



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL**

**PEDRO DANIEL DE SOUSA BRANDÃO**

***Neuroproteção Perinatal: Quo Vadis?***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

ANA LUÍSA FIALHO AMARAL DE AREIA

ANABELA MOTA PINTO

MARÇO/2018

# NEUROPROTEÇÃO PERINATAL: *QUO VADIS?*

Pedro Daniel de Sousa Brandão<sup>a</sup>, Ana Luísa Fialho Amaral de Areia<sup>b,c</sup>, Anabela Mota Pinto<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal;  
Endereço de correio eletrónico: pedrobrandao@live.com.pt

<sup>b</sup>Assistente Convidada da Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

<sup>c</sup>Assistente Hospitalar de Obstetrícia, Maternidade Daniel de Matos, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

<sup>d</sup>Professora Catedrática da Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Coimbra, março de 2018



## Índice

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Materiais e Métodos	12
Fisiopatologia da lesão cerebral	12
Encefalopatia da prematuridade	15
Encefalopatia hipóxico-isquémica	18
Tratamentos neuroprotetores	26
Hipotermia induzida	26
Sulfato de magnésio	33
Clampagem tardia do cordão umbilical	39
Melatonina	41
Eritropoietina	46
Corticoides e esteroides neuroativos	51
Creatina	54
N-acetilcisteína	56
Alopurinol	58
Topiramato	60
Xénon e outros gases nobres	61
Transplante de células estaminais	64
Discussão e Conclusão	69
Agradecimentos	71
Referências bibliográficas	72
Anexo 1	81



## **Resumo**

Uma vez que o sistema nervoso em desenvolvimento é particularmente vulnerável a inúmeros fatores e mecanismos patogênicos, a lesão cerebral perinatal pode surgir em diferentes momentos (durante o parto, mas também antes ou após), associada a etiologias que variam desde episódios de hipóxia-isquemia a distúrbios genéticos ou doenças infecciosas, assumindo-se assim como importante causa de mortalidade neonatal, sobretudo nos países subdesenvolvidos. Com os avanços nos cuidados obstétricos e neonatais e a consequente redução da mortalidade neonatal em idades gestacionais mais precoces, a morbidade e os riscos de sequelas neurológicas a longo prazo (como a paralisia cerebral) aumentaram, exigindo novas estratégias e agentes neuroprotetores eficazes, dado o seu impacto socioeconómico substancial. Neste sentido, a investigação desenvolvida para reduzir o impacto da lesão cerebral permitiu definir o sulfato de magnésio antenatal (em contexto de parto pré-termo iminente ou planeado) e a hipotermia induzida (na encefalopatia hipóxico-isquémica em recém-nascidos de termo) como medidas de neuroproteção. Apesar da franca melhoria dos resultados clínicos com as intervenções descritas, muitas são as suas limitações e critérios de exclusão, pelo que continuamos longe de eliminar a morbimortalidade associada a estes eventos patológicos. Assim, outras estratégias têm vindo a ser investigadas ao longo dos últimos anos ainda sem aplicação clínica instituída.

Com este trabalho pretende-se esclarecer os fenómenos fisiopatológicos subjacentes à lesão perinatal do cérebro imaturo e discutir as estratégias de neuroproteção desenvolvidas e em estudo, apresentando ainda os desafios e inovações emergentes que se afiguram nesta área.

**Palavras-Chave:** neuroproteção; fármacos neuroprotetores; feto; recém-nascido; doenças do sistema nervoso central; prematuridade; hipóxia-isquemia encefálica; hipotermia induzida; sulfato de magnésio; melatonina.

## **Abstract**

As the developing nervous system is particularly vulnerable to several factors and pathogenic mechanisms, perinatal brain injury may occur at different moments (frequently intrapartum but also ante or post-partum) and its etiologies vary from hypoxia-ischemia to genetic and metabolic disorders or infectious diseases, thus making it an important cause of neonatal mortality, especially in developing countries. The advances in obstetric and neonatal care and the resulting reduction in neonatal mortality in lower gestational ages led to increased morbidity and risk of long-term neurologic sequels in this population, such as cerebral palsy. Given its substantial socio-economic impact, it requires the development of new neuroprotective strategies and specific, effective agents. Therefore, the investigation developed to reduce perinatal brain injury allowed the establishment of antenatal magnesium sulfate (in the context of imminent or planned preterm delivery) and induced hypothermia (in hypoxic-ischemic term newborns) as neuroprotective measures. Despite the subsequent improvement in clinical outcomes, the described measures have important limitations and exclusion criteria, emphasizing how far we still are from ending the morbimortality associated with these pathological events. As a result, other strategies have been investigated over the last few years, still without clinical application.

This article aims to clarify the pathophysiology underlying perinatal brain injury and reviews neuroprotection strategies' evolution, presenting the challenges and emerging innovations in this area.

**Keywords** (MeSH terms): neuroprotection; neuroprotective agents; fetus; newborn; central nervous system diseases; prematurity; hypoxia-ischemia, brain; hypothermia, induced; magnesium sulfate; melatonin.

## Introdução

A encefalopatia neonatal (EN) é definida como o conjunto de manifestações clínicas resultantes de uma alteração da função neurológica em recém-nascidos de termo durante o período neonatal precoce<sup>1-5</sup>, que compreendem a diminuição do estado de consciência, do tônus muscular e reflexos, com dificuldade respiratória e frequentemente convulsões<sup>1-3,5-8</sup>. Enquanto definição puramente clínica, não informa sobre a etiopatogenia implicada na lesão cerebral.<sup>1</sup> No recém-nascido pré-termo, a lesão neurológica associada e as suas complicações designam-se por encefalopatia da prematuridade.<sup>9,10</sup>

Mundialmente, constituem as causas mais comuns de incapacidade por défice neurológico na infância<sup>2</sup> e assumem um importante impacto socioeconómico<sup>2</sup>, tornando prioritária a adoção de medidas de neuroproteção perinatal a fim de garantir a prevenção e redução das suas consequências a longo prazo<sup>2,5</sup>.

Atendendo à natureza complexa e multifatorial da EN, estão descritas diversas etiologias<sup>1,2,4,8</sup> (Tabela 1) e fatores de risco<sup>1,8</sup> (Tabelas 2 e 3).

<b>Etiologias da encefalopatia neonatal</b>
Asfixia intraparto
Sépsis neonatal
Infeções congénitas (virais, toxoplasmose)
Alterações da migração neuronal
Doenças miotónicas congénitas
Doenças pulmonares ou das vias aéreas
Distúrbios metabólicos
Trauma com perda sanguínea e/ou diminuição da pressão arterial significativas
Doenças genéticas associadas a alterações trombóticas ou trombofílicas

**Tabela 1** – Etiologias da EN. Baseado em Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury”; Hassell, 2015, “New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection”; Pimentel-



Coelho, 2012, “Umbilical cord blood mononuclear cell transplantation for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy”; e Fleiss, 2015, “Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants”.

	<b>Fatores de risco antenatais para EN (ordenados quanto ao risco relativo)</b>	<b>Fatores de risco intraparto para EN</b>
<b>Mãe</b>	Doença tiroideia (maior risco)	Evento intraparto agudo
	Idade materna avançada	Posição occipitoposterior persistente
	Tratamento de infertilidade	Febre materna
	Hemorragias	Parto vaginal instrumentado
	Infeção viral na gravidez	Cesariana de emergência
	História de convulsões	Rutura prolongada de membranas
	Baixa paridade	
<b>Recém-nascido</b>	Peso abaixo do terceiro percentil	

**Tabelas 2 e 3** – Fatores de risco antenatais e intraparto para EN, respetivamente. Baseado em Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury” e Fleiss, 2015, “Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants”.

Embora frequentemente usada indistintamente como EN, a designação de encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal (EHI) apenas se aplica perante evidência de hipóxia-isquémia (diminuição do aporte de oxigénio e da perfusão sanguínea cerebral, respetivamente) no período perinatal como causa da lesão neurológica.<sup>1,3,5,7,11</sup> No entanto, dada a inexistência de definições universalmente aceites, que variam frequentemente entre os estudos epidemiológicos, a identificação e comparação da incidência e de fatores de risco entre estas entidades é difícil.<sup>1</sup>

A EHI contabiliza 30 a 60% dos casos de EN<sup>4</sup>, nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos, respetivamente<sup>1,12</sup>. Tem uma incidência anual estimada variável, em média de 1 a 3 para 1000 nados-vivos<sup>4,5,9,12-16</sup>, mas que pode chegar a 26 em países subdesenvolvidos<sup>5,9</sup>, devido ao acesso limitado a serviços médicos<sup>1,8</sup>, maior risco de lesão intraparto e infeções graves e taxas mais elevadas de parto pré-termo<sup>1</sup>. Os recém-nascidos

prematturos apresentam maior risco de EHI, com uma incidência 60% superior à população geral.<sup>12</sup>

Ao contrário dos países em desenvolvimento, em que os fatores intraparto desempenham um papel causal mais relevante na EN, apenas numa minoria dos casos nos países desenvolvidos é possível identificar a presença de um evento agudo causador de lesão cerebral por hipóxia-isquemia<sup>1,8</sup> (Tabela 4), pelo que o diagnóstico de EHI é habitualmente presuntivo<sup>8</sup>.

<b>Causas agudas de lesão cerebral – eventos sentinela</b>
Prolapso do cordão umbilical
Rutura uterina
Descolamento da placenta
Embolia de líquido amniótico
Hemorragia materna aguda
Diminuição súbita do débito cardíaco materno e fluxo sanguíneo fetal
Hemorragia neonatal aguda (vasa prévia, perda sanguínea pelo cordão umbilical ou transfusão feto-materna)

**Tabela 4** – Eventos sentinela. Baseado em Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury” e Fleiss, 2015, “Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants”.

A presença de índices de Apgar reduzidos e acidose metabólica (no sangue arterial do cordão umbilical ou no recém-nascido) acompanhando a disfunção neurológica sugerem fortemente EHI.<sup>5,6,8</sup> Também a lesão concomitante de outros órgãos, com elevação dos marcadores de lesão hepática, renal ou cardíaca, e os padrões de lesão típicos na ressonância magnética nuclear (RMN) crânio-encefálica auxiliam este diagnóstico.<sup>6</sup>

Com vista a uniformizar os critérios para definir asfixia intraparto como causa de lesão neurológica, e particularmente paralisia cerebral, vários consensos têm sido publicados, dos quais o mais recente é apresentado na Tabela 5.<sup>1,17</sup>

<i>American College of Obstetricians and Gynecologists Taskforce, 2003</i>	
<b>Critérios essenciais</b>	Acidose metabólica (pH < 7,0 + déficit de base ≥ 12 mmol/L)
	Encefalopatia moderada a grave
	Paralisia cerebral com tetraplegia espástica ou de tipo discinético
	Exclusão de outras etiologias (trauma, distúrbios genéticos, coagulopatia, infecção)
<b>Critérios auxiliares (inespecíficos)</b>	Evento sentinela presente
	Bradicardia súbita e mantida
	Índice de Apgar entre 0-3 após 5 minutos
	Falência multissistêmica em 72 horas após o nascimento
	Evidência imagiológica

**Tabela 5** – Definição de asfixia intraparto, segundo *American College of Obstetricians and Gynecologists Taskforce* (2003). Baseado em Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury” e Hankins, 2003, “Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy”.

Como em consensos prévios, também neste o diagnóstico de EHI depende da presença de critérios essenciais e auxiliares.<sup>1,17</sup> No entanto, os tipos de paralisia cerebral referidos dificilmente poderão ser utilizados enquanto critério diagnóstico obrigatório para uma condição aguda como a asfixia intraparto, uma vez que, tratando-se de sequelas neurológicas da lesão, podem por vezes levar vários anos até serem confirmados.<sup>1</sup>

Embora descrita maioritariamente em contexto agudo durante o parto, a hipóxia-isquemia pode desenvolver-se aguda ou cronicamente, durante os períodos pré-natal (hipotensão ou hipóxia grave materna, infecção), intraparto (eventos sentinelas) ou pós-natal (paragem cardiorrespiratória, choque).<sup>9,12</sup> Além disso, é consensual que não existe um padrão simples, totalmente reprodutível, de lesão associada à EHI, uma vez que inúmeros fatores contribuem para as consequências finais desta, nomeadamente a etiologia, extensão e localização da área atingida, idade gestacional e estado maturativo do sistema nervoso central (SNC) e de saúde geral aquando do insulto.<sup>1</sup>

Assim, apesar dos avanços médicos e na compreensão da sua fisiopatologia, a EHI mantém-se uma das principais causas de mortalidade em recém-nascidos<sup>1,5,9,12,13,15,16,18</sup>, quantificando 23% dos 4 milhões de mortes anuais no período neonatal mundialmente<sup>1</sup>, e de morbidade a longo prazo por disfunção neurológica moderada a grave em crianças<sup>4,5,9,13,15,16,18,19</sup>.

As consequências clínicas a longo prazo da lesão neurológica na EN e na encefalopatia da prematuridade são muito variáveis. Incluem défices motores, sensitivo-sensoriais, cognitivos e do neurodesenvolvimento<sup>9,20,21</sup>, entre os quais se destacam a paralisia cerebral<sup>5,9,12,21</sup> (registada em 10 a 20% dos sobreviventes com EHI<sup>9</sup>), défices visuais e auditivos<sup>5,9,12</sup> (em 40% dos sobreviventes com EHI<sup>9</sup>), epilepsia<sup>5,9,12,21</sup>, dificuldades de aprendizagem<sup>5,12</sup>, défice de atenção e hiperatividade<sup>5,12</sup>, entre outras. Mesmo nos casos de lesão cerebral ligeira, as avaliações neurológicas a longo prazo encontram frequentemente défices cognitivos subtis e alterações neurocomportamentais.<sup>4</sup> Genericamente, a prevalência destes défices neurológicos varia inversamente com a idade gestacional, tendo o *Institute of Medicine* norte-americano estimado, em 2007, que até 47% dos casos de paralisia cerebral são atribuíveis a parto pré-termo, bem como 37%, 27% e 23% dos défices visuais, cognitivos e auditivos em crianças, respetivamente.<sup>10</sup>

Para estimar o risco de sequelas neurológicas associado à lesão cerebral e ponderar o prognóstico, foram desenvolvidas classificações consoante o tipo de lesão em causa, de que é exemplo a de *Sarnat*, aplicada perante a suspeita de EHI neonatal e dividindo-a em ligeira, moderada ou grave, com base na clínica e avaliação eletroencefalográfica.<sup>5,6,14,22</sup> A EHI grave está associada a um risco muito elevado de morte (até 85%) ou de paralisia cerebral entre os sobreviventes, enquanto na moderada predominam os défices motores grosseiros e também alterações da motricidade fina, disfunção cognitiva e défices visuais, entre outros.<sup>14,22</sup>

Este trabalho visa sintetizar o conhecimento científico atual sobre os modelos fisiopatológicos de lesão cerebral perinatal, particularmente os mecanismos e potenciais alvos terapêuticos envolvidos na patogênese das encefalopatias hipóxico-isquêmica e da prematuridade, e as estratégias de neuroproteção em aplicação na prática clínica e que têm vindo a ser desenvolvidas, destacando as que se mostram mais promissoras para o futuro.

## **Materiais e Métodos**

Para a elaboração deste artigo de revisão, realizou-se a pesquisa de artigos nas bases de dados MEDLINE, através do motor de busca PubMed, e Embase, usando os seguintes descritores em linguagem MeSH: “*neuroprotective agents*” ou “*neuroprotection*” cruzados com “*newborn*”, “*fetus*” e “*perinatal care*”. Ao total de 371 artigos obtidos, sob a tipologia de revisão simples, revisão sistemática, revisão integrativa ou meta-análise, foram excluídos os anteriores a janeiro de 2012, não publicados em inglês, português ou espanhol e sem informação relativa a estudos em humanos. Da análise dos 126 artigos, foram selecionados 67 de acordo com a adequação do conteúdo ao objetivo do trabalho. Posteriormente, pela sua relevância, foram acrescentados 7 artigos, incluindo o Consenso Nacional de Hipotermia Induzida no tratamento da EHI e o registo da experiência do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria, e 2 capítulos de *Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology*, num total de 76 referências.

## **Fisiopatologia da lesão cerebral perinatal**

Atendendo à etiologia complexa da EN<sup>1,2,8</sup> e à dificuldade em, por exemplo, identificar um evento sentinela consistente com EHI<sup>8</sup>, embora conhecidas as principais vias de lesão cerebral implicadas na disfunção neurológica, foi proposto um modelo de lesão cerebral

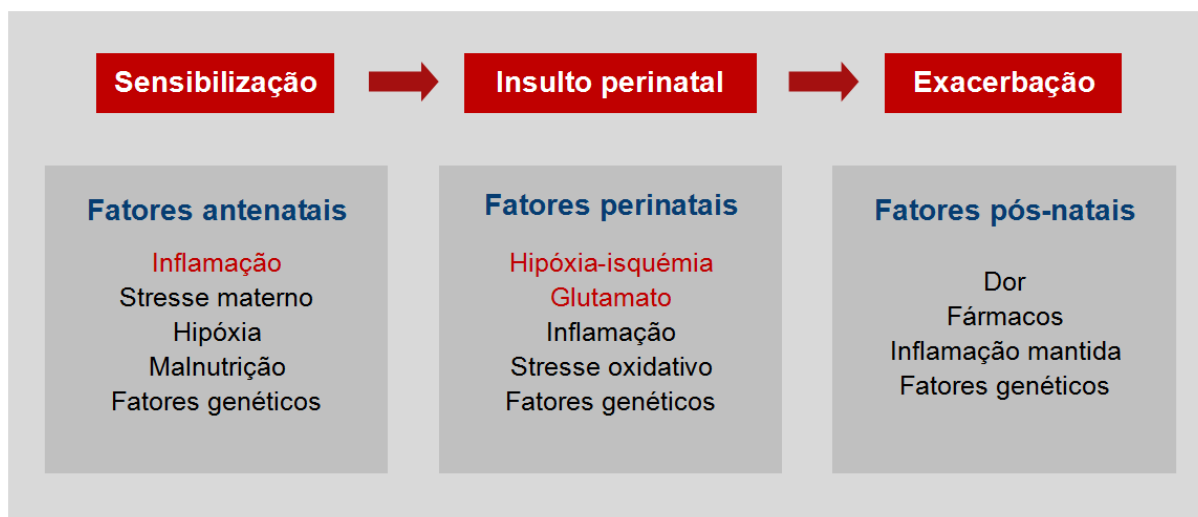
perinatal (Figura 1). Este modelo realça a importância de fatores de sensibilização, eventos não suficientemente graves para gerar diretamente lesão significativa mas que aumentam a suscetibilidade e potenciam o dano causado por outro insulto no cérebro em desenvolvimento<sup>8</sup>, contribuindo para resultados heterogêneos e diferentes graus de encefalopatia<sup>13</sup>. Este potencial deletério tem sido relacionado com vários fatores, incluindo febre materna<sup>1,13</sup>, inflamação/infeção fetal ou materna<sup>1,2,8,13</sup>, fatores genéticos<sup>1,8</sup>, stresse materno crónico na gravidez<sup>8</sup> e restrição de crescimento fetal (RCF)<sup>8,13</sup>.

Independentemente da evidência de infeção, a febre materna intraparto (temperatura > 37.5°C) mostrou aumentar o risco de lesão cerebral perinatal<sup>1,8</sup> e convulsões no recém-nascido de termo<sup>1</sup>, apesar de não se correlacionar com défices neurológicos a longo prazo<sup>8</sup>. A corioamnionite clínica, embora dificilmente definida devido à sua apresentação heterogênea que inclui febre materna, dor à palpação uterina, secreções de cheiro fétido e elevação dos marcadores inflamatórios maternos<sup>8</sup>, apresenta-se como fator de risco independente para paralisia cerebral em recém-nascidos de termo ou quase-termo<sup>1</sup>.

Também polimorfismos de genes envolvidos na inflamação, trombose/trombólise e função endotelial têm mostrado influenciar a resposta do cérebro imaturo aos insultos e fatores de sensibilização, atuando como moduladores da lesão.<sup>1,8</sup>

Uma vez que epidemiologicamente uma percentagem significativa dos recém-nascidos com EN apresenta sinais concordantes com lesão antenatal por RCF, esta condição é descrita como fator de sensibilização, quer na presença quer na ausência de etiologia hipóxico-isquémica<sup>1</sup>.

Para além destes, outros eventos, descritos na Figura 1 e que ocorrem após o insulto principal, podem exacerbar a lesão.<sup>8</sup>



**Figura 1** - Modelo de *multiple-hit* com fatores envolvidos na sensibilização e exacerbação da lesão cerebral perinatal. Adaptado de Fleiss *et al.*, 2015, “Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants”.

Devido à sua imaturidade estrutural e funcional, o cérebro do recém-nascido, sobretudo pré-termo<sup>23</sup>, é especialmente suscetível a lesões<sup>1,2,12,23,24</sup>. Para este estado de vulnerabilidade contribuem a deficiência de moléculas<sup>12,23</sup> e enzimas antioxidantes<sup>1,12,23,24</sup>, o consumo elevado de oxigénio<sup>12,24</sup>, as necessidades energéticas que ultrapassam a capacidade metabólica aeróbia<sup>23,24</sup> e a alta concentração de ácidos gordos polinsaturados facilmente oxidáveis<sup>1,12,24</sup> e de ferro livre<sup>1,12,23,24</sup>, que criam um ambiente pró-oxidante, promovendo o stresse oxidativo<sup>1,12,23,24</sup>. Também a sensibilidade neuronal aumentada dos recetores NMDA (N-metil-D-aspartato) de glutamato no cérebro do recém-nascido<sup>1,25,26</sup>, a vasoconstrição induzida por hiperóxia<sup>12,24</sup> e a mielinização limitada<sup>12</sup> expõe-no a maior risco de danos.

A lesão cerebral perinatal e as suas manifestações clínicas evoluem progressivamente, na dependência dos níveis energéticos, cuja diminuição tem um papel chave e habitualmente iniciador da disfunção neurológica, e das reações neuroquímicas decorrentes do insulto inicial.<sup>2</sup> Múltiplos mecanismos, nomeadamente o défice energético, a excitotoxicidade, o stresse oxidativo, a inflamação, a morte celular e as alterações no fluxo sanguíneo cerebral, são

transversais às diversas etiologias, resultando por isso em sequelas neurológicas e conseqüências funcionais idênticas.<sup>1</sup>

### **Encefalopatia da prematuridade**

O parto pré-termo é definido como o que ocorre antes das 37 semanas de gestação. A sua incidência varia de 5 a 18%<sup>10</sup>, com taxas tipicamente superiores em países subdesenvolvidos<sup>10</sup>, mas trata-se de uma complicação comum da gravidez, contabilizando globalmente cerca de 11% dos nascimentos<sup>10,27</sup>.

Face à melhoria das condições socioeconômicas e dos cuidados perinatais nas últimas décadas, a sobrevivência dos recém-nascidos prematuros é hoje substancialmente superior<sup>10,25-29</sup>, especialmente nos países desenvolvidos, observando-se taxas de mortalidade inferiores a 10% antes das 28 semanas de gestação<sup>10</sup> e ainda um aumento de nascimentos de grandes prematuros<sup>27</sup>, com idade gestacional inferior a 32 semanas.

Embora a transição entre os períodos fetal e neonatal precoce seja o momento de maior vulnerabilidade para lesão cerebral perinatal, os recém-nascidos pré-termo mantêm-se em risco de lesão neurológica após o nascimento devido à interrupção do aumento rápido de volume, forma e complexidade do cérebro fetal, caraterísticos do terceiro trimestre de gravidez.<sup>30,31</sup> Neste período, os pré-oligodendrócitos, cuja maturação ocorre entre as 24 e 32 semanas<sup>10,30-32</sup>, são as células mais suscetíveis. Quando lesados, a interrupção maturativa e conseqüente morte celular<sup>33</sup> impedem a mielinização cerebral normal<sup>33,34</sup>, que evolui habitualmente de forma progressiva e regulada até aos 2 anos de idade<sup>33</sup>. A lesão da substância branca é portanto caraterística da prematuridade, constituindo o principal padrão de lesão cerebral nos recém-nascidos pré-termo.<sup>9,20,26,30,32,33</sup>



A substância branca imatura nos prematuros é altamente suscetível a insultos, particularmente hipóxia-isquemia<sup>28,30-34</sup> e inflamação/infeção<sup>10,28,30-34</sup> (corioamnionite, sépsis, meningite), que resultam na ativação da microglia<sup>32-34</sup>, processos excitotóxicos<sup>30-34</sup> e formação de radicais livres<sup>30,32-34</sup>.

A infecção intra-amniótica ascendente e a infecção materna precedente correlacionam-se inversamente com a idade gestacional e estão fortemente associadas à ocorrência de parto pré-termo espontâneo, registrando-se corioamnionite histológica em > 85% dos partos antes das 28 semanas de gestação.<sup>10</sup> Neste contexto, pode desenvolver-se a chamada síndrome de resposta inflamatória fetal, caracterizada por alterações na autorregulação cardiovascular fetal<sup>34</sup> que potencializam a lesão cerebral, aumentando a morbidade neonatal.<sup>8,10,34</sup>

Também a RCF e alterações genéticas<sup>28</sup>, enterocolite necrotizante, doença pulmonar crônica e ventilação mecânica prolongada<sup>33</sup> se apresentam como fatores de risco. Ainda que a sua incidência tenha vindo a diminuir<sup>33</sup>, a lesão da substância branca é responsável por grande parte das alterações cognitivas e sensoriomotoras observadas<sup>32,33</sup> neste grupo.

A leucomalácia periventricular (LPV) constitui a sua forma mais comum<sup>10,11</sup> e engloba um espectro de lesões quísticas/focais, mais graves<sup>32,33</sup>, e não-quísticas/difusas<sup>10,20,32-34</sup>. Na LPV quística ou focal observam-se áreas macroscópicas de necrose de coagulação e liquefação na substância branca periventricular, que evoluem para quistos<sup>10,33</sup>, identificados por ultrasonografia<sup>33,34</sup>. Apesar da maior gravidade, graças aos avanços na abordagem dos recém-nascidos de alto risco<sup>28</sup>, a sua incidência tem diminuído drasticamente<sup>10,28,32,33</sup>, correspondendo atualmente a apenas 5% dos casos<sup>20</sup>. A LPV não-quística ou difusa, atualmente mais comum<sup>20,28,31</sup>, caracteriza-se por necrose microscópica isquêmica ou hemorrágica<sup>33</sup>, ocorrendo devido à morte celular de oligodendrócitos em desenvolvimento, astrogliose e microgliose<sup>10,20,28</sup>. Após a 32ª semana de gestação, a vascularização dos locais

predominantemente atingidos pela LPV aumenta significativamente, reduzindo a sua ocorrência a partir desta idade gestacional.<sup>34</sup> Por isso, os grandes prematuros apresentam maior risco de lesão primária e alterações secundárias na maturação cerebral.<sup>20,27</sup>

A hemorragia peri ou intraventricular (HIV) é outra das lesões típicas no cérebro do prematuro e, tal como a LPV, pode atingir os feixes piramidais, complicando-se por exemplo por paralisia cerebral espástica dos membros inferiores.<sup>34</sup> Com a redução da incidência da LPV quística, a hemorragia intracerebral é a principal causa de paralisia cerebral em prematuros.<sup>32</sup> Surge devido à fragilidade e ruptura dos vasos pelas flutuações do fluxo sanguíneo cerebral nos períodos pré e pós-parto no leito vascular da matriz germinativa subependimária, área cerebral que desaparece quase totalmente com a maturação fetal.<sup>32,34</sup> Habitualmente, causa não apenas destruição da matriz germinativa, mas também hidrocefalia, enfarte periventricular hemorrágico da substância branca<sup>30,34</sup> e convulsões<sup>30</sup>, podendo coexistir com LPV<sup>20</sup> e sendo o seu risco máximo durante a primeira semana de vida<sup>30</sup>.

Ainda que mais frequentemente descrita, a lesão cerebral da prematuridade não se limita à substância branca, englobando também lesão neuronal (nomeadamente no córtex, tálamo e núcleos da base<sup>10,20,33</sup>) e alterações na dendritogénese<sup>31</sup>, que no conjunto se designam por encefalopatia da prematuridade<sup>10,20</sup>.

Apesar da redução marcada da mortalidade em recém-nascidos prematuros a que se tem assistido, as complicações da prematuridade a longo prazo, nomeadamente as sequelas neurológicas que variam de défices cognitivo-comportamentais ligeiros a incapacidades graves<sup>10,25,26,31,35</sup>, constituem um importante problema de saúde pública<sup>10,28,31</sup>, pelo que várias estratégias têm sido desenvolvidas para as reduzir<sup>25,29</sup>. As principais incluem a prevenção do parto pré-termo e a neuroproteção do cérebro em desenvolvimento.<sup>10</sup> No entanto, a instituição generalizada de medidas para prevenção de parto pré-termo, cuja descrição não se inclui no

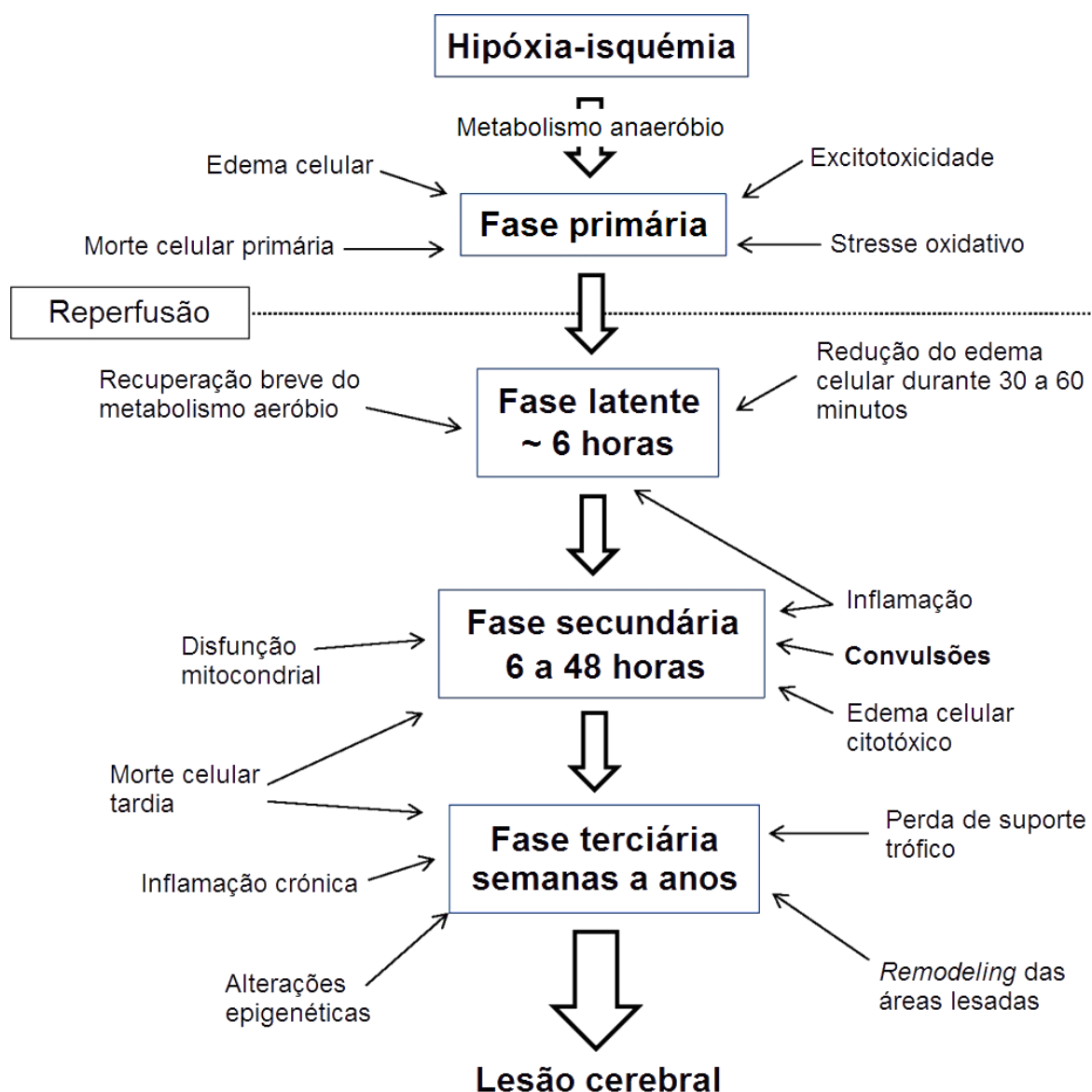
âmbito desta tese, reduziu apenas ligeiramente a sua taxa global<sup>10</sup>, mantendo-se atual a necessidade de desenvolver intervenções neuroprotetoras, pré e pós-natais, preventivas das complicações da prematuridade<sup>10,31</sup>.

No presente, apenas o sulfato de magnésio, apresentado adiante, está instituído clinicamente enquanto agente neuroprotetor antenatal neste contexto.<sup>8,10,13,20,25,27-29,31,34-44</sup>

### **Encefalopatia hipóxico-isquêmica**

Uma vez que a circulação cerebral é terminal, a disrupção da autorregulação do fluxo sanguíneo na dependência de um insulto hipóxico-isquémico em conjunto com as características de suscetibilidade do cérebro do recém-nascido levam a que, embora global, a lesão ocorra predominantemente em localizações específicas.<sup>1</sup> Os padrões de lesão cerebral mais frequentes na EHI incluem o tálamo, os núcleos da base e a lesão cerebral parassagital, habitualmente causada por hipóxia crônica devida a hipotensão materna ou infecção.<sup>1,6,9,31</sup>

Quanto à fisiopatologia da EHI, é atualmente aceite que os mecanismos de lesão cerebral ocorrem não apenas durante o insulto hipóxico-isquémico efetivo, mas também na reperfusão e reoxigenação<sup>15</sup>, podendo prolongar-se temporalmente após a agressão<sup>6,15</sup>. Descrevem-se várias fases sucessivas<sup>2,5,6,9,11,12,22,31</sup> (Figura 2): fase primária com depleção energética aguda; fase latente; fase secundária mediada por excitotoxicidade, stresse oxidativo e inflamação, conduzindo a apoptose; e fase terciária com inflamação mantida e alterações epigenéticas.



**Figura 2** – Fisiopatologia da encefalopatia hipóxico-isquêmica. Adaptado de Davidson, 2015, “Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy - Where to from Here?”.

A **fase primária** (Figura 2) inicia-se com o insulto hipóxico-isquémico e interrupção do fluxo sanguíneo cerebral. A privação súbita de oxigênio e glicose, que constitui o substrato energético primário do cérebro, conduz rapidamente ao consumo da energia celular disponível sob a forma de adenosina trifosfato (ATP)<sup>1,2,5,11,12,14,22,31,45</sup> e cessação do metabolismo aeróbio cerebral e fosforilação oxidativa<sup>1,12</sup>, com consequente acumulação de lactato<sup>1,5,12,22</sup>, por ativação do metabolismo anaeróbio, menos eficiente<sup>6,31</sup>.

Embora o lactato exerça inicialmente um efeito fisiológico ao atuar no músculo liso vascular aumentando o fluxo sanguíneo cerebral, e por estimular a atividade da creatina cinase, responsável pela síntese rápida de ATP a partir da fosfocreatina, a sua acumulação conduz a acidose tecidual grave, com perda dos mecanismos de autorregulação e lesão neuronal.<sup>1</sup>

Assim, perante a depleção súbita inicial de ATP que depende da intensidade e duração do insulto, um número variável de células sofre precocemente morte celular por necrose<sup>1,2,12</sup> devido à disfunção das bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentes de ATP membranares e consequente influxo maciço de sódio, cloro e água, que conduz a edema e lise celular<sup>11,14,22</sup>.

Nas células que sobrevivem ao evento agudo, as bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependentes de ATP falham progressivamente<sup>1,2,11,12,31</sup>, provocando despolarização das membranas neuronais<sup>1,2,5,11,12,14,22</sup> e libertação do glutamato contido nos terminais nervosos pré-sinápticos, que se acumula nas fendas sinápticas<sup>1,2,11,12,14,18,19,22,31</sup>. Também a recaptação glutamatérgica, dependente de energia, está comprometida, condicionando maior acumulação extracelular.<sup>1,11,19</sup>

Enquanto principal neurotransmissor excitatório do SNC, os 3 principais tipos de recetores de glutamato (NMDA, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico – AMPA e cainato) estão distribuídos ubiquitariamente pelas células cerebrais; assim, este exerce ação em numerosas vias neuronais, envolvidas em funções cognitivas, sensoriais e somatosensoriais.<sup>1</sup> Os efeitos neuroprotetores registados com a administração de agentes inibidores destes recetores, mesmo após o insulto, corroboram o papel central do glutamato e da excitotoxicidade na lesão cerebral perinatal, nomeadamente na EHI.<sup>1</sup>

Para além da ativação dos recetores NMDA, particularmente sensíveis no cérebro imaturo<sup>1,25,26</sup>, o influxo de cálcio ocorre através de outros transportadores membranares. É ainda libertado dos locais de armazenamento intracelular por dano físico<sup>2</sup>, conduzindo à elevação marcada do cálcio citosólico<sup>1,2,5,11,14,15,18,19,22,45</sup> e à ativação de cascatas de eventos

neurotóxicos<sup>1,2</sup>, que condicionam morte celular tardia com maior expressão na fase secundária da EHI<sup>1</sup>.

Inúmeros processos implicados na lesão cerebral, descritos na Tabela 6, são mediados pelo aumento do cálcio citosólico, maioritariamente através da ativação enzimática.<sup>1,2,5,14,15,18,22</sup>

<b>Ações diretas do cálcio citosólico</b>	<b>Efeitos</b>
Interrupção da fosforilação oxidativa mitocondrial	Diminuição da produção de ATP
Ativação de mecanismos de extrusão celular de cálcio dependentes de energia	Consumo de ATP, perpetuando o défice energético
Ativação de fosfolipases	Lesão membranar por hidrólise dos fosfolípidos; formação de radicais livres e eicosanoides (como as prostaglandinas), levando a inflamação
Ativação de proteases	Proteólise com disrupção do esqueleto celular; ativação de caspases, iniciando a apoptose celular
Ativação de nucleases	Lesão nuclear
Aumento do glutamato e das indolaminas	Excitotoxicidade
Ativação da protease que converte a xantina desidrogenase em xantina oxidase	Produção de ácido úrico e radicais livres
Ativação das isoformas dependentes de cálcio (neuronal e endotelial) e indutível da sintetase do óxido nítrico	Produção de óxido nítrico e radicais livres, nomeadamente peroxinitrito

**Tabela 6** – Ações do cálcio citosólico. Baseado em Hassell, 2015, “New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection”; Dixon, 2015, “Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy”; Lobo, 2013, “Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy?”; Shankaran, 2015, “Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy”; Bel, 2016, “Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia”; e Wu, 2015, “Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury”.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) observa-se durante a fase aguda da lesão hipóxico-isquêmica e, particularmente, após o período de reperfusão numa lesão grave<sup>1,2,24</sup>, dado que o aumento da disponibilidade de oxigênio potencia a sua gênese. Por esta razão, as recomendações atuais propõem que a ressuscitação de recém-nascidos no contexto de EHI deve evitar estados de hiperóxia, que agravam as sequelas a longo prazo.<sup>1,3</sup>

Neste processo de stresse oxidativo celular, as ROS e também o óxido nítrico (NO)<sup>1,2,11,15</sup>, cuja síntese depende da ativação de isoformas da sintetase de óxido nítrico (NOS), reagem com vários componentes celulares, gerando novos radicais livres, que ampliam os seus efeitos e conduzem a lesão irreversível<sup>1</sup> por peroxidação lipídica e nitrosilação proteica<sup>2</sup>, lesão membranar e necrose celular, ativação de genes específicos envolvidos na apoptose, entre outros mecanismos. Para anular os efeitos do stresse oxidativo, que ocorre naturalmente no indivíduo saudável, o organismo é dotado de sistemas antioxidantes endógenos, que, no entanto, não estão geralmente totalmente desenvolvidos no cérebro do recém-nascido.<sup>1,12,23,24</sup>

Para além de atuar enquanto fator de sensibilização na EN e potenciar a lesão mesmo com insultos abaixo do limiar, a ativação de vias envolvidas na inflamação ocorre na EHI<sup>31</sup> por ativação da microglia, responsável pela síntese de citocinas, e dos macrófagos e quimiotaxia e acumulação de neutrófilos no cérebro<sup>1</sup>. A investigação pré-clínica com agentes contra a microglia demonstrou resultados neuroprotetores, sublinhando a importância destas vias na instituição da lesão neurológica.<sup>1</sup>

Devido à acidose e ao aumento de prostaglandinas e NO, na EHI ocorre vasodilatação vascular máxima e hiperémia cerebral, com aumento do volume e fluxo sanguíneo cerebral e diminuição da resistência vascular.<sup>1,5</sup> Embora não seja claramente reconhecido como mecanismo adaptativo ou causa adicional de lesão, este aumento do fluxo sanguíneo cerebral,

em conjunto com a diminuição da reatividade vascular ao dióxido de carbono, correlaciona-se diretamente com o grau de lesão e agravamento do prognóstico.<sup>1</sup>

Por fim, todos os mecanismos de lesão cerebral descritos podem culminar na ativação de vias de morte celular.<sup>1,5,45</sup> Embora se julgue a necrose predominante face a insultos graves na fase aguda (desorganizada, com perda da integridade celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático para o espaço extracelular), e a apoptose como modelo principal na fase tardia (altamente controlada e dependente de um programa genético regulado), em insultos de menor intensidade; considera-se hoje que o fenótipo de morte celular é um *continuum* dependente da disponibilidade de energia, necessária para a conclusão dos mecanismos de apoptose com sucesso.<sup>1,2,5,14,45</sup>

Após a fase primária e com o início da reperfusão, observa-se recuperação breve do metabolismo aeróbio e redução do edema celular citotóxico durante 30 a 60 minutos.<sup>2,11,13,46</sup> Segue-se a **fase de latência**, descrita como um período de janela terapêutica<sup>4,13,14,21,22,46</sup>, cuja duração em modelos animais demonstrou ser de aproximadamente 6 horas<sup>7,14,21,22,46</sup> e durante o qual estratégias neuroprotetoras podem prevenir ou reduzir as consequências do dano cerebral<sup>2,13,15,46</sup>, que se institui progressivamente após a lesão estabelecida pelo insulto inicial. Esta fase caracteriza-se por uma reação inflamatória pós-isquêmica que envolve a libertação de citocinas, interleucinas e alguns fatores de transcrição, exercendo efeitos neuroprotetores, antioxidantes e antiapoptóticos.<sup>11,18</sup>

A extensão temporal da inibição endógena dos fenómenos oxidativos, e o aumento da oxigenação tecidual nesta fase, está inversamente relacionada com a gravidade do insulto, podendo durar até 24 horas, segundo estudos de espectroscopia de ressonância magnética.<sup>2</sup>

A **fase secundária** (Figura 2), também designada falência energética secundária<sup>2,9,22</sup>, sucede a fase latente na EHI moderada ou grave<sup>6</sup> 6 a 48 horas após o evento hipóxico-



isquémico<sup>5,9,11,31</sup> e é descrita por um estado de hiperperfusão relativa<sup>2</sup> com falência do metabolismo aeróbio e da função mitocondrial<sup>2,6,11,13,31,46</sup>.

Apesar da recuperação parcial com a reperfusão, a depleção das reservas de fosfocreatina e ATP mantém-se<sup>2</sup>. No entanto, ao contrário da primeira fase, a diminuição dos substratos energéticos não é acompanhada de acidose cerebral<sup>5,22</sup>, estando a elevação do pH intracelular nos primeiros dias após o nascimento associada a maior risco de mortalidade e sequelas neurológicas<sup>2</sup>. Clinicamente, é na fase secundária que têm início as convulsões<sup>2,13,46</sup>, resultantes do edema cerebral citotóxico.<sup>2,11,13,31,46</sup>

A produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células da microglia é notável nesta fase e a disfunção mitocondrial é característica<sup>2,11,46</sup>, sendo responsável pela libertação citosólica de sinais mitocondriais pró-apoptóticos. De facto, a manutenção da excitotoxicidade, stresse oxidativo, inflamação e, por fim, da apoptose estão na base da falência energética secundária.<sup>5,11,14,22</sup>

A apoptose (considerada o mecanismo mais importante de morte celular na EHI em resposta ao stresse oxidativo e excitotoxicidade)<sup>18</sup> ocorre por vias caspase-dependentes (intrínseca ou extrínseca) ou independentes<sup>1,22,31,47</sup>. A via intrínseca, mitocondrial ou mediada pelo citocromo c, depende do aumento da permeabilidade mitocondrial e da consequente libertação citoplasmática de fatores pró-apoptóticos, nomeadamente o citocromo c, a caspase-9 e o fator indutor de apoptose (AIF).<sup>1</sup> Nas primeiras 3 a 24 horas após o insulto dá-se a ativação da caspase-9, que, pela sua atividade proteolítica, cliva e converte a procaspase-3 em caspase-3 ativa, 6 a 48 horas após o insulto. A caspase-3, efetora, promove a proteólise de proteínas do citoesqueleto e enzimas fundamentais à sobrevivência celular, iniciando a fragmentação nuclear e outras alterações citomorfológicas típicas da apoptose.<sup>1</sup> A via extrínseca não depende de sinais mitocondriais, sendo antes regulada pela ligação de citocinas pró-inflamatórias ao recetor

membranas de morte celular Fas.<sup>1,31</sup> Desta ligação resulta a ativação da caspase-8, que leva por sua vez à ativação da caspase-3, com um curso posterior comum à via intrínseca.<sup>1,18</sup> A via independente de caspases é mediada pelo AIF, que, enquanto regulador intrínseco positivo da apoptose, migra para o núcleo e induz a condensação da cromatina e fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN).<sup>1</sup>

Têm sido descritas diferenças importantes dependentes do gênero entre estas vias, que se refletem na compreensão dos mecanismos de lesão cerebral.<sup>1,31</sup> Enquanto no gênero feminino a apoptose depende maioritariamente da via intrínseca, a excitotoxicidade parece exercer um papel lesivo mais preponderante nos neurónios de indivíduos do gênero masculino, sendo responsável pela ativação preferencial de vias associadas ao AIF.<sup>1,47</sup> Estes dados influenciam necessariamente o desenvolvimento de estratégias de neuroproteção dirigidas e a interpretação da sua eficácia, podendo no futuro traduzir-se em protocolos distintos e necessidade de otimização das terapêuticas entre gêneros.<sup>1,31,47</sup>

Embora na literatura fossem classicamente consideradas apenas duas fases na patogénese da EHI, há evidência de que, apesar da recuperação parcial do metabolismo aeróbio, existem mecanismos patológicos, denominados coletivamente por falência energética ou **fase terciária** (Figura 2), que se mantêm ativos semanas a anos após o insulto hipóxico-isquémico.<sup>2,5,6,12</sup> Nestes incluem-se a ativação persistente de recetores das vias de inflamação<sup>2,5,12</sup>, gliose<sup>2,6</sup> e alterações epigenéticas<sup>2,5,12</sup>. Na dependência da inflamação mantida<sup>2</sup>, há nesta fase perpetuação da lesão por disfunção da neurogénese<sup>5,12</sup>, crescimento axonal<sup>5,12</sup> e sinaptogénese<sup>5,12</sup>, com *remodeling* das áreas atingidas<sup>6</sup>.

## **Tratamentos neuroprotetores**

Só compreendendo intimamente as vias moleculares envolvidas na lesão cerebral perinatal é possível delinear intervenções terapêuticas capazes de atuar específica e eficazmente sobre os mecanismos lesivos.<sup>1,9,15,48</sup> Exemplo particular da aplicabilidade clínica do conhecimento fisiopatológico é o aproveitamento da resposta neuroprotetora endógena na fase de latência da EHI como janela terapêutica para a instituição de medidas neuroprotetoras no período pós-natal.

Apresentam-se de seguida as principais intervenções e agentes farmacológicos usados na prática clínica para neuroproteção perinatal ou em estudo para aplicação futura.

## **Hipotermia induzida**

Desde os anos 60 do século XX<sup>7,11</sup>, a hipotermia tem sido estudada como estratégia neuroprotetora na lesão cerebral neonatal com o objetivo de potenciar a resposta endógena<sup>2</sup> e limitar a neurotoxicidade da hipóxia-isquémia<sup>7,21</sup>, demonstrando-se segura e eficaz na redução da mortalidade e sequelas neurológicas em recém-nascidos de termo com EHI moderada a grave<sup>1-3,6,7,9,11,14,18,20,21,46</sup>. Perante esta evidência em estudos pré-clínicos e clínicos e dada a inexistência de outras intervenções disponíveis para além dos cuidados de suporte, a hipotermia induzida é atualmente a única terapêutica neuroprotetora pós-natal disponível, assumindo-se como tratamento de eleição nestas condições em países desenvolvidos.<sup>1-7,9,11,12,15,16,20,31,40,46,47,49</sup>

O programa pioneiro de hipotermia induzida na EHI em Portugal foi iniciado em 2009 no Hospital de Santa Maria, em Lisboa, seguindo um protocolo (Tabela 7) de acordo com os critérios de inclusão e exclusão aplicados nos estudos multicêntricos que determinaram a eficácia deste tratamento<sup>16</sup>, à semelhança dos apresentados no Consenso Nacional de Hipotermia Induzida publicado em 2012<sup>3</sup>. Nos primeiros dois anos de experiência deste

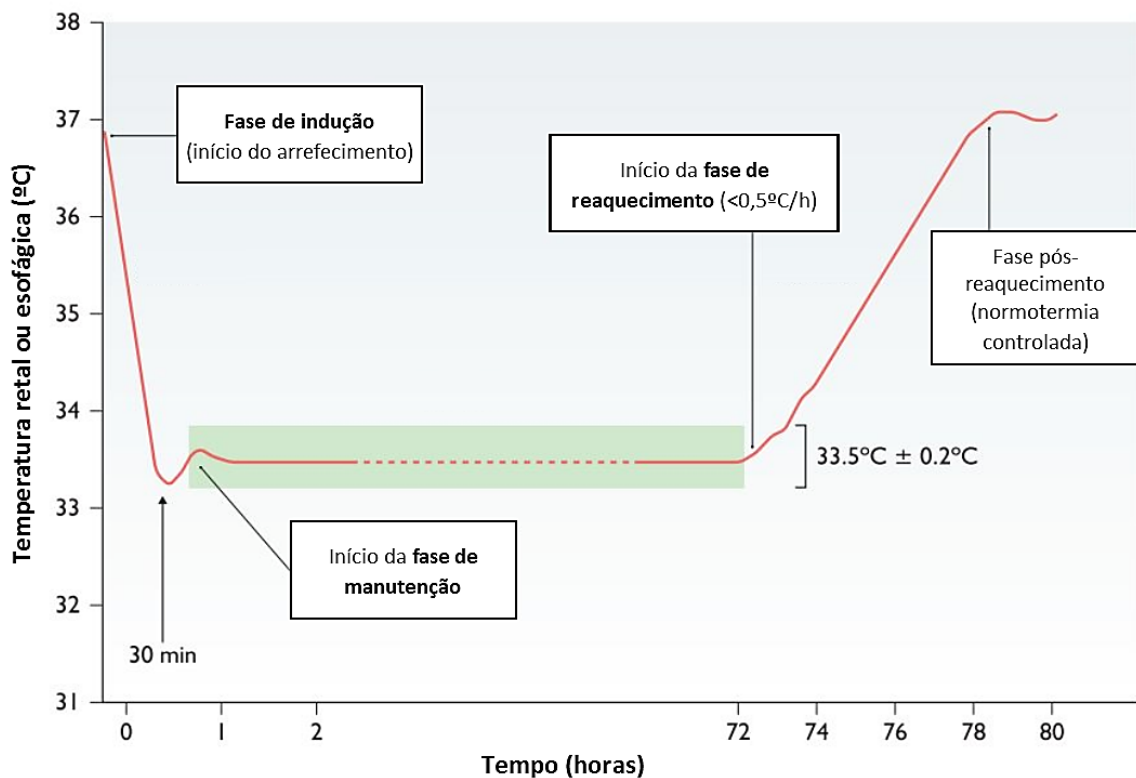
programa, a incidência combinada da mortalidade e sequelas neurológicas nos recém-nascidos tratados foi de 50%, dos quais 38% apresentavam encefalopatia grave à admissão. As taxas de mortalidade global e de sequelas neurológicas foram de 15 e 41%, respectivamente.<sup>16</sup>

<b>Critérios para tratamento com hipotermia induzida</b>	
<b>Avaliação inicial</b>	Recém-nascido $\geq$ 36 semanas de gestação e $<$ 6 horas de vida na altura da referenciação
<b>Critérios de inclusão</b>	<p><b>Evidência de asfixia perinatal (pelo menos 1 de):</b>  Índice de Apgar <math>\leq</math> 5 aos 10 minutos; necessidade de manobras de reanimação aos 10 minutos; pH <math>&lt;</math> 7,0 na primeira hora de vida; déficit de bases <math>\geq</math> 16 mM na primeira hora de vida  +  <b>Clínica de encefalopatia moderada/grave ou convulsões:</b>  Alteração do estado de consciência; hipotonia generalizada ou focal; diminuição dos reflexos primitivos; convulsões  +  <b>Alteração na atividade de base ou convulsões no aEEG</b></p>
<b>Critérios de exclusão (relativos)</b>	<p>Malformações congénitas major  Necessidade de cirurgia nos 3 primeiros dias de vida  Ausência de vaga nos centros de tratamento</p>

**Tabela 7** – Critérios para tratamento com hipotermia induzida. Baseado em Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury”; Graça *et al.*, 2012, “Hipotermia induzida no tratamento da encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal. Consenso Nacional”; e Sampaio *et al.*, 2012, “Hipotermia induzida na encefalopatia hipóxico-isquémica: experiência do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria”. aEEG – eletroencefalograma de amplitude integrada.

Estão descritas duas metodologias de aplicação de hipotermia: seletiva, com arrefecimento craniano exclusivo (*selective head cooling* - SHC), e global, dirigida a todo o corpo (*whole body cooling* - WBC), tendo ambas se mostrado eficazes.<sup>6,14</sup> Contudo, a hipotermia global é mais frequentemente usada<sup>1,6</sup>, dado o seu custo reduzido e facilidade de aplicação em comparação com a seletiva<sup>6</sup>.

Conforme esquematizado na Figura 3, a fase de indução corresponde ao início da hipotermia induzida, recomendado nas primeiras 6 horas de vida.<sup>1,3,9,16,21</sup> Mantém-se depois uma temperatura média retal ou esofágica de  $33,5^{\circ}\text{C}^{1,3}$  por 72 horas (fase de manutenção), a que se segue o reaquecimento durante pelo menos 4 horas, habitualmente a  $0,1$  a  $0,4^{\circ}\text{C}$  por hora, até a temperatura atingir os  $36,5$  a  $37^{\circ}\text{C}$ , independentemente da evolução clínica<sup>3</sup> (fase de reaquecimento)<sup>3,9,16</sup>. A monitorização da temperatura deve ser assegurada para evitar temperaturas demasiado baixas durante o tratamento e garantir a ausência de febre após o reaquecimento.<sup>1</sup>



**Figura 3** – Fases da hipotermia terapêutica – indução, manutenção e reaquecimento. Adaptado de Robertson, 2012, “Hypoxic-ischaemic brain injury”.

Para além disso, por exigir sedação, suporte cardiovascular e ventilação mecânica, entre outras medidas<sup>3</sup>, trata-se de uma técnica invasiva e implica portanto a existência de centros diferenciados de cuidados intensivos neonatais<sup>1</sup>.

Ainda que seja uma estratégia terapêutica estabelecida e com resultados comprovados, muitos dos mecanismos moleculares subjacentes ao uso da hipotermia induzida não estão esclarecidos.<sup>7,11,21</sup> Contudo, são-lhe atribuídos diversos efeitos, resumidos na Tabela 8.

<b>Efeitos da hipotermia induzida</b>	
<b>Antiapoptóticos</b>	Diminuição dos níveis de caspase-3
<b>Anti-inflamatórios</b>	Ativação de células da glia e produção de citocinas e NO
<b>Antioxidantes</b>	Aumento da afinidade da hemoglobina para o oxigênio; inibição da formação de ROS
<b>Anti-excitotóxicos</b>	Modulação da síntese, libertação e recaptção de neurotransmissores excitotóxicos; redução da fosforilação e ativação do recetor NMDA
<b>Redução do metabolismo cerebral</b>	Manutenção dos níveis intracelulares de fosfocreatina e ATP; diminuição de 5-7% do consumo energético por cada grau de temperatura corporal reduzido

**Tabela 8** – Efeitos terapêuticos da hipotermia induzida. Baseado em Hassell, 2015, “New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection”; Ma, 2012, “Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury”; Fleiss, 2015, “Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants”; Yildiz, 2017, “Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment”; Lobo, 2013, “Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy?”; Sampaio, 2012, “Hipotermia induzida na encefalopatia hipóxico-isquémica: experiência do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria”; Rees, 2011, “The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain”; Pietrini, 2012, “Neuroprotection and hypothermia in infants and children”; Shea, 2015, “What can you do to protect the newborn brain?”; Colver, 2014, “Cerebral palsy”; e Titomanlio, 2015, “Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models”.

A hipotermia induzida, como a maioria dos agentes pós-natais estudados neste trabalho, é iniciada durante a fase latente, habitualmente até às 6 horas após o insulto hipóxico-isquémico, por este constituir o período de oportunidade ótimo para potenciar os seus efeitos

neuroprotetores, conforme exposto previamente.<sup>7,14,15,21,22,46,47</sup> De facto, na presença de convulsões, característica clínica da fase secundária da EHI, está demonstrada menor eficácia da hipotermia.<sup>9</sup> Registam-se efeitos mais positivos no neurodesenvolvimento quando a hipotermia é iniciada nas primeiras 3 horas após insulto hipóxico-isquémico<sup>6,9</sup>, sugerindo maior efeito neuroprotetor quanto mais precoce o seu início<sup>1</sup>.

Inúmeros estudos publicados corroboram o potencial neuroprotetor da hipotermia, demonstrando a sua segurança<sup>14,21</sup> e eficácia, com redução significativa do risco de morte e sequelas neurológicas aos 18 meses de idade nas crianças com EHI moderada a grave<sup>1,6,7,9,14,20,21,46</sup>. Porém, o estudo *CoolCap*, aplicando SHC, apresentou resultados benéficos apenas na EHI moderada, tendo sido observados resultados equiparáveis noutros estudos com aplicação de WBC e efeitos positivos extensíveis à EHI grave.<sup>6,11</sup>

Quanto aos efeitos terapêuticos da hipotermia a longo prazo, surgem dados contraditórios. Um estudo não registou diferença significativa nas alterações do neurodesenvolvimento em crianças aos 6-7 anos de idade tratadas com hipotermia induzida no contexto de EHI.<sup>9,11</sup> No entanto, outros demonstraram recentemente que o tratamento da EHI com WBC se associa a melhoria dos resultados cognitivos aos 6-7 anos de idade, sugerindo a manutenção dos efeitos benéficos desta estratégia a longo prazo.<sup>40,46</sup> Também o estudo *TOBY* (*Total Body hYpoThermia*) revelou redução do risco de paralisia cerebral aos 18 anos de idade, com melhoria dos índices de neurodesenvolvimento no grupo tratado com hipotermia induzida.<sup>9,11</sup>

Embora controversas, a infeção sistémica grave, coagulopatia pré-existente e falência multiorgânica são consideradas contra-indicações à instituição de hipotermia induzida.<sup>21</sup> Porém, a última não deve ser considerada nestes doentes, dada a elevada frequência de falência orgânica no contexto da síndrome pós-asfixia.<sup>21</sup>

Quanto aos efeitos adversos da hipotermia, a maioria é apenas referida teoricamente, incluindo aumento do risco de infecção<sup>21</sup>, hipovolémia<sup>21</sup>, distúrbios hidroeletrólíticos<sup>21</sup>, particularmente hipocaliémia<sup>3</sup>, trombocitopenia e coagulopatia ligeiras<sup>1,3,7,21,40</sup>, insulinoresistência com hiperglicémia<sup>21</sup>, aumento da amilase<sup>21</sup> e alterações na excreção e metabolismo de fármacos<sup>3,21</sup>. Alguns destes fármacos (nomeadamente inotrópicos, opiáceos e anticonvulsivantes) são frequentemente administrados aos recém-nascidos em unidades de cuidados intensivos (UCI), pelo que as suas doses devem ser ajustadas. Para tal, é necessário investigar a sua farmacocinética e dinâmica e criar guias de tratamento adaptados à hipotermia induzida.<sup>21</sup>

A hipotermia pode induzir bradicardia sinusal<sup>7,21,40</sup> e diminuição do débito cardíaco, no entanto a redução da taxa metabólica associada permite habitualmente equilibrar de forma compensatória o aporte dos substratos e as necessidades dos tecidos<sup>21</sup>. Assim, na presença de hipovolémia corrigida com administração adequada de volume, a temperatura atingida na hipotermia induzida não influencia a contratilidade miocárdica nem causa hipotensão, ao contrário do que ocorre com temperaturas corporais inferiores a 30°C.<sup>21</sup>

As complicações descritas são no geral facilmente ultrapassáveis em UCI<sup>1</sup> e com a elevação lenta da temperatura em 1 ou 2°C<sup>3,21</sup>, exigindo no entanto controlo apertado.

Apesar dos claros benefícios da hipotermia induzida, são inúmeras as limitações desta estratégia terapêutica que restringem o seu uso a uma população selecionada.

Estudos clínicos em adultos e modelos pré-clínicos neonatais descrevem-na como ineficaz, e possivelmente prejudicial, na presença de inflamação/infecção.<sup>2,8,40</sup> Também nos recém-nascidos com < 36 semanas de gestação, a hipotermia está contraindicada.<sup>11,20,50,51</sup> Além disso, os riscos mesmo com hipotermia ligeira em grandes prematuros podem superar significativamente os benefícios hipotéticos.<sup>49</sup>



O uso da hipotermia terapêutica em países subdesenvolvidos, nomeadamente na África Subsaariana, associou-se a maior mortalidade neonatal, provavelmente pela incidência elevada de intercorrências infecciosas nas crianças com EN e pela inexistência de unidades diferenciadas que apliquem e monitorizem corretamente esta técnica.<sup>2</sup>

Assim sendo, embora a hipotermia induzida constitua um avanço significativo no tratamento da EHI em recém-nascidos de termo nos países desenvolvidos, um número muito elevado de casos de EHI moderada a grave (40 a 50%) não sobrevive ou mantém défices motores, sensoriais e cognitivos importantes.<sup>1,2,12,13,15,18-20,46,47</sup> Dada a necessidade pertinente de outras opções terapêuticas, vários agentes potencialmente neuroprotetores têm vindo a ser testados em conjunto com a hipotermia com vista a potenciar mutuamente os seus efeitos.<sup>1,4-6,9,11,12,14,15,18-20,40,46-50</sup> Entre as intervenções em estudo, destacam-se a melatonina<sup>1,5,12,15,18,40,50</sup> e a eritropoietina<sup>1,5,12,14,15,18,20,23,31,40,48,52</sup>, entre outras abordadas posteriormente.

Atendendo à variabilidade reduzida dos protocolos de hipotermia aplicados nos ensaios clínicos publicados, o início, intensidade e duração ótimos, bem como a segurança da hipotermia em recém-nascidos quase-termo, não estão estabelecidos.<sup>1,5-7,11,21,47</sup> Encontram-se, por isso, em curso vários estudos para avaliar e otimizar a eficácia da hipotermia: com início entre as 6 e 24 horas após o parto, de longa duração (durante 96 a 120 horas) e maior intensidade (temperaturas de 32°C)<sup>1,6</sup>, e em recém-nascidos com EHI entre as 33 e 35 semanas de gestação<sup>6</sup>. Contudo, um ensaio clínico recente foi interrompido precocemente devido ao aumento de mortalidade possivelmente associado à hipotermia mais profunda ou prolongada ou ambas.<sup>40</sup> São ainda importantes estudos de seguimento para comparar os benefícios e efeitos adversos da hipotermia de corpo inteiro face à seletiva a longo prazo.<sup>21,40</sup>

## Sulfato de magnésio

O magnésio é o quarto catião mais abundante no corpo humano<sup>35</sup> e o segundo no meio intracelular<sup>53</sup>. Principalmente presente no osso, células musculares e tecidos moles, é minoritariamente representado no fluido extracelular, sob as formas ionizada, ativa, e não-ionizada, sendo a nutrição a sua fonte principal.<sup>35,54</sup>

Está envolvido em diferentes processos celulares, nomeadamente na síntese proteica<sup>23,26,35,36,53,55</sup>, glicólise<sup>23,25,26,35,36,55</sup>, fosforilação oxidativa<sup>23,25,26,36,55</sup>, metabolismo lipídico<sup>26</sup> e dos ácidos nucleicos<sup>23,25,26,35,36,55</sup>, manutenção da integridade da membrana plasmática<sup>5,9,25,26,35,36,55</sup> e excitabilidade neuromuscular<sup>35,36</sup>, e as suas concentrações estão sujeitas a um controlo homeostático estreito, cujos mecanismos, embora pouco conhecidos, julga-se envolverem a paratormona e a modulação da sua absorção gastrointestinal e excreção renal<sup>35</sup>.

Utilizado como agente terapêutico em várias especialidades médicas<sup>12,35</sup>, também no âmbito da obstetrícia o magnésio, na forma de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ), foi usado durante décadas na prevenção da progressão de pré-eclâmpsia para eclâmpsia<sup>23,35,36,56,57</sup>, como anticonvulsivante de primeira linha no contexto de eclâmpsia<sup>20,23,29,34-36,56,57</sup> e como tocolítico<sup>29,34,36,42,48,56</sup>, ação que hoje não lhe é reconhecida, embora continue a ser prescrito em vários países<sup>23,35-37,42,44,54,56</sup>.

Ensaio clínicos que pretendiam avaliar a eficácia do  $MgSO_4$  na tocolise e no tratamento da pré-eclâmpsia foram os primeiros a assinalar o seu efeito neuroprotetor<sup>34,36,51,56</sup>, confirmado em estudos posteriores que conduziram ao desenvolvimento de indicações formais para a sua administração com este intuito. Assim, a neuroproteção constitui atualmente um dos usos obstétricos mais relevantes do  $MgSO_4$ .<sup>8,10,13,20,27-29,31,34-44</sup>

Ao atravessar rapidamente a placenta, a concentração fetal sérica de  $\text{MgSO}_4$  aumenta na primeira hora após administração materna<sup>25,36,37,40,55</sup>, o que o torna um agente terapêutico viável para neuroproteção antenatal.

O seu modo de ação não é, contudo, totalmente compreendido<sup>9,10,15,18,37,44,51,57</sup>, uma vez que as concentrações *in vivo* necessárias para a neuroproteção são inferiores às responsáveis pela ativação de alguns dos mecanismos que estão na base destes efeitos e que são descritos de seguida<sup>15,18</sup>.

Sabe-se que o  $\text{MgSO}_4$  tem efeitos em vários tipos celulares<sup>37</sup> e diversos mecanismos podem explicar o seu potencial neuroprotetor na lesão cerebral perinatal. Atua no SNC como antagonista não competitivo dos recetores NMDA<sup>5,8-10,12,15,18,23,25,26,34,36,37,40,47,48,53,56</sup>, aumentando o limiar convulsivo e prevenindo convulsões<sup>34,36,37</sup>, razão pela qual é o agente de escolha na prevenção e tratamento da eclâmpsia<sup>36,37</sup>. Ao diminuir a ativação destes e por bloquear também os recetores membranares de cálcio dependentes da voltagem, reduz o influxo de cálcio nas células cerebrais e os processos deletérios associados<sup>9,23,25,26,35,37,40,47,53,55,56</sup>, levando conseqüentemente a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo cerebral e anulando ou atenuando os efeitos da hipóxia-isquémia nestes tecidos<sup>6,25,29,34,35,37,40,51,55</sup>. Outros dos seus efeitos hemodinâmicos incluem a estabilização da pressão arterial no feto e recém-nascido.<sup>5,36,51,57</sup> Por apresentar efeitos anti-inflamatórios, ao inibir a produção de citocinas inflamatórias<sup>5,8,18,25,36,37,40,51,55,57</sup>, e antioxidantes, ao reduzir os radicais livres<sup>5,9,25,34,36,37,55,57</sup>, diminui a apoptose nos cérebros fetal e neonatal<sup>29,37</sup>, na EHI e nas doenças inflamatórias da gravidez<sup>25,55</sup>. O  $\text{MgSO}_4$  inibe ainda a agregação plaquetar<sup>18,37</sup> e aumenta a deformabilidade dos glóbulos vermelhos, permitindo o aumento do fluxo sanguíneo na artéria umbilical e nos vasos cerebrais fetais<sup>37</sup>. Para além disso, inibe a produção de NO nos neurónios após privação de oxigénio e glicose<sup>34,37</sup> e reduz a ativação da caspase-3<sup>18</sup>.

Em modelos animais de lesão cerebral hipóxico-isquêmica foi demonstrado que os pré-oligodendrócitos expostos a MgSO<sub>4</sub> apresentam maior resistência ao insulto e maior taxa de diferenciação em oligodendrócitos, contribuindo para a mielinização e proteção da substância branca em desenvolvimento.<sup>9,10,27</sup> Por outro lado, a ausência de proteção do MgSO<sub>4</sub> em oligodendrócitos maduros ajuda a compreender a sua utilização como agente neuroprotetor apenas no parto pré-termo.<sup>9</sup>

Apesar de dados de 5 ensaios clínicos randomizados serem aparentemente contraditórios (resumidos no Anexo 1), uma meta-análise mostrou que o tratamento antenatal com MgSO<sub>4</sub> em recém-nascidos pré-termo não apresenta efeito significativo na mortalidade pediátrica total, uma vez que, nos estudos em que se registou aumento desta, o MgSO<sub>4</sub> era usado como tocolítico (*MagNET*) ou anticonvulsivante materno (*MAGPIE*), estando estas mortes relacionadas com condições independentes do tratamento.<sup>10,44</sup> A mesma meta-análise revelou que o MgSO<sub>4</sub> antenatal reduz significativamente a incidência de paralisia cerebral (redução relativa do risco em 32%<sup>55</sup>) e de disfunção motora substancial em sobreviventes de parto pré-termo antes das 32 semanas<sup>9,10,23,25,26,29,34-37,43,44,48,51,55,57-59</sup>. O número médio de doentes necessário tratar para prevenir um caso de paralisia cerebral foi de 63<sup>26,29,43,51,55</sup>, variável entre estudos<sup>36,37</sup> e consoante a idade gestacional<sup>34,37</sup>, e para prevenir combinadamente morte ou paralisia cerebral foi de 42<sup>43</sup>.

Com base nestes ensaios clínicos, foram introduzidas em 2010 as primeiras recomendações internacionais, norte-americanas (publicadas pelo *American College of Obstetricians and Gynecologists* – ACOG) e australianas, para o uso de MgSO<sub>4</sub> como neuroprotetor em grandes prematuros.<sup>10,29,34-37,40,43,57</sup> No entanto, enquanto as recomendações do ACOG não definem uma dose ou idade gestacional para a instituição desta terapêutica<sup>10,29,36,37</sup>, as australianas restringem o uso de MgSO<sub>4</sub> a mulheres em risco de parto

iminente antes das 30 semanas de gestação, contestando os seus benefícios nas gestações mais tardias<sup>36</sup>.

Mais recentemente, organismos de outros países, como o Reino Unido, adotaram as recomendações australianas<sup>36</sup>, apresentadas na Tabela 9.

<i>Australian Clinical Practice Guidelines for antenatal magnesium sulphate prior to preterm birth for neuroprotection of the fetus, infant and child</i>	
<b>Indicação</b>	Parto antes das 30 semanas de gestação, planeado (se possível iniciar a administração 4 horas antes do parto) ou esperado em 24 horas, independentemente da causa, pluralidade, paridade, tipo de parto ou corticoterapia antenatal.
<b>Regime</b>	Infusão intravenosa de MgSO <sub>4</sub> – dose de carga de 4g (durante 20 a 30 minutos) + dose de manutenção de 1g/h até ao parto ou durante 24 horas. Se o parto não ocorrer em 24 horas, mas continuar iminente, considerar repetir.
Se necessário parto urgente por comprometimento materno ou fetal, não adiar o parto para administrar MgSO <sub>4</sub> .	

**Tabela 9** – Recomendações australianas da administração antenatal de MgSO<sub>4</sub> para neuroproteção perinatal. Baseado em Doyle, 2012, “Antenatal magnesium sulfate and neuroprotection”; Oddie, 2015, “Antenatal magnesium sulfate: Neuro-protection for preterm infants”; Jacquemyn, 2015, “The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection”; e Crowther, 2013, “Working to improve survival and health for babies born very preterm: the WISH project protocol”.

As recomendações da Organização Mundial da Saúde<sup>38,44</sup> e da *Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada*<sup>10,29,37</sup> para a prevenção da morbimortalidade devido a prematuridade são sobreponíveis às anteriores, mas, em vez das 30 semanas, recomendam o uso de MgSO<sub>4</sub> antes das 32 semanas de gestação perante parto iminente ou planeado. As recomendações canadianas estabelecem ainda a necessidade de interromper a tocólise quando se inicia a administração de MgSO<sub>4</sub>, enquanto as restantes não excluem esta combinação.<sup>37</sup>

Numa tentativa de esclarecer em que idades gestacionais o  $\text{MgSO}_4$  exerce maior efeito neuroprotetor eficaz<sup>36</sup>, a posologia ideal<sup>10,29,36,37</sup>, a duração ótima de administração e o melhor acompanhamento das grávidas e recém-nascidos estão em desenvolvimento diversos ensaios clínicos (*IRIS*, *AMICABLE* e *MAGENTA*)<sup>37</sup>. Também o estudo *MASP* se encontra em curso para determinar a magnitude do efeito do  $\text{MgSO}_4$  na lesão cerebral perinatal.<sup>37</sup> É ainda essencial reavaliar os sobreviventes dos ensaios atuais com  $\text{MgSO}_4$ , pelo menos na idade escolar, para investigar os seus efeitos motores e cognitivos a longo prazo, não devidamente conhecidos.<sup>29,36,44</sup>

Quanto aos efeitos adversos da administração sistêmica de  $\text{MgSO}_4$ , estão descritas reações maternas, facilmente controláveis<sup>36</sup>, que dependem sobretudo do seu efeito vasodilatador periférico<sup>25,26,55,56</sup> e incluem sensação de calor<sup>25,26,36,55,58</sup>, *flushing* facial<sup>25,26,36,54-56,58</sup>, sudorese<sup>26,34,55,56</sup> e irritação cutânea e dor no local de administração intravenosa<sup>26,34,36</sup>. Náuseas<sup>25,26,34,54,56,58</sup>, vômitos<sup>25,26,34,55,56,58</sup>, cefaleias<sup>25,26,54,58</sup>, palpitações<sup>25,55,58</sup> e visão turva<sup>26,54</sup> são efeitos dependentes da dose e velocidade de infusão<sup>25,55</sup>. Também se regista um aumento de 50% no risco de hipotensão e taquicardia.<sup>26,34,58</sup> Para além destas, não estão descritas outras complicações como mortalidade materna, hemorragia pós-parto grave ou aumento da taxa de cesarianas<sup>26,34</sup>; apesar disso, em doses elevadas, como as usadas na pré-eclâmpsia<sup>37</sup>, o magnésio pode causar fraqueza muscular e depressão respiratória<sup>25,36,55,56,58</sup>.

Nos recém-nascidos, a hipermagnesiemia pode teoricamente provocar hipotonia e depressão respiratória por bloqueio da entrada de cálcio nas células.<sup>25,36,37,40,56</sup> No entanto, não se regista maior risco de mortalidade fetal ou neonatal<sup>37</sup>, de depressão respiratória ao nascimento, nem aumento da necessidade de ressuscitação em grandes prematuros após exposição antenatal a  $\text{MgSO}_4$ <sup>36</sup>.

Por outro lado, a administração materna prolongada de MgSO<sub>4</sub> intravenoso reduz o cálcio sérico e causa conseqüentemente osteopenia e fraturas ósseas na mãe e na criança, razão pela qual não é atualmente recomendado o seu uso por mais de 5 a 7 dias.<sup>10,37</sup> O ACOG aconselha a sua administração nas menores doses e duração possíveis<sup>10</sup> e uso contínuo durante 48 horas no máximo<sup>37</sup>, atendendo ao aumento da mortalidade neonatal por HIV associado ao tratamento prolongado, com doses elevadas, da pré-eclâmpsia ou na tocolise<sup>37</sup>.

Ainda que o tratamento com MgSO<sub>4</sub> seja por vezes desnecessário, dado o diagnóstico incerto de parto pré-termo, e a sua administração exija maior monitorização hospitalar, esta constitui uma terapêutica altamente custo-efetiva na prevenção da paralisia cerebral e melhoria da qualidade de vida em grandes prematuros.<sup>36</sup>

Apesar da terapêutica antenatal com MgSO<sub>4</sub> estar atualmente estabelecida no parto pré-termo, também a eficácia e segurança do seu uso pós-natal têm sido estudadas na EHI.<sup>5,13,15,19,23,40,53,59</sup> Uma meta-análise recente que avaliou o tratamento com MgSO<sub>4</sub> em recém-nascidos com > 35 semanas de gestação na EHI durante as primeiras 24 horas após o nascimento não reuniu dados suficientes para concluir sobre benefícios nos resultados neurológicos a longo prazo ou na mortalidade, ainda que se verifique uma tendência para aumento da mortalidade nos grupos tratados com magnésio (provavelmente devido aos efeitos adversos associados).<sup>5,18,19,40</sup> Observou-se ainda risco de hipotensão grave, com interrupção precoce de alguns destes estudos.<sup>13,15,23</sup> Apesar de não ter sido ainda possível avaliar se o MgSO<sub>4</sub> altera a gravidade da EHI, alguns resultados positivos a curto prazo nos exames de neurodesenvolvimento, neuroimagem e neurofisiológicos indicam a importância de estudos futuros para determinar corretamente os seus benefícios a longo prazo.<sup>5,18,19,53</sup>

Uma vez que a hipotermia é hoje o tratamento de eleição nos recém-nascidos com EHI moderada a grave, não é possível, por razões éticas, randomizar doentes para avaliar a

terapêutica isolada com MgSO<sub>4</sub><sup>19</sup>, sendo indispensável desenhar cuidadosamente protocolos para os estudos futuros nesta área.

No âmbito da investigação desenvolvida sobre o uso de MgSO<sub>4</sub> como adjuvante em associação com hipotermia induzida<sup>5,9,23,40,53</sup>, um estudo recente comparando a terapêutica combinada com a hipotermia isolada em recém-nascidos de termo e quase-termo com EHI moderada a grave não revelou diferenças significativas a curto prazo entre os grupos (mortalidade, convulsões, coagulopatia, insuficiência renal, hemorragia pulmonar, enterocolite necrotizante, entre outros). Por outro lado, uma meta-análise descreveu aumento do risco de mortalidade por hipotensão e depressão respiratória aquando do uso conjunto das duas estratégias neuroprotetoras<sup>9</sup>, sobretudo durante infusões de MgSO<sub>4</sub> em bólus<sup>53</sup>. Assim, para compreender se esta associação poderá acompanhar-se de resultados positivos a longo prazo são necessários mais ensaios clínicos.<sup>9,53</sup>

### **Clampagem tardia do cordão umbilical**

A clampagem tardia do cordão umbilical, também conhecida como transfusão placentária, tem sido alvo de interesse científico e a sua definição sofreu já alterações.<sup>51</sup> Atualmente considera-se clampagem precoce ou imediata do cordão umbilical a que ocorre nos primeiros 15 segundos após a expulsão fetal durante o parto, variando o tempo da clampagem tardia entre os 30 segundos e os 5 minutos de vida, consoante os autores.<sup>51</sup>

Sabendo que o volume sanguíneo dos recém-nascidos ao nascimento pode ser significativamente influenciado pelo momento em que se realiza a clampagem do cordão umbilical<sup>34</sup>, o seu adiamento tem sido associado a prevenção da anemia da prematuridade<sup>51</sup>, reduzindo a necessidade de transfusões de glóbulos vermelhos<sup>34,51,60</sup> e melhorando a pressão arterial<sup>51</sup>, e a diminuição da incidência de HIV em prematuros até ao primeiro ano de



idade<sup>34,40,51</sup>. Observou-se também redução da ocorrência de sépsis nos recém-nascidos pré-termo em que foi aplicada esta estratégia.<sup>34</sup> Os efeitos neuroprotetores registrados em modelos animais dependem ainda do aumento dos fatores de coagulação<sup>34,40</sup> e do número de células estaminais circulantes<sup>34</sup>, que poderão conferir efeitos imunológicos e regenerativos adicionais, proveitosos em morbidades neonatais diversas<sup>51</sup>.

No entanto, apesar destes efeitos benéficos, a clampagem tardia do cordão umbilical aumenta o risco de policitêmia<sup>34</sup> e hiperviscosidade sanguínea<sup>51</sup> e de hiperbilirrubinemia<sup>34,51</sup>, com maior necessidade de fototerapia<sup>34</sup>. Face a estes efeitos adversos, foi realizado um estudo prospetivo comparando a clampagem imediata e tardia, 30 a 45 segundos após o nascimento, em prematuros com < 32 semanas de gestação, que revelou diminuição franca de hemorragia cerebral e de sépsis no último grupo, sem alterações nos níveis de bilirrubina ou quantidade de sangue transfundida.<sup>34</sup> Outros estudos e meta-análises confirmaram por sua vez os efeitos benéficos hematológicos e fisiológicos da clampagem tardia do cordão umbilical, sem se associarem a baixos índices de Apgar ou acidose.<sup>51</sup>

Com base nestes resultados, o ACOG recomenda a clampagem tardia do cordão umbilical, até 60 segundos, em todos os recém-nascidos pré-termo nascidos antes da 32ª semana de gestação.<sup>34</sup> Este procedimento deve ser realizado após o início das respirações, permitindo o enchimento do leito vascular pulmonar.<sup>51</sup> Durante o mesmo, o recém-nascido deve permanecer ao nível da placenta para otimizar o fluxo gravitacional.<sup>34,51</sup> O ACOG destaca ainda a investigação adicional necessária para otimizar o momento de clampagem consoante o tipo de parto (vaginal ou cesariana) e determinar os seus riscos e benefícios na prematuridade extrema (< 28 semanas de gestação).<sup>51</sup>

A sua principal limitação como estratégia neuroprotetora em recém-nascidos hipoxémicos e com compromisso do estado geral é a frequente necessidade emergente de

ressuscitação, que obriga à clampagem imediata do cordão para atuação da equipa médica.<sup>40</sup> Os efeitos a longo prazo da clampagem tardia em prematuros estão ainda poucos estudados, mas num estudo clínico em recém-nascidos de termo e de baixo risco registaram-se melhorias nos domínios social e motor fino aos 4 anos, particularmente no sexo masculino.<sup>51</sup>

## **Melatonina**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina endógena produzida principalmente pela glândula pineal<sup>6,9,12,13,23,24,28,50</sup> e que está envolvida na regulação e manutenção dos ritmos circadianos orgânicos<sup>2,6,12,23,24,28,50,59</sup>, de acordo com a fisiologia de múltiplos sistemas. A sua síntese, envolvendo a transformação de triptofano em serotonina<sup>9,23,28</sup>, e secreção rítmica ocorrem consoante os ciclos de luz-escuridão ambiental, atingindo um nível máximo durante a noite e menores concentrações diurnas<sup>28</sup>.

Embora a sua produção tenha apenas início no período pós-natal, sendo especialmente lenta e arritmica nos primeiros 3 meses de vida<sup>28</sup>, a melatonina materna atravessa facilmente a placenta, por ser uma molécula lipofílica<sup>2,13,28,50</sup>, e atinge a circulação fetal, expondo o feto durante a gravidez a concentrações noturnas elevadas e baixas durante o dia<sup>2,28</sup>. Ao longo da gravidez normal, os níveis maternos noturnos de melatonina aumentam progressivamente, sobretudo das 26 às 32 semanas de gestação, normalizando em 48 horas após o parto.<sup>28</sup> Nos recém-nascidos pré-termo, a secreção de melatonina sofre um atraso que persiste após correção da idade gestacional até aos 8 a 9 meses de idade.<sup>28</sup>

As ações da melatonina relacionadas com o ritmo circadiano são mediadas por recetores específicos (MT1 e MT2)<sup>28</sup>, mas a mesma hormona exerce outras funções de forma dependente ou independente de recetores, apresentando efeitos

antioxidantes<sup>2,5,6,9,10,12,13,15,18,20,23,24,28,40,48,50,59</sup>, antiapoptóticos<sup>2,5,9,13,15,18,24,28,40,48,50</sup> e anti-inflamatórios<sup>2,5,8,9,12,15,18,23,24,28,40,47,48,59</sup>.

Enquanto antioxidante direto, a melatonina, como alguns dos seus metabolitos<sup>24</sup>, neutraliza radicais livres<sup>2,5,6,9,10,12,15,18,20,24,47,50</sup>, entre os quais o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio, protegendo as células do stresse oxidativo. No entanto, esta ação é ampliada graças à capacidade da melatonina melhorar a eficiência da cadeia transportadora de eletrões mitocondrial<sup>2,9,12,23,24,48</sup>, reforçar a atividade antioxidante da glutathione e das vitaminas C e E<sup>24</sup>, e estimular a expressão genética<sup>2,12,20,24,48</sup> e ativação das mais importantes enzimas antioxidantes no tecido cerebral, incluindo a superóxido dismutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutathione redutase e peroxidase<sup>6,9,12,18,20,23,24,28</sup>. Ao contrário de outras moléculas antioxidantes, a melatonina não apresenta efeitos pró-oxidantes paradoxais e não interfere com as ações trombolíticas ou neuroprotetoras de outros fármacos.<sup>23</sup>

A melatonina atua também reduzindo a morte celular por apoptose<sup>2,24,28</sup>, ao limitar a libertação mitocondrial de citocromo c, smac e AIF<sup>18,24,50</sup>, o processamento de pro-IL-1 $\beta$ <sup>18</sup> e a ativação das caspases-1 e 3<sup>18,24</sup>. Promove o aumento dos níveis de ATP<sup>9</sup> e a ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência celular<sup>18,24</sup>, graças à expressão aumentada de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL) e diminuída de proteínas pró-apoptóticas (Bad e Bax)<sup>24</sup>. Exerce o seu efeito anti-inflamatório, prevenindo a ativação e translocação do NF-kB para o núcleo<sup>15,23,24,28,59</sup> ao ligar-se ao recetor MT1<sup>23</sup>, preservando a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE)<sup>18,28</sup>, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e consequente migração de células inflamatórias circulantes para o tecido lesado<sup>12,18,23</sup> e reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias<sup>6,10,24,28</sup>, malondialdeído e NO cerebrais<sup>6,18,20,23,24</sup>, ao inibir as isoformas neuronal e indutível da NOS<sup>24</sup>. No SNC, a melatonina regista ainda efeitos anti-excitotóxicos<sup>28</sup>, com diminuição das concentrações intracelulares de cálcio através da modulação dos recetores neuronais de glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA)<sup>24</sup>.

Atendendo a estes efeitos biológicos, sabe-se que a transmissão materna e a produção endógena de melatonina são fundamentais para o normal desenvolvimento e proteção do cérebro imaturo, observando-se elevação dos níveis plasmáticos de melatonina, 6 a 15 vezes superiores ao normal, após um insulto hipóxico-isquémico em modelos experimentais.<sup>2</sup>

Durante os últimos anos, a melatonina tem por isso sido considerada uma opção terapêutica para minimizar as sequelas neurológicas da lesão cerebral perinatal e, neste sentido, vários estudos demonstraram os seus efeitos promissores no tratamento da EHI<sup>2,5,8,12,13,18,24,50</sup>, mas também em condições de inflamação/infeção perinatal<sup>2,8,13,18,28,50,59</sup>, na prematuridade<sup>2,10,12,28</sup> ou na síndrome de dificuldade respiratória<sup>18,28</sup>.

Para além de poder ser administrada por via intravenosa ou em formulações orais<sup>13</sup>, a melatonina atravessa facilmente as barreiras fisiológicas, nomeadamente hemato-placentária e encefálica<sup>2,5,9,10,13,20,23,24,28</sup>, atingindo os compartimentos celulares onde exerce a sua ação. Apresenta elevada eficácia e, mesmo em concentrações supra-fisiológicas (com um largo intervalo de doses, desde 1,5 a 50 mg/kg<sup>9</sup>) ou administrada em diferentes momentos (horas a dias, antes ou depois do evento lesivo<sup>9</sup>), observa-se baixa toxicidade, não estando associada a efeitos adversos<sup>2,9,13,15,18,20,23,24,28,40,48</sup>, o que torna a sua utilização segura. De facto, nenhum estudo com administração ante ou pós-natal de melatonina indicou qualquer complicação associada.<sup>2,28</sup>

Estudos realizados em modelos animais demonstraram a eficácia neuroprotetora da melatonina na lesão hipóxico-isquémica, quer administrada antes ou após o insulto<sup>24</sup>, com redução do volume do enfarte, da perda neuronal e da peroxidação lipídica, bloqueio de vias apoptóticas, inibição da produção de radicais livres e diminuição da inflamação local<sup>12,20,24,40</sup>, com efeitos positivos a longo prazo, observados até à idade adulta<sup>18</sup>. Também os níveis de ferro livre, isoprostanos e neuroprostanos, envolvidos no stresse oxidativo e na inflamação, foram

reduzidos nos grupos tratados com melatonina<sup>12,18,28</sup>, limitando a lesão cerebral secundária<sup>2</sup>. Para além dos efeitos mencionados, a melatonina mostrou reduzir significativamente a ativação da microglia<sup>2,24,28,48</sup>, a neoformação de processos astrocíticos e a gliose reativa, assinalada pela redução da proteína glial fibrilar ácida<sup>24</sup>, e preservar a mielinização normal<sup>2,24,28,48</sup>, evitando a lesão da substância branca<sup>28</sup>, característica da prematuridade.

Em modelos experimentais de infeção perinatal, a terapêutica antenatal com melatonina (5 mg/kg), prévia à administração de lipopolissacarídeo (LPS), atenuou significativamente as respostas inflamatórias associadas ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6; a administração de melatonina pós-natal (20 mg/kg), 5 minutos após a de LPS, apresentou também resultados neuroprotetores ao reduzir a morte de oligodendrócitos, a lesão axonal na substância branca, a ativação das células da microglia e o stresse oxidativo, e ao melhorar a performance sensoriomotora do grupo tratado.<sup>59</sup>

Por ser bem tolerada pela grávida e dadas as suas características bioquímicas, a utilização da melatonina enquanto terapêutica neuroprotetora antenatal tem sido ponderada.<sup>2,5,13,20,28,48</sup> Para além disso, não lhe são conhecidos efeitos teratogénicos.<sup>13</sup> Estudos em modelos animais demonstraram que a administração materna de melatonina em baixa dose (0,1 mg/kg/dia) por mais de 7 dias na fase final da gravidez<sup>18,20</sup>, ou apenas administração única uma hora antes do insulto hipóxico-isquémico<sup>12</sup>, protege o feto dos efeitos lesivos que possam ocorrer durante o parto. Também em estudo está a suplementação materna de melatonina com vista a determinar a sua eficácia na prevenção de lesão cerebral em contexto de RCF.<sup>28,48,50</sup> No âmbito da encefalopatia da prematuridade, entre outros estudos, está em curso um ensaio clínico que pretende identificar a eficácia e segurança da administração diária de melatonina durante 7 dias a recém-nascidos pré-termo para reduzir a lesão cerebral associada.<sup>28,48,50</sup>

Contudo, atendendo à complexidade da fisiopatologia da lesão cerebral perinatal, estratégias sinérgicas (como a associação entre hipotermia e outros agentes terapêuticos) têm sido testadas com vista à otimização da neuroproteção.<sup>6,24,31,40,50</sup> A este respeito, a terapêutica combinada de hipotermia induzida com a administração intravenosa de melatonina, testada em recém-nascidos com EHI moderada a grave, mostrou potencializar o efeito da WBC, otimizando o metabolismo de energia cerebral<sup>12,24,50</sup> e reduzindo o stresse oxidativo, e melhorou a sobrevivência, com resultados favoráveis no neurodesenvolvimento aos 6 meses<sup>2,5,9,18,40</sup>. Esta associação demonstrou ainda diminuir as alterações da substância branca cerebral e a incidência de convulsões nos recém-nascidos tratados.<sup>40</sup>

Também a combinação de melatonina com outros potenciais agentes neuroprotetores, nomeadamente topiramato<sup>5,18</sup> ou sulfato de magnésio<sup>18,28</sup>, tem sido avaliada em modelos animais após insulto hipóxico-isquêmico, mostrando limitar o volume da área lesada.

Graças à sua aparente eficácia em recém-nascidos pré-termo<sup>2,5,10,13,28,39,40,48,50,59</sup> e de termo<sup>2,5,13,39,48,50</sup>, a melatonina surge como um agente neuroprotetor atrativo, natural e não tóxico, atendendo aos resultados favoráveis enquanto terapêutica isolada<sup>5,9,12,18,20,23,40,48,50</sup> ou combinada<sup>2,5,9,12,18,20,23,24,40,48,50</sup>. No entanto, a sua absorção oral variável<sup>13</sup> (sobretudo em condições de asfixia ou hipotermia), a rápida metabolização e as diferenças no seu perfil farmacocinético<sup>23,24,28</sup> (a meia-vida da melatonina em recém-nascidos é de 15 horas, enquanto em adultos varia de 45 a 60 minutos<sup>24</sup>), destacam a relevância da investigação clínica antes da entrada da melatonina na prática diária, de forma a obter informação concreta quanto à via, duração da administração e dose ótimas<sup>2,5,15,24,40</sup> para atingir um efeito máximo sem dessensibilizar os recetores de melatonina<sup>24</sup>.

Entre todos os agentes em estudo, a melatonina é o que reúne maior interesse e é considerado o mais promissor<sup>2,12,13,18,48</sup> pela sua eficácia neuroprotetora independentemente da

idade gestacional e perfis farmacocinético e de segurança adequados à administração ante e pós-natal, sendo expectável o seu uso clínico no futuro breve.

## Eritropoietina

A eritropoietina é uma glicoproteína endógena, mais conhecida pela sua ação central na eritropoiese<sup>6,9,10,12,30,31,51,52,57,59-63</sup>. Produzida primariamente pelas células de revestimento dos capilares peritubulares renais<sup>9,52</sup> após o nascimento, a sua síntese no período fetal é maioritariamente hepática<sup>9,31,52</sup>. A eritropoietina é também sintetizada no pâncreas<sup>52</sup> e no cérebro, por neurónios, astrócitos, oligodendrócitos e células da microglia<sup>6,9,12,23,31,47,52,63</sup>, estando descrito o seu papel como fator de crescimento e agente neuroprotetor no SNC em desenvolvimento<sup>2,12,18,30,31,48,51,52,57,63,64</sup>. Para além das células capazes de sintetizar eritropoietina, também as células endoteliais expressam variavelmente recetores membranares de eritropoietina (EpoR), o que suporta a sua função como hormona com ação autócrina e parácrina no SNC.<sup>2,30,52</sup>

É atualmente usada como terapêutica segura e eficaz na anemia da prematuridade<sup>6,20,51,59-61,63</sup>, diminuindo as necessidades transfusionais<sup>51,60</sup>.

A hipóxia atua como principal estímulo para a síntese de eritropoietina.<sup>31</sup> No cérebro, este processo é mediado pelo fator de transcrição *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1)<sup>2,5,12,15,18,31,52,64</sup>, que aumenta simultaneamente a expressão dos EpoR nas várias células<sup>2,5,6,12,15,23,30,48,64</sup>. O HIF-1 promove ainda a ativação de genes que codificam enzimas glicolíticas<sup>52</sup>, transportadores membranares de glicose<sup>48,52</sup> e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)<sup>12,13,18,48,52</sup>, responsáveis pela adaptação metabólica e aumento do aporte celular de oxigénio em condições de disponibilidade reduzida<sup>52</sup>. No SNC, para além da hipóxia, outros estímulos como hipoglicémia, insulina, ROS e citocinas pró-inflamatórias ativam o HIF-

1.<sup>52,64</sup> O papel do HIF-2, que atua como principal fator regulador noutros tecidos, é pouco claro no SNC.<sup>31</sup>

Habitualmente, a ação da eritropoietina depende da sua ligação a dois recetores com formação de um homodímero que ativa a tirosina cinase (JAK2) associada ao recetor e subsequentemente múltiplas cascatas de sinalização intracelular, incluindo a ativação de STAT5<sup>5,13,30,48,52</sup> e NF-kB<sup>13,52</sup>, que se deslocam para o núcleo e atuam como fatores de transcrição para genes antiapoptóticos (nomeadamente Bcl-2<sup>18,31,64</sup> e Bcl-xL<sup>31</sup>), e redução da expressão de fatores pró-apoptóticos (como o Bax<sup>18</sup>). Para além do efeito antiapoptótico, a via mediada pelo NF-kB é responsável pela produção de células estaminais neurais.<sup>52</sup> Contudo, embora controverso, pensa-se que o efeito neuroprotetor da eritropoietina é mediado por um recetor distinto, heterodimérico, com menor afinidade para a eritropoietina que o recetor homodimérico, presente maioritariamente nos precursores eritroides.<sup>52,63</sup>

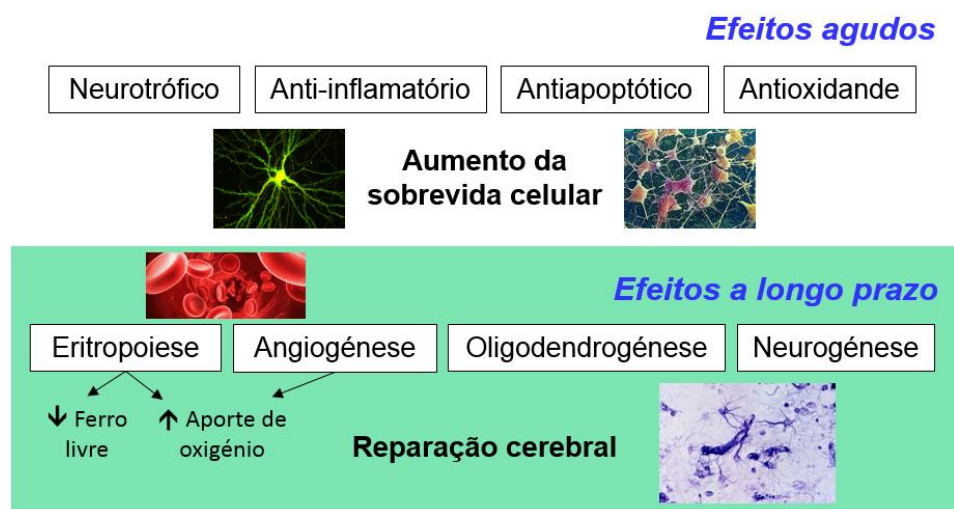
Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que a eritropoietina melhora a sobrevivência celular por exercer ações antiapoptóticas<sup>2,5,6,9,10,12,13,18,20,23,30,31,41,47,48,51,52,57,59,63,64</sup>, anti-inflamatórias<sup>2,5,6,9,10,12,15,18,20,23,30,31,41,48,51,52,57,61,63,64</sup>, antioxidantes<sup>2,5,12,15,18,23,30,31,48,51,52,57,59,64</sup> e neurotróficas<sup>13,15,20,31,52,57,59</sup>, e por promover o normal desenvolvimento e recuperação da lesão cerebral a longo prazo, através da estimulação da oligodendrogénese<sup>2,31,40,52,64</sup>, neurogénese<sup>2,5,6,9,10,13,15,20,23,30,31,40,41,47,48,51,52</sup> e angiogénese<sup>2,5,9,13,15,20,30,31,40,47,48,52,61</sup> (Figura 4).

A eritropoietina atua como antioxidante estimulando a expressão e ativação de enzimas, como a superóxido dismutase, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutatona redutase.<sup>18,23</sup> Diminui também o ferro livre circulante<sup>18,23,30,31,48</sup> envolvido na produção de radicais livres, ao promover a sua utilização na eritropoiese, apresentando um efeito antioxidante indireto. Graças às suas propriedades anti-inflamatórias, previne a elevação tardia



de citocinas pró-inflamatórias<sup>18,23,30,64</sup> e a infiltração lesional por neutrófilos<sup>18</sup>. Para além dos efeitos antiapoptóticos descritos, a eritropoietina inibe a ativação das caspases.<sup>18,64</sup>

Os seus efeitos neurotróficos são evidentes ao estimular o crescimento axonal<sup>48,52,64</sup> e a formação de dendrites, modular os níveis intracelulares de cálcio e a síntese e libertação de neurotransmissores e promover a diferenciação neuronal de células progenitoras<sup>52</sup>.



**Figura 4** – Efeitos neuroprotetores da eritropoietina. Adaptado de Juul *et al.*, 2015, “Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection”.

Apesar da elevação dos níveis de eritropoietina surgir como resposta tecidual neuroprotetora endógena à hipóxia<sup>2</sup>, é necessário que o estímulo se prolongue durante horas para que este mecanismo opere<sup>31</sup>. Assim, atendendo a que a interrupção breve da perfusão cerebral pode ser insuficiente para ativar a sua produção endógena, a administração exógena de eritropoietina, ou formas recombinantes, começou a ser estudada como estratégia de neuroproteção perinatal.<sup>31,52</sup>

Uma vez que a eritropoietina não atravessa a placenta, a terapêutica antenatal não é uma opção.<sup>13,23,48</sup> Por outro lado, apesar de cruzar a BHE, cuja permeabilidade aumenta no contexto de EHI<sup>5</sup>, fá-lo em quantidades reduzidas, exigindo doses de eritropoietina superiores às usadas na anemia da prematuridade para se verificar efeito neuroprotetor<sup>30,48</sup>.

Sabendo que, conforme referido anteriormente, a expressão de eritropoietina e seus recetores é necessária para o desenvolvimento cerebral normal<sup>2,12,18,30,31,48,52,57,63</sup>, foi inicialmente sugerido que a administração exógena de análogos inibisse a produção e ação endógenas, com efeitos deletérios nos progenitores celulares multipotentes<sup>18</sup> e redução da proliferação de células estaminais neurais. No entanto, apesar da variabilidade das metodologias aplicadas, os estudos em modelos animais apresentaram consensualmente efeitos benéficos na histologia da lesão cerebral e nas avaliações neurocomportamentais com a administração de eritropoietina.<sup>2,10,12,23,31,48</sup> Por exemplo, o tratamento com eritropoietina humana recombinante em modelos experimentais de lesão induzida por LPS mostrou reduzir a lesão axonal<sup>20</sup>, a resposta inflamatória microglial<sup>20</sup>, a morte celular de oligodendrócitos<sup>59</sup>, a desmielinização<sup>59</sup> e a expressão de proteína precursora de amiloide- $\beta$ <sup>20</sup>, marcadora de stresse neuronal, revelando ainda efeitos protetores noutros órgãos expostos a insultos inflamatórios, nomeadamente na retina, fígado e placenta<sup>20</sup>. Contudo, o efeito angiogénico da eritropoietina pode ser contraproducente em recém-nascidos pré-termo em risco de retinopatia da prematuridade.<sup>13</sup>

Inúmeros ensaios clínicos têm sido realizados na última década em populações neonatais distintas, nomeadamente prematuros e recém-nascidos de termo com EHI, acidente vascular cerebral isquémico, lesão cerebral traumática ou cardiopatia congénita cianótica.<sup>31,52,61,63</sup> A avaliação das propriedades farmacocinéticas e perfil de segurança da eritropoietina nestes estudos sugerem o uso de 500 a 3000 unidades/kg como dose eficaz e segura em recém-nascidos, independentemente da idade gestacional.<sup>31,48</sup> Dada a duração reduzida do tratamento nestes grupos, nenhum estudo publicado relatou efeitos secundários como policitémia, trombose ou hipertensão, habituais com a utilização de agentes estimuladores da eritropoiese em adultos.<sup>2,13,20,30,52</sup>

Quanto ao seu uso em recém-nascidos pré-termo, um estudo de fase III demonstrou que a eritropoietina aumenta a integridade da substância branca para a idade equivalente a termo.<sup>20,30,31,48,63,64</sup> Outro, usando repetidamente baixas doses de eritropoietina recombinante intravenosa (300 ou 500 unidades/kg 48 horas após o nascimento e diariamente durante 2 semanas), apresentou diminuição da mortalidade e da incidência de incapacidades aos 18 meses apenas em recém-nascidos de termo com EHI moderada, sem melhoria na EHI grave.<sup>6,11,15,20,23,30,59</sup> Também a administração de eritropoietina em dose única (3000 unidades/kg) nas primeiras 42 horas após o nascimento se associou a redução do risco de lesão cerebral detetável por RMN em recém-nascidos pré-termo.<sup>23,51</sup>

Tal como outros agentes neuroprotetores, também a eritropoietina tem sido estudada como adjuvante da hipotermia induzida na EHI<sup>5-7,12,14,18,22,23,31,40,45,47,48</sup> por exemplo na dose de 1000 unidades/kg<sup>5,6,31,40</sup>, mostrando-se eficaz, obtendo concentrações plasmáticas ótimas, e sem efeitos adversos relatados<sup>12,18,30,31</sup>. O momento de administração tem particular importância, uma vez que em alguns estudos não se evidenciou sinergismo, observando-se resultados sobreponíveis individualmente e na modalidade combinada.<sup>47</sup>

Outros agentes recombinantes, como a darbopoietina<sup>15,22,31,40,45,51,52,60,62,64</sup>, caracterizados por menor afinidade pelos EpoR dos precursores eritroides, e por isso sem estimulação considerável da eritropoiese<sup>2,13,15,52,60</sup>, e maior permeabilidade nas barreiras biológicas<sup>13</sup>, têm sido desenvolvidos, demonstrando efeitos neuroprotetores idênticos aos apresentados pela eritropoietina em recém-nascidos pré-termo<sup>15,31,48,52,60,64</sup>. A principal vantagem da darbopoietina é a semivida mais longa, que permite reduzir o número de administrações necessárias.<sup>15,40,52,60,64</sup> Estão em desenvolvimento ensaios clínicos para avaliar a eficácia da hipotermia induzida combinada com darbopoietina na EHI em recém-nascidos de termo.<sup>48,60</sup>

Também a combinação de eritropoietina e transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical tem sido estudada com vista a reduzir a incidência de paralisia cerebral<sup>65,66</sup>, tendo apresentado melhores resultados em termos de neurodesenvolvimento aos 6 meses comparativamente à administração isolada de eritropoietina<sup>66</sup>.

Ainda que os dados disponíveis sejam extremamente encorajadores, é essencial, antes da sua instituição na prática clínica, conhecer os resultados dos ensaios a decorrer, mas também desenvolver estudos futuros com vista a otimizar as doses e duração do tratamento com eritropoietina ou análogos em cada patologia individualmente<sup>2,13,31,48,52,63</sup> e para melhor compreender a sua segurança e eficácia a longo prazo<sup>63</sup>, nomeadamente o efeito reparador na fase terciária da EHI<sup>2</sup>.

### **Corticoides e esteroides neuroativos**

A administração materna antenatal de corticoides constitui atualmente a principal medida terapêutica de prevenção e redução da morbimortalidade neonatal em contexto de parto pré-termo<sup>10,44,54,59,67,68</sup>, tendo demonstrado reduzir o risco de HIV<sup>10,44,54,67</sup> e de LPV quística<sup>10,59</sup>. Contudo, a sua administração pós-natal em prematuros, bem como o uso antenatal de doses repetidas<sup>44</sup>, mostrou associar-se a alterações neurológicas significativas a longo prazo, nomeadamente aumento da incidência de paralisia cerebral<sup>59</sup>, alertando para os potenciais efeitos adversos dos corticoides na função e desenvolvimento cerebrais.

São reconhecidas ações importantes dos corticoides endógenos no SNC durante o desenvolvimento fetal, idade adulta e envelhecimento<sup>69</sup>, graças aos seus efeitos imunossupressor, particularmente da imunidade inata<sup>69</sup>, e neuroprotetor, por prevenir a sobreprodução de moléculas inflamatórias<sup>67,69</sup>.

No SNC, os seus níveis são estreitamente regulados pela inibição tónica do hipocampo sobre a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-supra-renal, cuja ativação depende de eventos stressantes. O tempo e a intensidade da ativação deste eixo determinam o efeito neuroprotetor ou neurotóxico dos corticoides, uma vez que a sua sobre-exposição estimula vias oxidativas e diminui a atividade das enzimas antioxidantes, levando a degeneração neuronal relacionada com a idade e declínio cognitivo.<sup>69</sup> Isto é, a exposição crónica a corticoides promove respostas pró-inflamatórias contrárias à atividade anti-inflamatória clássica descrita com a exposição aguda.<sup>67</sup>

Além da sua ação através de recetores específicos (tipo I e II) que controlam o eixo hipotalâmico-hipofisário-supra-renal consoante o seu padrão de ativação, os corticoides apresentam efeitos metabólicos e influenciam a metilação do ADN e modificação das histonas e ácidos ribonucleicos (ARN) não codificantes, com efeito na regulação epigenética. São também conhecidas as suas propriedades antioxidantes, envolvendo principalmente a produção de NO.<sup>69</sup> Ao aumentarem a sobrevivência dos neuroblastos, acelerarem a migração e maturação neuronais, induzirem a diferenciação dos pré-oligodendrócitos e promoverem a sinaptogénese e plasticidade cerebral, exercem efeitos neurotróficos, de particular relevo na neuroproteção.<sup>67</sup>

Em determinadas condições e concentrações, os corticoides podem, contudo, induzir a despolarização membranar, ativar os recetores NMDA e promover o aumento do cálcio intracelular, ativando uma cascata de eventos neurotóxicos que culmina na morte celular.<sup>69</sup> Por outro lado, a exposição fetal crónica a corticoides frena o normal aumento de esteroides neuroativos<sup>20,68</sup>, entre os quais a alopregnanolona, responsável pela modulação da atividade inibitória gabaérgica cerebral durante a gestação tardia e pela proteção do cérebro fetal contra a inflamação e a excitotoxicidade, mantendo níveis normais de apoptose e promovendo a proliferação celular e a mielinização<sup>10,68</sup>. Por isso, para além da investigação do potencial neuroprotetor dos corticoides, também várias terapêuticas de substituição de esteroides

neuroativos, nomeadamente progesterona e alopregnanolona, têm vindo a ser exploradas, no parto pré-termo e na EHI.<sup>10,68</sup>

Estudos em modelos animais demonstraram o efeito neuroprotetor dos glicocorticoides, com supressão da ativação da microglia e da perda de sinaptofisina, quando administrados no período antenatal, antes da instituição de inflamação/infeção. O momento da administração é de particular importância, porque na presença de inflamação/infeção estabelecida os glicocorticoides agravam a lesão por aumento da infiltração microglial e da apoptose.<sup>59</sup> Também o seu uso pós-natal, após injeção intracerebral de LPS, diminuiu a lesão cerebral ao reduzir a expressão da forma indutível da NOS, a ativação da microglia, a morte celular de oligodendrócitos e os défices mielínicos.<sup>59</sup> Em modelos animais de EHI com sensibilização induzida por LPS, a administração pós-natal de glicocorticoides limitou a lesão cerebral e os défices de aprendizagem e memória associados.<sup>59</sup>

Embora as recomendações para o uso de corticoides tenham sofrido alterações, propondo a administração em idades gestacionais cada vez mais inferiores, um estudo prospetivo em recém-nascidos com 22 a 25 semanas de gestação tratados com corticoides antenatais mostrou redução significativa da mortalidade ou comprometimento neurológico.<sup>10</sup> Uma meta-análise recente avaliou o estado neurológico a longo prazo de recém-nascidos sujeitos a administração antenatal única de corticoides, demonstrando diminuição do risco de paralisia cerebral, de alterações no desenvolvimento psicomotor e incapacidades graves. Por sua vez, o uso antenatal de doses repetidas aumentou a taxa de outras condições adversas, nomeadamente baixo peso ao nascimento, restrição de crescimento cerebral e perturbação de hiperatividade.<sup>44</sup>

A realização de mais estudos para compreender exatamente de que forma os efeitos neuroprotetores dos corticoides podem ser potenciados é fundamental. No entanto, sendo já

utilizados na população em causa, assumem-se como agentes particularmente interessantes nesta área.

## **Creatina**

A creatina é um composto guanidínico simples<sup>39</sup>, ubiqüitário no corpo humano e também presente no cérebro<sup>39</sup>, que apresenta um importante papel no armazenamento, sob a forma de fosfocreatina, e disponibilidade de energia, particularmente para consumo energético imediato ou em anaerobiose<sup>20,39</sup>. Sob ação da creatina cinase, a fosfocreatina é convertida em creatina, numa reação que permite a transformação rápida de adenosina difosfato (ADP) em ATP, usada como principal molécula energética.<sup>20,39</sup> A mesma enzima catalisa a reação inversa, possibilitando a reserva energética.

Embora sintetizada no fígado, rins e pâncreas a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina<sup>20,39</sup>, a creatina é maioritariamente obtida de forma exógena pela ingestão de laticínios, carne e peixe<sup>20,39,70</sup>.

As suas propriedades antioxidantes e neuroprotetoras têm sido descritas, sugerindo o benefício da suplementação com monohidrato de creatina<sup>70</sup> não apenas em doenças neurodegenerativas ou na lesão cerebral traumática no adulto, mas também na lesão cerebral perinatal mediada por hipóxia ou excitotoxicidade<sup>39,70</sup>.

A sua importância fisiológica no desenvolvimento do SNC foi inicialmente observada em crianças com deficiência congénita de creatina que, pela síntese endógena ineficaz, desenvolviam défices neurológicos durante o 1º ano de vida, preveníveis com suplementação oral precoce.<sup>20</sup> A morbidade neurológica associada a estas síndromes não se observa logo após o nascimento, confirmando o aporte materno e reserva fetal de creatina durante a gravidez.<sup>20</sup>

De facto, em estudos animais, a síntese fetal de creatina demonstrou ser limitada até à fase final da gestação, dada a baixa expressão hepática fetal da enzima N-metiltransferase, pelo que o feto depende de creatina materna durante quase toda a gravidez.<sup>20</sup> Assumindo que o mesmo se verifica em humanos, os recém-nascidos pré-termo são particularmente suscetíveis ao défice de creatina, uma vez que os órgãos que a sintetizam são imaturos e a sua absorção intestinal é pouco significativa, para além do risco de enterocolite necrotizante.<sup>20</sup>

O aumento do *pool* intracelular de creatina, e associadamente fosfocreatina, pela suplementação protege os tecidos fetais (neste caso o SNC) de lesão hipóxica, preservando os níveis energéticos celulares e protegendo a função mitocondrial.<sup>39</sup> A creatina atua ainda prevenindo a peroxidação lipídica e apoptose.<sup>39</sup> Aumenta por isso a sobrevivência das células neuronais perante necessidades energéticas elevadas e depleção rápida de ATP, ou quando expostas a níveis tóxicos de glutamato ou beta-amilóide.<sup>20</sup>

Por outro lado, enquanto “tampão energético”, a creatina apresenta-se como antioxidante, evitando a formação de radicais livres.<sup>39,70</sup> Melhora além disso a recuperação do fluxo sanguíneo cerebral após a cessação da isquémia e reduz o edema cerebral.<sup>39</sup>

A investigação pré-clínica registou diminuição da mortalidade e melhoria da taxa de crescimento pós-natal e dos défices neurológicos na EHI quando a dieta materna era suplementada com creatina durante quase toda a gravidez, confirmando a necessidade de suplementação prolongada para serem observados resultados benéficos.<sup>20</sup>

Para além destas ações, a suplementação materna de creatina demonstrou, em modelos animais, prevenir o dano renal e reduzir o risco de lesão diafragmática no recém-nascido, por atrofia muscular ou disfunção contrátil, devido a evento hipóxico intraparto.<sup>39</sup>



A suplementação prolongada durante a gravidez parece ser bem tolerada, sem impacto nas vias de síntese, armazenamento e transmissão desta fonte energética nos recém-nascidos, nem consequências adversas para a mãe, mesmo quanto à função renal em diabéticas tipo 2.<sup>39</sup>

Embora, atendendo à evidência atual, a suplementação de creatina na gravidez pareça exercer efeitos neuroprotetores fetais sem efeitos adversos, é fundamental prosseguir com mais investigação clínica para definir solidamente o regime terapêutico mais benéfico e seguro e esclarecer se a sua ação permite efetivamente reduzir o risco de paralisia cerebral, défices e incapacidades derivadas da lesão cerebral perinatal.<sup>39</sup>

## **N-acetilcisteína**

Sendo a sobreprodução de ROS uma das consequências da hipoxémia cerebral grave e da acidose metabólica, várias estratégias para reduzir o stresse oxidativo têm sido propostas com vista à neuroproteção, entre as quais a administração de N-acetilcisteína (NAC).<sup>6,9,10,12,13,15,18,20,23,28,47,48,59,71</sup>

Enquanto precursora da glutatona<sup>12,13</sup> e graças à sua capacidade de interagir diretamente com ROS livres<sup>9,12,13,20,23</sup>, a NAC exerce ações antioxidante<sup>10,12,13,20,28,59</sup> e anti-inflamatória<sup>9,10</sup>. Para além disso, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias<sup>12,20</sup> e de NO pela NOS indutível<sup>9,12,20,23</sup>, aumenta os níveis intracelulares de glutatona<sup>9,12,13,23</sup> e reduz o dano celular associado à reperfusão<sup>9,13,23</sup> e a morte celular por apoptose<sup>12,13</sup>, pela diminuição dos níveis de caspase-3. Está também envolvida na atenuação da resposta neuroinflamatória fetal<sup>59</sup>, reduzindo os níveis intracerebrais de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$ <sup>9,23,59</sup> e prevenindo a desmielinização<sup>12,13,23,59</sup>.

Não lhe são atribuídos efeitos teratogénicos<sup>13</sup> ou toxicidade importante<sup>9</sup>, pelo que a NAC é considerada segura na gravidez humana<sup>13</sup>. No entanto, algumas reações adversas

(eritema, prurido, angioedema, broncospasmo, taquicardia e hipotensão) estão descritas, com início habitualmente durante as primeiras 2 horas de infusão, e limitam o seu uso.<sup>13,23</sup> A NAC é transportada facilmente através da placenta<sup>9,13</sup>, mas apenas uma percentagem reduzida atravessa a BHE, pelo que se considera exercer o seu efeito neuroprotetor a nível do leito vascular<sup>13</sup>.

A eficácia neuroprotetora antenatal da NAC está demonstrada apenas em modelos animais de inflamação/infeção *in útero*, nomeadamente em roedores sensibilizados com administração intrauterina de LPS 2 horas após pré-tratamento com NAC<sup>9,23</sup>, pela redução do volume de enfarte cerebral associado à lesão hipóxico-isquémica focal, quer isoladamente quer em combinação com a hipotermia<sup>9,12,13,20,23,59</sup>. Estes resultados sustentam o potencial da NAC em atenuar os efeitos negativos da resposta inflamatória aguda à infeção, antes desta se estabelecer.<sup>59</sup> No entanto, investigação em fetos ovinos já expostos a LPS, isto é, a um ambiente inflamatório prévio, demonstrou agravamento da hipoxémia e hipotensão fetais induzidas pelo LPS com a administração de NAC.<sup>20,59</sup>

Embora tenha sido proposto que a NAC possa atuar atrasando os mecanismos de tolerância a endotoxinas, os resultados contraditórios supracitados sublinham a importância de estudos futuros para esclarecer de que forma este tratamento afeta o estado fisiológico do feto com exposição anterior a um ambiente inflamatório e como a NAC interage com o LPS exacerbando os seus efeitos deletérios no feto, o que constitui um aparente efeito adverso grave.<sup>20,59</sup>

À luz destes resultados, sugere-se que a NAC não seja um agente neuroprotetor seguro e adequado para administração antenatal na presença de inflamação/infeção estabelecida, como na corioamnionite.<sup>20,59</sup>

Noutros estudos, em modelos de EHI moderada, a administração pós-natal de NAC (20 ou 100 mg/kg/hora) após ressuscitação impediu o aumento dos níveis cerebrais de peróxido de hidrogénio e de glutatona oxidada.<sup>12</sup> Igualmente, quando administrada em bólus de 3 mL/kg, seguido de uma infusão de 2 mL/kg/hora durante 4 horas, a NAC reduziu marcadamente a acumulação de lactato e o stresse oxidativo cerebral e melhorou a perfusão cerebral.<sup>12</sup>

Quanto a estudos clínicos, embora preliminarmente, um ensaio randomizado com recém-nascidos pré-termo demonstrou que a administração contínua de NAC durante 6 horas após o nascimento reduz a incidência de LPV.<sup>20</sup> Não há ainda, no entanto, informação clínica quanto ao uso de NAC na EHI neonatal.<sup>9</sup>

A utilização de métodos alternativos de administração e distribuição de agentes anti-inflamatórios tem sido também discutida para a NAC, nomeadamente com recurso a nanotransportadores de fármacos, como os dendrímeros de poliamidoamina, que se mostraram capazes de atuar especificamente sobre células da microglia ativadas e astrócitos, reduzindo a neuroinflamação e permitindo obter resultados equiparáveis aos da administração sistémica com concentrações muito inferiores, e necessariamente menos efeitos secundários.<sup>48</sup>

## **Alopurinol**

O alopurinol é um composto químico que, tal como o seu metabolito ativo oxipurinol<sup>9,15,23</sup>, inibe a xantina desidrogenase<sup>13</sup> e a xantina oxidase<sup>5,9,12,13,15,18,23,40</sup>. Apresenta propriedades neuroprotetoras ao impedir a conversão da hipoxantina acumulada durante a anaerobiose em xantina<sup>12</sup>, mediada pela xantina oxidase, e conseqüentemente a produção de radicais superóxido e peróxido de hidrogénio durante a reperfusão cerebral<sup>9,12,23,40</sup>. Para além do efeito indireto descrito, o alopurinol atua por si só como agente antioxidante<sup>6,13,18,23</sup>, uma vez que, quando em altas concentrações, remove diretamente radicais hidroxilo<sup>5,9,12,15,18</sup>, auxilia

na quelação de íons metálicos<sup>5,9,15,18,23</sup>, particularmente ferro livre, e inibe a acumulação de neutrófilos<sup>9</sup>.

Dada a sua principal função enquanto antioxidante, o alopurinol deve ser administrado precocemente<sup>13</sup>, o que é possível uma vez que atravessa facilmente a placenta<sup>5,13,15,40</sup>, especialmente na forma de oxipurinol<sup>23</sup>, e atinge a circulação fetal em concentrações terapêuticas 20 minutos após a administração<sup>15</sup>. Porém, para neuroproteção antenatal são necessárias doses elevadas.<sup>13</sup>

Estudos em modelos animais de EHI demonstraram diminuição do edema e lesão cerebral a longo prazo aquando da administração subcutânea de alopurinol 15 minutos após insulto hipóxico-isquémico<sup>13,18</sup> e preservação do fósforo-31 cerebral após pré-tratamento com alopurinol, sugerindo que o seu efeito neuroprotetor pode também estar associado à preservação de metabolitos energéticos<sup>13</sup>. Contudo, a administração tardia (24 horas após lesão hipóxico-isquémica) ou em baixas doses não permitiu atingir os efeitos neuroprotetores esperados.<sup>9</sup> Para além disso, os principais modelos usados (roedores) apresentam níveis circulantes de xantina oxidase elevados, ao contrário dos humanos, dificultando a extrapolação de conclusões.<sup>13</sup>

Apesar da reduzida investigação em modelos animais, o número de ensaios clínicos que avaliam a eficácia do alopurinol na EHI é relevante. No entanto, os seus resultados são em geral contraditórios e pouco claros.<sup>12</sup>

Através da avaliação de biomarcadores de lesão neuronal<sup>9,12,13,23,40,48</sup> (lactato arterial no cordão umbilical e proteína S100B, derivada da glia) e de stresse oxidativo<sup>48</sup> (isoprostanos e radicais livres no sangue do cordão umbilical), a administração de 500 mg de alopurinol intravenoso, durante 10 minutos<sup>15</sup>, em grávidas com mais de 36 semanas de gestação e suspeita de hipóxia fetal mostrou diminuir os níveis de proteína S100B e de ferro não ligado a proteínas, envolvido na geração de ROS<sup>9,13,15,23</sup>. Já a utilização de alopurinol, seguindo um protocolo

semelhante, em grávidas em risco de parto pré-termo por suspeita de hipóxia intrauterina não diminuiu os níveis de marcadores de lesão neuronal fetal, ainda que tenham sido registados resultados dependentes do género, mais positivos no sexo feminino.<sup>5,9,15,18,40</sup>

Apesar da sua aparente indicação ótima se relacionar com o uso antenatal em casos de hipóxia fetal, o tratamento pós-natal com alopurinol intravenoso (20 mg/kg durante 10 minutos, às 4 ou 6 horas após o nascimento, repetindo a dose após 12 horas, ou a cada 12 horas num total de 120 mg/kg, dependendo dos estudos<sup>15</sup>) em recém-nascidos com EHI moderada apresentou resultados favoráveis, sem efeitos adversos relevantes, diminuindo a taxa de mortalidade e de incapacidade grave aos 4 a 8 anos de idade<sup>12,15</sup>. Noutro estudo, observou-se redução significativa de NO sérico no grupo tratado com alopurinol pós-natal nos 4 dias seguintes, e melhoria do neurodesenvolvimento aos 12 meses.<sup>9,12,23</sup>

Está atualmente em curso um ensaio clínico a nível europeu, o estudo *ALBINO (Effect of Allopurinol in addition to hypothermia for hypoxic-ischemic Brain Injury on Neurocognitive Outcome)*, com participação portuguesa através da Universidade do Porto. Este estudo, baseado na aplicação conjunta de hipotermia induzida e de alopurinol, 30 minutos após o nascimento e 12 horas depois, em recém-nascidos com EHI moderada a grave, pretende esclarecer os efeitos desta metodologia combinada aos 2 anos de vida.<sup>5,23,48</sup>

## **Topiramato**

O topiramato é um anticonvulsivante que atua por diversos mecanismos<sup>5,9,15</sup>, entre os quais se destaca a inibição de recetores de glutamato, particularmente os recetores AMPA e de cainato<sup>5,9,18</sup>. Bloqueia ainda os canais de sódio<sup>5,9,15,18</sup>, os canais de cálcio dependentes de voltagem<sup>5,9,18</sup>, as isoenzimas da anidrase carbónica e os poros de permeabilidade transitória mitocondrial<sup>5,9</sup>. Como resultado, o seu efeito neuroprotetor reflete-se no aumento da sobrevida

dos pré-oligodendrócitos<sup>5,9</sup>, na diminuição da disfunção mitocondrial<sup>9</sup> e da apoptose neuronal<sup>5,9</sup>, na inibição da astrogliose e da ativação da microglia<sup>5</sup> e na redução da atividade convulsiva<sup>5,6,9,18</sup>, principal indicação clínica para o uso de topiramato. Assim, a administração, mesmo isolada, de topiramato mostrou reduzir o dano cerebral na EHI neonatal em estudos pré-clínicos.<sup>9,18</sup>

Em modelos animais, o uso combinado de topiramato e melatonina demonstrou diminuir significativamente o volume de infarto cerebral e a apoptose na EHI, sendo contudo ainda necessário identificar as doses e tempos de administração destes agentes que permitam obter o máximo efeito neuroprotetor.<sup>5,18</sup>

Apesar de não estar demonstrada ação aditiva ou sinérgica clara da combinação de topiramato com hipotermia, um estudo em recém-nascidos que sofreram insulto hipóxico cerebral descreveu melhoria da sobrevivência e das anomalias detetadas a curto prazo na RMN cerebral aquando da associação de hipotermia induzida e topiramato oral durante 3 dias consecutivos (5 mg/kg no primeiro e 3 mg/kg dos dois dias seguintes).<sup>9</sup> No entanto, os resultados de ensaios clínicos recentemente publicados, em particular do estudo *NeoNATI*, cujo objetivo era avaliar a segurança e a potenciação dos efeitos neuroprotetores da WBC com topiramato oral (10 mg/kg na admissão, no segundo e terceiro dias) como terapêutica adjuvante na EHI<sup>5,9,14,15,22,45,72</sup>, demonstraram não haver redução significativa da mortalidade ou dos défices neurológicos graves aos 12, 18 e 24 meses<sup>15,72</sup>. Para esclarecer o papel do topiramato na prevenção de epilepsia subsequente são necessários mais estudos.<sup>72</sup>

### **Xénon e outros gases nobres**

O xénon é um gás nobre inerte<sup>11</sup>, usado como anestésico inalatório<sup>5,6,11,13,15,18,48</sup>, com baixo coeficiente de partição sangue-gás<sup>5,13</sup>, razão pela qual atravessa facilmente a BHE e

garante uma rápida indução anestésica<sup>5,6,15</sup>. Atravessa também a placenta<sup>13,15,48</sup>, mas, graças à rápida depuração plasmática fetal<sup>13</sup>, o seu efeito anestésico não se observa no feto, podendo por isso o xénon inalado assumir-se como potencial agente numa modalidade terapêutica antenatal<sup>11,13,48</sup>.

Enquanto inibidor não competitivo dos recetores NMDA<sup>6,9,11,13,15,18</sup>, o xénon reduz a excitotoxicidade e as convulsões associadas<sup>9,46</sup>. Outras das suas ações incluem a inibição da proteína cinase II dependente de cálcio-calmodulina<sup>13</sup>, a ativação de canais de potássio<sup>13</sup> e de mecanismos antiapoptóticos<sup>9,11,13,15,18</sup> (Bcl-XL e Bcl-2<sup>11,13,18</sup>, via Akt<sup>11</sup>) e a expressão de HIF-1 $\alpha$ , com aumento de eritropoietina e VEGF<sup>13,18</sup>, que interrompem a apoptose inerente à lesão cerebral.

De acordo com o conhecimento atual, o xénon não é teratogénico<sup>13</sup> e embora seguro e bem tolerado em adultos enquanto anestésico<sup>5</sup>, um estudo demonstrou que poderia desencadear degeneração neuronal no cérebro em desenvolvimento<sup>5</sup>, pelo que o seu uso não seria recomendado no recém-nascido. Contudo, investigação pré-clínica desenvolvida em contexto de lesão cerebral isquémica transitória apresentou efeitos neuroprotetores *in vitro*<sup>13,18,40</sup> e *in vivo*<sup>11,13,18,40</sup> associados ao xénon, mesmo no período neonatal em modelos animais, limitados enquanto estratégia isolada, mas potenciados quando em associação com hipotermia induzida<sup>5,40</sup>.

Outros estudos pré-clínicos realizados posteriormente comprovaram que o xénon é um agente seguro<sup>9</sup> e que, quando administrado em condições de hipóxia no período neonatal e em concentrações não inferiores a 40%, diminui significativamente a lesão cerebral<sup>13</sup>. Já administrado 4 horas após o insulto, apenas concentrações superiores a 60% se mostraram protetoras.<sup>13</sup> Na terapêutica combinada de xénon, a 20% apenas, e hipotermia induzida durante 90 minutos foi descrita maior eficácia neuroprotetora do que em qualquer das estratégias

isoladamente<sup>9,11</sup>, mesmo com o atraso de algumas horas até ao início da administração de xénon<sup>11,13</sup>.

Atendendo às suas características farmacocinéticas e apesar de teoricamente adequado, não há estudos sobre o potencial efeito neuroprotetor de tratamento antenatal com xénon.<sup>13,15</sup>

As principais desvantagens da utilização terapêutica deste gás relacionam-se com o custo elevado<sup>9,11,13,15,18,40</sup>, a necessidade de usar ventiladores especializados<sup>9,13,15,18,40</sup> e a limitação da administração de xénon quando necessária coadministração de oxigénio<sup>48</sup>. No entanto, o uso de xénon enquanto neuroprotetor é promissor, atendendo à sua potência de ação e efeitos secundários sistémicos mínimos<sup>11</sup>, tendo sido apenas reportada necrose gorda do tecido subcutâneo e dessaturação transitória durante RMN<sup>9</sup>. De notar que concentrações de xénon superiores a 50% têm efeito sedativo e reduzem a frequência cardíaca em 10%, sem hipotensão ou alteração do débito cardíaco.<sup>13</sup>

Outros gases nobres, como o árgon<sup>9,15,40</sup> e o hélio<sup>40</sup>, têm sido estudados como agentes neuroprotetores, também para evitar as desvantagens do xénon. Em modelos animais, mostraram reduzir significativamente o volume do enfarte cerebral após lesão e associar-se a melhores resultados funcionais.<sup>9</sup>

O protocolo de administração de xénon ótimo para neuroproteção perinatal é desconhecido, havendo necessidade de definir o momento de início, concentração e duração, assim como a temperatura a usar na terapêutica combinada, para que estas estratégias possam ser testadas e possivelmente adotadas na prática clínica diária.<sup>11,13</sup>

Mais recentemente, um extenso ensaio clínico multicentro no Reino Unido (*TOBY-Xe*<sup>73</sup>) mostrou que o uso combinado de ventilação com xénon a 30% durante 24 horas e hipotermia induzida não apresenta vantagens em recém-nascidos de termo com EHI quando comparado com a hipotermia terapêutica isolada<sup>9</sup>. A avaliação dos efeitos clínicos neste estudo baseou-se



na espectroscopia de ressonância magnética, identificando biomarcadores cerebrais como a proporção entre lactato e N-acetilaspártato, e na RMN, determinando a anisotropia fracionada, medida da integridade tecidual nos feixes de substância branca.<sup>73</sup>

Estes métodos, já utilizados no estudo em animais, poderão vir a ser aplicados no desenvolvimento e avaliação precoces de outros agentes neuroprotetores, acelerando estes processos e permitindo o planejamento de ensaios clínicos abrangentes e obtenção de resultados definitivos, e para prever resultados neurológicos após EHI, inclusive em recém-nascidos após tratamento com hipotermia induzida.<sup>9,73</sup> O principal desafio nesta abordagem é a normalização e validação destes marcadores nos vários aparelhos de RMN de modo a obter resultados comparáveis em termos de investigação e nos estudos desenvolvidos em diferentes centros.<sup>73</sup>

### **Transplante de células estaminais**

As células estaminais são designadas consoante a sua origem, como neurais, mesenquimatosas ou hematopoiéticas, por exemplo.

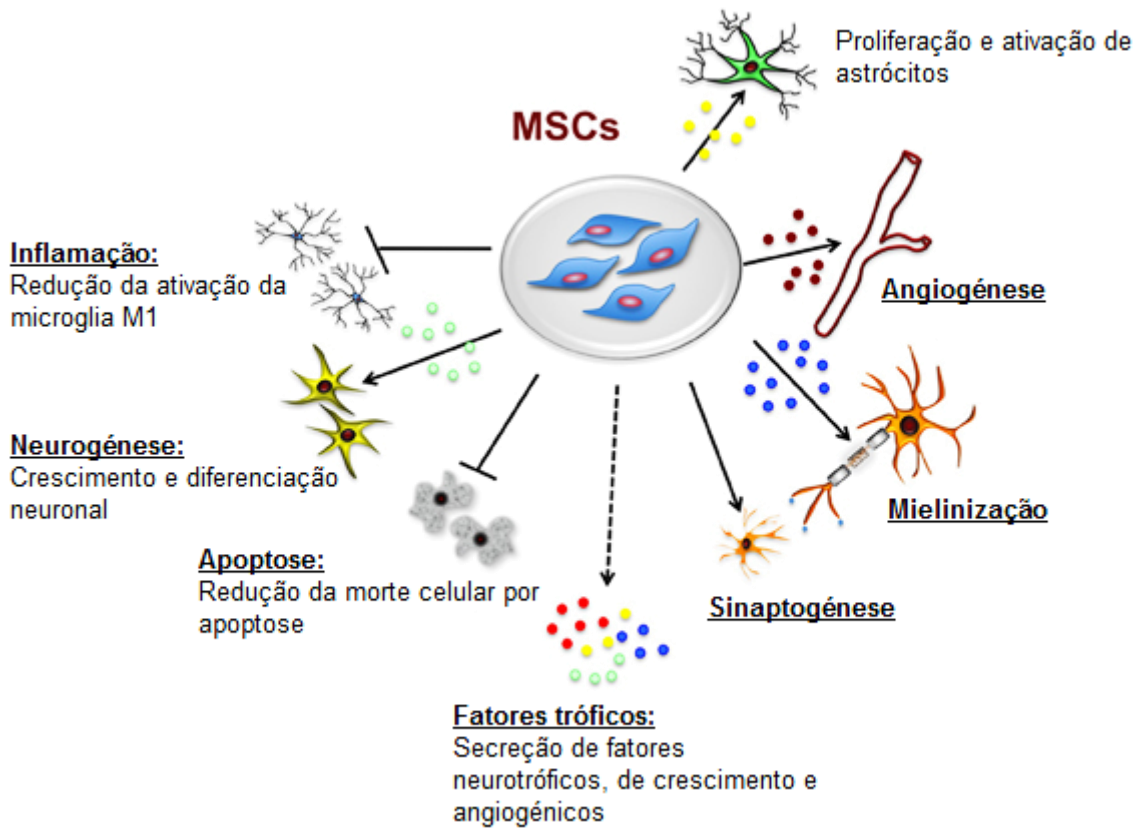
As células estaminais mesenquimatosas (MSCs) constituem uma população heterogénea de progenitores celulares multipotentes não-hematopoiéticos com capacidade de diferenciação nas várias linhagens mesenquimatosas, incluindo osso, cartilagem e gordura.<sup>74</sup> Embora sem marcadores específicos identificados, exprimem inúmeros antigénios de superfície, como CD73, CD90, CD105 e CD200<sup>74</sup>, que possibilitam o seu fácil isolamento e crescimento a partir da medula óssea ou tecidos extraembrionários, como a placenta ou o cordão umbilical, sendo atualmente as que reúnem maior interesse clínico<sup>34</sup>.

A sua disponibilidade em grandes quantidades, colheita não invasiva e manipulação fácil, maior atividade proliferativa que as MSCs da medula óssea, menos problemas éticos em comparação com as células estaminais embrionárias, baixa imunogenicidade na aplicação

clínica, sem necessidade de imunossupressão<sup>5</sup>, e menor risco de contaminação viral tornam as MSCs derivadas da geleia de Wharton<sup>34,74</sup> ou do sangue do cordão umbilical nas mais promissoras no âmbito da medicina celular regenerativa<sup>74</sup>. No entanto, embora rico em células estaminais primitivas, o sangue do cordão umbilical contém um número limitado de tipos celulares, sobretudo células mononucleares, que mostraram menor pluripotencialidade que as células estaminais embrionárias.<sup>5</sup>

Quanto à sua aplicação como terapêutica neonatal na lesão cerebral, vários estudos demonstraram os efeitos benéficos do transplante de células estaminais após um insulto hipóxico-isquêmico<sup>15,34,59,66,74-76</sup>, mas também no contexto de inflamação intrauterina<sup>59</sup>. Contudo, ao contrário da noção inicial de que este efeito resultaria da multiplicação, diferenciação e substituição do tecido lesado por estas células, sabe-se hoje que o mecanismo de neuroproteção subjacente ao uso de células estaminais é mais complexo<sup>4,34,66,75</sup>, uma vez que o seu crescimento relativamente lento e reduzida taxa de diferenciação após transplante<sup>34</sup> não explicam os resultados positivos observados.

Demonstrou-se então que as células estaminais aplicadas apresentam múltiplos efeitos (Figura 5), atuando pela libertação de fatores que modulam vias de sinalização celular implicadas na apoptose<sup>4,34,74,76</sup>, neurogênese<sup>4,34,40,41,74,76</sup>, sinaptogênese<sup>4,34,40,76</sup> e angiogênese<sup>4,34,40,74-76</sup>.



**Figura 5** – Efeitos neuroprotetores das MSCs. Adaptado de Castillo-Melendez *et al.*, 2013, “Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells”.

De facto, as MSCs promovem a expressão aumentada de fatores de crescimento e neurotróficos<sup>4,34,40,74-76</sup> (BDNF, FGF-2, EGF e VEGF), induzindo a proliferação de progenitores neuronais<sup>4,34</sup> nas principais regiões cerebrais neurogênicas após o nascimento, o giro dentado hipocampal<sup>4,34,74</sup> e a região subventricular<sup>4</sup>. Estas células progenitoras migram então para a área lesada, onde se diferenciam em neurónios<sup>34,76</sup>, oligodendrócitos<sup>34,76</sup> e astrócitos<sup>34,74,76</sup>, sob influência das MSCs transplantadas. Envolvidas na proliferação e diferenciação de oligodendrócitos<sup>4,34,76</sup>, as MSCs são ainda responsáveis pela mielinização dos axónios recém-formados. Adicionalmente, através da produção de proteínas como as neuropilinas e neuroregulinas, regulam o crescimento axonal<sup>4,34</sup> e promovem a sinaptogênese<sup>34,76</sup>, estimulando a plasticidade cerebral<sup>4</sup>.

Para além das ações descritas, o transplante de MSCs estimula a regeneração do tecido cerebral lesado modulando a resposta imunológica fetal<sup>4,59,74</sup>, ao reduzir a ativação da microglia M1<sup>34,59</sup>, classicamente associada à inflamação e responsável pela libertação de citocinas pró-inflamatórias, ROS e neurotoxinas, e ao promover alternativamente a ativação da microglia M2<sup>34</sup>, que através da síntese de IL-10, IGF-1 e TGF- $\beta$  exerce atividade anti-inflamatória.

Enquanto estratégia neuroprotetora, a terapêutica com células estaminais tem como objetivos primários reduzir as respostas inflamatórias aguda e tardia ao insulto<sup>41</sup>, responsáveis pelo agravamento da lesão estabelecida, e estimular a neurogênese<sup>34,41,75,76</sup>. Embora a utilização de MSCs, em particular de células mononucleares do cordão umbilical<sup>4,40</sup>, seja a que reúne maior consenso, a escolha do tipo de célula, o protocolo de administração, os parâmetros de segurança e as técnicas de manipulação celular pré-injeção para potenciar a expressão dos fatores neurotróficos<sup>4</sup>, assim como o tipo e distribuição das lesões às quais esta estratégia deve ser dirigida, não estão ainda estabelecidos<sup>41</sup>, exigindo-se investigação e otimização destes critérios antes de planear ensaios em recém-nascidos humanos<sup>74</sup>.

Entre os estudos pré-clínicos já realizados, a colheita, preparação e infusão autóloga de sangue do cordão umbilical mostrou-se viável em modelos de EHI, melhorando os défices sensoriais após evento isquémico<sup>4</sup> e afirmando esta modalidade como potencial opção terapêutica futura<sup>4,5,40</sup>.

Embora há muito considerada promissora em múltiplas patologias, poucos são efetivamente os ensaios clínicos com aplicação do transplante de MSCs no contexto de doenças neurológicas em idade pediátrica<sup>74</sup>, destacando-se a investigação em doentes com perturbações do espectro do autismo, acidente vascular cerebral, paralisia cerebral e lesão cerebral hipóxico-isquémica<sup>65,74</sup>.

Ensaio clínico internacional procura ainda esclarecer a segurança e eficácia do transplante de células estaminais autólogas, embrionárias ou pluripotenciais induzidas, não havendo atualmente evidência estabelecida para a sua aplicação no contexto de paralisia cerebral.<sup>41</sup>

Uma vez que não existem também estudos *in vivo* que avaliem a sua eficácia em combinação com hipotermia induzida na EN, é importante esclarecer se o transplante de células estaminais pode ter o seu efeito potenciado com esta associação.<sup>4,65</sup> Do mesmo modo que a hipotermia altera o curso de eventos fisiopatológicos iniciados pelo insulto lesivo primário e modifica o metabolismo dos agentes administrados como terapias adjuvantes, a utilização de uma estratégia combinada de transplante de células estaminais com hipotermia deve considerar que os sinais inflamatórios que medeiam o *homing* das células para as áreas lesadas e o efeito parácrino dos fatores neurotróficos libertados pelas mesmas podem sofrer variações pelas condições de temperatura corporal, exigindo adaptações aos regimes terapêuticos. Propõe-se que estas condições sejam superadas com a realização do transplante celular após a cessação da hipotermia, mas, independentemente, esta combinação deve ser avaliada com rigor, como estratégia terapêutica individual.<sup>65</sup>

De notar que os métodos de neuroimagem têm tido um papel crucial na avaliação da segurança e da biodistribuição das células estaminais transplantadas ao longo do tempo em investigação clínica e pré-clínica, bem como na apreciação da eficácia do tratamento.<sup>4</sup>

Para além do transplante de células estaminais, estão também em curso estudos no âmbito da neuroproteção com fatores de crescimento, tendo a utilização de fator estimulador das colónias de granulócitos (G-CSF) e de *glial-cell derived neurotrophic factor* mostrado resultados promissores.<sup>5</sup>

## Discussão e Conclusão

As encefalopatias neonatal e da prematuridade exigem mais do que nunca o desenvolvimento e instituição de novas intervenções neuroprotetoras seguras e eficazes, por se manterem entre as mais importantes causas de morbimortalidade neonatal, apesar da melhoria global dos cuidados de saúde perinatais, e por serem limitadas, em termos quantitativos e qualitativos, as opções disponíveis para a sua prevenção e tratamento.

Atendendo ao enorme impacto destas entidades clínicas nos gastos nacionais em saúde e na qualidade de vida dos doentes e famílias, a investigação nesta área tem-se mantido constante, permitindo, com base no conhecimento fisiopatológico cada vez mais profundo, identificar e testar agentes farmacológicos e outras medidas terapêuticas com vista a prevenir, reduzir, e até reparar, a lesão no cérebro imaturo do recém-nascido. Estas estratégias são apresentadas na Tabela 10, consoante aplicadas antes ou após o nascimento.

<b>Intervenções neuroprotetoras ante e pós-natais discutidas neste trabalho</b>	
<b>Neuroproteção antenatal</b>	<b>Neuroproteção pós-natal</b>
<u>MgSO<sub>4</sub></u>	<u>Hipotermia induzida</u>
Melatonina	<u>Clampagem tardia do cordão umbilical</u>
Alopurinol	Melatonina
N-acetilcisteína	Eritropoietina
Corticoides	N-acetilcisteína
Creatina	Alopurinol
	Xénon
	Topiramato
	Corticoides
	MgSO <sub>4</sub>
	Transplante de células estaminais

**Tabela 10** - Intervenções para neuroproteção perinatal (as usadas atualmente na prática clínica apresentam-se sublinhadas).

A maioria dos estudos publicados com estes agentes, em fases pré-clínicas, recorre a modelos animais de lesão cerebral de etiologias diversas. Contudo, existem diferenças relevantes entre as respostas registadas nestes e as observadas no cérebro humano face a insultos, bem como outras limitações metodológicas, o que complica a extrapolação de conclusões sólidas, justificando a dificuldade da transição destes estudos para ensaios clínicos controlados em recém-nascidos humanos, até à sua aplicação médica. Surge assim a necessidade de desenvolver biomarcadores de lesão cerebral e aperfeiçoar os existentes, nomeadamente de neuroimagem, a fim de acelerar a instituição na clínica dos agentes em estudo, e também facilitar a avaliação neurológica dos doentes a longo prazo.<sup>1,5</sup>

Atualmente, a melatonina é considerada o agente com maior aplicabilidade potencial, seguida da eritropoietina,<sup>5,18</sup> ambas já em estudo em recém-nascidos humanos com resultados positivos, particularmente para neuroproteção pós-natal na EHI.

Por outro lado, perante a sua complexidade, cada vez mais se reconhece que a atuação sobre uma única via fisiopatológica é insuficiente para impedir a lesão cerebral perinatal, pelo que os estudos mais recentes exploram o uso concomitante de agentes com ações distintas, procurando obter efeitos aditivos ou sinérgicos.<sup>18</sup> Nesta lógica, também a hipotermia induzida na EHI tem sido avaliada em combinação com alguns dos agentes descritos na Tabela 9, procurando melhorar os seus efeitos terapêuticos a curto e longo prazo, com resultados encorajadores registados em diversos estudos.<sup>1,4-6,9,11,12,14,15,18-20,40,46-50</sup>

Há todavia um longo caminho a percorrer para definir os protocolos de administração (critérios de inclusão, início, dose, duração e via) mais adequados para a maioria dos agentes neuroprotetores referidos, nomeadamente em combinação, entre si e com hipotermia, e de acordo com a etiologia em causa. De facto, ao longo dos últimos 5 anos, a que se dedicou esta revisão da literatura, muitos fármacos foram testados, viram os seus efeitos neuroprotetores

confirmados em modelos animais e alguns iniciaram mesmo fases experimentais clínicas, mas nenhuma nova intervenção para neuroproteção perinatal foi introduzida na prática corrente. Até ao momento, a única estratégia aplicada durante o período de janela terapêutica é a hipotermia induzida em recém-nascidos de termo com EHI moderada a grave.<sup>1-7,9,11,12,15,16,20,31,40,46,47,49</sup> No âmbito da encefalopatia da prematuridade, apenas a administração antenatal de sulfato de magnésio, antes das 30 ou 32 semanas de gestação, consoante os países, está recomendada como medida neuroprotetora.<sup>8,10,13,20,27-29,31,34-44</sup> A clampagem tardia do cordão umbilical é também prática atual por se associar a menor risco de lesão neurológica face à clampagem imediata.<sup>34,40,51</sup>

É esperado que uma ou mais destas estratégias neuroprotetoras promissoras, atualmente nas fases iniciais dos ensaios clínicos, sejam em breve transferidas com sucesso para a clínica, permitindo melhorar o futuro de milhões de crianças com estas doenças neurológicas incapacitantes.

## **Agradecimentos**

À Doutora Ana Areia pela disponibilidade constante com que acompanhou a realização deste trabalho e pela orientação e contribuição fundamentais à sua construção.

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto pela presença contínua e pronta recetividade, desde logo aquando da escolha da área científica.



## Referências bibliográficas

1. Robertson NJ, Groenendaal F. Hypoxic-ischaemic brain injury. In: Rennie JM, editor. Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology. 5th Edition ed. London, United Kingdom: Elsevier Limited 2012. p. 1114-1155.
2. Hassell KJ, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy DJ, Robertson NJ. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2015;100(6):F541-52.
3. Graça A, Pinto F, Vilan A, Dinis A, Sampaio I, Matos C, et al. Hipotermia induzida no tratamento da encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal. Consenso Nacional. In: Secção de Neonatologia - Sociedade Portuguesa de Pediatria; 2012.
4. Pimentel-Coelho PM, Rosado-de-Castro PH, da Fonseca LM, Mendez-Otero R. Umbilical cord blood mononuclear cell transplantation for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatr Res 2012;71(4 Pt 2):464-73.
5. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. Int J Mol Sci 2015;16(9):22368-401.
6. Douglas-Escobar M, Weiss MD. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. JAMA Pediatr 2015;169(4):397-403.
7. Ma H, Sinha B, Pandya RS, Lin N, Popp AJ, Li J, et al. Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury. Curr Mol Med 2012;12(10):1282-96.
8. Fleiss B, Tann CJ, Degos V, Sigaut S, Van Steenwinckel J, Schang AL, et al. Inflammation-induced sensitization of the brain in term infants. Dev Med Child Neurol 2015;57 Suppl 3:17-28.

9. Yildiz EP, Ekici B, Tatli B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Rev Neurother* 2017;17(5):449-459.
10. Chang E. Preterm birth and the role of neuroprotection. *Bmj* 2015;350:g6661.
11. Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *J Neurosci Res* 2013;91(4):473-8.
12. Arteaga O, Alvarez A, Revuelta M, Santaolalla F, Urtasun A, Hilario E. Role of Antioxidants in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury: New Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2017;18(2).
13. Robertson NJ, Tan S, Groenendaal F, van Bel F, Juul SE, Bennet L, et al. Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant? *J Pediatr* 2012;160(4):544-552.e4.
14. Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr Opin Pediatr* 2015;27(2):152-7.
15. Bel F, Groenendaal F. Drugs for neuroprotection after birth asphyxia: Pharmacologic adjuncts to hypothermia. *Semin Perinatol* 2016;40(3):152-9.
16. Sampaio I, Graça A, Moniz C, Machado MdC. Hipotermia induzida na encefalopatia hipóxico-isquémica: experiência do Serviço de Neonatologia do Hospital de Santa Maria. *Acta Pediatr Port* 2012;43(5):183-189.
17. Hankins GD, Speer M. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy. *Obstet Gynecol* 2003;102(3):628-36.
18. Wu Q, Chen W, Sinha B, Tu Y, Manning S, Thomas N, et al. Neuroprotective agents for neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Drug Discov Today* 2015;20(11):1372-81.

19. Tagin M, Shah PS, Lee KS. Magnesium for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Perinatol* 2013;33(9):663-9.
20. Rees S, Harding R, Walker D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J Dev Neurosci* 2011;29(6):551-63.
21. Pietrini D, Piastra M, Luca E, Mancino A, Conti G, Cavaliere F, et al. Neuroprotection and hypothermia in infants and children. *Curr Drug Targets* 2012;13(7):925-35.
22. Shankaran S. Current status of hypothermia for hypoxemic ischemia of the newborn. *Indian J Pediatr* 2014;81(6):578-84.
23. Tataranno ML, Perrone S, Longini M, Buonocore G. New antioxidant drugs for neonatal brain injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:108251.
24. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martinez-Ibarguen A, Hilario E. Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia. *Int J Mol Sci* 2013;14(5):9379-95.
25. Crowther CA, Middleton PF, Wilkinson D, Ashwood P, Haslam R. Magnesium sulphate at 30 to 34 weeks' gestational age: neuroprotection trial (MAGENTA)--study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013;13:91.
26. Bain E, Middleton P, Crowther CA. Different magnesium sulphate regimens for neuroprotection of the fetus for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev* 2012(2):Cd009302.
27. Duerden EG, Taylor MJ, Miller SP. Brain development in infants born preterm: looking beyond injury. *Semin Pediatr Neurol* 2013;20(2):65-74.

28. Biran V, Phan Duy A, Decobert F, Bednarek N, Alberti C, Baud O. Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant? *Dev Med Child Neurol* 2014;56(8):717-23.
29. Doyle LW. Antenatal magnesium sulfate and neuroprotection. *Curr Opin Pediatr* 2012;24(2):154-9.
30. Juul S. Neuroprotective role of erythropoietin in neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25 Suppl 4:105-7.
31. Juul SE, Pet GC. Erythropoietin and Neonatal Neuroprotection. *Clin Perinatol* 2015;42(3):469-81.
32. Dyet LE, Rennie JM. Preterm brain injury. In: Rennie JM, editor. *Rennie & Robertson's Textbook of Neonatology*. 5th Edition ed. London, United Kingdom: Elsevier Limited 2012. p. 1156-1181.
33. Gano D. White Matter Injury in Premature Newborns. *Neonatal Netw* 2016;35(2):73-7.
34. Berger R, Soder S. Neuroprotection in preterm infants. *Biomed Res Int* 2015;2015:257139.
35. Dean C, Douglas J. Magnesium and the obstetric anaesthetist. *Int J Obstet Anesth* 2013;22(1):52-63.
36. Oddie S, Tuffnell DJ, McGuire W. Antenatal magnesium sulfate: Neuro-protection for preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015;100(6):F553-7.
37. Jacquemyn Y, Zecic A, Van Laere D, Roelens K. The use of intravenous magnesium in non-preeclamptic pregnant women: fetal/neonatal neuroprotection. *Arch Gynecol Obstet* 2015;291(5):969-75.

38. Azad K, Mathews J. Preventing newborn deaths due to prematurity. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2016;36:131-144.
39. Dickinson H, Bain E, Wilkinson D, Middleton P, Crowther CA, Walker DW. Creatine for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev* 2014(12):Cd010846.
40. Shea KL, Palanisamy A. What can you do to protect the newborn brain? *Curr Opin Anaesthesiol* 2015;28(3):261-6.
41. Colver A, Fairhurst C, Pharoah PO. Cerebral palsy. *Lancet* 2014;383(9924):1240-9.
42. Navathe R, Berghella V. Tocolysis for Acute Preterm Labor: Where Have We Been, Where Are We Now, and Where are We Going? *Am J Perinatol* 2016;33(3):229-35.
43. Crowther CA, Middleton PF, Bain E, Ashwood P, Bubner T, Flenady V, et al. Working to improve survival and health for babies born very preterm: the WISH project protocol. *BMC Pregnancy Childbirth* 2013;13:239.
44. Nijman TA, van Vliet EO, Koullali B, Mol BW, Oudijk MA. Antepartum and intrapartum interventions to prevent preterm birth and its sequelae. *Semin Fetal Neonatal Med* 2016;21(2):121-8.
45. Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol* 2012;39(4):919-29.
46. Uria-Avellanal C, Robertson NJ. Na(+)/H(+) exchangers and intracellular pH in perinatal brain injury. *Transl Stroke Res* 2014;5(1):79-98.
47. Titomanlio L, Fernandez-Lopez D, Manganozzi L, Moretti R, Vexler ZS, Gressens P. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. *Pediatr Neurol* 2015;52(6):566-584.

48. Juul SE, Ferriero DM. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol* 2014;41(1):119-31.
49. Austin T, Shanmugalingam S, Clarke P. To cool or not to cool? Hypothermia treatment outside trial criteria. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013;98(5):F451-3.
50. Ramanantsoa N, Fleiss B, Bouzlama M, Matrot B, Schwendimann L, Cohen-Salmon C, et al. Bench to cribside: the path for developing a neuroprotectant. *Transl Stroke Res* 2013;4(2):258-77.
51. Davis AS, Berger VK, Chock VY. Perinatal Neuroprotection for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol* 2016;33(3):290-6.
52. Rangarajan V, Juul SE. Erythropoietin: emerging role of erythropoietin in neonatal neuroprotection. *Pediatr Neurol* 2014;51(4):481-8.
53. Bell SG. Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Serum Magnesium Monitoring and Maintenance. *Neonatal Netw* 2016;35(3):159-63.
54. Abramovici A, Cantu J, Jenkins SM. Tocolytic therapy for acute preterm labor. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2012;39(1):77-87.
55. Antenatal magnesium individual participant data international collaboration: assessing the benefits for babies using the best level of evidence (AMICABLE). *Syst Rev* 2012;1:21.
56. Nguyen TM, Crowther CA, Wilkinson D, Bain E. Magnesium sulphate for women at term for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev* 2013(2):Cd009395.
57. Favrais G, Tourneux P, Lopez E, Durrmeyer X, Gascoin G, Ramful D, et al. Impact of common treatments given in the perinatal period on the developing brain. *Neonatology* 2014;106(3):163-72.

58. Zeng X, Xue Y, Tian Q, Sun R, An R. Effects and Safety of Magnesium Sulfate on Neuroprotection: A Meta-analysis Based on PRISMA Guidelines. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(1):e2451.
59. Ranchhod SM, Gunn KC, Fowke TM, Davidson JO, Lear CA, Bai J, et al. Potential neuroprotective strategies for perinatal infection and inflammation. *Int J Dev Neurosci* 2015;45:44-54.
60. Patel S, Ohls RK. Darbepoetin Administration in Term and Preterm Neonates. *Clin Perinatol* 2015;42(3):557-66.
61. Wang H, Zhang L, Jin Y. A meta-analysis of the protective effect of recombinant human erythropoietin (rhEPO) for neurodevelopment in preterm infants. *Cell Biochem Biophys* 2015;71(2):795-802.
62. Stein DG. A clinical/translational perspective: can a developmental hormone play a role in the treatment of traumatic brain injury? *Horm Behav* 2013;63(2):291-300.
63. Zhang J, Wang Q, Xiang H, Xin Y, Chang M, Lu H. Neuroprotection with erythropoietin in preterm and/or low birth weight infants. *J Clin Neurosci* 2014;21(8):1283-7.
64. Messier AM, Ohls RK. Neuroprotective effects of erythropoiesis-stimulating agents in term and preterm neonates. *Curr Opin Pediatr* 2014;26(2):139-45.
65. Fleiss B, Guillot PV, Titomanlio L, Baud O, Hagberg H, Gressens P. Stem cell therapy for neonatal brain injury. *Clin Perinatol* 2014;41(1):133-48.
66. Yoshimoto M, Koenig JM. Stem Cells: Potential Therapy for Neonatal Injury? *Clin Perinatol* 2015;42(3):597-612.

67. Malaeb SN, Stonestreet BS. Steroids and injury to the developing brain: net harm or net benefit? *Clin Perinatol* 2014;41(1):191-208.
68. Hirst JJ, Kelleher MA, Walker DW, Palliser HK. Neuroactive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139:144-53.
69. Canteros MG. D-Arginine as a neuroprotective amino acid: promising outcomes for neurological diseases. *Drug Discov Today* 2014;19(5):627-36.
70. Iqbal S, Ali M, Iqbal F. Effect of creatine monohydrate supplementation on relative serum level of IL-6 and IL-18 following neonatal hypoxia ischemia in male albino mouse. *Pak J Pharm Sci* 2015;28(6):2141-5.
71. Keunen K, van Elburg RM, van Bel F, Benders MJ. Impact of nutrition on brain development and its neuroprotective implications following preterm birth. *Pediatr Res* 2015;77(1-2):148-55.
72. Filippi L, Fiorini P, Catarzi S, Berti E, Padrini L, Landucci E, et al. Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2017:1-8.
73. Azzopardi D, Robertson NJ, Bainbridge A, Cady E, Charles-Edwards G, Deierl A, et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): a proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2016;15(2):145-153.
74. Dalous J, Larghero J, Baud O. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a novel strategy to protect the central nervous system: technical aspects, preclinical studies, and clinical perspectives. *Pediatr Res* 2012;71(4 Pt 2):482-90.



75. Wang F, Maeda N, Yasuhara T, Kameda M, Tsuru E, Yamashita T, et al. The therapeutic potential of human umbilical cord blood transplantation for neonatal hypoxic-ischemic brain injury and ischemic stroke. *Acta Med Okayama* 2012;66(6):429-34.
76. Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci* 2013;7:194.

## Anexo 1

Estudo	Crítérios	Dose de MgSO <sub>4</sub>	Mortalidade pediátrica (RR)	Paralisia cerebral (RR)	Disfunção motora substancial (RR)
<b>Magnesium And Neurological Endpoints Trial (MagNET)</b>	Grávidas em trabalho de parto (dilatação cervical de pelo menos 4 cm) entre as 25 e as 33 semanas de gestação	<b>Tocólise:</b> bólus de 4g + 2 a 3g/h <b>Neuroproteção:</b> Bólus de 4g	Maior mortalidade pediátrica no grupo tratado com magnésio (RR=9.41)	Sem alterações nas taxas de PC (RR=0.94)	
<b>Australasian Collaborative Trial Of Magnesium Sulphate (ACTOMgSO<sub>4</sub>)</b>	Grávidas com parto previsto nas 24 horas seguintes com menos de 30 semanas de gestação	4g iv durante 20 minutos + 1g/h até 24 horas ou até ao nascimento	Sem aumento da mortalidade pediátrica (RR=0.81)	Sem alterações nas taxas de PC (RR=0.85)	Redução da taxa de disfunção motora substancial (RR=0.53)
<b>PREMAG</b>	Grávidas com parto planeado ou esperado nas 24 horas seguintes com menos de 33 semanas de gestação, independentemente da paridade	4g iv durante 30 minutos	Sem aumento da mortalidade pediátrica (RR=0.85)	Sem alterações nas taxas de PC (RR=0.70)	Sem alterações nas taxas de disfunção motora substancial (RR=0.78)
<b>Beneficial Effects Of Antenatal Magnesium Sulfate (BEAM)</b>	Grávidas com gravidez simples ou gemelar entre as 24 e 31 semanas e alto risco de parto	Dose de carga de 6g durante 20 a 30 minutos + infusão de manutenção de 2g/h	Mortalidade pediátrica idêntica no controlo (RR=1.13)	Redução da taxa de PC (RR=0.59)	Redução da taxa de disfunção motora substancial (RR=0.53)
<b>Magnesium Sulphate For Prevention Of Eclampsia Trial (MAGPIE)</b>	Grávidas com pré-eclâmpsia grave para prevenção de eclâmpsia	4g iv durante 10 a 15 minutos + 1g/h iv ou 5g/4h im durante 24 horas	Maior mortalidade pediátrica no grupo tratado com magnésio (mas maioria dos centros em países subdesenvolvidos)	A paralisia cerebral e a disfunção motora foram extremamente subestimadas, uma vez que as crianças não foram devidamente examinadas por pediatras ou neurologistas	

**Tabela 1** – Ensaios clínicos que avaliam o efeito neuroprotetor do sulfato de magnésio em recém-nascidos prematuros com base nos dados de Doyle, 2012, “Antenatal magnesium sulfate and neuroprotection”; Crowther, 2013, “Magnesium sulphate at 30 to 34 weeks' gestational age: neuroprotection trial (MAGENTA)--study protocol”; Oddie, 2015, “Antenatal magnesium sulfate: Neuro-protection for preterm infants”; Zeng, 2016, “Effects and Safety of Magnesium Sulfate on Neuroprotection: A Meta-analysis Based on PRISMA Guidelines”; Dean, 2013, “Magnesium and the

obstetric anaesthetist”; 2012, “Antenatal magnesium individual participant data international collaboration: assessing the benefits for babies using the best level of evidence (*AMICABLE*)”; Berger, 2015, “Neuroprotection in preterm infants”; e Chang, 2015, “Preterm birth and the role of neuroprotection”. RR – risco relativo.