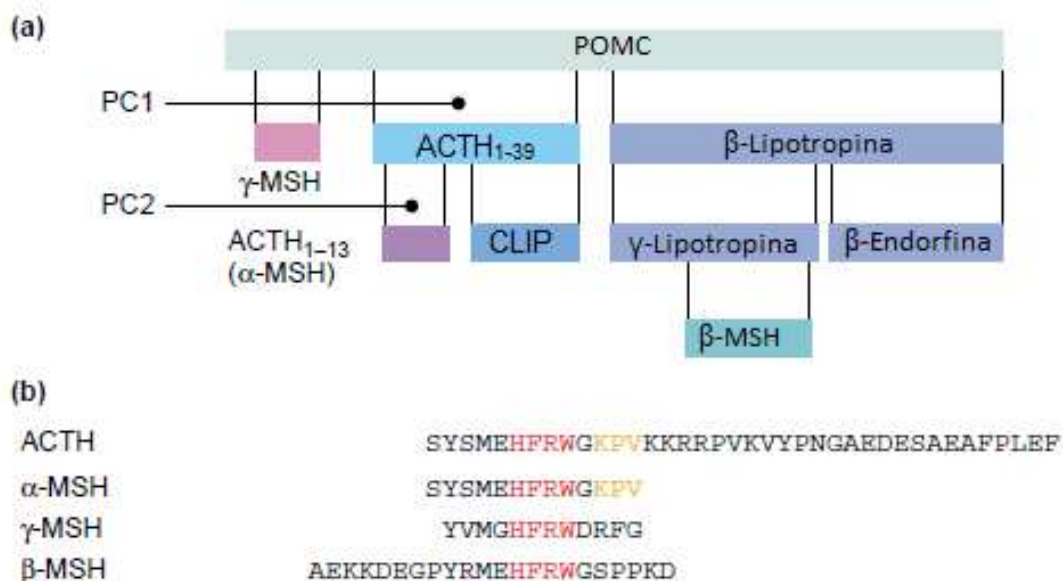


Figura 6. Diagrama esquemático da pró-opiomelanocortina (POMC) e seus fragmentos. (a) O peptídeo POMC sofre clivagem proteolítica pelas PC1 e PC2, com PC1 gerando o ACTH e PC2 levando à geração do α-MSH. (b) Todos os peptídeos derivados contêm uma sequência de aminoácidos em comum - HFRW (destacado em vermelho). O triplo peptídeo KPV (destacado em laranja) tem a capacidade de antagonizar efeitos da interleucina 1. PC1: Pró-hormônio convertase 1; PC2: Pró-hormônio convertase 2. Adaptado de Getting (2002).

As melanocortinas só exercerão seus efeitos após sua ligação e ativação dos receptores de melanocortinas (MCRs) (Lasaga et al. 2008; Catania et al. 2010; Giuliani et al. 2012). Cinco subtipos de receptores de melanocortinas estão descritos na literatura, classificados como MCR1 – MCR5. Os MCRs pertencem à família dos receptores associados às proteínas G e diferem entre si na afinidade de ligação às diferentes melanocortinas e na sua distribuição nos tecidos (Lasaga et al. 2008; Catania et al. 2010), conforme demonstrado na tabela 2. Todos os 5 MCRs são ativados pelo ACTH, entretanto, o MCR2 não é ativado pelas outras melanocortinas (Lasaga et al. 2008). O MCR2 é o receptor presente no córtex da adrenal e sua ativação estimula a secreção de glicocorticoides (Lasaga et al. 2008). O MCR4 é receptor mais prevalente no tecido cerebral, seguido do MCR3, e estão envolvidos na regulação da homeostase energética, inflamação e comportamento alimentar (Catania et al. 2010). O receptor MCR4 está relacionado com as principais funções centrais das melanocortinas, incluindo neuroproteção (Catania et al. 2010).

Tabela 2. Receptores de melanocortinas: suas afinidades para as diferentes melanocortinas, distribuição tecidual e benefícios experimentais comprovados.

Receptor	Afinidade para melanocortinas	Distribuição tecidual	Benefícios experimentais comprovados
MCR1	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	Melanócitos, células gliais, células imunes/inflamatórias, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, testículo, rim	Pigmentação, efeitos antipiréticos e anti-inflamatórios
MCR2	ACTH	Glândula suprarrenal e tecido adiposo	Esteroidogênese
MCR3	γ -MSH = β -MSH = ACTH = α -MSH	SNC, coração, rim, intestino, sistema imunológico, músculo esquelético	Recuperação da função cardíaca, redução da área infartada, homeostasia energética, efeitos anti-inflamatórios, natriurético, comportamento alimentar
MCR4	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	SNC, detectado em baixas concentrações no músculo esquelético, linfócitos e alguns órgãos periféricos	Efeitos anti-inflamatórios e antipiréticos, aumento da neuroproteção, aumento da neurogênese, homeostasia energética, comportamento sexual, aumento da espermatogênese, reversão de choque circulatório
MCR5	α -MSH $\geq$ β -MSH = ACTH > γ -MSH	Glândulas exócrinas	Secreção exócrina

Fonte: Adaptado de Lasaga et al. (2008), Catania et al. (2010) e Giuliani et al. (2012).

Trabalhos prévios demonstraram efeito neuroprotetor do ACTH e do α -MSH em lesões do parênquima nervoso e diante de condições hipóxicas, como choque circulatório, parada respiratória e isquemia do miocárdio (Giuliani et al. 2007a, 2011, 2012).

Trabalhos neste sentido foram realizados por Guarani et al. (2004) ao demonstrar que, em ratos, o ACTH₁₋₂₄ suprimiu a resposta inflamatória sistêmica e reverteu a condição de choque hemorrágico pela ativação de respostas anti-inflamatórias. Após reproduzir um modelo de isquemia cerebral em ratos pela oclusão das artérias vertebrais, Aronsson et al. (2006) descreveram que a administração de α -MSH na dose de 0,5 mg/kg 30 minutos, 24, 48, 72 e 96 horas após o início da isquemia foi capaz de promover ação neuroprotetora nos neurônios piramidais do hipocampo e, concomitantemente, reduzir a ativação astrogliar. Giuliani et al. (2007), após gerarem modelo de isquemia cerebral em ratos por microinjeção de endotelina-1 no estriado, trataram os animais, por via intraperitoneal, com doses nanomolares de α -MSH por 11 dias, iniciando-as 3 ou 9

horas após a indução da lesão. α – MSH apresentou ação neuroprotetora, inclusive em modelos graves de isquemia cerebral, com período de ação terapêutica considerável uma vez que não houve diferença significativa nos efeitos quando os tratamentos foram iniciados 3 h ou 9 h após a microinjeção de endotelina-1. Chen et al. (2008) demonstraram que o α -MSH foi capaz de diminuir o volume da região com lesão isquêmica cerebral em ratos Wistar adultos submetidos à oclusão da artéria cerebral média quando comparados ao grupo controle. A seguir, Giuliani et al. (2011) descreveram que NDP- α -MSH, análogo sintético da α -MSH, recuperou a resposta funcional, neste caso aprendizado e memória, e estimulou a neurogênese após isquemia cerebral. Mais recentemente, Benjamins et al. (2013, 2014) e Lisak et al. (2015) descobriram que, *in vitro*, o efeito direto do ACTH na oligodendroglia e nos neurônios protege-os de grave apoptose, excitotoxicidade e alterações relacionados à inflamação. É muito provável que o efeito neuroprotetor das melanocortinas ocorra pela inibição dos principais mecanismos de dano cerebral (superprodução de radicais livres, excitotoxicidade, resposta inflamatória e apoptose), mantendo íntegra a transmissão sináptica e a plasticidade neuroglial tecidual (Figura 7) (Trato 2005; Catania 2008). Alguns estudos indicam ainda que o efeito neuroprotetor das melanocortinas é diretamente proporcional ao momento em que se inicia o tratamento após a lesão, sugerindo-se que 18 horas é o tempo limite para que se obtenham resultados favoráveis (Bazzani et al. 2002; Giuliani et al. 2007; Catania 2008; Giuliani et al. 2014a).

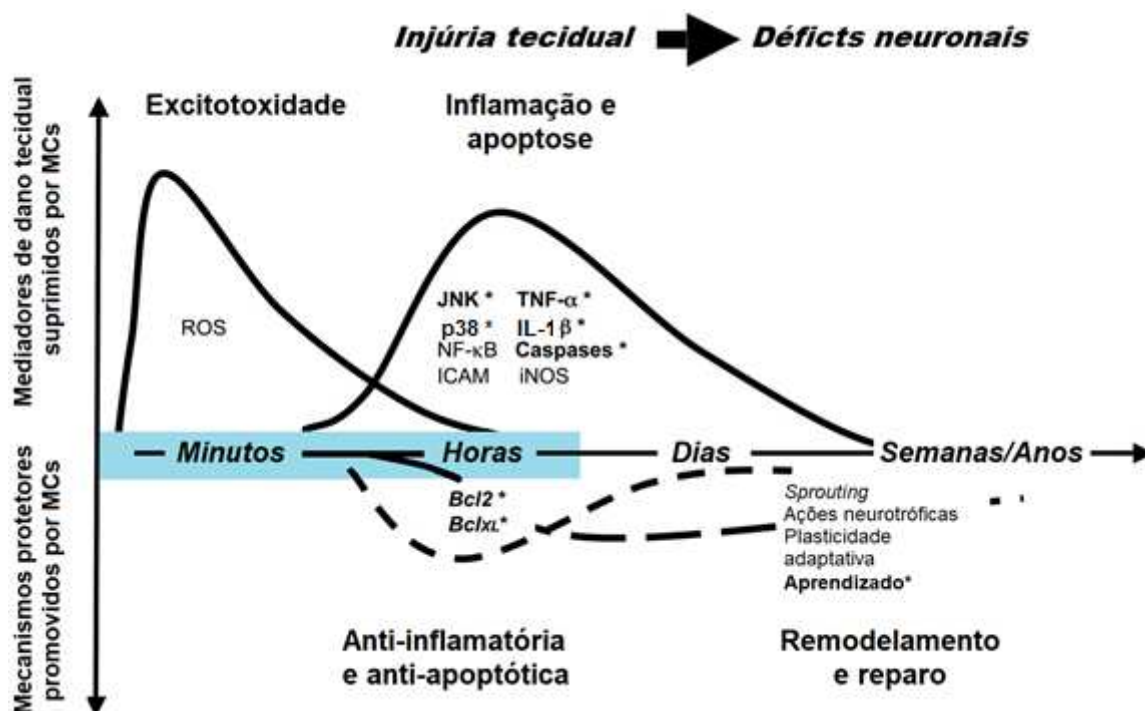


Figura 7. Ação das melanocortinas na isquemia cerebral – mecanismos de dano tecidual e ação neuroprotetora. Melanocortinas suprimem processos mediadores de dano tecidual e promovem processos neuroprotetores em isquemia cerebral. O gráfico retrata alguns mediadores pós-isquêmicos de dano cerebral e neuroproteção que podem ser modulados pelas melanocortinas. *Achados em modelos de isquemia cerebral; outros foram demonstrados em inflamações cerebrais ou sistêmicas, isquemia de órgãos, lesão nervosa ou em células neuronais/gliais *in vitro*. A barra azul indica o tempo estabelecido para a administração eficaz das melanocortinas na isquemia cerebral. MCs: melanocortinas, ROS: espécies reativas de oxigênio, JNK: c-Jun quinase terminal, p38: proteína 38, NF-κB: fator nuclear kappa B, ICAM: moléculas de adesão celular, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa, IL-1β: interleucina-1-beta, iNOS: óxido nítrico-sintase induzida, Bcl2: “célula-B de linfoma 2”, Bclxl: “célula-B de linfoma extra grande”. Adaptado de Tatro (2005).

Modelos de isquemia/hemorragia em ratos têm sido amplamente utilizados para testar mecanismos “*in vivo*” de neuroproteção e reparação neural após injúria cerebral (Mestriner et al. 2015) e significam um grande avanço para compreender a fisiopatologia da lesão nervosa e gerar possibilidades terapêuticas. Apesar do desenvolvimento de modelos animais de HPIV em ratos RNs, ainda não há estudos que demonstrem a ação do ACTH no tecido cerebral de ratos neonatos após a indução de HPIV.

Assim, o estudo de possíveis efeitos neuroprotetores do ACTH em condições de HPIV são importantes, não somente para a proteção de neurônios, mas também

de outras células cerebrais, como astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (Catania 2008), e pode servir como uma nova abordagem terapêutica em casos onde a mortalidade e a ocorrência de sequelas é alta.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação neuroprotetora do ACTH em um modelo de hemorragia peri-intraventricular em ratos Wistar neonatos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a indução de hemorragia peri-intraventricular em ratos Wistar com um dia de vida pela infusão de collagenase intracerebroventricular;
- Analisar histologicamente a região periventricular para avaliar comprometimento neuronal e glial após hemorragia no tecido nervoso adjacente à lesão;
- Estudar os efeitos temporais (às 12 h) após a infusão da collagenase na extensão da lesão cerebral para definir o melhor momento de intervenção terapêutica;
- Realizar análise imunohistoquímica dos cortes obtidos com o intuito de mensurar e relacionar os marcadores bioquímicos GFAP, S100 β e NG2 com a lesão cerebral ocorrida;
- Estudar os efeitos neuroprotetores do ACTH na extensão da lesão hemorrágica, na contagem de neurônios e células gliais no local lesionado e na expressão de biomarcadores relacionados com o dano parenquimatoso cerebral.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Este artigo será submetido ao periódico “*Brain Structure and Function*”, fator de impacto 4.231 (2017).

Neuroprotective effect of ACTH on collagenase-induced periventricular hemorrhage in rat pups

Camila A. Martins^{1,2}, Laura Tartari Neves³, Marina Mena Barreto³, Pamela Brambilla Bagatini³, Rafaela Barboza³, Régis Gemerasca Mestriner^{3*}, Léder Leal Xavier^{3*}, Alberto Antônio Rasia-Filho^{2,4*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brasil.

² Departamento de Ciências Básicas/Fisiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brasil.

³ Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90619-900, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 90170-050, RS, Brasil.

* These authors contributed equally to the present work.

****Corresponding author:** Prof. A. A. Rasia-Filho, UFCSPA/DCBS/Physiology, R. Sarmiento Leite 245, Porto Alegre 90170-050-RS, Brazil. E-mail: rasiafilho@pq.cnpq.br; aarf@ufcspa.edu.br

Abstract

Few agents are currently available that promote effective neuroprotection in the peri-intraventricular hemorrhage (PIVH), a serious premature-related complication. Melanocortins such as ACTH₁₋₂₄ have anti-inflammatory properties that suggest its potential candidate neuroprotection after PIVH. Therefore, this study sought to investigate the neuroprotective effect of ACTH on a collagenase-induced PIVH model in Wistar rat pups. Injury extension, neuronal/glial densities and reactive gliosis were used as the main outcomes. Briefly, animals received microinjections containing 3 IU of collagenase type VII or PBS on post-natal day 1 (P1) in the periventricular zone. 12 hours later, all the PIVH or sham animals (a total of eight groups) received a combination of 0.048 mg/kg of ACTH₁₋₂₄, 0.06 nmol of SHU9119 (MCR3/MCR4 antagonist) or PBS in the same injury location. Our findings revealed injured animals injected with ACTH₁₋₂₄ experienced an important neuroprotection evidenced through reductions in lesion extension, GFAP, S100 β and NG2-positive cell proliferation as well as neuronal loss in the periventricular tissue. Overall, we concluded a single dose of ACTH reversed glial reactivity, preserved neural/glial cell densities in the perilesional tissue and reduced the extension of the PIVH damage most likely via MCR3/MCR4 independent/compensatory pathways.

Key-words: peri-intraventricular hemorrhage; melanocortins; ACTH; reactive gliosis; GFAP; S100 β ; NG2-positive cells.

INTRODUCTION

Complications due to prematurity (i.e., in infants born prior to 37 weeks of gestation) account for approximately one million deaths per year in the world, which corresponds to 75% of all human neonatal deaths (Maclellan et al. 2010; Andrikopolou et al. 2014) as well as 40% of the neurologically impaired children (Florio et al. 2010). Premature births account near 15 million per year, representing 11% of all births in 2010 (WHO 2012; Purisch and Gvamfi-Bannerman 2017).

Peri-intraventricular hemorrhage (PIVH) is one of the most severe premature-related complications and leads to serious neurodevelopmental problems (Alles et al. 2010). Its incidence is inversely proportional to gestational age and newborn weight, affecting nearly 50% of infants born on or before the 26th week (Alles et al. 2010; Brasil 2011; Marba et al. 2011). Moreover, the risk of PIVH and its damaging consequences is higher in male than in female newborns (Coskun et al. 2018).

PIVH affects the germinal matrix (GM) - a highly vascularized area, located between the head of the caudate nucleus and thalamus, underneath the periventricular ependyma - responsible for neuronal and glial proliferation and migration. For instance, GM provides glioblasts that differentiate into oligodendroglia and astrocytes during brain development (Ballabh 2010). PIVH is a multifactorial event, defined as the rupture of thin, fragile and immature vessels in the GM with the subsequent leakage of blood into the ventricular system, mainly caused by changes in cerebral blood pressure and flow (Cloherty et al. 2005; Ballabh 2010; Aquilina 2011). It more frequently occurs during the first 72 hours after birth, damages the GM and the adjacent white matter resulting in cerebral palsy, periventricular hemorrhagic infarct, periventricular leukomalacia, post-hemorrhagic hydrocephalus, and cognitive deficits (Alles et al. 2010; Lekic et al. 2012; Coskun et al. 2018).

Neuroglial proteins can be used as biomarkers to indicate the presence or severity of tissue injury and are used to investigate physiopathology in the central nervous system (CNS) (Florio et al. 2010; Douglas-Escobar and Weiss 2013; Andrikopolou et al. 2014). Some biomarkers studied in the nervous tissue, cerebrospinal fluid or plasma can be overexpressed after brain injury indicating changes in tissue protection and repair (Florio et al. 2010; Sofroniew 2015). Some neuroglial proteins such as glial fibrillary acid protein (GFAP), S100 β protein and NG2 (neural/glial antigen 2) can elucidate possible mechanisms and

severity of brain injury in prematurity (Gazzolo et al. 1999, 2009; Florio et al. 2010; Douglas-Escobar and Weiss 2013; Andrikopolou et al. 2014). GFAP is the cytoskeletal intermediate filament mostly expressed in mature astrocytes (Douglas-Escobar and Weiss 2013). S100 β is a calcium-binding protein physiologically expressed and released by astrocytes in the CNS (Böhmer et al. 2011). The expression of NG2 has been widely employed as a criterion to identify oligodendrocyte progenitors (Chittajallu et al. 2004).

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and α -, β - e γ -melanocyte-stimulating hormones (α -, β - e γ -MSH) are endogenous peptide products of the pro-opiomelanocortin gene, collectively called melanocortins (Giuliani et al. 2007, 2011, 2012). Melanocortins act via five melanocortin receptors (MCRs) (Lasaga et al. 2008; Catania et al. 2010; Giuliani et al. 2012), classified as MCR1-MCR5 (Lasaga et al. 2008; Catania et al. 2010). MCR4 and MCR3 are the most prevalent MCRs in the brain and are involved in the regulation of energy homeostasis, control of inflammation and feeding behavior (Catania et al. 2010). MCR4 mediates most of the central effects of melanocortins, including neuroprotection (Catania et al. 2010).

Several studies have shown neuroprotector effects of ACTH and α -MSH in lesions of nervous parenchyma and in hypoxic conditions, such as hemorrhagic shock, prolonged respiratory arrest, myocardial ischemia, ischemic stroke and neurodegenerative diseases (Giuliani et al. 2007, 2011, 2012). For example, ACTH₁₋₂₄ suppressed the systemic inflammatory response and reverted shock condition in rats by activating anti-inflammatory pathway (Guarini et al. 2004). Moreover, Aronsson et al. (2006) reported the administration of 0.5 ml/kg α -MSH at 30 min, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h post-ischemia provided neuroprotection in pyramidal neurons in the hippocampus, concomitant with a reduction in astroglia activation in a rat model of cerebral ischemia. Giuliani et al. (2007), showed α -MSH presented long-lasting neuroprotective action, even in severe models of cerebral ischemia. The same research group also reported treatment with nanomolar amounts of NDP- α -MSH, a synthetic analogue of α -MSH, induced functional recovery, with improvement in learning and memory, and increase neurogenesis after cerebral ischemia (Giuliani et al. 2011). In the same way, Chen et al. (2008) reported α -MSH reduced the infarct volume in focal brain ischemic stroke in adult male Wistar rats subjected to right middle cerebral artery occlusion. Finally, Benjamins et al. (2013, 2014) and Lisak et al. (2015) found a direct protective effect of ACTH on oligodendroglia and neurons in vitro,

which protected these cells from apoptosis, excitotoxicity and inflammatory-related changes. Hence, the neuroprotective effect of melanocortins may occur by inhibiting/modulating a wide range of combined mechanisms, i.e. oxidative stress, glutamatergic excitotoxicity, inflammation and apoptosis, thus improving the synaptic transmission and plasticity (Trato 2005; Catania 2008).

Thus, the translational research on melanocortins sounds a promising pathway, since neuroprotective options are very scarce to treat PIVH in the clinics (Catania 2008). In this study we sought to investigate the potential neuroprotective effect of ACTH on a collagenase-induced PIVH model in rat pups.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Offspring male Wistar rats (N=48) from a local colony at UFCSPA were used in the experiments. The litters were standardized (8 pups per mother) and maintained under standard laboratory conditions, with water and food *ad libitum*, room temperature at 22 °C and light / dark cycle of 12 h. The day of birth was considered the day 0 (P0). Efforts were made to minimize the number of animals needed and their suffering - all experimental procedures were performed followed all ethical rules established by the 8th Edition of Guide for Care and Use of Experimental Animals published by National Research Council of the National Academies, 2011 (available at <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratoryanimals.pdf>) in accordance with ARRIVE guidelines and the National Council for Control of Animal Experimentation's guideline (Concea, Brazil). This study was reviewed and approved by the Animal Ethics Committee from UFCSPA, under the number 506/17.

2.2 Peri-intraventricular hemorrhage model

PIVH induction was performed on P1 (that corresponds to 24-26 weeks of gestational age in humans) by injecting 3 IU of collagenase type VII (Sigma-Aldrich, USA), diluted in 2 µL of PBS, under stereotaxic surgery (Alles et al. 2010). Briefly, P1 pups were anesthetized

with isoflurane (2% for induction and 0.5% for maintenance). After that, a 30-gauge needle was attached to a 5 μ L Hamilton syringe (Hamilton, Reno, USA) and percutaneously introduced into the right periventricular region of each newborn animal using a free hand technique (Xue et al. 2003). The technique aimed to achieve the periventricular region, included subependymal region and the striatum. The microinjections were performed using a custom-made guide (to place the needle 4 mm below the skull and 3 mm away from the right ear, tangential to an imaginary line from the ear to the eye). The injection was delivered throughout 5 min and kept placed in the same position for additional 2 minutes to prevent backflow. After this procedure, the animals were maintained in a heated surface for anesthetic recovery (Xue et al. 2003; Balasubamarian et al. 2006; Alles et al. 2010) and then they returned to their mothers in standard living cages.

2.3 Experimental Groups

In this study, microinjections (2 μ L of total volume) containing a) 3 IU of collagenase type VII; b) PBS; c) 0.048 mg/kg of ACTH₁₋₂₄; and c) 0.06 mmol of SHU9119 (MCR3/MCR4 antagonist) were used in the following groups:

- Sham group (Sham, n=6): received only PBS.
- ACTH group (ACTH, n=6): received only 0.048 mg/kg of ACTH₁₋₂₄ (A0298, Sigma-Aldrich, USA);
- Antagonist group (ANTAG, n=06): received only 0.06 nmol of the SHU9119, a MCR3/MCR4 antagonist (ab141164, Abcam, UK);
- Antagonist plus ACTH group (ANTAG + ACTH, n=06): received both, ACTH and SHU9119;
- Collagenase group (COL, n = 06): received only 3 IU of collagenase type VII;
- Collagenase + ACTH group (COL+ACTH, n=06): received a first microinjection containing collagenase and, 12 h later, a new injection containing ACTH;
- Collagenase + Antagonist group (COL+ANTAG, n=06): received a first microinjection of collagenase and, 12 h later, a new injection containing SHU9119;
- Collagenase + Antagonist + ACTH group (COL+ANTAG+ACTH, n=06): received a microinjection of collagenase and, 12 h later, new injections with both SHU9119 and ACTH. ACTH was administered 5 min after of infection of SHU9119.

All the microinjections were delivered in the periventricular tissue using the same custom-made guide and technique, as described above.

2.4 Histological and Immunofluorescence procedures

After 7 days of birth (P7), all animals were deeply anesthetized using isoflurane 5% and were perfused through the left cardiac ventricle with heparin (1,000 IU) followed by 100 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were removed and left for post-fixation in the same fixative solution at 4°C for 24 h. After this, the material was cryoprotected by diving the brain in 30% sucrose in PBS at 4°C for 2 days. Coronal sections (50 µm thick) were performed using cryostat (Leica, Germany) to hematoxylin-eosin and immunofluorescence approach for GFAP, S100β and NG2.

For histological evaluation, sections were stained with hematoxylin–eosin (for technical reasons, $n = 5$ in the “ANTAG”, “COL+ACTH”, “COL+ANTAG” and “COL+ANTAG+ACTH” groups). The right striatum adjacent to the microinjection site was sampled from 0.70 mm to 0.26 mm posterior to the bregma. The images of each microscopic field were digitalized and a 1 mm² equidistant grid of points was utilized. The estimated area of the induced lesion or corresponding normal tissue was measured by point count method, using the following equation:

$$A = \sum p.a/p$$

where: A = area estimation, $\sum p$ = sum of points overlaid striatum and $a.p$ = point area (1 mm²) (Alles et al. 2010), after was calculated the mean of each rat of each group.

The number of neurons and glia cells per mm² ($n = 5$ in the “SHAM”, “ANTAG”, “COL”, “COL+ACTH”, “COL+ANTAG” and “COL+ANTAG+ACTH” groups) was estimated using a light microscope (Olympus BX-61, Japan) coupled to a CCDDP72 high performance camera (Olympus, Japan) and Image Pro-Plus 7.0 software (Media Cybernetics, USA). For this analysis, five digitized images (40 x) from selected areas of striatum were obtained from each section (Fig. 1). The area of interest (AOI, measuring approximately 4000 µm²) was overlaid on the center of each microscopic image. All the cells located inside this AOI or intersected by the lower and/or left edges were counted (edges of inclusion). The cells touched by upper and/or right edges were not counted (edges of exclusion) (Saur et al. 2012).

For GFAP immunofluorescence, the sections were treated in 10% methanol and 3% H₂O₂ for 30 min and washed carefully. Then, the sections were incubated with anti-GFAP monoclonal antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA) diluted 1:500 in PBS containing 0.3% Triton X-100 with 3% albumin bovine serum for 46 h at 4 °C. After washing several times with PBS, the sections were covered with Fluoromount (F4680, Sigma-Aldrich, USA) and coverslips. The same immunofluorescence technique was performed to anti-S100 β monoclonal antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (ab196442 – Abcam, UK) diluted 1:100 overnight. For the NG2 immunofluorescence, the sections were treated in 10% methanol and 3% H₂O₂ for 30 min and washed carefully. Then, the sections were pre-incubated with the anti-NG2 antibody (ab129051 – Abcam, UK) at concentration of 1:200 in PBS containing 0.3% Triton X-100 with 3% albumin bovine serum overnight at 4 °C. After washing several times with PBS-Tx the sections were incubated in a rabbit anti-rabbit IgG conjugated with Alexa fluor 555 (ab150086 – Abcam, UK) at concentration of 2 μ g/mL in PBS-Tx at RT for 1 h. Sections were washed several times in PBS and covered with Fluoromount and coverslips.

2.5 Data acquisition and quantification

Images of the area adjacent to the lesion in the periventricular region were acquired using a confocal microscope (LeicaTCS SP8, Germany) with a plan apochromatic 63x/1.4 water-immersion objective lens. Spectral detectors were adjusted to capture emission from lasers wave-length of 520 nm to visualize GFAP and S100 β and 565 nm to visualize NG2. The z-stack acquisition was performed at 0.2 μ m using a resolution of 1,024 x 1,024 pixels. For the three biomarkers studied, immunohistochemical data were obtained from 1.70 to 1.80 posterior to the bregma (Paxinos and Watson 1998). Adjustments of sharpness, color saturation, brightness and contrast were made to all images using Photoshop CS3 program (Adobe Systems, Inc., USA) without altering their content.

The area of positive GFAP cells were obtained through binarization with ImageJ 1.50i Software (National Institutes of Health, USA). The use of the binary method provided the correlation between the point counting method and the binarization was performed, where we counted the total number of green pixels (“pix”) in each image, starting to count from different green pixel intensities. A strong correlation was acquired with the pixel from

intensity 19 (pix = 19), where it was established that all pixels above the intensity 19 are considered positive GFAP and below this were considered pix = 0, that is, black.

To establish the GFAP area through the binary count of pixels was: (1) adjusted the contrast to start counting at pix = 19; (2) produced a graph of the intensity of green pixels by the histogram command; (3) through the List command, was identified the amount of pix = 0; (4) subtracted the amount of pix = 0 from the total pixels of the image, obtaining the absolute number of green pixels in the image – considered positive GFAP; (5) used a simple three rule to calculate the area (%) occupied by “GFAP + pixels”.

For the stereological estimation of the number of immunofluorescent marked S100 β and NG2 cells, images of the striatum in the periventricular region were obtained with a confocal microscope and Image Pro-Plus 6.0 software (Media Cybernetics, USA). For this analysis, two images (60x) were obtained from each section. Three area of interest (AOI) measuring 900 μm^2 for S100 β and 100 μm^2 for NG2 was overlaid on each image. The cells located inside this AOI or intersected by the lower and/or left edges were counted (edges of inclusion). The cells touched by upper and/or right edges were not counted (edges of exclusion) (Saur et al. 2012).

The numerical density of immunofluorescent marked cells was estimated using the following formula (Dall'Oglio et al. 2013):

$$N_v = (1/[a/f \times h]) \times (\sum Q/\sum P)$$

where, N_v = estimated numerical density, a/f = AOI; h dissector height; $\sum Q$ = sum of cells counted and $\sum P$ = sum of analyzed AOI's.

3. STATISTICAL ANALYSIS

The extension of the periventricular lesion was compared between groups using a one-way analysis of variance followed by the Tukey test for multiple comparisons. The non-parametric data corresponding to the number of neurons and glial cells per mm^2 , the percentual values of GFAP coverage, and the number of S100 β - and NG2- positive cells per mm^3 were compared between groups using the Kruskal–Wallis test corrected for ties followed by the Dunn's test for multiple comparisons. The statistically significant level was set *a priori* at $p < 0.05$.

4. RESULTS

The microinjection of collagenase in periventricular region of the brain induced a reliable injury in the newborn rats, as expected. Moreover, a single dose of ACTH₁₋₂₄ 12 h after the collagenase-induced injury promoted neuroprotection evidenced by different morphophysiological outcomes, as follows.

Injured area

Collagenase-induced lesions were classified from minimal to maximum and the ACTH administration seemed to prevent the severity of the injury (Fig. 2a-b). The *post hoc* comparisons revealed the COL and COL+ANTAG groups exhibited larger injury area in the ipsilesional hemisphere (right) when compared with the sham animals, as expected ($p < 0.05$; Fig. 2c). Interestingly, SHAM, ACTH, COL+ACTH and COL+ANTAG+ACTH groups did not differ in terms of the damaged area ($p > 0.05$; Fig. 2c). No between-group differences were found in the uninjured (left) hemisphere ($p > 0.05$; Fig. 2d).

Neuronal and glial densities

Differences were observed regarding neuronal (KW = 34.35; $p < 0.001$; Fig. 3a) and glial densities (KW = 35.79; $p < 0.001$; Fig. 3b) in the perilesional area. The SHAM group showed a higher density of neurons when compared with COL and COL+ANTAG groups ($p < 0.001$). In addition, the ACTH administration prevented the neuron loss, since the groups SHAM, COL+ACTH and COL+ANTAG+ACTH did not differ ($p > 0.05$). Curiously, the ACTH showed neuroprotective properties even in the presence of the MCR3 and MCR4 antagonist (Fig. 3a-c). In terms of glia cells, the SHAM group exhibited a lower cellular density when compared to the COL, COL+ANTAG and COL+ANTAG+ACTH groups ($p < 0.05$; Fig. 3b-c). However, SHAM, COL+ACTH and COL+ANTAG+ACTH did not differ ($p > 0.05$). It is important to notice the ACTH did not change neuronal and glial densities in the uninjured animals.

GFAP, S100 β and NG2 expression

There was a main group effect for GFAP in the perilesional tissue (KW = 33.35; $p < 0.001$; Fig. 4a-b). The *post hoc* comparisons revealed SHAM, ACTH, ANTAG, ACTH+ANTAG, COL+ACTH and COL+ANTAG+ACTH did not differ ($p > 0.05$). However, the SHAM group exhibit lower % of GFAP covered area in comparison with COL and COL+ANTAG groups ($p < 0.05$).

Main effects were also observed for S100 β -positive cells (KW = 38.76; $p < 0.001$; Fig. 4c-d). The *post hoc* tests revealed no changes when comparing the undamaged groups ($p > 0.05$), showing the ACTH and the antagonist *per se* did not influence the S100 β immunofluorescence. Notwithstanding, the SHAM group showed a lower density of S100 β -positive cells in comparison with COL and COL+ANTAG groups ($p < 0.05$). However, the SHAM, COL+ACTH and COL+ANTAG+ACTH did not change, suggesting the ACTH alleviated the increase of S100 β cells in the perilesional tissue.

The density of NG2-positive cells was highly significant as well (KW = 36.12; $p < 0.001$; Fig. 4e-f). The *post hoc* tests exhibit no changes in all the uninjured animals ($p > 0.05$). The SHAM group had a lower number of NG2-positive cells when compared with COL and COL+ANTAG ($p < 0.05$). In the same direction of the above-described results, the ACTH prevented the injury-induced-NG2-positive cells proliferation in the perilesional tissue. Overall, the single dose of ACTH seems to reduce all the studied biomarkers of reactive gliosis.

5. DISCUSSION

PIVH is one of the main prematurity-related complications leading to injury in the germinative matrix (including its glial precursors) and deficits in neuropsychomotor development in newborns (Inder 2006; Alles et al. 2010). Currently, the clinical management of this complication is based on life-maintaining procedures, whereas effective neuroprotectant options are scarce (Cloherty et al. 2005).

Thus, we sought to test the potential neuroprotective effect of ACTH in rat pups submitted to the PIVH model induced by the intracerebroventricular microinjection of

collagenase type VII. Different histophysiological outcomes were used to test the drug-induced neuroprotection such as lesion extension, neuro-glial densities and immunofluorescence for GFAP, S100 β and NG2. Our study reproduced the animal model of PIVH and confirmed the hypothesis that ACTH₁₋₂₄ provides neuroprotection in this rat model. To the best of our knowledge, this is the first study to show a single injection of ACTH₁₋₂₄, 12 h post-injury, can induce neuroprotective effects in a PIVH model in rat pups. Specifically, the ACTH reduced the injured brain area, alleviated the neuronal loss and decreased GFAP, S100 β and NG2 expression in the perilesional tissue. Overall, our results are in agreement with the literature, since the melanocortins induce neuroprotectant effects by suppressing inflammatory mechanisms, apoptosis and cellular excitotoxicity, which may explain the better sensorimotor recovery, ability to walk and cognition in different models of CNS injury (Bazzani et al. 2002; Huang and Tatro 2002; Guarini et al. 2004; Aronsson et al. 2006, 2007; Chen et al. 2008; Giuliani et al. 2006a, 2006b, 2007, 2011, 2014, 2015; Gatti et al. 2012; Bitto et al. 2012; Schaible et al. 2013; Benjamin et al. 2013, 2014; Lisak et al. 2015; Medvedeva et al. 2017).

Reactive gliosis is a hallmark in virtually every type of brain injury and plays a critical role in neural plasticity and recovery (Pekny and Pekna 2014; Sofroniew 2015). Particularly, glia can either decrease or increase the brain damage, depending on the severity and time post-injury. PIVH is considered a serious clinical condition, typically associated with the development of intense reactive gliosis (Mukai et al. 2017). Therefore, effective neuroprotectants in the acute phase of injuries, such as PIVH, should be able to minimize damage-related gliosis (Stocchetti et al. 2015; Carbonara et al. 2018). In this context, astrocytes and NG2-positive glia have been thought to have an important role in neuroprotection (Dawson et al. 2000; Trendelenburg 2005; Song et al. 2017; Becerra-Calixto and Cardona-Gómez 2017). While astrocytes increase the expression of molecules like GFAP and S100 β in the perilesional region to protect the remaining tissue (Sofroniew 2015; Becerra-Calixto and Cardona-Gómez 2017), they can also undergo intense hypertrophy and proliferation, which may result in anisomorphic astrogliosis and glial scar development (Pekny and Pekna 2014; Sofroniew 2015). Moreover, NG2-positive glia proliferates to promote tissue repair, although the failure of these newly-generated glia to differentiate into functional cells may contribute to reduce the functional efficacy of the repair (Tanaka et al. 2001; Song et al. 2017).

Our findings show administering ACTH reduces injury-related GFAP expression - a cytoskeleton protein highly influenced by several hormones and growth factors (Yang and Wang 2015). The same pattern was observed for S100 β , a calcium-binding protein that regulates astrocyte differentiation (Brozzi et al. 2008). However, the fact the basal immunolabeling pattern of GFAP and S100 β -positive cells was unaffected by ACTH administration in undamaged animals suggests ACTH infusion interacts with injury-triggered mechanisms that reduce inflammation (Caruso et al. 2013) and modulate reactive astrogliosis. Interestingly, we found the infusion of the MCR3 and MCR4 antagonist (SHU9119) did not reverse the neuroprotective effects of the ACTH. In the same way, Kaneva et al. (2012) reported SHU9119 did not reverse α -MSH anti-inflammatory effects in a rheumatoid arthritis model *in vitro*, suggesting α -MSH acts by modulating other receptors. Conversely, Giuliani et al. (2011) showed the infusion of the HS024 - a potent MCR4 antagonist - suppressed the neuroprotective effects of NDP- α -MSH in an experimental ischemic stroke model. In the same way, several authors have shown the infusion of SHU9119 blocks MCR3 and MCR4 in regulating eating behavior, metabolism and cardiovascular response (Obici et al. 2001; Gutierrez-Juarez et al. 2004; Schuhler et al. 2004; Bassi et al. 2015). However, the fact the SHU9119 infusion did not reverse the ACTH-related neuroprotection in the present study can be explained in several ways. The SHU9119 dose used may have primarily blocked MCR3-related signaling, which might explain a compensatory neuroprotection via the viable/unblocked MCR4 receptors. Moreover, as suggested in several papers, glial cells express MCR1 receptors (Ignar et al. 2003; Catania et al. 2010; Giuliani et al. 2012; Arnason et al. 2013; Mykicky et al. 2016; Carniglia et al. 2017; Benjamins et al. 2018), which would contribute to activate anti-inflammatory pathways and may explain why the SHU9119 did not work as expected. Furthermore, ACTH-related neuroprotection may have occurred by activating other signaling routes such as the cholinergic anti-inflammatory pathway (Borovikova et al. 2000; Tracey 2007; Ottani et al. 2009) or modulating the interaction between melanocortin and dopaminergic systems (Derkach et al. 2018). Hence, our study suggests a single dose of ACTH reverses astroglial reactivity after an experimental PIVH model, although the precise mechanisms behind the reduction in GFAP, S100 β and NG2 immunolabeling are still a matter of debate. Notwithstanding, the current study opens new research avenues on the ACTH-induced neuroprotectant mechanisms after PIVH.

The collagenase-induced PIVH also increased the immunodetection of NG2-positive cells. Typically, NG2-positive cells regulate neuroimmunological mechanisms to maintain cellular proliferation/migration and differentiate into oligodendrocytes, astrocytes or microglia (Nakano et al. 2017; Song et al. 2017). For example, ablation of NG2-positive cells resulted in increased inflammation, neuronal damage and atrophy in the hippocampus via activation of the interleukin-1 beta (IL-1 β) pathway (Nakano et al. 2017). On the one hand, NG2-positive cells can differentiate into oligodendrocytes to produce new myelin sheaths around injured axons, contributing to neural repair and recovery. On the other hand, these cells may turn into reactive glia and contribute to shape the glial scar (Song et al. 2017). Nonetheless, lower levels of NG2-positive cells surrounding a damaged area may indicate a milder brain injury (Wang et al. 2016). Our results revealed ACTH infusion reverses the increase in NG2-positive cells typically seen after PIVH. Overall, we found a single dose of ACTH after PIVH reduced reactive gliosis, promoting a tissue-saving effect.

This study provides preclinical evidence to show ACTH may be of use in the treatment of PIVH - an urgent need due to the burden of the disease. For example, the vast majority of RNPTs who suffer PIVH will experience life-long deficits in terms of sensorimotor and cognitive performance, impairing their daily living activities and quality of life (Inder 2006; Coskun et al. 2018). Moreover, the monetary and non-monetary costs of PIVH to society are extremely high (Marba et al. 2011; Lekic et al. 2015).

In terms of translational potential and feasibility, we know ACTH crosses the blood-brain barrier (Giuliani et al. 2011; Spaccapelo et al. 2011) and can be delivered in the typical routine of neonatal intensive care units (NICUs). For instance, RNPTs usually receive peripheral catheters in neonatal ICUs as a standard procedure, which facilitates the systemic administration of the drug. Intraventricular injections might be suitable as well since RNPTs have a large frontal fontanelle, which facilitates the intervention - the puncture of this structure is a widely used procedure to collect cerebrospinal fluid in ICUs (Cloherty et al. 2005; Shah et al. 2012). Thus, by using intraventricular injections it is possible to provide higher ACTH levels in a short period of time, thus enhancing the binding ratio of melanocortin receptors and triggering neuroprotective effects. However, the confirmation of these positive results in human newborns and the selection of the best path to deliver the drug are steps for further studies.

In conclusion, the present findings revealed a single dose of ACTH reverses glial reactivity, preserves neural and glial densities in the perilesional tissue and reduces the extension of the PIVH damage. Further studies are needed to clarify the possible existence of ACTH-related neuroprotective effects that are independent of MCR3 and MCR4 binding.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Alles YCJ, Greggio S, Alles RM, Azevedo PN, Xavier LL, DaCosta JC (2010) A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res* 1356:130-138. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.106>
- Andrikopoulou M, Almaki A, Farzin A, Cordeiro CN, Johnston MV, Burd I (2014) Perinatal biomarkers in prematurity: Early identification of neurologic injury. *Int J Dev Neurosci* 36:25-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.04.002>
- Akilina, K (2011) Intraventricular haemorrhage of the newborn. *ACNR*11(5). http://www.acnr.co.uk/09%20ND11/22%20ACNRND11_neurosurg.pdf
- Arnason BG, Berkovich R, Catania A, Lisak RP, Zaidi M (2013) Mechanisms of action of adrenocorticotrophic hormone and other melanocortins relevant to the clinical management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 19:130-136. <https://doi.org/10.1177/1352458512458844>
- Aronsson AF, Spulber S, Popescu L, Winblad B, Port C, Oprica M, Schultzberg M (2006) alpha-Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global ischemia. *Neuropeptides* 40:65-75. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.10.006>
- Aronsson AF, Spulber S, Oprica M, Winblad B, Post C, Schultzberg M (2007) Alpha-MSH rescues neurons from excitotoxic death. *J Mol Neurosci* 33:239-251. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0019-2>
- Ballabh P (2010) Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatr Res* 67:1-8. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c1b176>

- Balasubramaniam J, Xue M, Buist RJ, Ivanko TL, Natuik J, Bigio MRD (2006) Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp Neurol* 197:122-132. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.09.010>
- Bassi M, Nakamura NB, Furuya WI, Colombari DSA, Menani JV, do Carmo JM, da Silva AA, Hall JE, Colombari E (2015) Activation of the brain melanocortins system is requires for leptin-induced modulation of chemorespiratory function. *Acta Physiol (Oxf)* 213:893-901. <https://doi.org/10.1111/apha.12394>
- Bazzani C, Mioni C, Ferrazza G, Cainazzo MM, Bertolini A, Guarini S (2002) Involvement of the central nervous system in the protective effect of melanocortins in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Resuscitation* 52:109-115. [https://doi.org/10.1016/S0300-9572\(01\)00436-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9572(01)00436-1)
- Becerra-Calixto A, Cardona-Gómez GP (2017) The role of astrocytes in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Front Mol Neurosci* 10:88. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00088>
- Benjamins JA, Nedelkoska L, Bealmear B, Lisak RP (2013) ACTH protects mature oligodendroglia from excitotoxic and inflammation-related damage in vitro. *Glia* 61:1206-1217. <https://doi.org/10.1002/glia.22504>
- Benjamins JA, Nedelkoska L, Lisak RP (2014) Adrenocorticotropin Hormone 1-39 promotes proliferation and differentiation of oligodendroglial progenitor cells and protects from excitotoxic and inflammation-related damage. *J Neurosci Res* 92:1243-1251. <https://doi.org/10.1002/jnr.23416>
- Benjamins JA, Nedelkoska L, Lisak RP (2018) Melanocortin receptor subtypes are expressed on cells in the oligodendroglial lineage and signal ACTH protection. *Neurosci Res* 96:427-435. <https://doi.org/10.1002/jnr.24141>

- Bitto A, Polito F, Irrera N, Calò M, Spaccapelo L, Marini HR, Giuliani D, Ottani A, Rinaldi M, Minutoli L, Guarini S, Squadrito F, Altavilla D (2012) Protective effects of melanocortins on short-term changes in a rat model of traumatic brain injury. *Crit Care Med* 40:945-951. doi: 10.1097/CCM.0b013e318236efde
- Böhmer AE, Oses JP, Schimdt AP, Péron CS, Krebs CL, Oppitz PP, D'Avila TT, Souza DO, Portela LV, Stefani MA (2011) Neuron-specific enolase, S100 β , and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery* 68:1624-1631. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e318214a81f>
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458-462. <https://doi.org/10.1038/35013070>
- Brasil (2011) Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais da saúde. Brasília
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2009) S100 β protein regulates astrocyte shape and migration via interaction with Src Kinase: Implications for astrocyte development, activation, and tumor growth. *J Biol Chem* 284:8797-8811. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M805897200>
- Catania A (2008) Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci* 31:353-360. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.04.002>
- Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S (2010) The melanocortins system in control of inflammation. *Sci World J* 14:1840-1853. <http://dx.doi.org/10.1100/tsw.2010.173>

- Carbonara M, Fossi F, Zoerle T, Ortolano F, Moro F, Pischutta F, Zanier ER, Stocchetti N (2018) Neuroprotection in traumatic brain injury: mesenchymal stromal cells can potentially overcome some limitations of previous clinical trials. *Front Neurol* 9:885. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00885>
- Carniglia L, Ramírez D, Durand D, Saba J, Turati J, Caruso C, Scimonelli TN, Lasaga M (2017) Neuropeptides and microglial activation in inflammation, pain, and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm* 2017:5048616. <https://doi.org/10.1155/2017/5048616>
- Caruso C, Carniglia L, Durand D, Scimonelli TN, Lasaga M (2013) Astrocytes: new targets of melanocortins 4 receptor actions. *J Mol Endocrinol* 51:33-50. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0064>
- Cloherty JP, Eichenwald EC, Stark AR (2005). *Manual de Neonatologia*. Rio de Janeiro
- Chen G, Frokiaer J, Pedersen M, Nielsen S, Si Z, Pang Q, Stodkilde-Jorgensen H (2008) Reduction of ischemic stroke in rat brain by alpha melanocyte stimulating hormone. *Neuropeptides* 42:331-338. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.01.004>
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V (2004) NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* 561:109-122. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074252>
- Coskun Y, Isik S, Bayram T, Urgun K, Sakarya S, Akman I (2018) A clinical scoring system to predict the development of intraventricular hemorrhage (IVH) in premature infants. *Childs Nerv Syst* 34:129-136. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3610-z>
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61:471-479. [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000901\)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000901)61:5<471::AID-JNR1>3.0.CO;2-N)

- Derkach KV, Romanova IV, Shpakov AO (2018) Functional interaction between the dopamine and melanocortin systems of the brain. *Neurosci Behav Physi* 48:213-219. <https://doi.org/10.1007/s11055-018-0554-z>
- Douglas-Escobar MD, Weiss MD (2013) Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol* 3:185. <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00185>
- Florio P, Abella R, Marinoni E, Di Iorio R, Li Volti G, Galvano F, Pongiglione G, Frigiola A, Pinzauti S, Petraglia F, Gazzolo D (2010) Biochemical markers of perinatal damage. *Front Biosci (Schol Ed)* 2:47-72. doi: 20036928
- Gatti S, Lonati C, Acerbi F, Sodi A, Leonardi P, Carlin A, Gaini SM, Catania A (2012) Protective action of NDP-MSH in experimental subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol* 234:230-238. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.039>
- Gazzolo D, Vinesi P, Bartocci M, Geloso MC, Bonacci W, Serra G, Haglid KG, Michtti F (1999). Elevated S100 blood level as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Correlation with cerebral doppler velocimetry. *J Neurol Sci*. 170(1):32-5. doi: 10540033
- Gazzolo D, Abella R, Marinoni E, Di Iorio R, Volti GL, Galvano F, Frigiola A, Temporini F, Moresco L, Colivicchi M, Sabatini M, Ricotti A, Strozzi MC, Crivelli S, Risso FM, Sannia A, Florio P (2009). New markers of neonatal neurology. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 22:57-61. <https://doi.org/10.1080/14767050903181468>
- Guarini S, Cainazzo MM, Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Marini H, Bigiani A, Ghiaroni V, Passanito M, Leone S, Bazzani C, Caputi AP (2004) Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway. *Cardiovasc Res* 63:357-365. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.029>

- Giuliani D, Leone S, Mioni C, Bazzani C, Zaffe D, Botticelli AR, Altavilla D, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Squadrito F, Guarini S (2006a) Broad therapeutic treatment window of the [Nle⁴, D-Phe⁷]α-melanocyte-stimulating hormone for long-lasting protection against ischemic stroke, in Mongolian gerbils. *Eur J Pharmacol* 538:48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.038>
- Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Leone S, Bazzani C, Minutoli L, Bitto A, Cainazzo MM, Marini H, Zaffe D, Botticelli AR, Pizzala R, Savio M, Necchi D, Schiöth HB, Bertolini A, Squadrito F, Guarini S (2006b) Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinol* 147:1126-1135. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0692>
- Giuliani D, Ottani A, Mioni C, Bazzani C, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Zaffe D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2007) Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins. *Eur J Pharmacol* 570:57-65. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.05.025>
- Giuliani D, Zaffe D, Ottani A, Spaccapelo L, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Irrera N, Contri M, Altavilla D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2011) Treatment of cerebral ischemia with melanocortins acting at MC4 receptors induces marked neurogenesis and long-lasting functional recovery. *Acta Neuropathol* 122:443-453. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0873-4>
- Giuliani D, Minutoli L, Ottani A, Spaccapelo L, Bitto A, Galantucci M, Altavilla D, Squadrito F, Guarini S (2012) Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions. *Front Neuroendocrinol* 33:179-193. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.04.001>

- Giuliani D, Galantucci M, Neri L, Canalini F, Calevro A, Bitto A, Ottani A, Vandini E, Sena P, Sandrini M, Squadrito F, Zaffe D, Guarini S (2014) Melanocortins protect against brain damage and counteract cognitive decline in a transgenic mouse model of moderate Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 740:144-150. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.063>
- Giuliani D, Neri L, Canalini F, Calevro A, Ottani A, Vandini E, Sena P, Zaffe D, Guarini S (2015) NDP- α -MSH induces intense neurogenesis and cognitive recovery in alzheimer transgenic mice through activation of melanocortin MC4 receptors. *Mol Cell Neurosci*. 67:13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.05.004>
- Gutierrez-Juarez R, Obici S, Rosseti L (2004) Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J Biol Chem* 279:49704-15. doi: 10.1074/jbc.M408665200
- Huang Q, Tatro JB (2002) Alpha-melanocyte stimulating hormone suppresses intracerebral tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta gene expression following transient cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 334:186-190. doi: 12453626
- Kaneva MK, Kerrigan ML, Grieco P, Curley GP, Locke IC, Getting SJ (2012) Chondroprotective and anti-inflammatory role of melanocortin peptides in TNF- α activated human C-20/A4 chondrocytes. *Br J Pharmacol* 167:67-79. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01968.x>
- Ignar DM, Andrews JL, Jansen M, Eilert MM, Pink HM, Lin P, Sherrill RG, Szewczyk JR, Conway JG (2003) Regulation of TNF-alpha secretion by specific melanocortin-1 receptor peptide agonist. *Peptides* 24:709-716. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(03\)00127-X](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00127-X)
- Inder, TE (2006) Neurodevelopmental impact of low-grade intraventricular hemorrhage in very preterm infants. *J Pediatr* 149:152-154. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.05.046>

- Lasaga M, Debeljuk L, Durand D, Scimonelli TN, Caruso C (2008) Role of α -melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. *Peptides* 29:1825-1835. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.009>
- Lekic T, Manaenko A, Rolland W, Krafft PR, Peters R, Hartman RE, Altay O, Tang J, Zhang JH (2012) Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus. *Exp Neurol* 236:69-78. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.04.003>
- Lekic T, Klebe D, Poblete R, Krafft PR, Rolland WB, Tang J, Zhang JH (2015) Neonatal brain hemorrhage (NBH) of prematurity: Translational mechanisms of the vascular-neural network. *Curr Med Chem.* 22:1214-1238. doi: [10.2174/0929867322666150114152421](https://doi.org/10.2174/0929867322666150114152421)
- Lisak RP, Nedelkoska L, Dealmeier B, Benjamins JA (2015) Melanocortin receptor agonist ACTH 1-39 protects rat forebrain neurons from apoptotic excitotoxic and inflammation-related damage. *Exp Neurol* 273:161-167. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.012>
- MacLellan CL, Silasi G, Auriat AM, Colbourne F (2010) Rodent models of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41:95-98. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.594457>
- Marba ST, Caldas JP, Vinagre LE, Pessoto MA (2011) Incidence of periventricular/intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants: a 15-year cohort study. *J Pediatr* 87:505-511. <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2137>
- Medvedeva EV, Dmitrieva VG, Limborska AS, Myasoedov NF, Dergunova LV (2017) Semax, an analog of ACTH₍₄₋₇₎, regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats. *Mol Genet Genomics* 292:635-653. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1297-1>

- Mykicki N, Herrmann AM, Schwab N, Deenen R, Sparwasser T, Limmer A, Wachsmuth 7, Klotz L, Köhrer K, Faber C, Wiendl H, Luger TA, Meuth SG, Loser K (2016) Melanocortin-1 receptor activation is neuroprotective in mouse models of neuroinflammatory disease. *Sci Transl Med* 8:362ra146. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8732
- Mukai T, Mori Y, Shimazu T, Takahashi A, Tsunoda H, Yamaguchi S, Kiryu S, Tojo A, Nagamura-Inoue T (2017) Intravenous injection of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells attenuates reactive gliosis and hypomyelination in neonatal intraventricular hemorrhage model. *Neuroscience* 355:175-187. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.006>
- Nakano M, Tamura Y, Yamato M, Kume S, Eguchi A, Takata K, Watanabe Y, Kataoka Y (2017) NG2 glial cells regulate neuroimmunological responses to maintain neuronal function and survival. *Sci Rep*. 7:42041. <https://doi.org/10.1038/srep42041>
- Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L (2001) Central melanocortins receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 108:1079-1085. doi: 10.1172/JCI12954
- Ottani A, Giuliani D, Mioni C, Galantucci M, Miutoli L, Bitto A, Altavilla D, Zaffe D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2009) Vagus nerve mediates the protective effects of melanocortins against cerebral and systemic damage after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:512–523. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.140>
- Paxinos G, Watson, C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego
- Pekny M, Pekna M (2013) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94:1077-1098. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013>
- Purisch SE, Gyanfi-Bannerman C (2017) Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol*. 41:387-391. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2017.07.009>

- Saur L, Baptista PPA, de Senna PN, Paim MF, Nascimento P, Ilha J, Bagatini PB, Achaval M, Xavier LL (2012) Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct* 219:293-302. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0500-8>
- Schaible EV, Steinsträßer A, Jahn-Eimermacher A, Luh C, Sebastiani A, Kornes F, Pieter D, Schäfer MK, Engelhard K, Thal SC (2013) Single administration of tripeptide α -MSH(11-13) attenuates brain damage by reduced inflammation and apoptosis after experimental traumatic brain injury in mice. *PLoS One*. 8:e71056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071056>
- Schuhler S, Horan TL, Hastings MH, Mercer JG, Morgan PJ, Ebling FJ (2004) Feeding and behavioural effects of central administration of the melanocortin 3/4-R antagonist SHU9119 in obese and lean Siberian hamsters. *Behav Brain Res* 152:177-185. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(03\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(03)00260-2)
- Shah SS, Ohlsson A, Shah VS (2012) Intraventricular antibiotics for bacterial meningitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 7:CD004496. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004496.pub3>
- Spaccapelo L, Bitto A, Galantucci M, Ottani A, Irrera N, Minutoli L, Altavilla D, Novellino E, Grieco P, Zaffe D, Squadrito F, Giuliani D, Guarini S (2011) Melanocortin MC4 receptor agonists counteract late inflammatory and apoptotic responses and improve neuronal functionality after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 670:479-486. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.09.015>
- Song FE, Huang JL, Lin SH, Wang S, Ma GF, Tong XP (2017) Roles of NG2-glia in ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther* 23:547-553. <https://doi.org/10.1111/cns.12690>
- Sofroniew MV (2015) Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7:a020420. doi: [10.1101/cshperspect.a020420](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020420)

- Stocchetti N, Taccone FS, Citerio G, Pepe PE, Le Roux PD, Oddo M, Polderman KH, Stevens RD, Barsan W, Maas AI, Meyfroidt G, Bell MJ, Silbergleit R, Vespa PM, Faden AI, Helbok R, Tisherman S, Zanier ER, Valenzuela T, Wendon J, Menon DK, Vincent JL (2015) Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review. *Crit Care* 19:186. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0887-8>
- Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y (2001) Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain. *Neuroreport* 12:2169-2174. doi: 11447328
- Tatro JB (2006) Melanocortins defend their territory: Multifaceted neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology* 147:1122-1125. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1573>
- Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature* 420:853-859. <https://doi.org/10.1038/nature01321>
- Tracey KJ (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117:289-296. doi: [10.1172/JCI30555](https://doi.org/10.1172/JCI30555)
- Trendelenburg G, Dirnagl U (2005) Neuroprotective role of astrocyte in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 51:307-320. <https://doi.org/10.1002/glia.20204>
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2016). Guia de anestesia e analgesia para ratos e camundongos. Centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório. http://www.ufrgs.br/creal/anestesia_FINAL_2016.pdf.
- Xue M, Balasubramaniam J, Bigio MRD (2003) Brain inflammation following intracerebral hemorrhage. *Curr Neuropharmacol* 1:325-332. doi: [10.2174/1570159033477008](https://doi.org/10.2174/1570159033477008)

Wang X, Gao X, Michalski S, Zhao S, Chen J (2016) Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *J Neurotrauma* 33:721-733.
<https://doi.org/10.1089/neu.2015.4097>

World Health Organization (2012) Born too soon: the global action report on preterm birth.
http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoon-report.pdf.

Yang Z, Wang KKW (2015) Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci* 38:364-374.
<https://doi.org/10-1016/j.tins.2015.04.003>

Legends

Figure 1 (a) Cellular quantification procedure performed in the striatum adjacent to microinjections in the experimental groups. Numbers represent the place of tissue sampling and counting. Scale bar = 1 mm. (b) The stereological area of interest (4000 μm^2) with including (solid lines) and excluding (dashed lines) borders. Neurons are indicated by thin arrows and glia by a dashed arrow. Haemotoxylin and eosin technique. Scale bar = 20 μm .

Figure 2 (a) Representative illustration of minimal, intermediary and maximal injury area in the right hemisphere. Scale bar = 1mm. (b) Number of rats in each experimental group showing minimal, intermediary or maximal injury in the right hemisphere striatum. Note the occurrence of more extensive lesion in the groups microinjected with collagenase than in the others. n = number of animals (c) Values (mean $\pm$ SD in mm^2) for the area of the right hemisphere striatum where microinjections were done in the experimental groups (n = 5 in ANTAG, COL+ACTH, COL+ANTAG and COL+ANTAG+ACTH groups; n = 6 in SHAM, ACTH, ACTH+ANTAG and COL groups). * $p < 0.05$ in each comparison indicated. (d) Corresponding values (mean $\pm$ SD in mm^2) for the contralateral, right hemisphere striatum.

Figure 3 Values (median + interquartile ranges) for (a) the density of neurons and (b) glia cells in the right hemisphere striatum of rats (n = 5 in “SHAM”, “ANTAG”, “COL”, “COL+ACTH”, “COL+ANTAG” and “COL+ANTAG+ACTH” groups; n = 6 in “ACTH” and “ACTH+ANTAG” groups). Values in $\text{n}^\circ \text{ cells/mm}^2$. * $p < 0.05$ in each comparison indicated. (c) Representative images of the neurons and glia cells observed in each experimental group. Scale bar = 20 μm .

Figure 4 Values (median + interquartile ranges) for the immunofluorescent coverage area of GFAP (a) and density (cells/ mm^3) of S100 β (c) and NG2 (e) cells (n = 6 in all groups) in the right striatum adjacent to tested microinjections. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ in each comparison indicated. (b), (d) and (f) are representative images of the corresponding results in each group studied. Scale bar = 25 μm . Final image adjustments were made using Photoshop CS3 software (Adobe Systems, Inc., USA).

Fig. 1

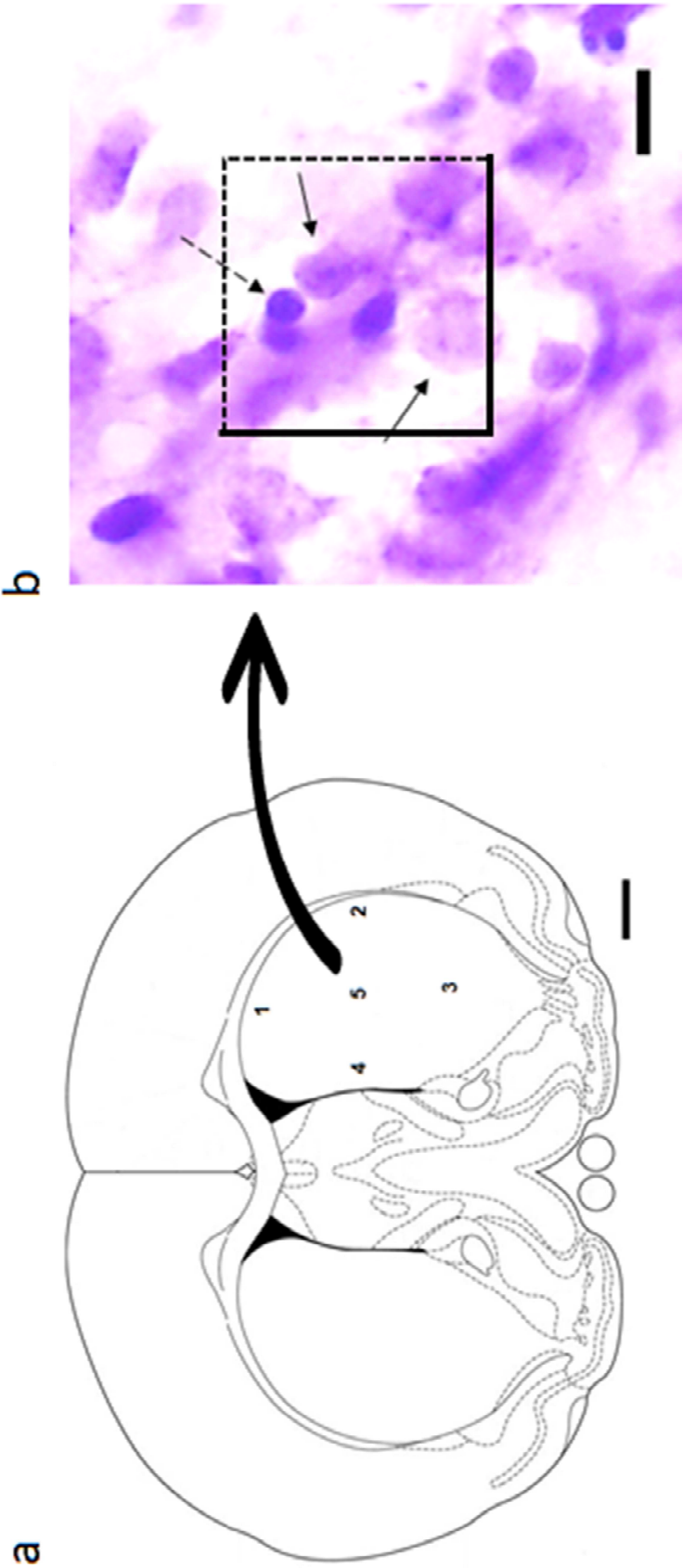


Fig. 2

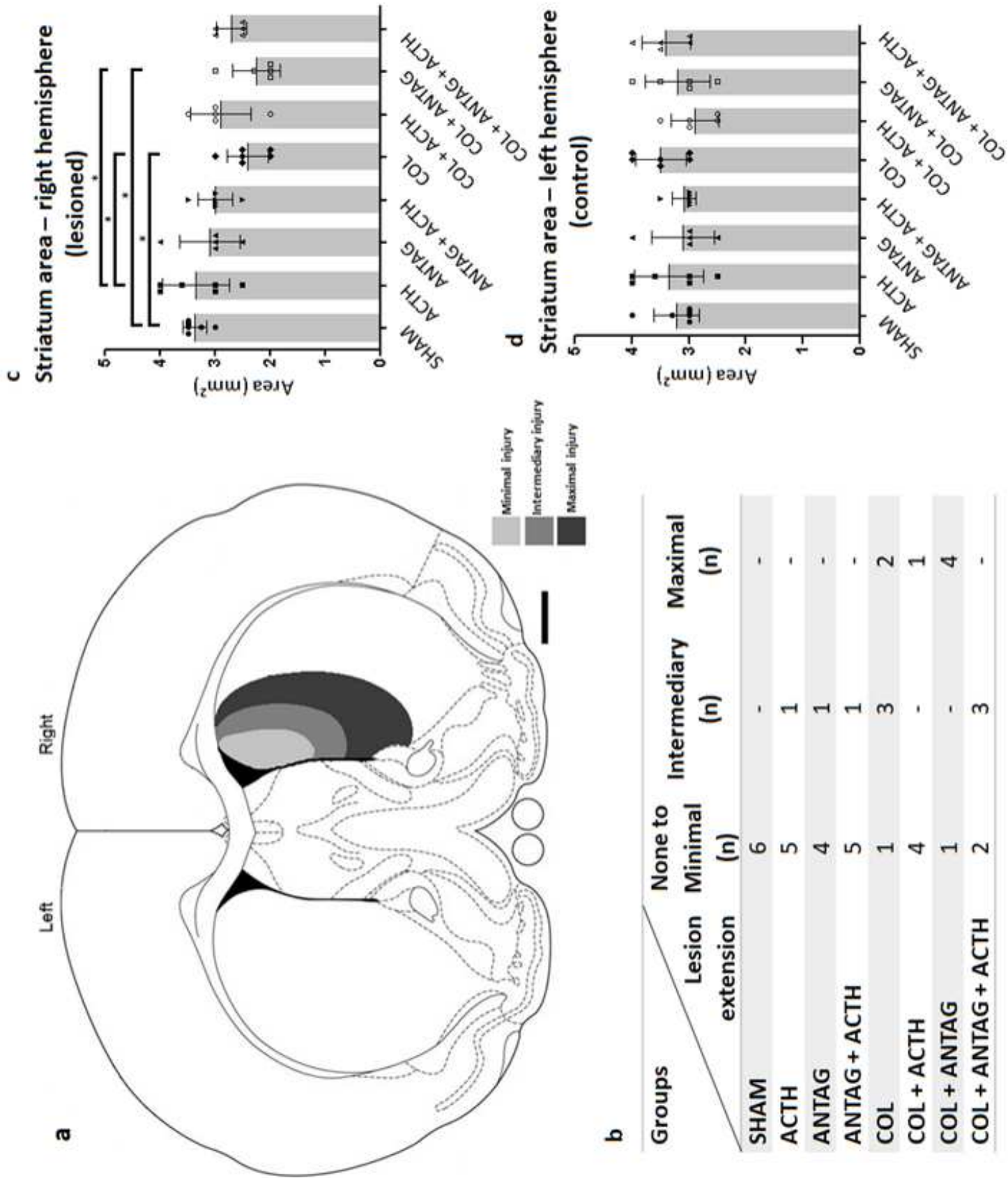


Fig. 3

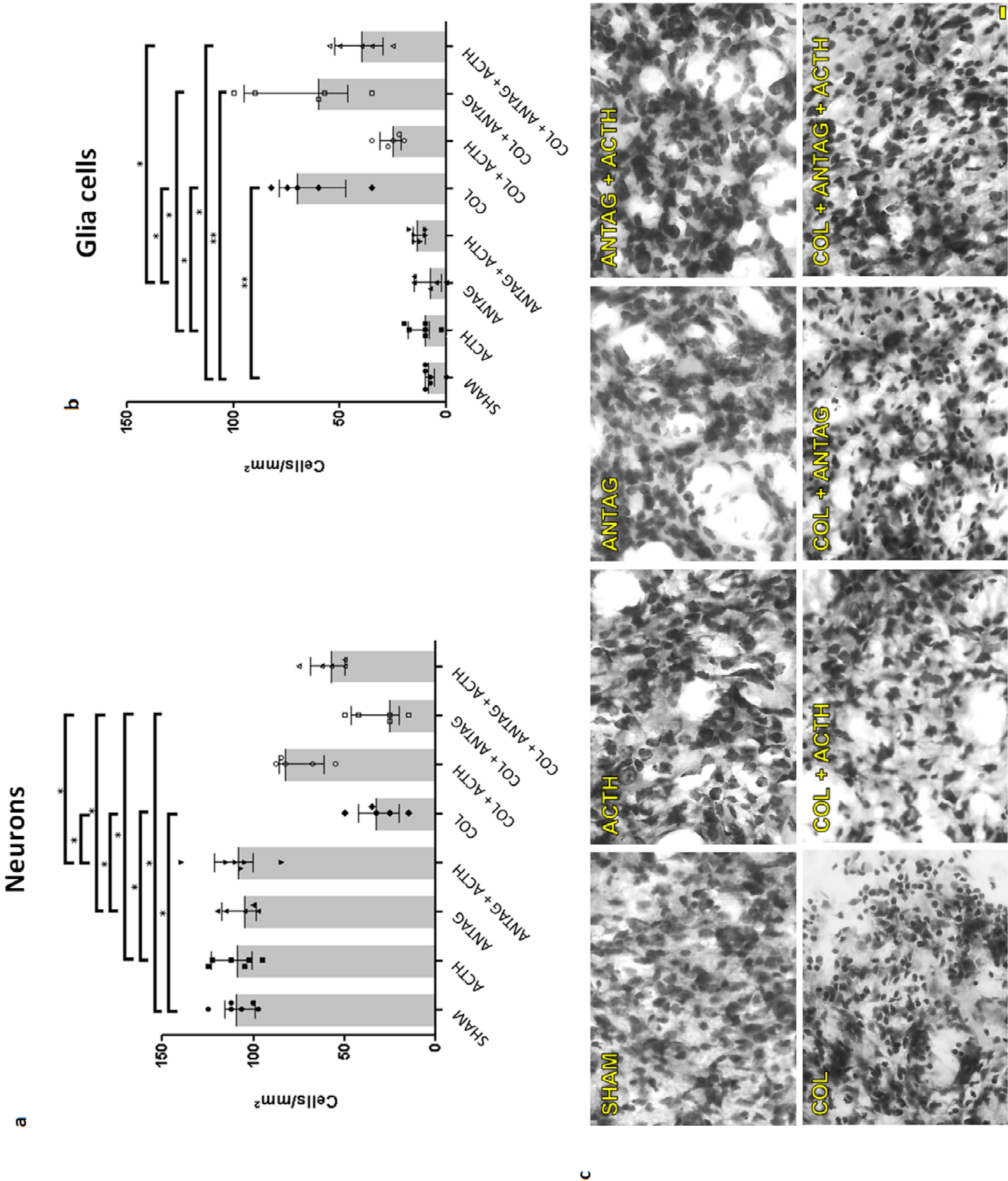
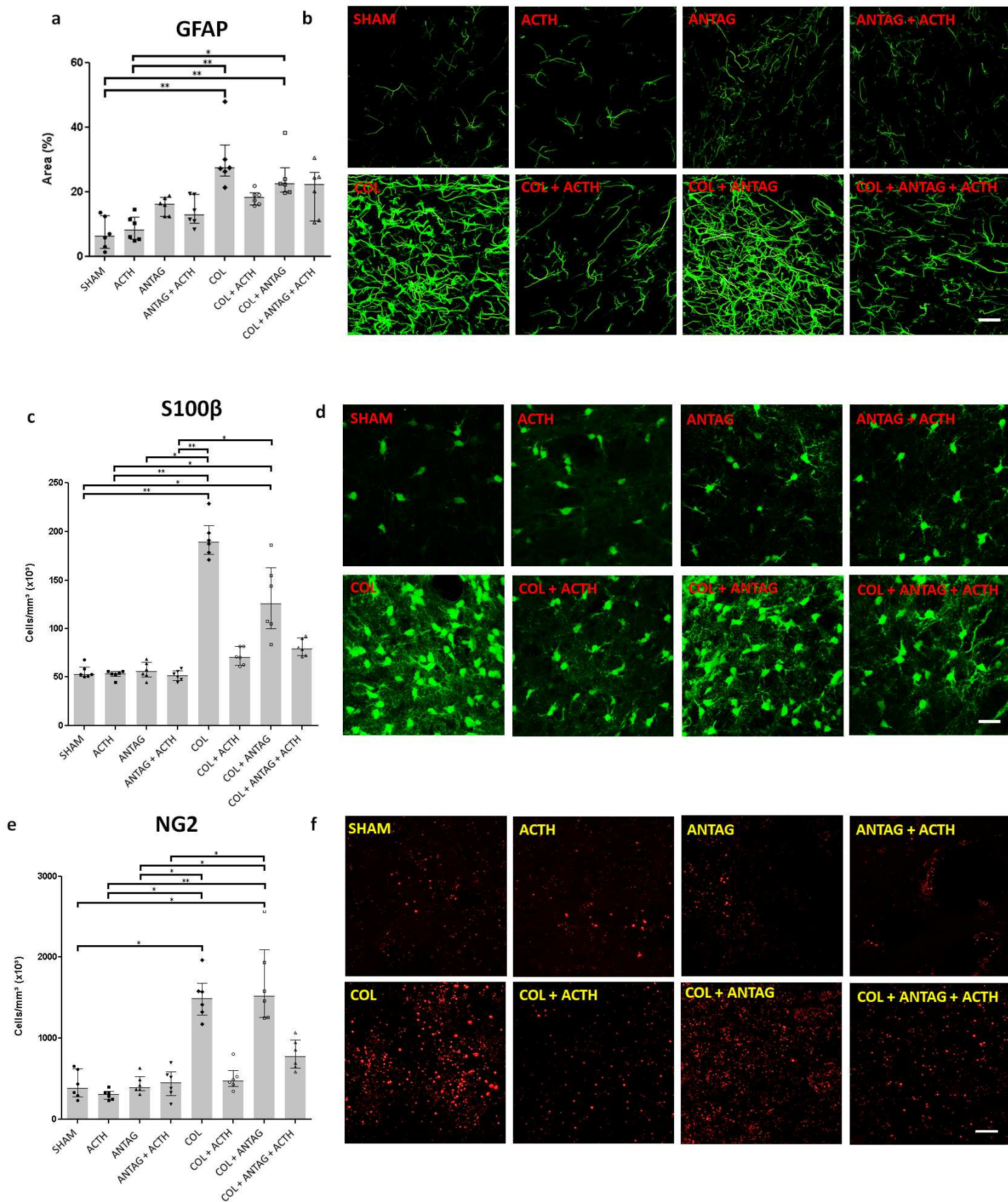


Fig. 4



4. DISCUSSÃO

A HPIV é umas das principais complicações relacionadas ao nascimento prematuro, causando sérios impactos no desenvolvimento neuropsicomotor do RNPT devido à destruição da MG e dos seus precursores gliais locais (Alles et al. 2010; Inder 2006). Atualmente, não existe um tratamento específico para a HPIV, somente terapias paliativas para monitoramento da evolução da hemorragia e de suas complicações vitais (Cloherty et al. 2005). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do ACTH em ratos neonatos submetidos à HPIV pela microinjeção intracerebroventricular (ICV) de collagenase tipo VII.

No modelo estudado, a administração de 3 UI de collagenase ICV foi suficiente para produzir hemorragia na região periventricular, conforme estudo piloto realizado (dados não mostrados), corroborando com Alles et al. (2010) e Lekic et al. (2012). A HPIV é considerada uma condição clínica/neurológica grave, caracterizada pela presença de uma intensa gliose reativa (Mukai et al. 2017), condição observada no modelo estudado. Após a indução de lesão cerebral, tanto a GFAP quanto S100 β e NG2 apresentaram aumento na sua expressão, mostrando que os três biomarcadores propostos podem ser utilizados para indicar lesão no SNC relacionada à HPIV, conforme já sugerido por Florio et al. (2010), Douglas-Escobar e Weiss (2013) e Andrikopolou et al. (2014). O aumento destes biomarcadores também foi descrito em outros modelos de hemorragia cerebral e HPIV em ratos (Lekic et al. 2012; Joseph et al. 2016; Dawes et al. 2016; Neves et al. 2017) e em RNs prematuros humanos com HPIV (Gazzolo et al. 1999; Gazzolo et al. 2001; Whitelaw et al. 2001; Stewart et al. 2013).

Observamos, ainda, que a expressão destes biomarcadores está proporcionalmente relacionada à extensão da lesão, pois nos grupos em que a expressão de GFAP, S100 β e NG2 está mais elevada também encontramos o maior número de animais apresentado a extensão máxima de lesão. Os grupos “controle” também apresentaram algum grau de lesão e de expressão dos biomarcadores, isso ocorreu, provavelmente, por microtraumas causados pela inserção da agulha na região periventricular do encéfalo do rato.

No presente estudo mostramos, pela primeira vez, que a administração de uma única dose de ACTH₁₋₂₄, 12 horas após a indução de HPIV, apresentou efeito neuroprotetor em ratos neonatos, evidenciado pela redução da extensão da lesão, preservação no número de neurônios e redução da expressão dos biomarcadores de lesão cerebral (GFAP, S100 β e NG2). Importante ressaltar que as melanocortinas, incluindo o ACTH, tem demonstrado efeito neuroprotetor em diversos modelos de lesões do SNC, *in vivo* e *in vitro*, pela supressão dos principais mecanismos inflamatórios, apoptose e excitotoxicidade, reduzindo a extensão da lesão e promovendo recuperação funcional, como processos cognitivos, orientação sensório-motora e marcha dos animais lesados (Bazzani et al. 2002; Huang e Tatò 2002; Guarini et al. 2004; Aronsson et al. 2006, 2007; Giuliani et al. 2006a, 2006b, 2007, 2009, 2011, 2014a, 2014b, 2015; Chen et al. 2008; Gatti et al. 2012; Bitto et al. 2012; Schaible et al. 2013; Benjamins et al. 2013, 2014; Lisak et al. 2015; Medvedeva et al. 2017). O efeito neuroprotetor das melanocortinas está relacionado, principalmente, à ativação dos seus receptores presentes no SNC, sobretudo o MCR4, como já demonstrado por Giuliani et al. (2006b, 2007b, 2011, 2017) e Spaccapelo et al. (2011).

A ativação da resposta inflamatória possui um papel fundamental na evolução e desfecho de processos isquêmicos/hemorrágicos e em doenças neurodegenerativas, além de ser responsável por sequelas irreversíveis em lesões do SNC (Leone et al. 2013). A ativação dos receptores de melanocortinas por seus agonistas naturais ou sintéticos exerce efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores e a sua eficácia no tratamento de distúrbios inflamatórios agudos, crônicos e sistêmicos tornam as melanocortinas um tratamento promissor para insultos do SNC, pois ainda apresentam efeitos neuroprotetores e neurotróficos (Leone et al. 2013; Bertolini et al. 2009; Catania et al. 2010; Chen et al. 2018).

Interessante que quando adicionamos o antagonista dos receptores de melanocortinas MCR3/MCR4, SHU9119, no modelo estudado, o mesmo não foi capaz de bloquear totalmente o efeito do ACTH, diferente de alguns trabalhos onde, esse mesmo antagonista, aboliu a ação central e sistêmica relacionada ao comportamento alimentar, funções metabólicas e cardiovasculares dos MCR3 e

MCR4 (Obici et al. 2001; Gutierrez-Juarez et al. 2004; Schuhler et al. 2004; Bassi et al. 2015). Porém, corrobora com Kaneva et al. (2012) onde a administração do SHU9119 não aboliu os efeitos anti-inflamatórios do α -MSH em modelo *in vitro* de artrite reumatoide. Por outro lado, um potente antagonista para o MCR4 (HS024, Tocris Bioscience, Reino Unido) foi capaz de suprimir totalmente o efeito neuroprotetor do NDP- α -MSH em modelo de isquemia cerebral (Giuliani et al. 2011). Deste modo, parece que o SHU9119 está preferencialmente associado ao bloqueio dos efeitos relacionados ao comportamento alimentar dos MCRs do que os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, ou, talvez, ele possa apresentar uma especificidade maior para o MCR3, receptor que também está relacionado ao comportamento alimentar. Além disso, vários trabalhos sugerem que as células gliais também podem expressar receptores MCR1, que contribui para a ativação de vias anti-inflamatórias e também pode explicar a razão pelo qual o SHU9119 foi incapaz de bloquear os efeitos neuroprotetores do ACTH neste estudo (Ignar et al. 2003; Catania et al. 2010; Giuliani et al. 2012; Arnason et al. 2013; Carniglia et al. 2017).

Tratamentos com efeitos neuroprotetores para RNPTs são imprescindíveis, pois, além da HPIV deixar sequelas incapacitantes durante toda a vida do paciente, possui um alto custo social para a família e, apesar de todo o avanço da medicina neonatal, as sequelas decorrentes deste tipo de complicação ainda são muito frequentes, em menor ou maior grau (Neves et al. 2007; Alles et al. 2010; Aquilina 2011; Lekic et al. 2012). As primeiras horas de vida do RN prematuro são críticas e praticamente definem seu prognóstico e evolução. Medidas terapêuticas que possam ser adotadas durante esse período e que sejam eficazes podem melhorar a qualidade de vida desse paciente e todo o desfecho de sua internação na UTI neonatal.

No modelo estudado observamos uma ação neuroprotetora do ACTH, o que nos leva a acreditar que ele possa ser um tratamento promissor para a HPIV. Afim de explorar melhor os efeitos do ACTH como neuroprotetor no RNPT é necessário realizar estudos onde seja avaliado e acompanhado o desenvolvimento neuromotor e cognitivo do modelo estudado, a curto, médio e longo prazo, definindo assim se todos os mecanismos de neuroproteção do ACTH apresentam caráter definitivo.

Em conjunto com a pesquisa translacional, deve-se investigar o melhor momento de se iniciar a intervenção e por quanto tempo mantê-la, ou seja, dose, frequência e tempo de tratamento. Um estudo clínico para uso do ACTH seria um avanço para a medicina neonatal, tendo em vista que as terapias existentes hoje são apenas de suporte.

Em termos práticos, a administração de ACTH nos prematuros internados na UTI neonatal poderia ser realizada por via endovenosa, pois sabe-se que o ACTH tem a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Giuliani et al. 2011; Spaccapelo et al. 2011), além disso, no momento de sua internação, os RNs prematuros são imediatamente cateterizados pelos vasos sanguíneos umbilicais ou já possuem algum outro dispositivo intravenoso instalado. É importante ressaltar que, apesar do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estar imaturo no RN prematuro, não se sabe efetivamente se a administração endovenosa de ACTH iria influenciar na produção de cortisol ou se sua biodisponibilidade iria diminuir devido os receptores MCR2 presentes no córtex da adrenal (Dannevig et al. 2005; Mörelius et al. 2016). A via intraventricular é comumente utilizada para tratamento de infecções do SNC, pois, em teoria, a concentração de antibióticos quando administrados ICV é maior em relação a via endovenosa (Shah et al. 2012), e ainda, em neonatologia ou pediatria, são realizadas punções ventriculares para administração de antibióticos ou para coleta ou drenagem de líquido (Cloherty et al. 2005). Nos prematuros é uma via de fácil acesso, pois os mesmos possuem a fontanela bregmática ampla, o procedimento pode ser realizado no leito, com auxílio do aparelho de ecografia para visualização correta do local de punção, e com acompanhamento de neurocirurgião e neurologista pediátrico. Acreditamos que, com a administração de ACTH via ICV a biodisponibilidade da medicação para o SNC estará aumentada e rapidamente o ACTH poderá se ligar aos seus receptores MCR3 e MCR4, desempenhando seus efeitos neuroprotetores.

Os efeitos adversos da administração do ACTH incluem, principalmente, hipertensão arterial sistêmica, irritabilidade e sintomas relacionados à função adrenal, relacionados a altas doses e a tempos prolongados de tratamento (Ito et al. 2002; Hamano et al. 2006; Gomes et al. 2008; Kondo et al. 2008). Isso é diferente do que é proposto no presente estudo, o qual utilizou uma intervenção terapêutica

de curta duração, especificamente durante a fase aguda da hemorragia. Tal ponto é relevante ressaltar pois pode contribuir para a aplicabilidade do ACTH na rotina das UTIs neonatais.

Nos últimos anos, tem-se investido muito em tecnologias pesadas para aumentar a sobrevida dos pacientes internados em UTI neonatal, porém medidas para tratar e/ou mesmo evitar sequelas causadas tanto pelo tratamento quanto pela própria prematuridade também precisam ganhar atenção. Apesar do melhor tratamento para HPIV ser o RN não nascer prematuro, o desenvolvimento de terapias que proporcione à equipe de saúde devolver para os pais uma criança saudável é fundamental e terá reflexo na vida dessa família e na sociedade como um todo. Neste estudo, o ACTH apresentou efeito neuroprotetor em modelo de HPIV e encorajam novos estudos visando a translação deste potencial tratamento para os RNPT com lesões do SNC.

5. CONCLUSÕES

- A microinjeção de 3UI de colagenase no tecido cerebral do rato produziu gliose reativa intensa, evidenciada pelo aumento dos biomarcadores GFAP, S100 β e NG2.

- Uma única dose de ACTH₁₋₂₄, 12 h após lesão, reverteu a reatividade glial, reduziu a perda neuronal no tecido adjacente à lesão e reduziu a extensão da lesão causada pela HPIV.

- O antagonista dos receptores de melanocortinas MCR3/MCR4, SHU9119, não reverteu a ação neuroprotetora do ACTH.

- O efeito neuroprotetor do ACTH pode atuar por vias independentes dos receptores de melanocortinas MCR3/MCR4.

- O ACTH apresentou efeito neuroprotetor no modelo estudado e é um forte candidato para ser estudado na HPIV de RNs prematuros.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este estudo podemos citar:

1. Avaliar o desenvolvimento neuromotor e cognitivo, do modelo animal, a curto e longo prazo, a fim de determinar se os efeitos neuroprotetores do ACTH apresentam caráter definitivo.
2. Realizar outros estudos para avaliar o envolvimento dos receptores de melanocortinas MCR1 e outras vias que possam estar associadas aos efeitos neuroprotetores do ACTH.
3. Promover estudos com perspectiva translacional para verificar a aplicabilidade da administração do ACTH nos recém-nascidos prematuros com HPIV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alles YCJ, Greggio S, Alles RM, Azevedo PN, Xavier LL, DaCosta JC (2010) A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res* 1356:130-138.
- Arnason BG, Berkovich R, Catania A, Lisak RP, Zaidi M (2013) Mechanisms of action of adrenocorticotrophic hormone and other melanocortins relevant to the clinical management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 19:130-136.
- Aronsson AF, Spulber S, Popescu L, Winblad B, Port C, Oprica M, Schultzber M (2006) α -Melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global ischemia. *Neuropeptides* 40:65-75.
- Aronsson AF, Spulber S, Oprica M, Winblad B, Post C, Schultzberg M (2007) Alpha-MSH rescues neurons from excitotoxic death. *J Mol Neurosci* 33:239-251.
- Akilina, K (2011) Intraventricular haemorrhage of the newborn. *ACNR*11(5).
- Airolidi MJ, Silva SBC, Souza RCT (2009) Avaliação de recém-nascidos pré-termo com hemorragia peri-intraventricular e/ou leucomalácia periventricular. *Rev Neuroscienc* 17:24-29
- Andrikopoulou M, Almaki A, Farzin A, Cordeiro CN, Johnston MV, Burd I (2014) Perinatal biomarkers in prematurity: Early identification of neurologic injury. *Int J Dev Neurosci* 36:25-31.
- Ballabh P (2010) Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatr Res* 67:1-8.

- Bassi M, Nakamura NB, Furuya WI, Colombari DSA, Menani JV, do Carmo JM, da Silva AA, Hall JE, Colombari E (2015) Activation of the brain melanocortins system is requires for leptin-induced modulation of chemorespiratory function. *Acta Physiol (Oxf)* 213:893-901.
- Bazzani C, Mioni C, Ferrazza G, Cainazzo MM, Bertolini A, Guarini S (2002) Involvement of the central nervous system in the protective effect of melanocortins in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Resuscitation* 52:109-15.
- Brasil (2011) Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações programáticas e estratégicas. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para os profissionais da saúde. Brasília: Ministério da Saúde.
- Blencowe H, Cousens S, Chou D, Oestergaard M, Say L, Moller AB, Kinney M, Lawn J (2013) Born too soon: The global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health* 10(Suppl1):S2.
- Benamins JA, Nedelkoska L, Bealmear B, Lisak RP (2013) ACTH protects mature oligodendroglia from excitotoxic and inflammation-related damage in vitro. *Glia* 61:1206-1217.
- Benamins JA, Nedelkoska L, Lisak RP (2014) Adrenocorticotropin Hormone 1-39 promotes proliferation and differentiation of oligodendroglial progenitor cells and protects from excitotoxic and inflammation-related damage. *J Neurosci Res* 92:1243-1251.
- Bertolini A, Tacchi R, Vergoni AV (2009) Brain effects of melanocortins. *Pharmacol Res* 59:13-47.

- Bitto A, Polito F, Irrera N, Calò M, Spaccapelo L, Marini HR, Giuliani D, Ottani A, Rinaldi M, Minutoli L, Guarini S, Squadrito F, Altavilla D (2012) Protective effects of melanocortins on short-term changes in a rat model of traumatic brain injury. *Crit Care Med* 40:945-951.
- Böhmer AE, Oses JP, Schmidt AP, Péron CS, Krebs CL, Oppitz PP, D'Avila TT, Souza DO, Portela LV, Stefani MA (2011) Neuron-specific enolase, S100 β , and glial fibrillary acidic protein levels as outcome predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery* 68:1624-1630.
- Cabral LA, Velloso M (2014) Comparing the effects of minimal handling protocols on the physiological parameters of preterm infants receiving exogenous surfactant therapy. *Braz J PhysTher* 18:152-164.
- Carniglia L, Ramírez D, Durand D, Saba J, Turati J, Caruso C, Scimonelli TN, Lasaga M (2017) Neuropeptides and microglial activation in inflammation, pain, and neurodegenerative diseases. *Mediators Inflamm* 2017:5048616.
- Catania A (2008) Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci* 31:353-360.
- Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S (2010) The melanocortins system in control of inflammation. *Sci World J* 14:1840-1853.
- Chen G, Frokiaer J, Pedersen M, Nielsen S, Si Z, Pang Q, Stodkilde-Jorgensen H (2008) Reduction of ischemic stroke in rat brain by alpha melanocyte stimulating hormone. *Neuropeptides* 42:331-338.
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.

- Chen S, Zhao L, Sherchan P, Ding Y, Yu J, Nowrangi D, Tang J, Xia Y, Zhang JH (2018) Activation of melanocortin receptor 4 with RO27-3225 attenuates neuroinflammation through AMPK/JNK/p38 MAPK pathway after intracerebral hemorrhage in mice. *J Neuroinflammation* 15:106-118.
- Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V (2004) NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol* 561:109-122.
- Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 115:1896-1905.
- Cloherly JP, Eichenwald EC, Stark AR, Eds. *Manual de Neonatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 450-461.
- Coskun Y, Isik S, Bayram T, Urgun K, Sakarya S, Akman I (2018) A clinical scoring system to predict the development of intraventricular hemorrhage (IVH) in premature infants. *Childs Nerv Syst* 34:129-136.
- Dannevig I, Dale HC, Liestøl K, Lindemann R (2005) Blood pressure in the neonate: three non-invasive oscillometric pressure monitors compared with invasively measured blood pressure. *Acta Paediatr* 94:191-196.
- Dawes WJ, Zhang X, Fancy SPJ, Rowitch D, Marino S (2016) Moderate-grade germinal matrix haemorrhage activates cell Division in the neonatal mouse subventricular zone. *Dev Neurosci* 38:430-444.
- Duarte AS, Correia A, Esteves AC (2014) Bacterial collagenases – a review. *Crit Rev Microbiol* 42:106-126.
- Douglas-Escobar M, Weiss MD (2013) Biomarkers of brain injury in the premature infant. *Front Neurol* 3:185.

- Florio P, Abella R, Marinoni E, Di Iorio R, Li Volti G, Galvano F, Pongiglione G, Frigiola A, Pinzauti S, Petraglia F, Gazzolo D (2010) Biochemical markers of perinatal damage. *Front Biosci* 2:47-72.
- Gangoni FMC, Formiga CKMR (2012) Associação da hemorragia periventricular com peso ao nascer e uso de ventilação mecânica em neonatos pré-termo. *Pediatr Mod* 48(4).
- Gatti S, Lonati C, Acerbi F, Sodi A, Leonardi P, Carlin A, Gaini SM, Catania A (2012) Protective action of NOP-MSH in experimental subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol* 234:230-238.
- Guarini S, Cainazzo MM, Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Marini H, Bigiani A, Ghiaroni V, Passanito M, Leone S, Bazzani C, Caputi AP (2004) Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway. *Cardiovasc Res* 63:357-365.
- Ghaddhab C, Vuissoz JM, Deladoëy J (2017) From bioinactive ACTH to ACTH antagonist: the clinical perspective. *Front Endocrinol* 8:17.
- Gazzolo D, Vinesi P, Bartocci M, Geloso MC, Bonacci W, Serra G, Haglid KG, Michetti F (1999) Elevated S100 blood level as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants. Correlation with cerebral doppler velocimetry. *J Neurol Sci* 170:32-35.
- Gazzolo D, Bruschettini M, Lituanica M, Serra G, Bonacci W, Michetti F (2001) Increased urinary S100 β protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem* 47:1836-1838.

- Gazzolo D, Abella R, Marinoni E, Di Iorio R, Volti GL, Galvano F, Frigiola A, Temporini F, Moresco L, Colivicchi M, Sabatini M, Ricotti A, Strozzi MC, Crivelli S, Risso FM, Sannia A, Florio P (2009) New markers of neonatal neurology. *J Matern Fetal Neonatal Med* 22:57-61
- George N, Geller HM (2018) Extracellular matrix and traumatic brain injury. *J Neuro Res* 96:573-588.
- Giuliani D, Leone S, Mioni C, Bazzani C, Zaffe D, Botticelli AR, Altavilla D, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Squadrito F, Guarini S (2006a) Broad therapeutic treatment window of the [Nle4, D-Phe7] α -melanocyte-stimulating hormone for long-lasting protection against ischemic stroke, in Mongolian gerbils. *Eur J Pharmacol* 538:48-56.
- Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Leone S, Bazzani C, Minutoli L, Bitto A, Cainazzo MM, Marini H, Zaffe D, Botticelli AR, Pizzala R, Savio M, Necchi D, Schiöth HB, Bertolini A, Squadrito F, Guarini S (2006b) Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinol* 147:1126-1135.
- Giuliani D, Ottani A, Mioni C, Bazzani C, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Zaffe D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2007a) Neuroprotection in focal cerebral ischemia owing to delayed treatment with melanocortins. *Eur J Pharmacol* 570:57-65.
- Giuliani D, Mioni C, Bazzani C, Zaffe D, Botticelli AR, Capolongo S, Sabba A, Galantucci M, Iannone A, Grieco P, Novellino E, Colombo G, Tomasi A, Catania A, Guarini S (2007b) Selective melanocortin MC4 receptor agonists reverse haemorrhagic shock and prevent multiple organ damage. *Br J Pharmacol* 150:595-603.

- Giuliani D, Ottani A, Minutoli L, Di Stefano V, Galantucci M, Bitto A, Zaffe D, Altavilla D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2009) Functional recovery after delayed treatment of ischemic stroke with melanocortins is associated with overexpression of the activity dependent gene Zif268. *Brain Behav Immun* 23:844-850.
- Giuliani D, Zaffe D, Ottani A, Spaccapelo L, Galantucci M, Minutoli L, Bitto A, Irrera N, Contri M, Altavilla D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2011) Treatment of cerebral ischemia with melanocortins acting at MC4 receptors induces marked neurogenesis and long-lasting functional recovery. *Acta Neuropathol* 122:443-453.
- Giuliani D, Minutoli L, Ottani A, Spaccapelo L, Bitto A, Galantucci M, Altavilla D, Squadrito F, Guarini S (2012) Melanocortins as potential therapeutic agents in severe hypoxic conditions. *Front Neuroendocrinol* 33:179-193.
- Giuliani D, Bitto A, Galantucci M, Zaffe D, Ottani A, Irrera N, Neri L, Cavallini GM, Altavilla D, Botticelli AR, Squadrito F, Guarini S (2014a) Melanocortins protect against progression of Alzheimer's disease in triple-transgenic mice by targeting multiple pathophysiological pathways. *Neurobiol Aging* 35:537-547.
- Giuliani D, Galantucci M, Neri L, Canalini F, Calevro A, Bitto A, Ottani A, Vandini E, Sena P, Sandrini M, Squadrito F, Zaffe D, Guarini S (2014b) Melanocortins protect against brain damage and counteract cognitive decline in a transgenic mouse model of moderate Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 740:144-150.
- Giuliani D, Neri L, Canalini F, Calevro A, Ottani A, Vandini E, Sena P, Zaffe D, Guarini S (2015) NDP- α -MSH induces intense neurogenesis and cognitive recovery in alzheimer transgenic mice through activation of melanocortin MC4 receptors. *Mol Cell Neurosci* 67:13-21.

- Giuliani D, Ottani A, Neri L, Zaffe D, Grieco P, Jochem J, Cavallini GM, Catania A, Guarini S (2017) Multiple beneficial effects of melanocortins MC4 receptor agonists in experimental neurodegenerative disorders: Therapeutic perspectives. *Prog Neurobiol* 148:40-56.
- Getting SJ (2002) Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. *Trends Pharmacol Sci* 23:447-449.
- Gomes MDC, Garzon E, Sakamoto A (2008) Os 50 anos de uso do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no tratamento da síndrome de West: Revisão de literatura e protocolo da INIFESP. *J Epilepsy Clin Neurophysiol* 14:27-32.
- Gomes FCA, Tortelli VP, Diniz L (2013) Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estud Av* 27:61-84.
- Gutierrez-Juarez R, Obici S, Rosseti L (2004) Melanocortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. *J Biol Chem* 279:49704-19715.
- Hol EM, Pekny M (2015) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr Opin Cell Biol* 32:121-130.
- Hamano S, Yamashita S, Tanaka M, Yoshinari S, Minamitani M, Eto Y (2006) Therapeutic efficacy and adverse effects of adrenocorticotrophic hormone therapy in west syndrome: differences in dosage of adrenocorticotrophic hormone, onset of age, and cause. *J Pediatr* 148:485-488.
- Huang Q, Tatro JB (2002) Alpha-melanocyte stimulating hormone suppresses intracerebral tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta gene expression following transient cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 334:186-190.

- Inder, TE (2006) Neurodevelopmental impact of low-grade intraventricular hemorrhage in very preterm infants. *J Pediatr* 149:152-154.
- Ito M, Aiba H, Hashimoto K, Kuroki S, Tomiwa K, Okuno T, Hattori H, Go T, Sejima H, Dejima S, Ikeda H, Yoshioka M, Kanazawa O, Kawamitsu T, Ochi J, Miki N, Noma H, Oguro K, Ozaki N, Tamamoto A, Matsubara T, Miyajima T, Jujii T, Konishi Y, Okuno T, Hojo H (2002) Low-dose ACTH therapy for West syndrome: initial effects and long-term outcome. *Neurology* 58:110-114.
- Joseph MJE, Caliaaperumal J, Schlichter LC (2016) After intracerebral hemorrhage, oligodendrocyte precursors proliferate and differentiate inside white-matter tracts in the rat striatum. *Transl Stroke Res* 7:192-208.
- Kaneva MK, Kerrigan ML, Grieco P, Curley GP, LockelC, Getting SJ (2012) Chondroprotective and anti-inflammatory role of melanocortin peptides in TNF- α activated human C-20/A4 chondrocytes. *Br J Pharmacol* 167:67-79.
- Khwaja O, Volpe JJ (2008) Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 93:153-161.
- Kondo Y, Okumura A, Watanabe K, Negoro T, Kato T, Kubota T, Hiroko K (2005) Comparison of two low dose ACTH therapies for West syndrome: their efficacy and side effect. *Brain Dev* 27:326-330.
- Lacar B, Young SZ, Platel JC, Bordey A (2010) Imaging and recording subventricular zone progenitor cells in live tissue of postnatal mice. *Front Neurosci* 19(4).
- Lasaga M, Debeljuk L, Durand D, Scimonelli TN, Caruso C (2008) Role of α -melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. *Peptides* 29:1825-1835.

- Lekic T, Manaenko A, Rolland W, Krafft PR, Peters R, Hartman RE, Altay O, Tang J, Zhang JH (2012) Rodent neonatal germinal matrix hemorrhage mimics the human brain injury, neurological consequences, and post-hemorrhagic hydrocephalus. *Exp Neurol* 236:69-78.
- Lekic T, Klebe D, Poblete R, Krafft PR, Rolland WB, Tang J, Zhang JH (2015) Neonatal brain hemorrhage (NBH) of prematurity: Translational mechanisms of the vascular-neural network. *Curr Med Chem* 22:1214-1238.
- Leone S, Noera G, Bertolini A (2013) Melanocortins as innovative drugs for ischemic diseases and neurodegenerative disorders: established data and perspectives. *Curr Med Chem* 20:735-750.
- Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MT, Meyers RL, Vanucci SJ (2001) Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci* 23:234-247.
- Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential. *Immunity* 46:957-967.
- Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481-487.
- Lisak RP, Nedelkoska L, Dealmear B, Benjamins JA (2015) Melanocortin receptor agonist ACTH 1-39 protects rat forebrain neurons from apoptotic excitotoxic and inflammation-related damage. *Exp Neurol* 273:161-277.
- Luo J, Luo Y, Zeng H, Reis C, Chen S (2018) Research advances of germinal matrix hemorrhage: an update review. *Cell Mol Neurobiol* 39:1-10.

- MacLellan CL, Silasi G, Auriat AM, Colbourne F (2010) Rodent models of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 41:95-98.
- Marba ST, Caldas JP, Vinagre LE, Pessoto MA (2011) Incidence of periventricular/intraventricular hemorrhage in very low birth weight infants: a 15-year cohort study. *J Pediatr* 87:505-511.
- Mestriner RG, Saur L, Bagatini PB, Baptista PP, Vaz SP, Ferreira K, Machado SA, Xavier LL, Netto CA (2015) Astrocyte morphology after ischemic and hemorrhagic experimental stroke has no influence on the different recovery patterns. *Behav Brain Res* 218:257-261.
- McCrea HJ, Ment LR (2008) The diagnosis, management and postnatal prevention of intraventricular hemorrhage in the preterm neonate. *Clin Perinatol* 35:777-792.
- Medvedeva EV, Dmitrieva VG, Limborska AS, Myasoedov NF, Dergunova LV (2017) Semax, an analog of ACTH(4-7), regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats. *Mol Genet Genomics* 292:635-653.
- Mörelus E, He HG, Shorey S (2016) Salivary cortisol reactivity in preterm infants in neonatal intensive care: an integrative review. *Int J Environ Res Public Health* 13:337-350.
- Mukai T, Mori Y, Shimazu T, Takahashi A, Tsunoda H, Yamaguchi S, Kiryu S, Tojo A, Nagamura-Inoue T (2017) Intravenous injection of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells attenuates reactive gliosis and hypomyelination in neonatal intraventricular hemorrhage model. *Neuroscience* 355:175-187.

- Neves LAT, Neto JAC, Kneipp D, Fonseca LG, Rosado MP, Barreto MRP (2007) Intracranial hemorrhages in preterm newborns. Casuistry of the Albert Sabin Hospital's Neonatal Unit. *HU rev* 33:49-54.
- Neves JD, Aristiminha D, Vizuete AF, Nicola F, Vanzela C, Petenuzzo L, Mestriner RG, Sanches EF, Gonçalves CA, Netto CA (2017) Glial-associated changes in the cerebral cortex after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the rat striatum. *Brain Res Bull* 134:55-62.
- Obici S, Feng Z, Tan J, Liu L, Karkanias G, Rossetti L (2001) Central melanocortins receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 108:1079-1085.
- Purisch SE, Gyanfi-Bannerman C (2017) Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol* 41:387-391.
- Privat A (2003) Astrocytes as support for axonal regeneration in the central nervous system of mammals. *Glia* 43:91-93.
- Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfield M (1990) Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 21:801-807.
- Ross AP, Bem-Zacharia A, Harris C, Smrtka J (2013) Multiple sclerosis, relapses, and the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. *Front Neurol* 4:21.
- Sabel M (2017) Brain tumors in children. Intervening with the aftermath: relapse and long term side effects. Tesis. Department of Pediatrics, University of Gothenburg. Suécia. p 70.

- Schaible EV, Steinsträßer A, Jahn-Eimermacher A, Luh C, Sebastiani A, Kornes F, Pieter D, Schäfer MK, Engelhard K, Thal SC (2013) Single administration of tripeptide α -MSH(11-13) attenuates brain damage by reduced inflammation and apoptosis after experimental traumatic brain injury in mice. *PLoS One* 8:1-10.
- Shah SS, Ohlsson A, Shah VS (2012) Intraventricular antibiotics for bacterial meningitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 7
- Spaccapelo L, Bitto A, Galantucci M, Ottani A, Irrera N, Minutoli L, Altavilla D, Novellino E, Grieco P, Zaffe D, Squadrito F, Giuliani D, Guarini S (2011) Melanocortin MC4 receptor agonists counteract late inflammatory and apoptotic responses and improve neuronal functionality after cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 670:479-486.
- Schousboe A, Sarup A, Bak LK, Waagepetersen HS, Larsson OM (2004) Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission 45:521-527.
- Schuhler S, Horan TL, Hastings MH, Mercer JG, Morgan PJ, Ebling FJ (2004) Feeding and behavioural effects of central administration of the melanocortin 3/4-R antagonist SHU9119 in obese and lean Siberian hamsters. *Behav Brain Res* 152:177-185.
- Strimbu K, Tavel JA (2010) What are biomarkers?. *Curr Opin HIV AIDS* 5:463-466.
- Stewart A, Tekes A, Huisman TA, Jennings JM, Allen MC, Northington FJ, Graham EM (2013) Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for periventricular white matter injury. *Am J Obstet Gynecol* 209:27.
- Sofroniew MV (2015) Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a020420.

- Szymonowicz W, Schafler K, Cussen LJ, Yu VY (1984) Ultrasound and necropsy study of periventricular haemorrhage in preterm infants Arch Dis Child. 59:637-642.
- Tatro JB (2005) Melanocortins defend their territory: Multifaceted neuroprotection in cerebral ischemia. Endocrinology 147:1122-1125.
- UNICEF (2013) Prematuridade e suas possíveis causas. Disponível em: https://www.unicef.org/brazil/pt/br_prematuridade_possiveis_causas.pdf
- Valny M, Honsa P, Kriska J, Anderova M (2017) Multipotency and therapeutic potential of NG2 cells. Biochem Pharmacol 141:42-55
- Volpe JJ (1997) Brain injury in the premature infant: neuropathology, clinical aspects, and pathogenesis. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 3:3-12
- Volpe JJ (2001) Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 7:56-64.
- Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirum K, Bonet M, Lumbiganon P (2018) The global epidemiology of preterm birth. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 52:3-12.
- Walsh BH, Inder TE, Volpe JJ (2017) Intraventricular hemorrhage in the neonate. Fetal and Neonatal Physiology 1333-1349.
- Whitelaw A, Rosengren L, Blennow M (2001) Brain specific proteins in posthaemorrhagic ventricular dilatation. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 84:F90-1.

World Health Organization (2012). Born too soon: the global action report on preterm birth. Disponível em: http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/201204_borntoosoon-report.pdf.

Yan T, Chopp M, Chen J (2015) Experimental animal models and inflammatory cellular changes in cerebral ischemic and hemorrhagic stroke. *Neurosci Bull* 31:717-734.

Anexo 1**CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO****1) PROTOCOLO Nº: 205/17****Parecer 506/17****2) DATA DO PARECER: 12/07/17****3) TÍTULO DO PROJETO:**

Estudo sobre o possível efeito neuroprotetor do ACTH em modelos de hemorragia peri-intraventricular em ratos neonatos.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Alberto Antônio Rasia Filho

5) RESUMO DO PROJETO:

Trata-se de estudo experimental, controlado e randomizado, composto por 5 grupos com n=12 animais em cada grupo. Será induzida hemorragia peri-intraventricular nos ratos neonatos através da infusão de collagenase intracerebroventricular. Após a indução da hemorragia, será administrada doses de ACTH intracerebroventricular (0,024 mg/kg ou 0,048 mg/kg em diferentes grupos). Após dois dias do procedimento os animais serão eutanasiados para análise histológica, bioquímica e imunohistoquímica dos seus encéfalos para os biomarcadores S100 β , GFAP e vimentina. Os dados obtidos serão analisados em programa estatístico Epilnfo versão 7.2, análise de variância (ANOVA) de uma via e teste de Tukey. Espera-se observar que o uso do ACTH após hemorragia da matriz germinativa apresente efeito neuroprotetor no tecido cerebral, com redução do volume da lesão isquêmica e maior viabilidade de neurônios, glia e neuroglia.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Estudar os efeitos da lesão cerebral após indução de hemorragia peri-intraventricular por uso da collagenase e avaliar a relação da extensão da lesão com biomarcadores imunohistoquímicos e a possível ação neuroprotetora do ACTH no tecido cerebral de ratos neonatos.

Específicos:

- Reproduzir um modelo de hemorragia peri-intraventricular em ratos neonatos através da infusão de collagenase ICV.
- Estudar os efeitos temporais (6, 24 ou 48h) após a infusão da collagenase na extensão da lesão cerebral para definir o melhor momento da intervenção terapêutica.
- Analisar e dimensionar a extensão da lesão com o estudo de imagens histológicas.
- Realizar análise imunohistoquímica e técnica de ELISA dos cortes obtidos com o intuito de mensurar e relacionar os marcadores bioquímicos GFAP, S100 β e vimentina com a lesão cerebral ocorrida.
- Comparar o efeito das diferentes doses de ACTH administradas com a extensão da lesão no tecido cerebral e com os biomarcadores estudados.

7) FINALIDADE DO PROJETO:
☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários

Introdução

☒

Adequada

☐

Comentários

Objetivos ☒ Adequados ☐ Comentários

Relevância e Justificativa ☒ Adequados ☐ Comentários

Materiais e Métodos ☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa ☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora ☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas ☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C ☐ D ☐ E ☐

Justifique:

Grau de invasividade = G2: Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor de leve intensidade

Espécie: rato

Número Amostral: 109

Redução Amostral:

☐ Sim

☒ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

☐ Sim

☒ Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

☒ Adequada

☐ Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Laboratório de Fisiologia da UFCSPA

Outra instituição. Qual? Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da PUCRS

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data

Espécie

Sexo

Quantidade

12) RECOMENDAÇÃO:

☒

Aprovado

☐

Com Pendência

☐

Não aprovado

Data de início: 01/05/2017 Data de Término: 31/12/2018

Comentários gerais sobre o projeto:

As questões sugeridas foram atendidas em sua totalidade.