

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

Ana Laura Ferreira Mársico Dalto

**Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o
intestino e o cérebro de ratos submetidos a modelo
experimental de enterocolite necrosante**

Ribeirão Preto
2023

Ana Laura Ferreira Mársico Dalto

**Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o
intestino e o cérebro de ratos submetidos a modelo
experimental de enterocolite necrosante**

Versão corrigida

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Ribeirão Preto
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

MÁRSICO DALTO, A. L. F.

Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o intestino e o cérebro de ratos submetidos a modelo experimental de enterocolite necrosante. Ribeirão Preto, 2023.

134 f.: il.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Sbragia, Lourenço

Versão original

1. Enterocolite necrosante 2. Oxigenoterapia hiperbárica 3. Estresse oxidativo. 4. Lesão encefálica. 5. Superóxido dismutase.

MÁRSICO DALTO, A. L. F. Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o intestino e o cérebro de ratos submetidos a modelo experimental de enterocolite necrosante. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes com enterocolite necrosante que já cuidei durante o exercício da minha profissão.

AGRADECIMENTO

Agradeço à minha família, pai, mãe e irmã, pelo apoio, incentivo e amor, que me moveram ao longo da vida para que eu chegasse até aqui.

Ao meu marido, Vitor, por toda a ajuda ao longo dos anos de pós graduação, por ser um modelo de pesquisador científico e pelas colaborações técnicas nessa tese.

À minha filha, Olívia, por me fazer uma pessoa e uma médica melhores a cada dia. Que ela tenha motivos para se orgulhar da mãe, assim como me orgulho dela.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lourenço Sbragia, pelo incentivo, pelo exemplo e pela incansável busca de contribuir com a pesquisa científica.

Às colegas que fiz durante a pós graduação, vocês foram exemplo de trabalho e comprometimento. Em especial à Karina, Stephanya e Pâmela, pela paciência e pela ajuda imensurável na elaboração dessa tese.

Aos funcionários dos laboratórios da cirurgia experimental e do biotério da FMRP, obrigada por toda a ajuda.

À Juliana, secretária da CPG, uma pessoa competente e de muito valor para os pós graduandos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

EPÍGRAFE

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”
Friedrich Nietzsche.

RESUMO

Mársico Dalto ALF. “Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o intestino e o cérebro de ratos submetidos a modelo experimental de enterocolite necrosante” 2023. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: A enterocolite necrosante (ECN) é a emergência mais comum do trato gastrointestinal em recém-nascidos. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo colonização bacteriana, alimentação por fórmula enteral e lesão hipóxico-isquêmica. A patologia da ECN consiste em necrose de coagulação e supercrescimento bacteriano, com poucos métodos preventivos. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é um tratamento bem estabelecido para infecções de tecidos moles por anaeróbios e lesões secundárias a hipoperfusão, podendo ser uma alternativa para o tratamento da ECN. **Objetivo:** Avaliar o efeito da OHB no intestino e no cérebro de um modelo experimental de ECN em rato. **Material e Métodos:** Filhotes recém nascidos de ratas Sprague Dawley foram divididos em 6 grupos: 1) Controle (C), 2) Controle + 1 dia de HBO (COHB1), 3) Controle + 2 dias de HBO (COHB2), 4) Enterocolite necrosante (ECN), 5) ECN + 1 dia de OHB (ECNOHB1) e 6) ECN + 2 dias de OHB (ECNOHB2). Para indução de ECN, os grupos receberam fórmula e foram submetidos à hipóxia e à hipotermia. As sessões de OHB foram feitas 2 vezes ao dia a 3ATA, por 2h. Análises morfométricas, histológicas e imuno-histoquímicas (IHQ) foram realizadas no intestino (iNOS, I-FABP e SOD3) e no cérebro (GFAP, NeuN e SOD3) a fim de identificar os danos. **Resultados:** a mortalidade foi de ECN (30,8%), ECNOHB1 (15,8%), ECNOHB2 (14,3%) e nenhum óbito nos demais. A variação de peso corporal (PC) foi positiva nos grupos C e negativa nos grupos ECN, sem diferença com o tratamento. Peso intestinal (PI) e peso cerebral (Pcer) também não tiveram diferença. A OHB reduziu o escore de lesão intestinal e preservou o número e o arranjo de células no cérebro, principalmente no hipocampo. No intestino a OHB aumentou os marcadores avaliados por IHQ. No hipocampo, a OHB levou a um aumento da SOD3. **Conclusão:** A OHB reduziu mortalidade e gravidade das lesões intestinal e cerebral na ECN experimental. Preservou a integridade celular intestinal, demonstrada pelo aumento de I-FABP, e combateu o estresse oxidativo através do incremento na SOD3.

Palavras-chave: Enterocolite necrosante, oxigenoterapia hiperbárica, estresse oxidativo, lesão encefálica, superóxido dismutase.

ABSTRACT

Mársico Dalto ALF. “Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestine and brain of rats submitted to an experimental model of necrotizing enterocolitis” 2023. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2023.

Introduction: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common emergency of the gastrointestinal tract in newborns. Its multifactorial etiology involves bacterial colonization, enteral formula feeding, and hypoxic-ischemic injury. The pathology of NEC consists of coagulation necrosis and bacterial overgrowth, with few preventative methods. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a well-established treatment for anaerobic soft tissue infections and injuries secondary to hypoperfusion and may be an alternative for the treatment of NEC. **Objective:** To evaluate the effect of HBO on the intestine and brain of an experimental NEC model in rats. **Material and Methods:** Newborn pups of Sprague Dawley rats were divided into 6 groups: 1) Control (C), 2) Control + 1 day of HBO (CHBO1), 3) Control + 2 days of HBO (CHBO2), 4) Necrotizing enterocolitis (NEC), 5) ECN + 1 day of HBOT (ECNHBO1) and 6) ECN + 2 days of HBOT (ECNHBO2). For NEC induction, the groups received formula and were submitted to hypoxia and hypothermia. The HBOT sessions were performed twice a day at 3ATA, for 2 hours. Morphometric, histological, and immunohistochemical (IHC) analyses were performed in the intestine (iNOS, I-FABP, and SOD3) and in the brain (GFAP, NeuN, and SOD3) in order to identify damage. **Results:** mortality was ECN (30.8%), ECNOHB1 (15.8%), ECNOHB2 (14.3%), and no deaths in the others. The change in body weight (BW) was positive in the C groups and negative in the ECN groups, with no difference according to the treatment. Intestinal weight (PI) and brain weight (Pcer) also showed no difference. HBOT reduced the intestinal lesion score and preserved the brain cells' number and arrangement in the hippocampus. In the intestine, HBO increased the markers evaluated by IHC. In the hippocampus, HBOT led to an increase in SOD3. **Conclusion:** HBOT reduced mortality and severity of intestinal and brain lesions in experimental NEC. It preserved intestinal cell integrity, demonstrated by the increase in I-FABP, and it fought oxidative stress through an increase in SOD3.

Keywords: Necrotizing enterocolitis, hyperbaric oxygen therapy, oxidative stress, brain damage, superoxide dismutase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O sistema límbico	24
Figura 2 - Curva de dissociação da hemoglobina.....	26
Figura 3 - O estresse oxidativo	27
Figura 4 - Desenho do estudo	34
Figura 5 - Animais.....	35
Figura 6 - Fotografias da administração de leite artificial para os animais.....	37
Figura 7 - Anóxia e resfriamento dos animais.....	38
Figura 8 - Câmara hiperbárica experimental.....	40
Figura 9 - Coleta intestinal	41
Figura 10 - Biometria dos animais	42
Figura 11 - Classificação histológica de lesão intestinal.....	44
Figura 12 - Avaliação macroscópica intestinal.....	50
Figura 13 - Cortes histológicos do íleo.....	56
Figura 14 - Análise imuno-histoquímica da expressão da iNOS no íleo.....	59
Figura 15 - Análise imuno-histoquímica intestinal da expressão da I-FABP	62
Figura 16 - Análise imuno-histoquímica intestinal da SOD3.....	65
Figura 17 - Análise histológica cerebral.....	68
Figura 18 - Análise imuno-histoquímica cerebral da GFAP.....	71
Figura 19 - Análise imuno-histoquímica cerebral da NeuN.....	74
Figura 20 - Análise imuno-histoquímica cerebral da SOD3	77

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de mortalidade.....	51
Gráfico 2 – Variação do peso corporal.....	52
Gráfico 3 – Peso intestinal.....	53
Gráfico 4 – Escore de lesão histológica intestinal.....	55
Gráfico 5 – Avaliação imuno-histoquímica da iNOS.....	58
Gráfico 6 – Avaliação imuno-histoquímica da I-FABP.....	61
Gráfico 7 – Avaliação imuno-histoquímica da SOD3.....	64
Gráfico 8 – Peso cerebral.....	66
Gráfico 9 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP.....	70
Gráfico 10 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da NeuN.....	73
Gráfico 11 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore de lesão histológica intestinal

Tabela 2 – Avaliação imuno-histoquímica da iNOS

Tabela 3 - Avaliação imuno-histoquímica da I-FABP

Tabela 4 - Avaliação imuno-histoquímica da SOD3

Tabela 5 – Resultados das análises Imuno-histoquímicas cerebrais

Tabela 6 – Taxa de marcação pela NeuN na imuno-histoquímica cerebral

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator indutor de apoptose
ATA	Atmosfera absoluta
atm	Atmosfera
BDP	Broncodisplasia
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , soro albumina bovina
C	Controle
COHB1	Controle com 1 dia de OHB
COHB2	Controle com 2 dias de OHB
C3	Caspase 3
C8	Caspase 8
CA1	Corno de Amon 1
CAT	Catalase
cm	Centímetro
CTX	Córtex cerebral
CTX Hip	Córtex hipocampal
DAB	3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EBP	Extremo baixo peso
ECN	Enterocolite necrosante
ECNOHB1	Enterocolite necrosante com 1 dia de OHB
ECNOHB2	Enterocolite necrosante com 2 dias de OHB
EIC	Eixo intestino cérebro
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide sintetase</i> , óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
ERN	Espécie reativa de oxigênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
Fr	French
g	Gramma
GD	Giro denteado
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic fator</i> , fator neurotrófico derivado de uma linhagem de célula
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i> , proteína ácida fibrillar glial
GPX	Glutaciona peroxidase
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina eosina
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha, ator indutor de hipóxia 1- alfa
HPA	Hipotálamo-pituitário-adrenal
I-FABP	<i>Intestinal fatty acid bindign protein</i> , proteína ligante de ácidos graxos intestinal
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible nitric oxide sintetase</i> , óxido nítrico sintetase induzida
IR	Isquemia-reperfusão

kDA	Quilodalton
Kgf	Quilograma força
l	Litro
LMPV	Leucomalácia periventricular
LOO·	Lipoperóxido
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Metro
M	Mol
MDA	Malondialdeído
MFC	Malformação congênitas
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimol
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , ácido ribonucleico mensageiro
N ₂	Gás nitrogênio
N ₂ O ₃	Dióxido de tri nitrogênio
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
NO	<i>Nitric oxide</i> , óxido nítrico
NO ₂ ·	Dióxido de nitrogênio
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2</i> , fator nuclear derivado do eritroide 2
ns	Não significativo
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
·OH	Radical hidroxila
O ₂	Oxigênio
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> , fator ativador de plaquetas
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampão fosfato salino
PC	Peso corporal
PCA	Persistência do canal arterial
Pcer	Peso cerebral
PI	Peso intestinal
PICC	Peripherally inserted central catheter, cateter central de introdução periférica
RN	Recém nascido
RNPT	Recém-nascido pré-termo
RNT	Recém-nascido a termo
ROO·	Radical peroxila
RPP	Retinopatia da prematuridade
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SIC	Síndrome do intestino curto
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TFF3	<i>Trefoil factor 3</i>
TGF-β	Transforming growth factor beta, fator de crescimento transformador beta
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> , fator de necrose tumoral alfa

USA	<i>United States of America</i> , Estados Unidos da América
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , Fator de crescimento endotelial vascular
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivo Específico.....	31
4 MÉTODOS.....	32
4.1 Avaliação da Comissão de Ética de Experimentação Animal.....	32
4.2 Animais	32
4.3 Grupos Experimentais	32
4.4 Indução da Enterocolite Necrosante	36
4.5 Câmara Hiperbárica Experimental.....	39
4.6 Coleta das Amostras.....	40
4.7 Avaliação biométrica	41
4.8 Processamento histológico intestinal	42
4.9 Graduação Histológica de Lesão Intestinal.....	43
4.10 Análise imuno-histoquímica intestinal.....	44
4.11 Análise histológica cerebral	46
4.12 Análise imuno-histoquímica cerebral	46
4.13 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS	49
5.1 Mortalidade	51
5.2 Análise morfológica corporal e intestinal	51
5.3 Graduação Histológica de Lesão Intestinal.....	53
5.4 Análise por imuno-histoquímica intestinal	57
5.4.1 iNOS.....	57
5.4.2 I-FABP	60
5.4.3 SOD3.....	63

5.5 ANÁLISE DO PESO CEREBRAL	66
5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA CEREBRAL.....	67
5.7 Análise por imuno-histoquímica cerebral.....	69
5.7.1 GFAP.....	69
5.7.2 NeuN	72
5.7.3 SOD3.....	75
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO	87
7.1 Geral	87
7.2 Específica	87
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES.....	97

1 INTRODUÇÃO

A enterocolite necrosante (ECN) é a emergência do trato gastrointestinal (TGI) mais comum do recém-nascido (RN). É de etiologia multifatorial e patogênese indefinida(1). Acomete RNs pré-termo (RNPT) e a termo (RNT), sendo mais tardia e mais comum nos prematuros(2). A ECN é uma doença inflamatória grave que pode ocorrer em qualquer parte do intestino, mais tipicamente no íleo terminal e no cólon ascendente(1).

Devido ao avanço dos cuidados em terapia intensiva neonatal com consequente aumento de sobrevivência dos RNPT, a incidência de ECN vem crescendo(3). Acomete, em média, de 1 a 3 bebês para cada 1000 nascidos vivos, atingindo até 7% dos neonatos de extremo baixo peso (EBP) (<1000g)(2). Mais de 90% dos casos ocorrem em RNPT(4,5). Quanto menor a idade gestacional ao nascimento, maiores a incidência, a gravidade e a letalidade da ECN(6). O número de mortes chega a 13,1 para cada 100.000 nascidos vivos, com óbito neonatal variando de 15 a 30% do total de acometidos(2,5,7). A ECN com necessidade de tratamento cirúrgico apresenta uma mortalidade de 35% contra 21% daqueles pacientes tratados clinicamente (8). Ademais, em estudo coorte, Hintz *et al.* (2005) mostraram, em RNs de extremo baixo peso, que a ECN possui alta morbidade a longo prazo, com maiores índices de atraso no desenvolvimento neurológico e déficit de crescimento, especialmente naqueles que necessitaram de tratamento cirúrgico comparados aos tratados clinicamente (9).

A etiologia da ECN não está completamente esclarecida. Infere-se que, após algum tipo de insulto inicial ocorra uma resposta inflamatória intestinal exacerbada. Tal insulto pode ser relacionado a um estado de hipoxemia, como nas cardiopatias congênitas ou na sepse grave, ou ao uso de fórmulas enterais(4,10). Essas condições são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de ECN, porém a prematuridade e o baixo peso ao nascer continuam sendo os principais fatores(10). Após a agressão inicial, a combinação da flora bacteriana intestinal com a imaturidade do epitélio leva à lesão da mucosa intestinal e ao processo de translocação bacteriana.

A patogênese da ECN envolve a quebra da barreira intestinal, a qual é composta pela interação de uma série de mecanismos, tais como as junções de oclusão (*tight junctions*), o peristaltismo e o muco intestinal, incluindo mucina e IgA secretora (11). Já foi demonstrado que há supressão de genes relacionados às junções de oclusão no intestino de pacientes com ECN(12). A prematuridade está diretamente ligada à falha nos mecanismos da barreira

intestinal, como dismotilidade intestinal, escassez de mucina e alta permeabilidade (11,13). Nos RNT, a ECN costuma estar associada a outras doenças de base, como as cardiopatias congênitas, a asfixia perinatal, a policitemia e os distúrbios ventilatórios(10,14).

A hipóxia é um fator importante na patogênese da doença, seja em humanos ou em modelos experimentais. O controle do fluxo sanguíneo mesentérico no prematuro ainda é pouco compreendido. Na redução desse fluxo, a região ileocólica, que é irrigada pelos ramos terminais da artéria mesentérica superior, sofre mais com o processo isquêmico (2). Em estudos com RNs, amostras de intestino submetidas à hipóxia extra vivo mimetizam a histologia intestinal de RNs com ECN(12).

As espécies reativas do oxigênio (ERO) estão envolvidas no desenvolvimento da ECN. No intestino, as ERO são geradas a partir da enzima xantina oxidase (XO), considerada a fonte inicial de radicais livres no evento isquêmico(15). Essa enzima produz ácido úrico e ânions superóxido (O_2^-), responsáveis por ativar a sinalização apoptótica mitocondrial intestinal no estresse oxidativo (EO). Além disso, radicais livres levam à peroxidação lipídica e lesão de membranas celulares, culminando com a perda da integridade celular e aumento da permeabilidade vascular, evidentes da ECN(15,16). Kim *et al.* (2012) postularam, em estudo que utilizou um modelo baseado em agente, que as células epiteliais do intestino do RN têm dificuldade em combater o EO, principalmente quando se somam fatores como alimentação enteral hiperosmolar e a ativação de receptores do tipo *toll like receptor 4* (TLR4)(17).

As bactérias são importantes na ECN, uma vez que a doença não ocorre sem que haja a colonização intestinal (18). Após uma semana de vida, bactérias anaeróbias já estão presentes no intestino. A ativação do TLR4 se dá pelo lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede bacteriana capaz de elicitar uma resposta celular inflamatória (18). Esse processo foi demonstrado como necessário no desenvolvimento da ECN. Em modelo experimental, a exclusão do receptor protegeu contra o desenvolvimento da doença, ao passo que sua ativação lesou a barreira intestinal pela supressão da sinalização via enzima óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide sintetase*- eNOS)(19). A eNOS regula a produção de óxido nítrico (*nitric oxide* - NO), principal vasodilatador intestinal. Pacientes com ECN apresentam níveis reduzidos de citrulina e arginina, aminoácidos importantes na síntese do NO. Sua redução leva a alteração no fluxo sanguíneo da alça, diminuição da perfusão e consequente necrose(20,21).

Além do efeito vasodilatador, o NO em excesso pode ter um efeito deletério sobre a mucosa intestinal, agindo como um potente oxidante ao reagir com O_2^- , formando peroxinitrito (ONOO⁻). Este aumenta a permeabilidade intestinal e leva à apoptose de enterócitos do vilão intestinal(22). A óxido nítrico sintase induzida (*inducible nitric oxide synthase- iNOS*), ao contrário das enzimas constitutivas (eNOS e NOS neuronal), é produzida em resposta à inflamação, gerando grandes quantidades de NO. Na avaliação de amostras intestinais de bebês com ECN, foi demonstrado aumento da expressão de microRNA (mRNA) para iNOS, sendo diretamente relacionado à severidade da lesão intestinal(22).

A avaliação histológica intestinal na ECN mostra infiltrado inflamatório, supercrescimento bacteriano e necrose de coagulação. Nos casos mais avançados, toda a parede intestinal é comprometida, podendo levar à perfuração intestinal(1,10).

A apresentação clínica da ECN varia desde uma forma indolente até uma forma rapidamente progressiva e grave, podendo levar à instabilidade hemodinâmica e óbito. Os sinais clínicos iniciais são semelhantes a qualquer quadro infeccioso, manifestando-se por apneia, bradicardia, letargia, aumento no resíduo gástrico, distensão abdominal e piora da dinâmica ventilatória(2,10). Classicamente a suspeita diagnóstica da ECN é feita quando o neonato apresenta distensão abdominal, massa abdominal palpável ou sangramento intestinal (2).

Mais de 80% dos neonatos com ECN demonstram falência respiratória, cardiovascular, renal e hematológica, que podem ser mais graves quanto mais avançado for o estágio da doença(23). Exames laboratoriais podem demonstrar trombocitopenia, leucocitose ou leucopenia, acidose metabólica, hipo ou hiperglicemia e distúrbios eletrolíticos(10).

Na avaliação por imagem, a ECN apresenta, à radiografia, distensão abdominal às custas de dilatação e edema de alças e pneumatose intestinal nos casos iniciais. Nos casos mais avançados, podem ser vistos aerobilia, gás na veia porta e pneumoperitônio(24). A ultrassonografia tem surgido como um instrumento importante na avaliação da necrose intestinal, sendo capaz de identificar a pneumatose mais precocemente que a radiografia, bem como avaliar afinamento da parede intestinal e redução da perfusão da alça. Esses achados estão relacionados à maior probabilidade de necessidade de cirurgia e maior mortalidade(8,25).

Estudos recentes têm focado em biomarcadores que possam inferir a gravidade da doença. A calprotectina, a proteína ligante de ácidos graxos intestinal (*Intestinal fatty acid binding protein- I-FABP*), claudinas e fator trefoil 3 (*Trefoil factor 3- TFF3*) são os mais estudados. A calprotectina fecal, uma proteína produzida por neutrófilos e presente nas fezes,

mostra-se aumentada em bebês com ECN (26). A I-FABP, proteína citosólica do enterócito que é liberada quando há lesão celular, também é capaz de fazer diagnóstico precoce da doença, tanto na dosagem urinária quanto na sanguínea (27,28).

Bell *et al.* (1978) classificaram clinicamente a ECN em três estágios, a partir de critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos: a) estágio I como suspeita, b) estágio II como definida e confirmada e c) estágio III como avançada e cirúrgica. Os estágios I e II são principalmente tratados com jejum, drenagem gástrica e antibióticos parenterais. O estágio III é tratado cirurgicamente com drenagem peritoneal ou laparotomia exploradora(3,9,29), uma vez que nesse estágio se encontram os pacientes com necrose e perfuração intestinal ou aqueles que não responderam ao tratamento clínico imposto.

Estratégias para prevenção de ECN baseiam-se no cuidado intensivo neonatal e na introdução alimentar precoce, principalmente através de leite materno. Evitar a hipóxia e uso inadvertido de antibióticos são medidas que reduzem o risco de ECN(30). A administração de pequenos volumes de leite materno estimula o trofismo intestinal, melhora a ação das enzimas digestivas, aumenta o fluxo sanguíneo e a motilidade intestinais(10,31). O uso de probióticos já foi demonstrado como protetor contra a ECN. Eles são capazes de produzir substâncias bactericidas e bacteriostáticas, participando da imunomodulação. Porém, a normatização, o controle de qualidade, as cepas e a posologia desse tipo de tratamento ainda carecem de mais estudos(30).

A fim de estudar os aspectos fisiopatológicos e terapêuticos da ECN, existem vários modelos experimentais em neonatos de porcos, camundongos e ratos, que têm como base a combinação de hipóxia intestinal e a utilização de uso de fórmulas lácteas hiperosmolares(32).

Cohen *et al.* (1991) submetem porcos RNs à hipóxia, através da manutenção da pressão parcial de oxigênio arterial (PaO₂) em 50% por 30 minutos, seguida de hipotermia com temperatura corporal de 35°C e obtiveram ECN clínica e histológica em 3 a 4 dias(33). Crissinger *et al.* (1994) utilizaram o mesmo animal, promovendo isquemia mesentérica por 60 minutos associado à administração de fórmula enteral no íleo(34). Em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que o componente lipídico da fórmula infantil era o principal responsável pelo aumento da permeabilidade da alça intestinal e que este componente favorecia a translocação bacteriana(35).

Barlow *et al.* (1974) publicaram o primeiro modelo de ECN em neonatos de ratos(36). Nesse modelo, os neonatos eram expostos à hipóxia por 3 a 5 minutos e alimentados com

fórmula láctea 4 vezes ao dia, com um grupo recebendo adicionalmente a bactéria *Klebsiella sp* via oral. Os neonatos expostos à hipóxia e à fórmula apresentavam sinais clínicos de distensão, diarreia e enterorragia e morriam em 2 a 5 dias. Também foi constatado, pelo sacrifício dos animais em diferentes tempos, que alterações intestinais começavam a partir de 36h do protocolo e que predominavam no íleo (36).

Apesar dos 60 anos em pesquisa sobre a ECN, pouco se evoluiu na terapêutica da doença. Nos Estados Unidos, estimou-se em 2011 que um prematuro extremo sem ECN tenha uma média de internação de 64,5 dias, com um custo médio de US\$207.378,00. Quando considerados os bebês com ECN submetidos a tratamento clínico ou cirúrgico, o tempo médio de internação aumentou 11,7 e 43,1 dias, respectivamente. O custo também aumentou o equivalente a US\$74.004,00 e US\$198.040,00, em média, respectivamente. Ou seja, o custo de um RN com ECN com necessidade de tratamento cirúrgico dobra(37).

Perfuração intestinal ou piora clínica apesar do tratamento otimizado são indicações de cirurgia na ECN (8,38) A síndrome do intestino curto (SIC) é definida pela má absorção que ocorre após a ressecção de grande extensão de intestino delgado, ou pela dependência de nutrição parenteral (NP) prolongada (mais de 90 dias) secundária à falência intestinal(39). A ECN é responsável por 35% dos casos de SIC entre a população infantil(40). A dependência de NP traz complicações, tais como falência hepática, infecções relacionadas a cateter venoso central e esgotamento de acessos venosos, principais causas de óbito entre esses pacientes. A média de sobrevivência de crianças dependentes de NP é de 1 a 2 anos. Além disso, a NP pode servir como ponte para um tratamento definitivo de transplante intestinal e até hepático, a depender da hepatopatia consequente da NP prolongada e sepses recorrentes (8,38). Cerca de 12 a 15% dos transplantes intestinais infantis são secundários a ECN. Um levantamento no Reino Unido mostrou que o custo médio do tratamento de um paciente que recebeu transplante intestinal, em 30 meses, foi de US\$340.000,00 (41).

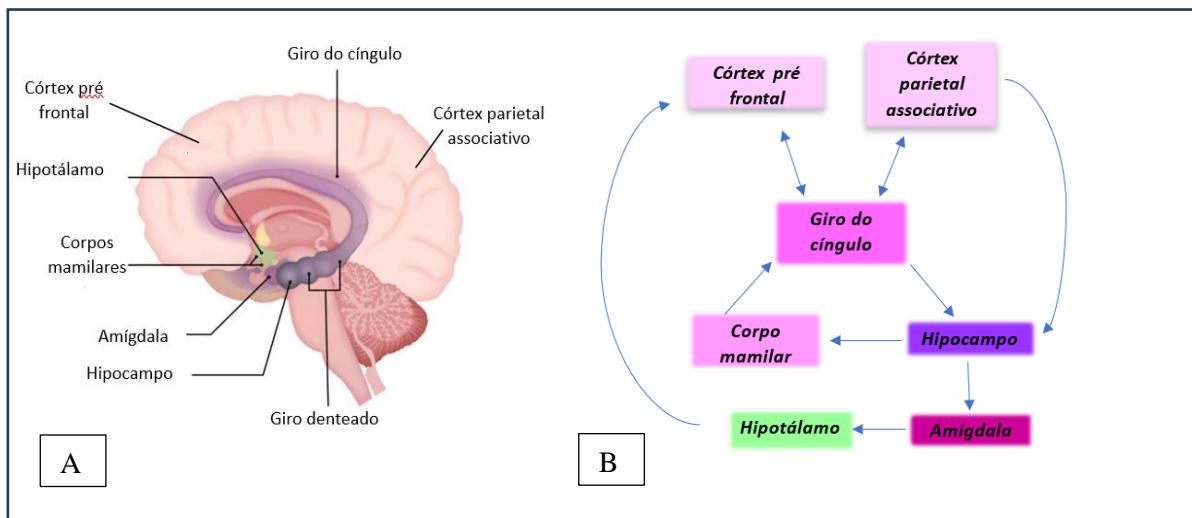
Além das sequelas intestinais, o desenvolvimento neuropsicomotor também pode ser prejudicado na ECN. Supostamente, a microbiota tem um papel importante nesse processo no RN (42). Um estudo de revisão concluiu que a presença de certas bactérias no intestino de modelos experimentais com ratos influencia o desenvolvimento de vias neuronais relevantes de controle de atividades cerebrais, incluindo comportamentos ansiosos, controle motor, memória e aprendizado (43).

O eixo intestino cérebro (EIC) constitui-se de uma sinalização que envolve vias hormonais, neurais e imunológicas entre o intestino e cérebro. Permite à microbiota intestinal e seus metabólitos interferirem no desenvolvimento e em diversas funções cerebrais, de forma ainda pouco conhecida. As bactérias produzem ácidos e produtos do metabolismo do triptofano e também estimulam a produção de citocinas e neurotransmissores. Essas moléculas acessam o cérebro, provocando respostas físicas, comportamentais e emocionais (44). O eixo é composto pelo córtex cerebral, sistema límbico, eixo hipotálamo-hipófise e tronco cerebral(45)

O intestino se liga ao cérebro via sistema nervoso autônomo (fibras simpáticas e parassimpáticas). O nervo vago responde pela maior parte da inervação parassimpática do TGI. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal atua junto ao sistema simpático sobre o intestino em resposta ao estresse (44). O sistema límbico é conectado às aferências autonômicas do intestino. Ele é composto principalmente pelo hipocampo, amígdala e córtex límbico (46)(Figura 1).

O hipocampo é responsável pela memória e aprendizado. É uma área particularmente sensível ao estresse (internação em unidade de terapia intensiva, separação materna, estímulos nociceptivos, dor visceral e pós operatória), à hipóxia e à elevação do nível de glicocorticoides (47). Esse mecanismo não é bem elucidado, mas sabe-se que o estresse altera o metabolismo celular neuronal, aumentando a suscetibilidade a processos hipóxico-isquêmicos e possivelmente ao EO (48). Estudo *in vitro* demonstrou que a exposição ao corticóide aumenta a sensibilidade de células do hipocampo a produtos do EO, como glutamato e proteína β -amilóide(49).

Figura 1 - O sistema límbico



O sistema límbico: composto anatomicamente pelo hipotálamo, amígdalas, tálamo medial, giro do cíngulo e corpo mamilar. O hipotálamo coordena a função autonômica do sistema nervoso central (SNC). A amígdala processa emoções e gera memórias afetivas; giro do cíngulo integra funções emocionais, viscerais e de alerta. A: desenho das áreas anatômicas. B: uma representação da interrelação dos estímulos entre as diferentes áreas. Adaptado de Jones *et al.* (2006) (50).

Biouss *et al.* (2019) demonstraram em modelo experimental em ratos que a ECN provoca redução de neurônios e de oligodendrócitos no cérebro. Também foi encontrado aumento da neuroinflamação através do aumento de astrócitos e microgliose. Todos esses achados foram diretamente proporcionais à gravidade da doença (51). Isso é compatível com os achados de estudos clínicos. Matei *et al.* (2019), em estudo de revisão, relataram maior incidência de atraso no neurodesenvolvimento em crianças que sobreviveram à ECN (52). Déficits sensoriomotores e dificuldades de aprendizado se mostraram mais incidentes nessa população.

A necessidade de intervenção cirúrgica mostrou-se como um agravante nas sequelas neurológicas, o que sugere uma relação direta entre a gravidade do processo inflamatório e isquêmico no intestino e o acometimento do SNC(52) . Essa relação também foi verificada em avaliação por ressonância magnética de crianças que tiveram ECN, a qual mostrou maior dano cerebral naquelas que tiveram que ser submetidas ao tratamento cirúrgico(53) .

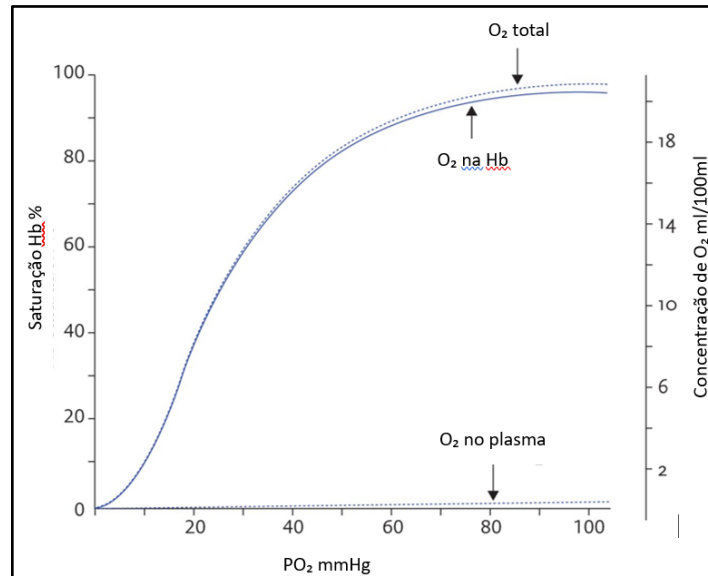
Por ser uma doença de etiologia multifatorial e fisiopatologia complexa, a intervenção precoce torna-se difícil na ausência de um fator alvo para o tratamento.

Definida a alta morbimortalidade da ECN, principalmente nos casos cirúrgicos, estratégias focadas em prevenção, diagnóstico precoce e redução do processo inflamatório e da necrose intestinal são essenciais. O EO como participante da fisiopatologia da doença vem se firmando na literatura. Nesse contexto, a oxigenoterapia hiperbárica (OHB) surge como uma modalidade terapêutica que poderia ser aplicada para esses fins.

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é definida, de acordo com a *Undersea and Hyperbaric Medical Society* (UHMS), como a oferta intermitente de oxigênio (O_2) a 100%, em uma câmara que atinge uma pressão maior que a pressão ao nível do mar, que é de 1 atmosfera absoluta (ATA), promovendo aumento da tensão de oxigênio ao nível tecidual(54). Este aumento é amparado nas leis químicas de Boyle e Henry que respectivamente afirmam que, em temperatura constante, o volume fixo de um gás é inversamente proporcional à sua pressão e que a quantidade de gás dissolvida em um líquido ou tecido é proporcional à pressão parcial do mesmo gás, quando em contato com o líquido ou tecido(55). A concentração sanguínea de O_2 depende da pressão parcial de O_2 inalado, da mecânica ventilatória, da concentração da hemoglobina (Hb) e de sua afinidade pelo O_2 . O volume máximo de O_2 por 100ml de sangue é de 20ml, com saturação máxima da Hb (56). Em condições basais, a fração do gás presente no plasma é mínima, como mostra a Figura 2.

A administração de O_2 a 100% aumenta em 5 vezes a concentração do gás no plasma comparado à inspiração do ar ambiente. Sob pressão de 3ATM, esse aumento chega a 20 vezes (57). Dessa forma, a OHB aumenta a oxigenação de tecidos inclusive hipoperfundidos por aumentar a quantidade de O_2 dissolvida no plasma.

Figura 2 - Curva de dissociação da hemoglobina



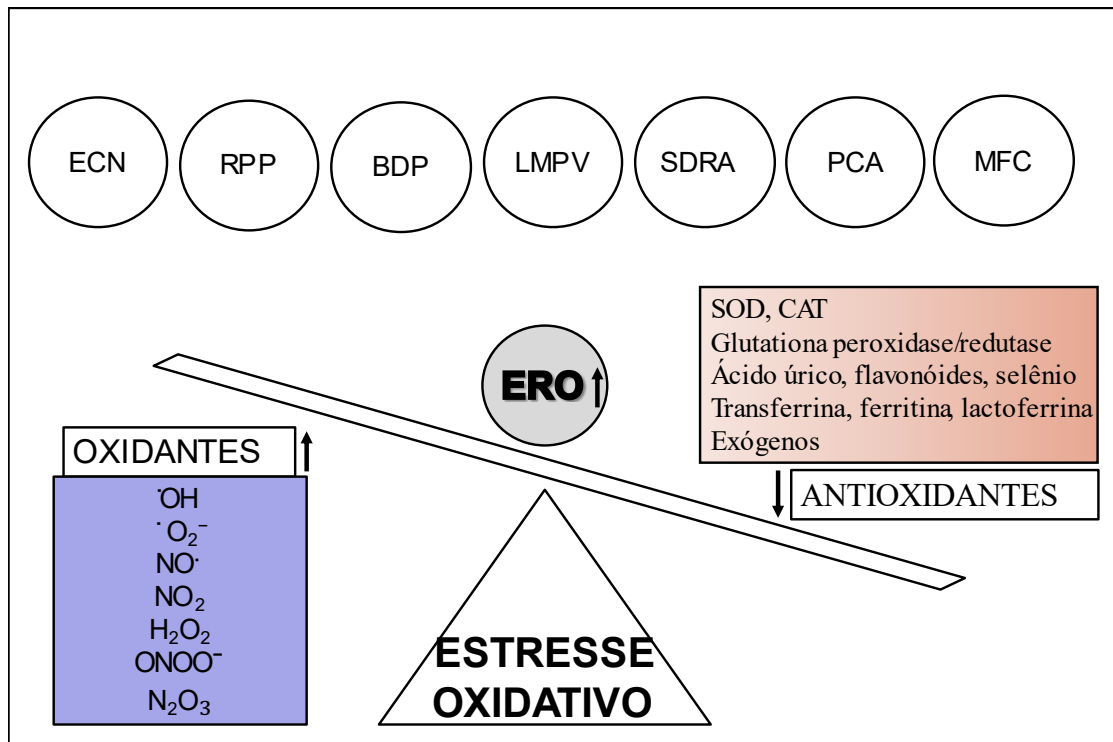
A pressão parcial de O_2 (PO_2) inalado interfere diretamente na saturação da Hb pela molécula, até certo ponto (cerca de 60mmHg), quando a saturação da HB é próxima do máximo, bem como a concentração de O_2 no sangue. Adaptado de Korhonen *et al.* (2000) (56)

O O_2 é utilizado na produção de energia da forma de trifosfato de adenosina (ATP), principalmente a nível mitocondrial, processo que gera também ERO. ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são partes fisiológicas do metabolismo. Porém, essas moléculas, também chamadas de radicais livres, lesam tecidos por roubarem elétrons de lipídeos, proteínas e do DNA. Como já foi mencionado, o O_2^- é formado da transferência de elétrons durante a produção de energia no sistema xantina hipoxantina oxidase(58). A partir disso, outras moléculas como radicais hidroxila ($\cdot OH$) e peroxila ($ROO\cdot$), lipoperóxidos ($LOO\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), $NO\cdot$, $ONOO^-$, dióxido de nitrogênio ($NO_2\cdot$) e trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) também são geradas.

Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationala peroxidase (GPX) fazem parte do sistema antioxidante endógeno. A SOD3, ou SOD extracelular, é produzida no intracelular e excretada para o extracelular em vários tecidos. A presença das SOD é importante na resistência intestinal à isquemia-reperfusão (IR) (59). Ela converte O_2^- em H_2O_2 , que, por sua vez, será convertido pela CAT ou GPX em água (H_2O) e O_2 .

As ERO são necessárias para o metabolismo celular normal. Promovem maturação celular, ativam a produção de citocinas e são produzidos por neutrófilos e macrófagos no combate a agentes infecciosos. O EO ocorre quando a capacidade de neutralização dos antioxidantes é superada pelo excesso de radicais livres. Ele está relacionado à ocorrência de várias patologias no RN(60) (Figura 3).

Figura 3 - O estresse oxidativo



O desbalanço resultante da saturação dos antioxidantes pelo excesso de oxidantes. RPP: retinopatia da prematuridade; BDP: broncodisplasia; LMPV: leucomalácia periventricular; SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo; PCA: persistência do canal arterial; MFC: malformação congênita. Antioxidantes exógenos são: vitaminas C e E, carotenóides, ácido fenólico, acetilcisteína, selênio, zinco, magnésio e cobre. Adaptado de Ozsurekci *et al.* (2016) (60)

Seria esperado que a maior oferta de O₂ proporcionado pela OHB levasse ao EO pelo aumento de ERO gerados na mitocôndria. Porém, os estudos mostram que poucas sessões de OHB (1 a 5) reduzem a atividade mitocondrial(61). Além disso, a OHB mostrou atuar na sinalização intercelular, ativando fatores como Nrf2 (*nuclear factor erythroid-derived 2-like 2*). Sob EO, o Nrf2 entra no núcleo e ativa a transcrição gênica de antioxidantes (61,62). Além de aumentar a oferta de O₂ aos tecidos com baixa vascularização através do incremento na fração O₂ livre no plasma, a OHB estimula a neoangiogênese, através da produção de fator de

crescimento endotelial vascular (VEGF) e de fator induzido por hipóxia (HIF-1 α), reduz a adesão leucocitária e controla a proliferação bacteriana. (55,63)

A OHB é amplamente utilizada no tratamento de diferentes doenças em adultos. É considerada segura e eficaz ao ser utilizada a pressão superior a 1.4 e inferior a 3 ATA e em duração inferior a 120 minutos(63). Intoxicação por monóxido de carbono, doença descompressiva, osteonecrose, embolismo gasoso, infecções por anaeróbio ou poli microbianas de tecidos moles, lesões actínicas, fraturas expostas com lesão por esmagamento são exemplos de algumas das condições onde a OHB tem mais alto nível de recomendação (64).

A aplicação da OHB em RNs tem crescido. Seu uso é descrito em neonatos com sepse severa e nos pacientes que apresentam distúrbios de cicatrização e/ou injúrias isquêmicas(65,66). Apesar disso, a terapia ainda não é recomendada para prematuros menores de 34 semanas e meia ou para neonatos menores que 1,2kg, devido ao risco de toxicidade pelo oxigênio, principalmente seus efeitos sobre retina, cérebro e pulmões(65).

Estudos experimentais tentam provar a segurança da OHB em neonatos. Torbati *et al.* (1993) mostraram que a toxicidade do O₂ em condições hiperbáricas é menor nos ratos RNs do que nos adultos(67). Graças a mecanismos de proteção mais ativos nos filhotes, como a vasoconstrição capilar, há menor formação de ERO nos tecidos através da restrição da perfusão(68).

Smith *et al.* (1968) realizaram torção cirúrgica do intestino de ratos e, depois da distorção, submetem-nos à OHB. O grupo tratado teve 44% de sobreviventes, enquanto que no grupo controle só 16% sobreviveram (69). Outro estudo comparando ratos com ECN submetidos a OHB e grupo controle mostrou maior ganho ponderal, menor estresse oxidativo e melhora da atividade de enzimas antioxidantes, com redução do TNF- α e da lesão histológica intestinal no intestino dos animais tratados(70).

Wiebers *et al.* (2006) relataram sucesso em um caso de necrose de extremidades inferiores após oclusão arterial aguda, tratado com OHB em RN a partir do 7º dia de vida(71). Foi relatado um caso de recuperação completa de isquemia de membro superior em RNT a partir de um esquema intensivo de OHB, a partir de 48h de vida (72). Waisman *et al.* (1998) publicaram a experiência de quase 20 anos com aplicação de OHB em pacientes de 2 meses a 18 anos, com 139 casos relatados, apenas 2 casos de feitos colaterais completamente revertidos(73). Vazquez *et al.* (1990) mostraram melhora na cicatrização de feridas após cirurgia cardíaca e de feridas resultantes de complicação de cateterização umbilical de quatro

RNs. A cicatrização após a OHB foi satisfatória, sem evidência de efeitos colaterais significativos(66).

A literatura traz muitos estudos experimentais sobre o uso de OHB em modelos de lesão cerebral hipóxico-isquêmica. Modelos de hipóxia cerebral a partir da ligadura da artéria carótida em RN de ratos tratados com OHB mostraram reparo e regeneração do sistema nervoso central. Houve também melhora no aprendizado, na execução de tarefas e na memória desses animais tratados (74,75). Em modelo semelhante, Zhu *et al.* (2015) demonstraram que a aplicação precoce de OHB (até 72h pós hipóxia/isquemia) promoveu a preservação neuronal a nível de hipocampo e reduziu os marcadores de apoptose caspase-3 (C3) e caspase-8 (C8). Sendo o EO o principal indutor de apoptose cerebral, o mesmo estudo mostrou que a terapia reduziu os níveis de óxido nítrico (NO) e de malondialdeído (MDA), que são produtos da peroxidação lipídica, e aumentou a SOD (76).

Considerando o potencial da OHB da modulação do EO e da inflamação, e a importância desses processos na fisiopatologia da ECN, estudar seus impactos no tratamento da doença poderia ajudar tanto na melhor compreensão da patologia quanto na proposição de uma nova modalidade terapêutica.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços em medicina fetal e terapia intensiva neonatal, pouco se evoluiu no tratamento da ECN nos últimos anos. Terapêuticas que evitem a progressão da necrose intestinal e suas consequências sistêmicas, reduzindo a gravidade da doença, são escassas e muitas delas ainda em estágios pré-clínicos. Impacto da doença no cérebro vêm se mostrando relevante, à medida que trazem ao conhecimento possíveis pontos alvo de tratamento. O papel do EO na fisiopatologia da doença, seja a nível intestinal ou cerebral, já está sendo estabelecido na literatura. Porém, o emprego da OHB como modalidade terapêutica na ECN é restrito a um único estudo experimental. Até o presente momento, não há estudo que avalie concomitantemente os impactos da OHB no intestino e no cérebro na ECN. Isto posto, desenhamos este estudo a fim de melhor avaliar o impacto da OHB em diferentes quantidades de sessões em modelo experimental de ECN, no ensejo de que essa possa ser no futuro uma nova modalidade terapêutica contra tamanha morbimortalidade provocada por essa doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a diferença na mortalidade e no dano histológico intestinal e cerebral em neonatos de ratos submetidos ao modelo experimental de ECN tratados com OHB.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar o efeito do tratamento da OHB em diferentes quantidades de sessões no tratamento da ECN por meio de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo a nível tecidual intestinal e cerebral.

4 MÉTODOS

4.1 Avaliação da Comissão de Ética de Experimentação Animal

O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA - FMRP) sob o número 102/2017.

4.2 Animais

Ratos machos e fêmeas de ratos *Sprague-Dawley* adultos provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP, Brasil) foram submetidos ao acasalamento todos os dias da semana durante o período escuro do dia. Foram colocadas de uma a duas ratas com um macho em cada gaiola. Na manhã seguinte, a região genital das fêmeas foi examinada e foi realizado esfregaço vaginal para observação de espermatozoides. A presença de espermatozoides configurou o acasalamento e foi considerado o dia zero de prenhez (o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias). Os animais foram mantidos em gaiolas padrão (41 x 34 x 16 cm), com água e ração para roedores *ad libitum*, em condições controladas de luminosidade (12h de luz/12h de escuro), temperatura (média de 23 °C) e umidade relativa do ar (média de 55%).

4.3 Grupos Experimentais

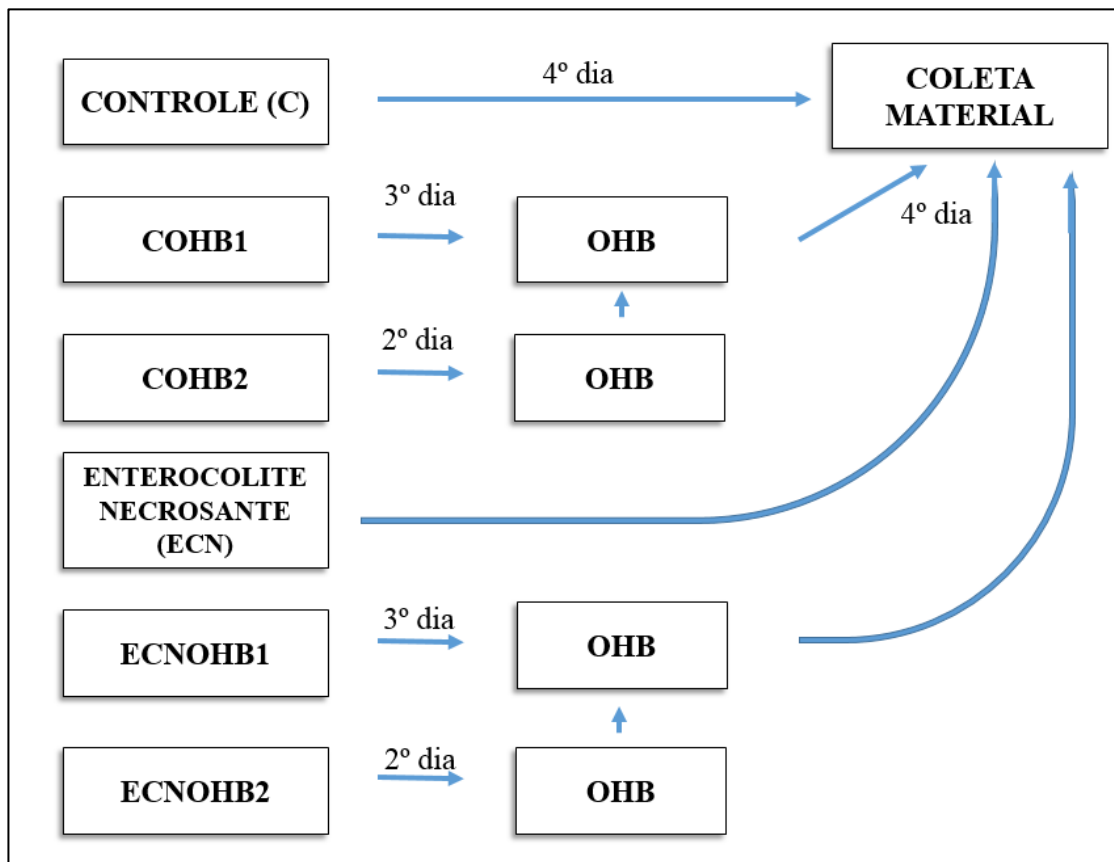
Nos dias 21,5 da gestação, as ratas foram separadas e mantidas em caixas individuais para o alojamento, colocadas em ambiente tranquilo, livre de manipulação para que não houvesse estresse e conseqüentemente interrupção do parto. No dia 22 da gestação, acompanhamos o nascimento espontâneo dos animais. Todos os filhotes foram pesados ao nascimento. Selecionamos aleatoriamente os fetos de cada rata, separando em até 6 grupos de forma randomizada, a depender do número de filhotes gerados (Figuras 4 e 5):

- a) **Grupo I**, denominado controle sem intervenção (C): os filhotes foram manipulados apenas para o controle de peso diário e retornaram às respectivas

mães para amamentação exclusiva. No 4º dia de vida foram sacrificados para estudo (n= 18);

- b) **Grupo II**, denominado controle com intervenção (COHB1): os filhotes foram amamentados pela respectiva mãe e receberam OHB no 3º dia, num total de 2 sessões de 90 minutos cada. No 4º dia de vida foram sacrificados para estudo (n= 14);
- c) **Grupo III**, denominado controle com intervenção (COHB2): os filhotes foram amamentados pelas respectivas mães e receberam OHB nos 2º e 3º dias, num total de 4 sessões de 90 minutos cada. No 4º dia de vida foram sacrificados para estudo (n= 17);
- d) **Grupo IV**, denominado enterocolite necrosante (ECN): neonatos submetidos a protocolo de enterocolite necrosante, sendo sacrificados para estudo no 4º dia de vida (n = 26);
- e) **Grupo V**, denominado enterocolite necrosante + OHB por 1 dia (ECNOHB1): os filhotes foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo IV associado à OHB no 3º dia, num total de 2 sessões de 90 minutos cada. No 4º dia de vida foram sacrificados para estudo (n=19);
- f) **Grupo VI**, denominado enterocolite necrosante + OHB por 2 dias (ECNOHB2): os filhotes foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo IV associado à OHB nos 2º e 3º dias, num total de 4 sessões de 90 minutos cada. No 4º dia de vida foram sacrificados para estudo (n= 21).

Figura 4 - Desenho do estudo



Grupo I: Grupo Controle (C). **Grupo II:** Grupo Controle + 1 dia de OHB no 3º dia de vida (COHB1). **Grupo III:** Grupo Controle + 2 dias de OHB nos 2º e 3º dias de vida (COHB2). **Grupo IV:** Grupo Enterocolite Necrosante (ECN), submetido ao protocolo de ECN desde o nascimento. **Grupo V:** Grupo Enterocolite Necrosante + 1 dia de OHB (ECNOHB1), submetido ao protocolo de ECN desde o nascimento e OHB no 3º dia de vida. **Grupo VI:** Grupo Enterocolite Necrosante + 2 dias de OHB (ECNOHB2), submetido ao protocolo de ECN desde o nascimento e OHB nos 2º e 3º dias de vida. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 5 – Animais



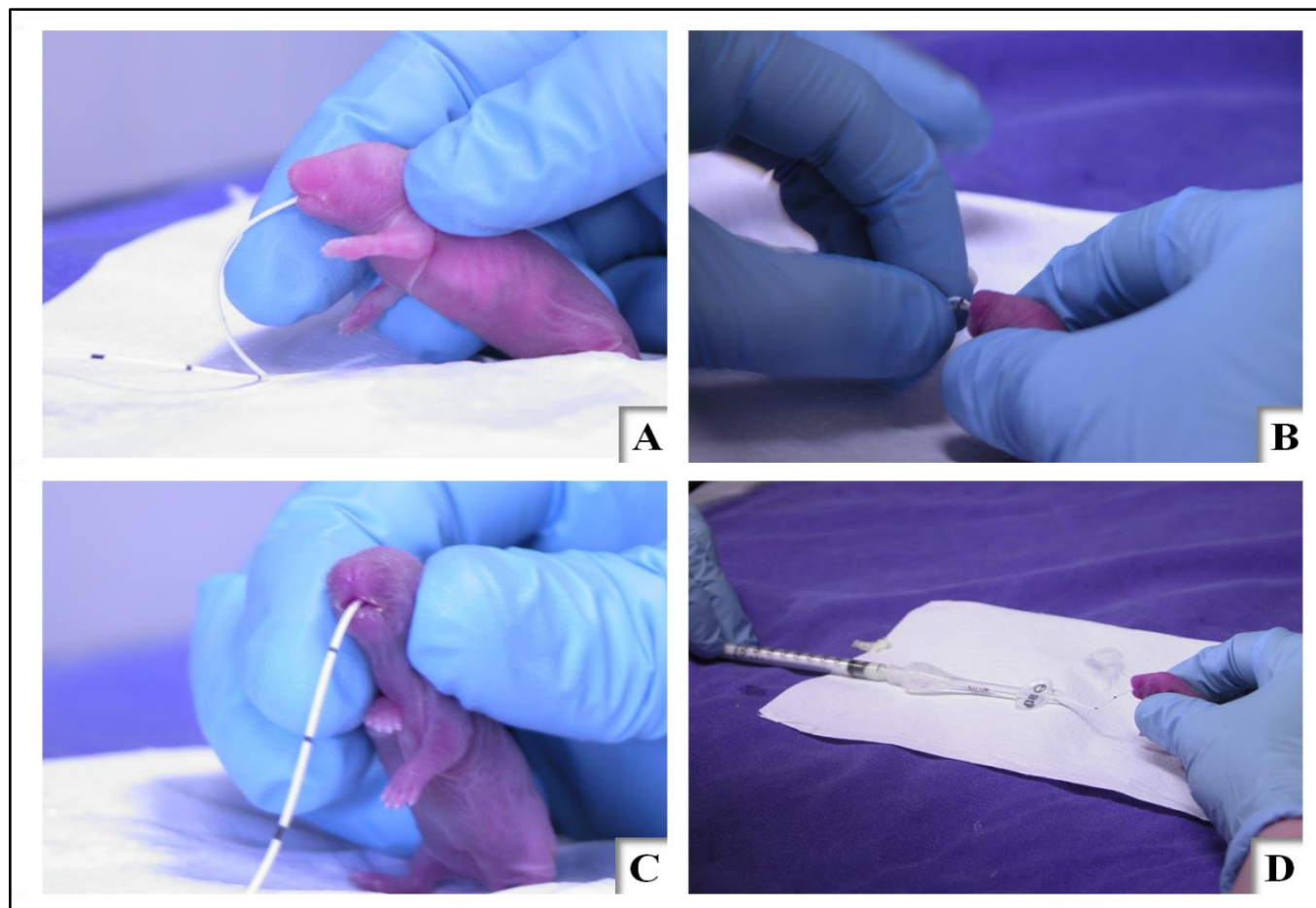
A, fotografia do grupo C, rata mãe *Sprague-Dawley* com seus filhotes. B: marcação dos filhotes dos grupos controle com identificação numérica no dorso. C: grupos intervenção em caixas *box*, com sua identificação nas etiquetas em cada repartição. Essas caixas são mantidas sobre plataforma ou colchão térmicos, a 36° a 38°C. Fonte: Simões (2014) (77) e imagens do autor.

4.4 Indução da Enterocolite Necrosante

Para indução da ECN os neonatos foram submetidos aos três principais fatores de risco da doença: a alimentação hiperosmolar, asfixia e hipotermia, segundo modelo publicado por Jilling *et al.* (2006)(18) e adaptado por Gonçalves *et al.* (2013) (78).

Para realização da alimentação artificial foi utilizado um Cateter Central de Inserção Periférica (PICC), 1.9 Fr (26 Gauge), monolúmen, marca BD (Sandy, Utah, USA). Os RNs foram posicionados lateralmente sobre colchão aquecido, sendo realizada a medida da distância de introdução da sonda, colocando-se a extremidade da mesma no lóbulo da orelha ao ápice do focinho até a região abaixo do processo xifoide, aproximadamente 0,3cm. A dieta foi administrada a cada três horas, fornecendo de 0,05 a 0.1 mL de leite artificial Esbilac® (PetAg, Hampshire, IL, USA). O horário de aleitamento se deu das 06:00 às 00:00h (Figura 6).

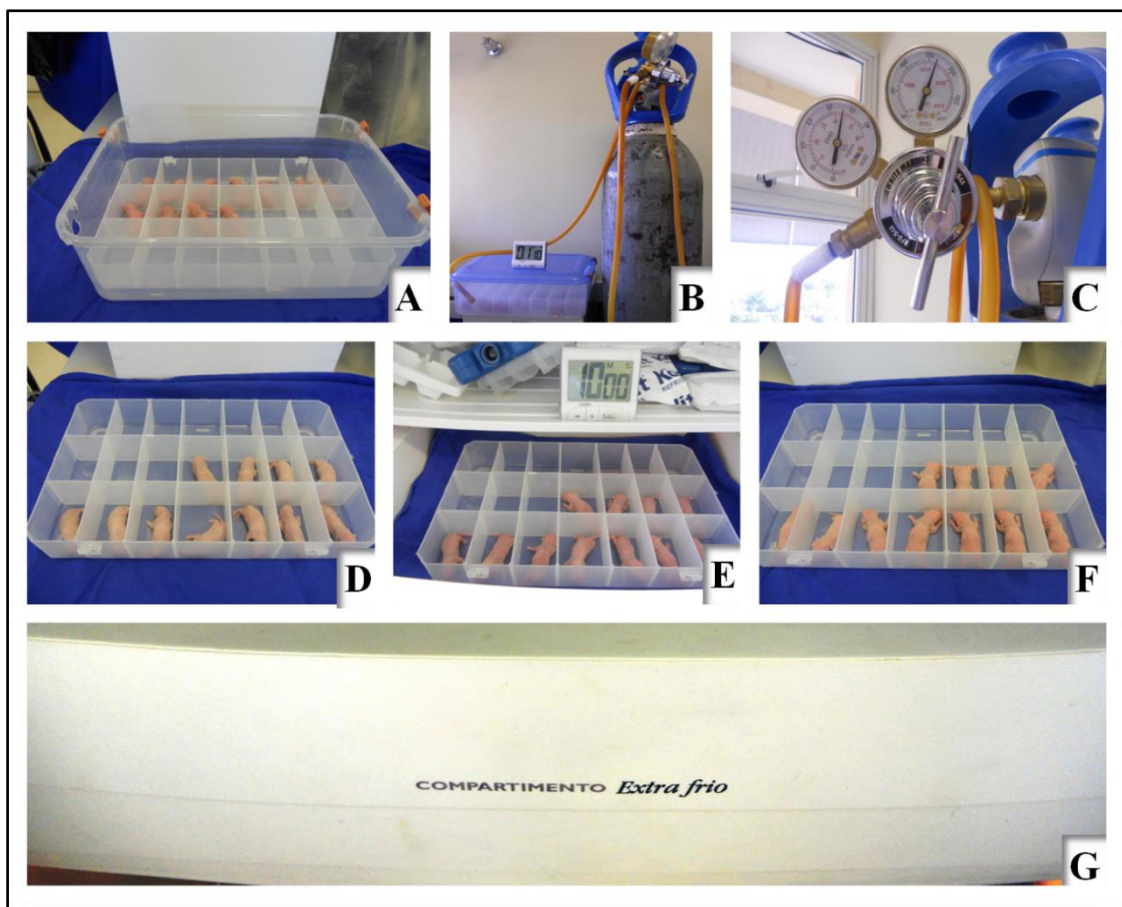
Figura 6 - Fotografias da administração de leite artificial para os animais



A e C: fotografias do posicionamento para a realização da técnica de sondagem orogástrica. **B:** fotografia da sondagem orogástrica com cateter PICC BD 1.9Fr. **D:** fotografia da administração do leite artificial Esbilac®. Fonte: Simões (2014) (77).

Para indução da isquemia foi utilizada uma câmara anóxica de plástico com tampa, de dimensões 30 x 20 x 12,5cm. Os filhotes acomodados em caixa *box* compartimentalizada (máximo de 21 animais por caixa) foram expostos a nitrogênio (N_2) a 35 l/min por 1 minuto e 10 segundos para o total preenchimento da câmara. A seguir, foram submetidos à hipotermia, sendo direcionados a um compartimento extrafrio a ($4^\circ C$) por 10 minutos em refrigerador marca Electrolux RE 26. O procedimento ocorreu respectivamente às 8:00h e às 20:00h, compatível ao horário de nascimento (Figura 7).

Figura 7 - Anóxia e resfriamento dos animais



A: fotografia da câmara anóxica de plástico com tampa utilizada para a asfixia. **B:** fotografia do torpedo de nitrogênio (N_2) **C:** fotografia da válvula reguladora para a realização do procedimento 35 l/min por 1 minuto. **D:** fotografia da caixa compartimentalizada com os filhotes após o procedimento. **E:** fotografia filhotes em caixa compartimentalizada prestes a serem submetidos à hipotermia por um período de 10 minutos (cronômetro acima). **F:** fotografia dos filhotes após a hipotermia. **G:** fotografia compartimento extra frio a $4^\circ C$ em refrigerador marca Electrolux RE 26. Fonte: Simões (2014) (77).

4.5 Câmara Hiperbárica Experimental

A câmara hiperbárica experimental utilizada possui 63cm de altura, 70cm de comprimento, diâmetro externo de 86cm e interno de 78cm. A câmara possuía vigia de acrílico para visualização e monitoramento dos animais, válvula de controle na entrada, manômetro diferencial (kgf/cm²) para controle da pressão interna, fluxímetro na saída para a manutenção do ciclo entrada/saída e temperatura interna controlada entre 21 e 22° C com termômetro. O equipamento fica localizado no laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental no Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP – USP (Figura 8).

Para a realização das sessões de OHB, os neonatos foram distribuídos em caixas plásticas (máximo de 21 animais por caixa), colocados no interior da câmara hiperbárica experimental. As caixas eram compartimentalizadas, de forma que cada rato tinha seu espaço próprio, preenchido com maravalha para maior conforto.

A câmara foi pressurizada diretamente com O₂ puro (FiO₂ = 100%). Os neonatos receberam sessões terapêuticas diárias de OHB de acordo com a determinação do grupo em que estavam inseridos. A aplicação consistiu em 15 minutos de pressurização lenta até 2 ATA, 90 minutos de sessão (tempo de fundo) e 15 minutos finais para despressurização. Somado à pressão atmosférica na cidade de Ribeirão Preto, a 546m acima do nível do mar, que é de 1,06 ATA, os animais ficaram, portanto, submetidos a um total de 3 ATA.

Ao final de cada sessão de OHB os animais foram observados por aproximadamente 15 minutos para averiguar se não houve efeitos adversos após o tratamento como: sangramento auditivo, desconforto respiratório, vômitos ou distensão abdominal.

Figura 8 - Câmara hiperbárica experimental



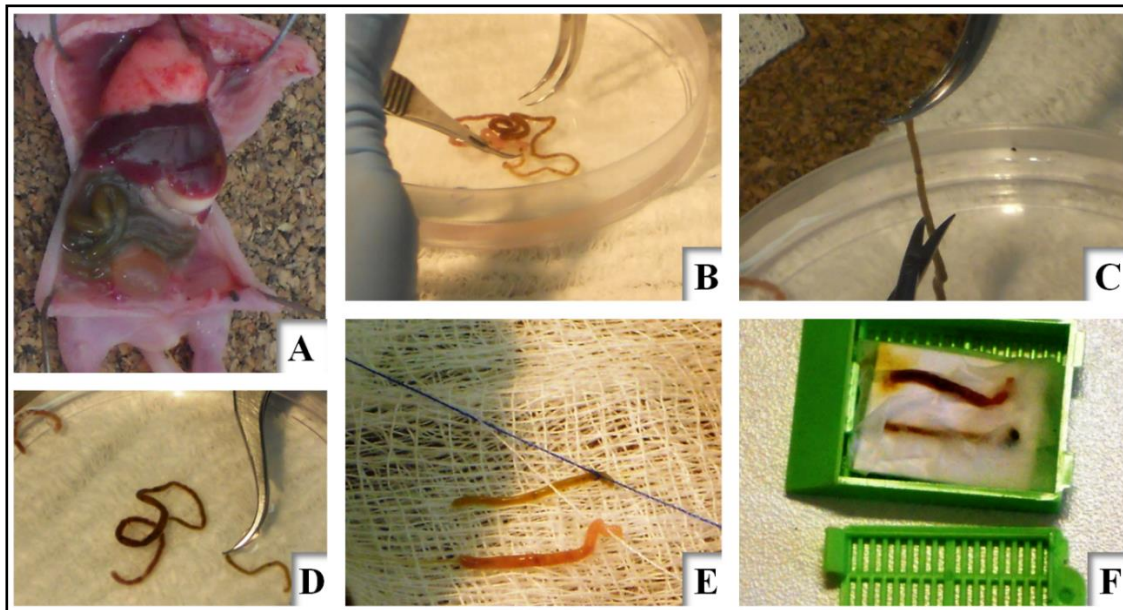
A: fotografia da câmara hiperbárica experimental. **B:** fotografia dos filhotes dispostos em caixa compartimentalizada para início da sessão de OHB. **C:** manômetro pressurizado a 1 Kg/cm² (1 ATM= 1,03323Kg/cm²) **D:** fotografia do visor de acrílico presente na câmara que permite monitoramento visual dos animais durante a sessão (seta). Fonte: elaborado pelo autor.

4.6 Coleta das Amostras

As coletas foram realizadas após 72h do nascimento dos filhotes. Eles foram pesados em balança modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO, USA) e então eutanasiados por decapitação. Uma craniotomia mediana deu acesso ao encéfalo, que foi retirado em bloco. A laparotomia foi efetuada com a abertura do abdome por incisão mediana, fígado e intestino foram removidos e pesados. O intestino foi dissecado sob foco de luz, dividido em dois segmentos a partir do ângulo de Treitz em direção ao íleo distal. Cada segmento com

aproximadamente dois a três centímetros de comprimento foi identificado, a porção do jejuno proximal recebeu um nó utilizando uma linha de algodão comum de cor branca, enquanto o íleo proximal a cor azul. Os segmentos foram acomodados paralelamente em sequência da esquerda para a direita em molduras próprias para histologia e colocados em formalina a 10% (Figura 9).

Figura 9 - Coleta intestinal

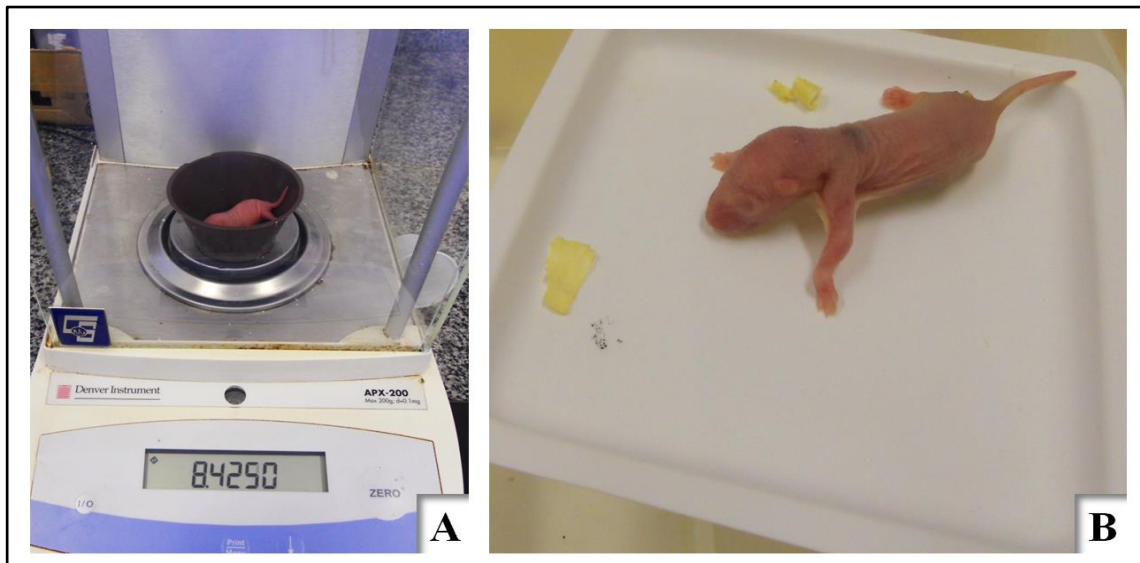


A: fotografia do procedimento de coleta com exposição dos órgãos. **B:** fotografia da placa de Petri com solução fisiológica para dissecação intestinal e retirada do mesentério. **C:** fotografia do isolamento e secção do íleo proximal. **D:** fotografia da separação do jejuno e íleo. **E:** fotografia da identificação dos segmentos com fios de algodão, extremidades proximais: jejuno na cor branca e íleo na cor azul. **F:** fotografia da acomodação dos segmentos em cassete para realização dos estudos histológicos. Fonte: Simões (2014) (77).

4.7 Avaliação biométrica

As avaliações do peso corporal (PC), do peso intestinal (PI) e do peso cerebral (PCer) foram realizadas. Relações corporais foram realizadas para se calcular a proporção do peso das alças intestinais e cerebrais e demonstrar as diferenças entre os grupos, como as razões matemática PI/PC e $PCer/PC$, com o objetivo de se excluir a variável do PC sobre a avaliação do peso dos órgãos (Figura 10).

Figura 10 - Biometria dos animais



A: fotografia da pesagem dos animais após o nascimento. **B:** fotografia filhote desnutrido do grupo ECN. fonte: Simões (2014) (77).

4.8 Processamento histológico intestinal

Após a fixação em paraformaldeído 4% as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol, sendo 70%, 80%, 90% e 100% respectivamente, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Foram realizados cortes transversais dos segmentos de jejuno e íleo com 5 μ m de espessura utilizando-se um micrótomo Leica – Modelo RM214 (Leica, Salzburg, Austria). Posteriormente, os cortes foram corados por Tricômio de Masson, permitindo visualização das fibras colágenas (azul), do citoplasma (rosa) e do núcleo (roxo) ou separadas para imuno-histoquímica (IHQ).

Os cortes foram fotografados com fotomicroscópio NIKON Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Melville, Nova Iorque, Estados Unidos da América) com aumento de 20x para histologia e 40x para IHQ. As imagens foram capturadas utilizando o programa NIS- Elements (Nikon Corporation, Tochigi, Japão) e convertidos em arquivo JPEG.

4.9 Graduação Histológica de Lesão Intestinal

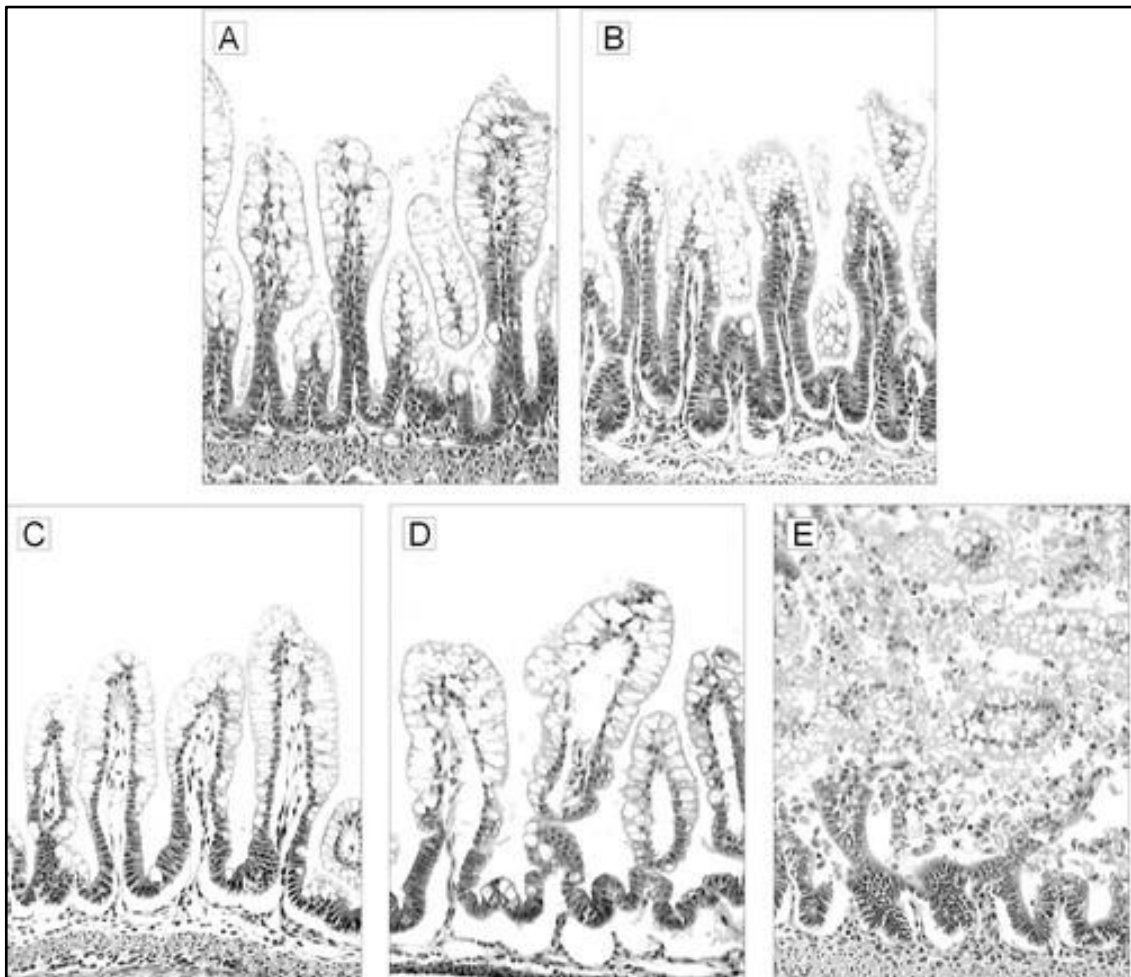
Os filhotes coletados foram avaliados para histologia, sendo três segmentos de íleo por animal. As lâminas foram analisadas por três avaliadores blindados, experientes e independentes.

Cada corte foi analisado de acordo com a graduação descrita por Dvorak *et al.* (2002) (79) em:

- a) 0 = nenhum dano;
- b) 1 = ligeira separação da lâmina própria e/ou submucosa;
- c) 2 = moderada separação da lâmina própria e/ou submucosa, e/ou edema nas camadas submucosa e muscular;
- d) 3 = grave separação da lâmina própria e/ou submucosa, e/ou grave edema nas camadas submucosa e muscular, e/ou descamação das vilosidades;
- e) 4 = perda de vilosidades e necrose.

Pontuações intermediárias de 0,5, 1,5, 2,5 e 3,5 foram também utilizadas para uma avaliação mais precisa dos níveis de lesão intestinal. Para determinar comprometimento tecidual significativo foram considerados animais com escore histológico ≥ 2 (Figura 11).

Figura 11 - Classificação histológica de lesão intestinal



Alterações histológicas na arquitetura intestinal de ratos com ECN. Imagens do íleo de neonatos de ratos corados por hematoxilina e eosina, de acordo com a classificação proposta por Dvorak. Em **A**, íleo normal (graduação 0). Em **B**, nota-se discreta separação entre mucosa e lâmina própria (graduação 1). Em **C**, há moderada separação da lâmina própria e submucosa, com edema nas camadas submucosa (graduação 2). Em **D**, nota-se intensa separação da lâmina própria e submucosa (graduação 3). Em **E**, há perda das vilosidades e necrose (graduação 4). (Magnificação, 20x). Adaptado de Dvorak *et al.* (2006) (79).

4.10 Análise imuno-histoquímica intestinal

Para avaliação da expressão proteica no íleo por IHQ foram avaliados 4 animais por grupo, 10 imagens por animal. As proteínas avaliadas foram:

- a) I-FABP: proteína citosólica de aproximadamente 14-15 kDa, responsável pelo transporte intracelular de ácidos graxos de cadeia longa. Presente nas células epiteliais do vilo do intestino delgado e cólon de ratos e humanos;

- b) iNOS: proteína de 131kDa expressa sob condições inflamatórias, produtora de NO, importante sinalizador celular, principalmente na vasodilação;
- c) SOD3: enzima tetramérica contendo cobre e zinco, produzida em muitos tecidos, principalmente fígado e rim. É lançada no extracelular, sendo a única enzima antioxidante conhecida nesse espaço.

Após desparafinização e hidratação em uma série de etanol, para recuperação antigênica, os cortes foram colocados em solução de citrato de sódio (10mM, pH 6,0) em panela a vapor *Optisteam Plus*, modelo 652, (Marca Krups North America, Inc., Closter, NJ, USA) por 40 minutos. A seguir, foram resfriados em banho maria com gelo por 15 minutos e posteriormente lavados em água destilada. Após estas etapas, o bloqueio da peroxidase endógena foi preparado para a incubação das lâminas em Tampão Fosfato Salino (PBS – Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 0,45M pH7,4) e H₂O₂ (0,5%) por 30 minutos, depois as lâminas foram lavadas em água destilada. O bloqueio foi feito com BSA (soro albumina bovina) durante 1h em câmara escura. Após remoção do tampão de bloqueio, os cortes foram incubados *overnight* à temperatura de 4°C com os anticorpos primários específicos [(goat I-FABP antibody (C-20) sc-16063 e rabbit NOS2 antibody (N-20) sc-651, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)] diluídos 1:200 em BSA.

No segundo dia, os cortes foram lavados em banhos sequenciais de PBS com detergente não iônico Triton (PBST – Na₂HPO₄ 20mM + NaCl 0,45M + Triton 2%, pH7,4) por 20 minutos. Removido o anticorpo primário, foram adicionados os anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase anti-goat feita em rabbit para I-FABP (antibody sc-2768, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e peroxidase com anti-rabbit feita em goat para iNOS (antibody sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluídos a 1:200 em BSA por duas horas. Após esta etapa, os cortes foram lavados e tratados com avidina-biotina (Vectastain ABC kit, *Vector Labs*, CA, USA) diluído 1:20 em PBS ou streptavidina por 50 minutos, depois lavados com PBST, PBS e Tampão Tris-HCl (50mM, pH7,6) sequencialmente. A revelação foi realizada com solução de DAB (3,3'-diaminobenzidino-tetra-hidrocloro; *Sigma*, St Louis, MO, USA) e H₂O₂ por dez minutos. As lâminas foram submetidas à contra coloração com Hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de alcoóis e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Para avaliação da IHQ, utilizamos o Image-Pro Plus software (IPP; Media Cybernetics Corporation, Maryland, USA). A partir da seleção de padrões da expressão da proteína dentro das células, fizemos a marcação e o programa calculou a área marcada. Depois, marcamos toda a área de tecido presente no corte, obtendo a área total. A divisão da área marcada pelo anticorpo pela área total do corte vezes 100 nos deu um valor em porcentagem.

4.11 Análise histológica cerebral

As amostras coletadas foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%), diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados por um micrótomo rotativo em secções de 4 µm de espessura no plano coronal ao nível do bregma -3.72. Para a avaliação da região cortical e do hipocampo, mais especificamente as subáreas: corno de Amon (CA1) e giro denteado (GD). A seguir, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas para microscopia (Knittel, Lowestoft, Reino Unido). As lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por uma hora. A seguir, os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água. Posteriormente, foram corados com hematoxilina-eosina (HE). A citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular foram observadas por um examinador blindado e experiente. Os núcleos corados pela hematoxilina ficam evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, em rosa.

4.12 Análise imuno-histoquímica cerebral

Para a realização das análises IHQ cerebrais, os cortes estendidos foram fixados em lâminas silanizadas Starfrost (Knittel, Lowestoft, Reino Unido). Após o período de secagem, as lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por 30 minutos e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Todas as análises imuno-histoquímicas foram feitas por três observadores cegos ao tratamento e contabilizadas pelo software Image-Pro Plus software (IPP; produced by Media Cybernetics Corporation, Maryland, USA). As proteínas avaliadas foram:

- a) GFAP (*glial fibrillary acid protein*): para avaliar a distribuição e aspecto morfológico da astróglia. Foi avaliada a densidade celular (nº total de células/área) e seu escore de

marcação baseado na intensidade de marcação e na morfologia do astrócito, sendo: 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados; e 2: astrócitos reativos fortemente marcados e com prolongamentos muito grossos;

- b) NeuN (*neuronal nuclei*): de localização nuclear e citoplasmática, para determinar se a ECN e a OHB alteram/preservam o número total e a densidade de neurônios. Foram feitos o cálculo da densidade celular, cálculo da porcentagem de marcação (células positivas/total de células x100) e a aplicação de um escore de intensidade de marcação (1- marcação leve, marrom claro, 2- marcação média, marrom em tom caramelo e 3- marcação forte, marrom escuro);
- c) SOD3: para a avaliação do efeito antioxidante da OHB. Foram feitos o cálculo da densidade celular e o escore de intensidade de marcação, como já citado anteriormente.

O protocolo utilizado na IHQ inclui o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (Dinâmica®, Indaiatuba, Brasil). Posteriormente é feito o bloqueio com soro adequado a 10% (Ab7481, Abcam, Cambridge, UK) diluído em PBS por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* à temperatura de 4° C com o anticorpo primário anti-GFAP Z0334 1:2000 (DAKO, Santa Clara, USA), anti-NeuN Ab104225 1: 1000 (Abcam, Cambridge, UK) e anti-SOD3 SC-101338 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Após lavar o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (biotinilado de cabra anti-rabbit SC-2040 ou anti-mouse SC-2039, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o conjugado estreptavidina - HRP 405210 (BioLegend, Califórnia, USA) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3-diaminobenzidina D8001, Merck Millipore, Massachusetts, USA). Por fim, as lâminas foram submetidas à contra coloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e cobertas por lamínulas montadas com Permount® (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC image plus 2.0, como também os microscópios de luz AxiosKop2 Plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCam Hrc (Carl Zeiss) acoplados à um computador Pentium II equipado com o

software Axio Vision 3.1, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP – USP. Todas as lâminas de histologia e de IHQ foram fotografadas com aumento de 40X.

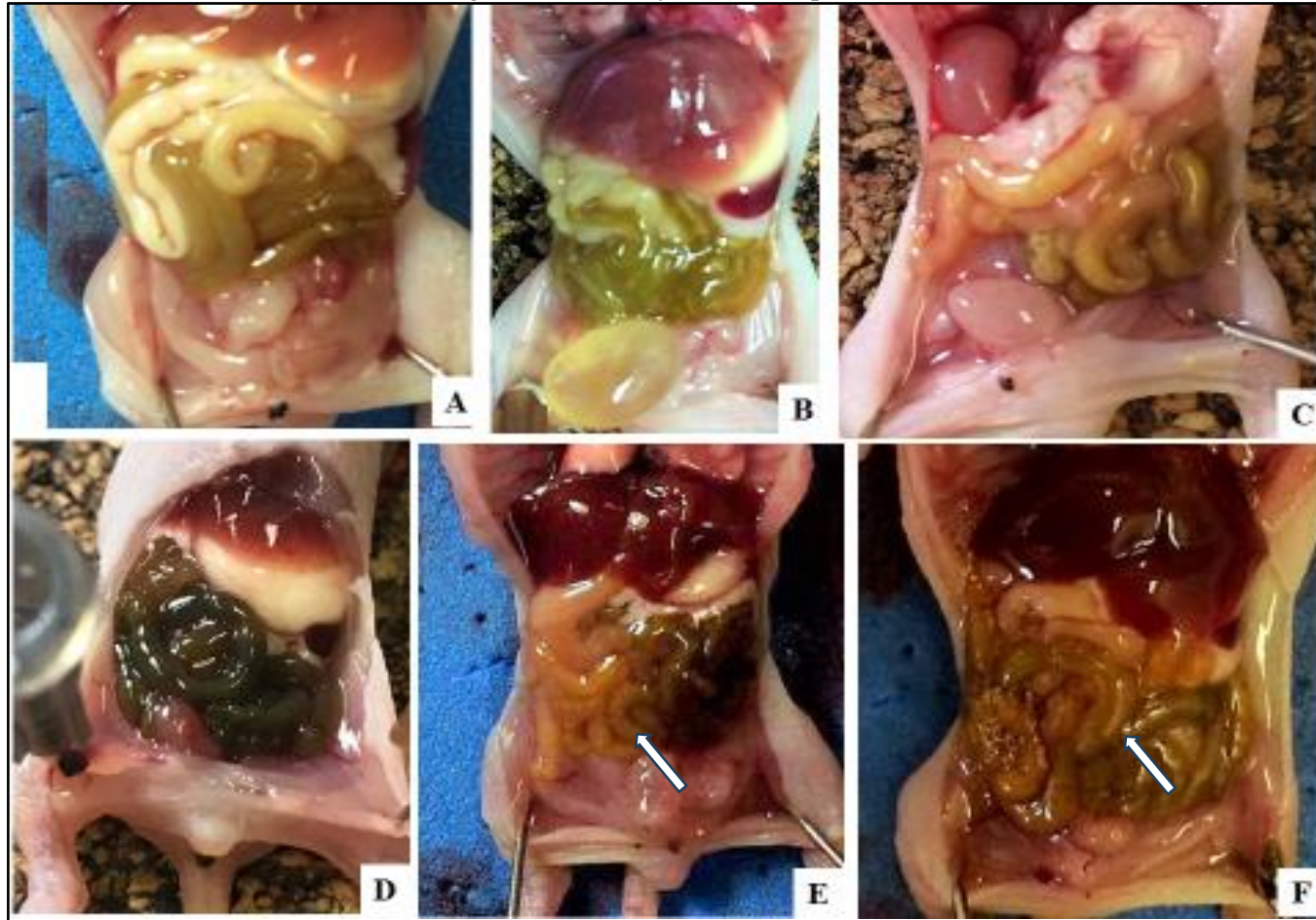
4.13 Análise estatística

Os valores obtidos pela biometria, graduação da lesão histológica e marcação da IHQ foram avaliados pelo método ANOVA *One-way* com pós-teste *Tukey-Kramer* para a comparação de grupos com dados normalmente distribuídos. Teste de *Kruskall-Wallis* com pós teste de *Dunn* foram usados nas comparações de dados não paramétricos. Para avaliação da mortalidade, utilizamos o teste logrank. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão (DP), com resultados significativos para $p < 0.05$. As comparações foram feitas intergrupos. Os cálculos foram feitos utilizando os softwares GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, Califórnia, Estados Unidos da América) e Microsoft Excel (2010).

5. RESULTADOS

Nasceram 133 filhotes de *Sprague-Dawley*, resultantes de 11 ratas prenhez. Antes da coleta, foram excluídos 18 animais, 3 do grupo controle, 1 do grupo COHB2, 5 do grupo ECN, 3 do grupo ECNOHB1 e 6 do grupo ECNOHB2. O motivo da exclusão foi falha na aplicação do protocolo. Morreram 14 filhotes ao longo dos protocolos, restando, portanto, 101 filhotes coletados. Na figura 12, são mostradas fotografias da laparotomia de animais de cada grupo.

Figura 12 - Avaliação macroscópica intestinal

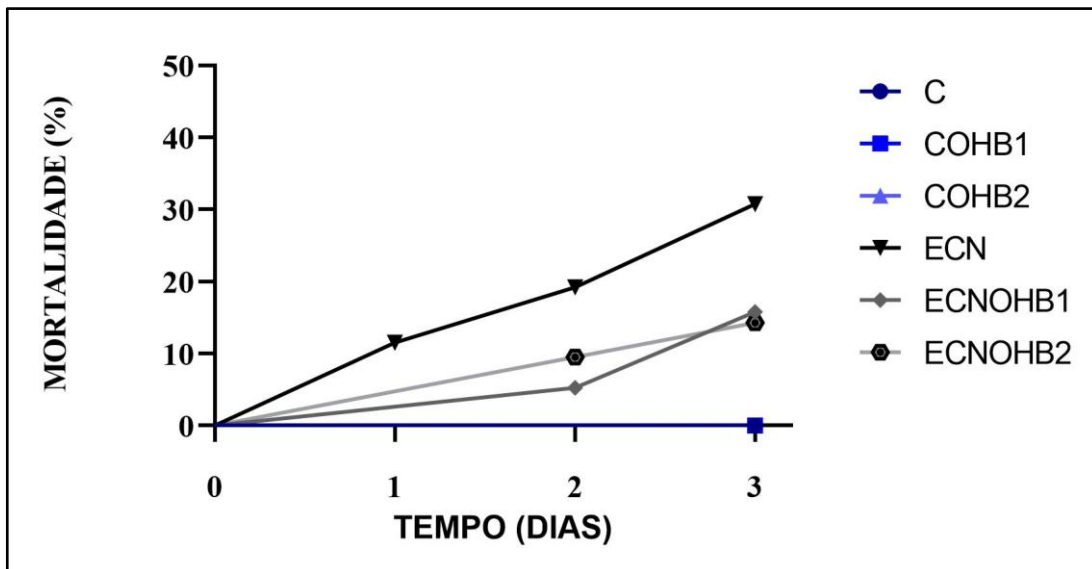


Cada fotografia é representativa de um grupo. Setas brancas em **E** e **F**: intestinos com pneumatose. **A**: C (Controle); **B**: COHB1 (Controle + 1 dia de OHB); **C**: COHB2 (Controle+ 2 dias de OHB); **D**: ECN (enterocolite necrosante); **E**: ECNOHB1 (ECN + 1 dia de OHB); **F**: ECNOHB2 (ECN + 2 dias de OHB).
 Fonte: elaborado pelo autor.

5.1 Mortalidade

A mortalidade ao longo dos protocolos variou entre os grupos. Os grupos C, COHB1 e COHB2 não tiveram nenhum óbito. Já o grupo ECN concentrou a maior proporção de óbitos, 30,77% (8/26). No grupo ECNOHB1, 15,79% (3/19) dos animais morreram e no grupo ECNOHB2, 14,28% (3/21). A mortalidade ao longo dos dias de protocolo está demonstrada no Gráfico 1. Na comparação das curvas de sobrevivência, não houve diferença estatística na mortalidade entre os grupos ECN (teste logrank $p=0,26$).

Gráfico 1 – Curva de Mortalidade



Porcentagem de óbitos em cada grupo ao final de cada dia do protocolo. No eixo Tempo, 0 é o nascimento e 3 o final do terceiro dia de vida, quando se procedeu a coleta. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

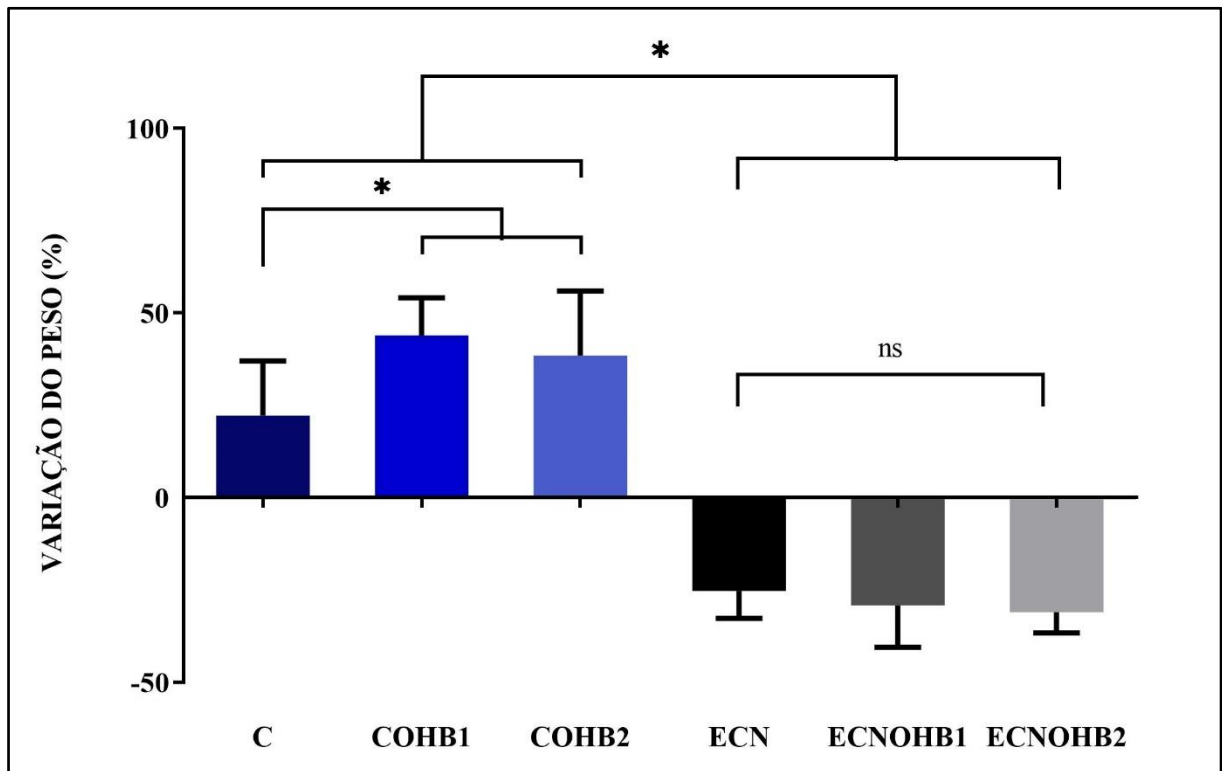
5.2 Análise morfológica corporal e intestinal

A porcentagem de variação do peso foi calculada pela diferença entre o peso corporal na coleta (D3) menos o peso ao nascimento (D0), dividido pelo peso do nascimento. Todos grupos controle (C, COHB1 e COHB2) tiveram médias de variação do PC positivas. A diferença entre

as variações comparando-se o grupo C com o grupo COHB1 e com o COHB2 foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na comparação entre a variação do PC dos animais dos grupos COHB1 e COHB2 (Apêndice A).

Os grupos ECN (ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2) apresentaram médias de variação do PC negativas. Os animais do grupo ECNOHB1 perderam em média 29,25% de PC, e os do grupo ECNOHB2 perderam em média 31,06% do PC. O grupo ECN teve variação menor, com média de 25,28% de perda de PC. Apesar dessa diferença, as comparação entre os grupos ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2 não foram estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Gráfico 2) (Apêndice A).

Gráfico 2 – Variação do peso corporal



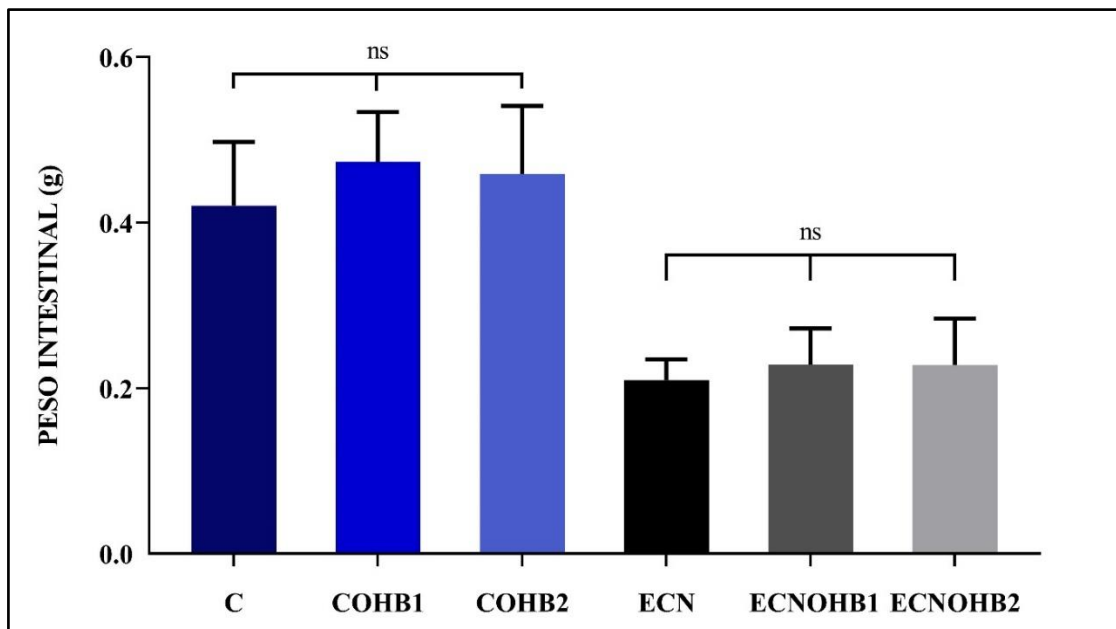
Variação do PC dos animais ao longo dos dias do protocolo (PC no D3 menos PC no D0, dividido pelo PC no D0 x 100). C: $*p < 0,05$. ns: não significativo. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pela autora.

Na avaliação do peso intestinal (PI), grupos controles apresentaram médias de PI maiores, sendo 0,42g ($\pm 0,07$ g), 0,473g ($\pm 0,06$ g) e 0,459g ($\pm 0,08$ g) respectivamente para os

grupos C, COHB1 e COHB2. Os grupos com ECN apresentaram médias de PI menores, sendo 0,209g (\pm 0,02g) para ECN, 0,228g (\pm 0,04g) para ECNOHB1 e 0,228g (\pm 0,05g) para ECNOHB2. A análise estatística mostrou diferença significativa na comparação entre grupos controle (C, COHB1 e COHB2) e grupos ECN (ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos ECN, como também não houve entre os grupos C (Gráfico 3) (Apêndice A).

Ao analisar a relação PI/PC, não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos (Apêndice A).

Gráfico 3 – Peso intestinal



Peso intestinal em gramas (g). Comparando-se grupos controle com grupos ECN, houve diferença em todas as comparações. * $p < 0,05$. ns: não significativo. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Graduação Histológica de Lesão Intestinal

A avaliação da histologia feita através do escore de lesão histológica intestinal apresentou valores médios de 0,20 para o grupo C, 0,96 para o grupo COHB1 e de 0,85 para o

grupo COHB2. Os grupos ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2 tiveram scores médios de 3,36, 1,71 e 1,74 respectivamente (Tabela 1) (Apêndice B).

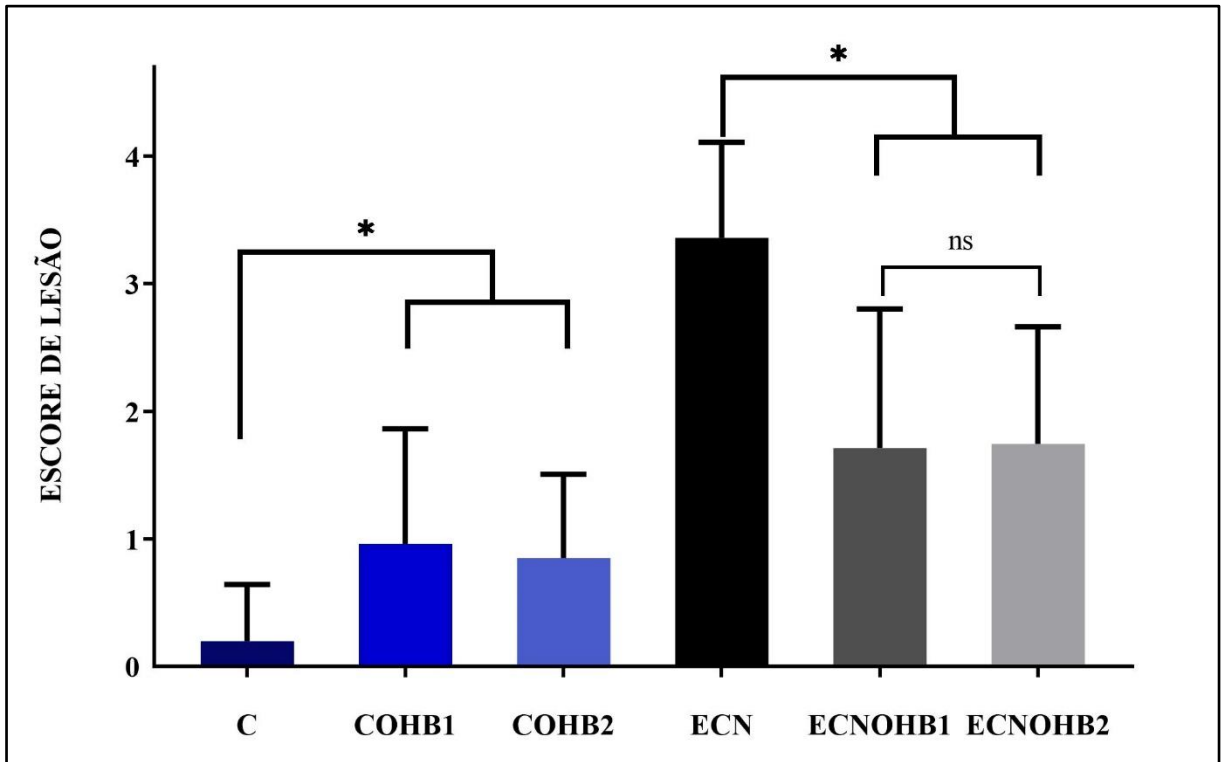
Os grupos COHB1 e COHB2 apresentaram graduação histológica mais alta quando comparados ao C ($p < 0,05$). Entre si, os grupos COHB1 e COHB2 não apresentaram diferença significativa. Todos os grupos C apresentaram graduação menor que o grupo ECN ($p < 0,05$). O grupo ECN teve graduação maior que os grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 ($p < 0,05$), não havendo diferença estatística na comparação entre os dois últimos (Gráfico 4, Figura 13).

Tabela 1 – Escore de lesão histológica intestinal

	C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
N	11	7	11	12	10	10
Média	0,20*	0,96*	0,85*	3,36	1,71*	1,74*
Desvio Padrão	0,445	0,904	0,66	0,748	1,09	0,919

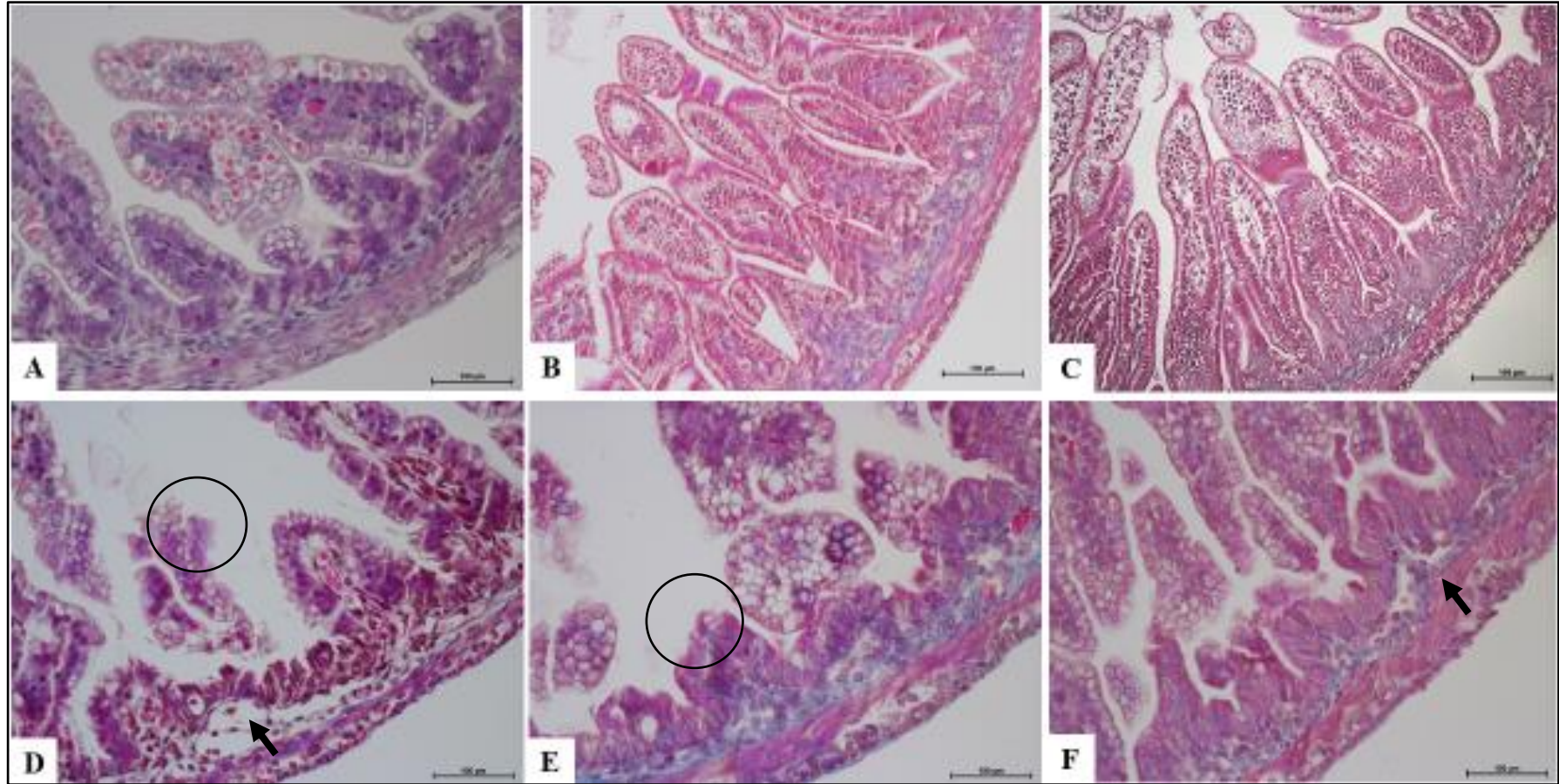
Valores expressos em média e desvio padrão. N: número de animais avaliados em cada grupo. *: diferença significativa com o grupo ECN ($p < 0,05$). C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB.

Gráfico 4 – Escore de lesão histológica intestinal



Valores expressos em média e DP do escore de lesão histológica intestinal. Não apresentaram diferença significativa as comparações COHB1 vs. COHB2, COHB2 vs. ECNOHB1, COHB1 vs. ECNOHB1, ECNOHB1 vs. ECNOHB2. Todas as demais avaliações intergrupos mostraram diferença estatisticamente significativa. * $p < 0,05$. ns: não significativo. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 13 - Cortes histológicos do fêo



Coloração: Tricômio de Masson. Aumento de 20x. Barra de escala = 100µm. Cada fotomicrografia é representativa de um grupo. **A:** C (Controle); **B:** COHB1 (Controle + 1 dia de OHB); **C:** COHB2 (Controle+ 2 dias de OHB); **D:** ECN (enterocolite necrosante); **E:** ECNOHB1 (ECN + 1 dia de OHB); **F:** ECNOHB2 (ECN + 2 dias de OHB). Setas em **D** e **F**: separação da lâmina própria. Círculos em **D** e **E**: perda de vilosidades. Fonte: elaborado pelo autor.

5.4 Análise por imuno-histoquímica intestinal

Análises por IHQ dos íleos de 4 animais por grupo foram feitas. A avaliação foi baseada na porcentagem de área marcada do corte.

5.4.1 iNOS

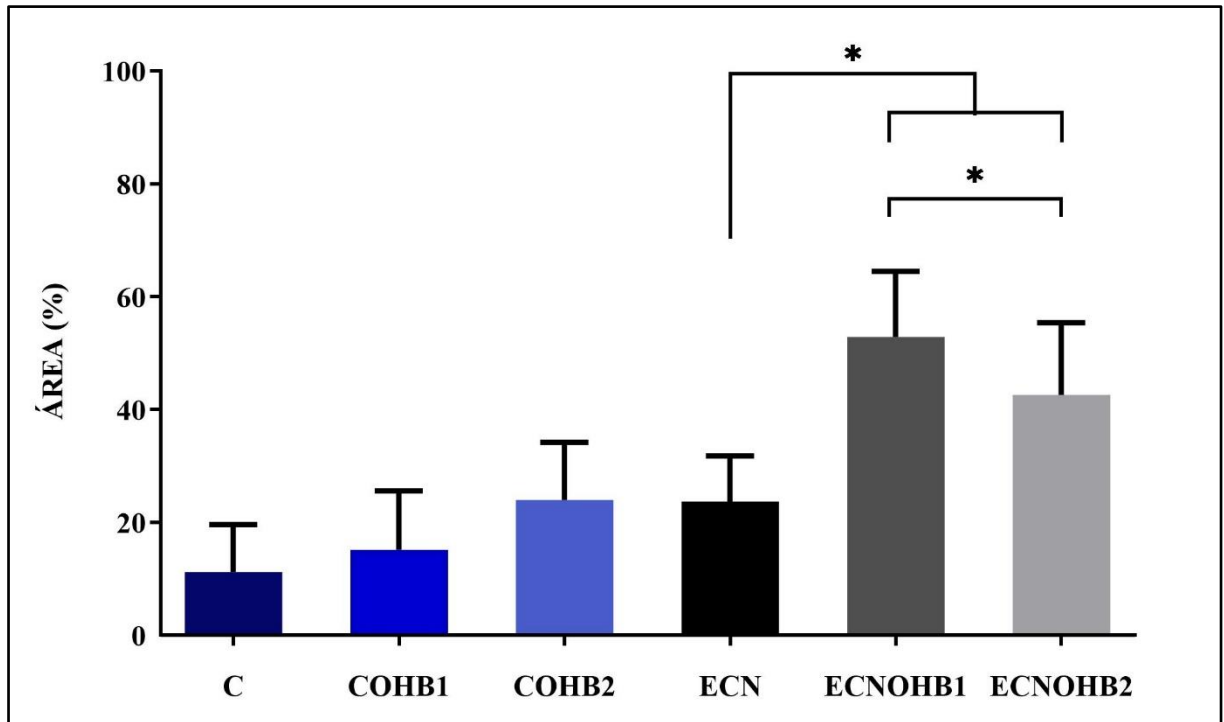
Na avaliação da expressão de iNOS por área marcada no íleo dos animais, encontramos aumento desta nos grupos ECN em comparação com o grupo C. A porcentagem de área marcada foi maior nos grupos ECNOHB1 (52,88%) com relação ao ECNOHB2 (42,59%) ($p<0,05$). Ambos os grupos tratados tiveram diferença significativa em relação ao ECN (23,72%) ($p<0,05$). Também houve diferença na comparação entre os grupos COHB1 (15,19%) e COHB2 (23,99%) ($p<0,05$), e entre os grupos C (11,23%) e COHB2 ($p<0,05$). Demais comparações não mostraram diferença significativa (Tabela 2, Gráfico 5, Figura 14) (Apêndice C).

Tabela 2 – Avaliação imuno-histoquímica da iNOS

	C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
Média	11,23*	15,19	23,99	23,72	52,88*	42,59*
Desvio Padrão	8,4	10,41	10,23	8,06	11,58	12,8

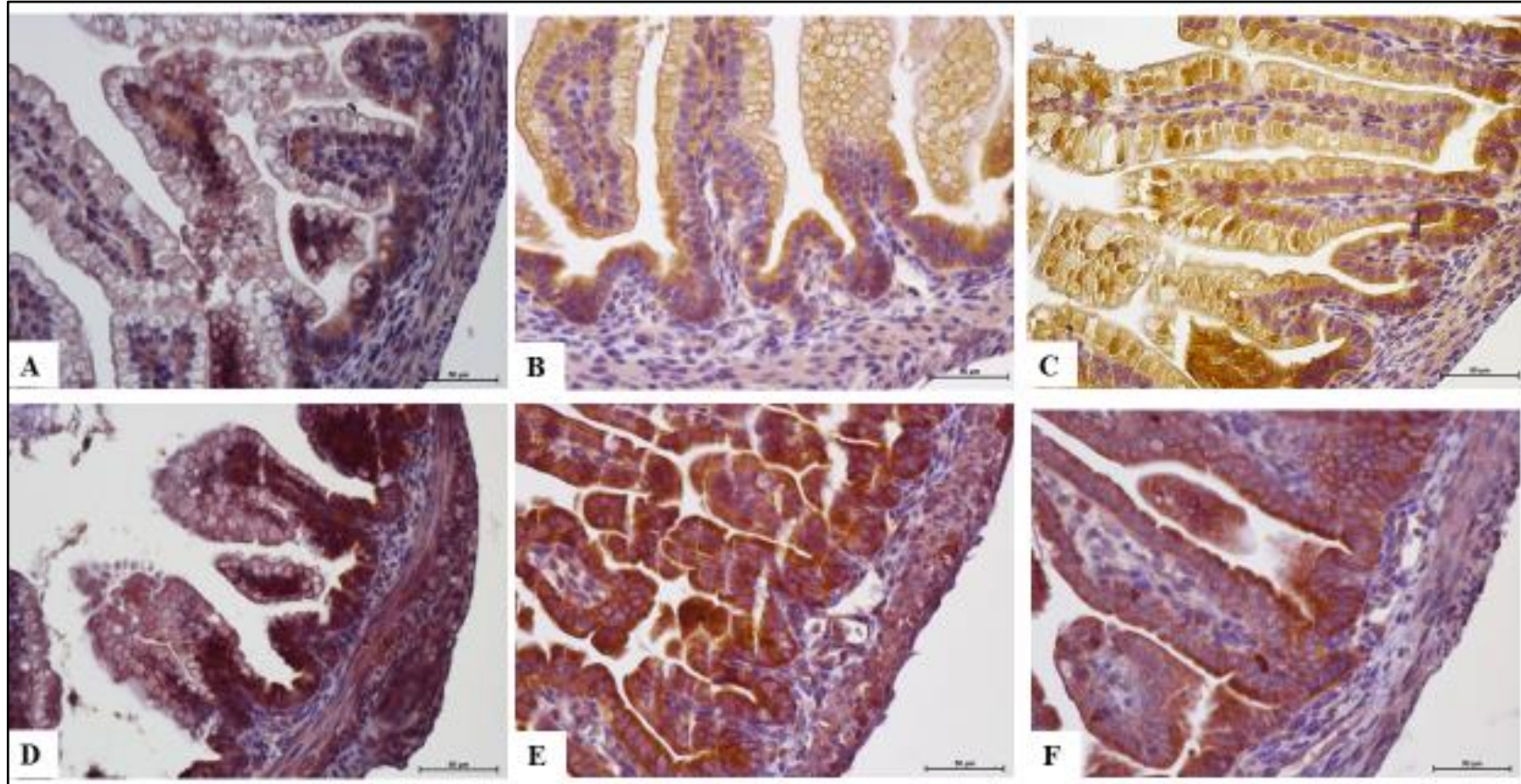
Valores de média e desvio padrão da análise por porcentagem da área marcada no corte pela iNOS no íleo. *: diferença significativa com o grupo ECN ($p<0,05$). C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Gráfico 5 – Avaliação imuno-histoquímica da iNOS



Valores expressos em média e DP da porcentagem da área do corte marcada pela iNOS no íleo. *: $p < 0,05$. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 - Análise imuno-histoquímica da expressão da iNOS no íleo



Cortes de íleo com imunomarcção para iNOS. Aumento 40x. Barra de escala = 50 μ m. **A:** C (Controle); **B:** COHB1 (Controle + 1 dia de OHB); **C:** COHB2 (Controle+ 2 dias de OHB); **D:** ECN (enterocolite necrosante); **E:** ECNOHB1 (ECN + 1 dia de OHB); **F:** ECNOHB2 (ECN + 2 dias de OHB). Fonte: elaborado pelo autor.

5.4.2 I-FABP

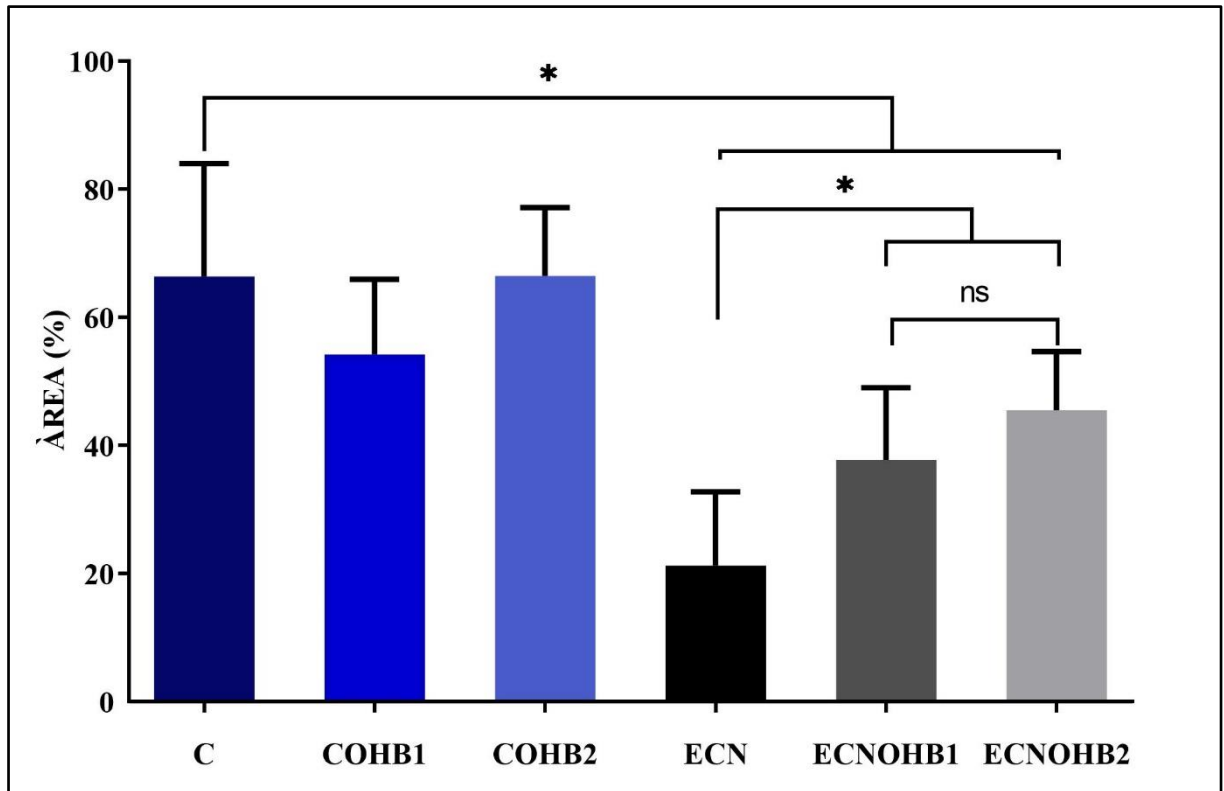
Na análise da expressão de I-FABP por porcentagem de área marcada, os grupos ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2 tiveram graduação média menor que o grupo C ($p < 0,05$). O grupo ECN também teve menor expressão do marcador que os grupos COHB1, COHB2, ECNOHB1 e ECNOHB2 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos C e COHB2. Também não houve diferença significativa entre os grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 (Tabela 3, Gráfico 6, Figura 15) (Apêndice D).

Tabela 3 - Avaliação imuno-histoquímica da I-FABP

	C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
Média (%)	66,35*	54,25*	66,45*	21,26	37,76*	45,46*
Desvio Padrão	17,68	11,7	10,68	11,5	11,28	9,22

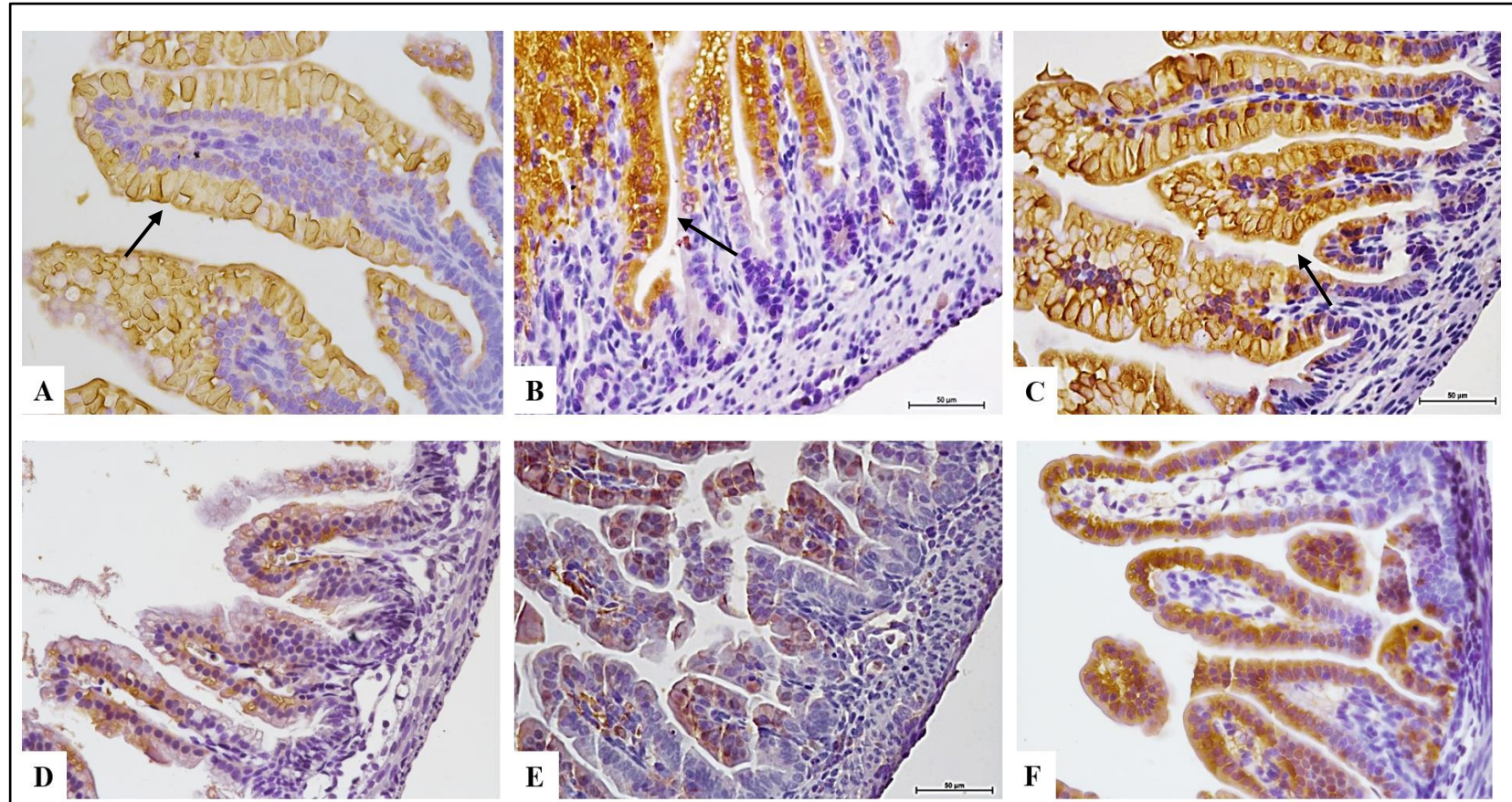
Valores de média e desvio padrão da análise por porcentagem de área marcada no corte pela I-FABP no íleo. *: diferença significativa com o grupo ECN ($p < 0,05$). C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Gráfico 6 – Avaliação imuno-histoquímica da I-FABP



Valores expressos em média e DP da porcentagem da área do corte marcada pela I-FABP no íleo.*: $p < 0,05$. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 15 - Análise imuno-histoquímica intestinal da expressão da I-FABP



Cortes de íleo com imunomarcção para I-FABP. Aumento 40x. Barra de escala = 50µm. **A: C** (Controle); **B: COHB1** (Controle + 1 dia de OHB); **C: COHB2** (Controle+ 2 dias de OHB); **D: ECN** (enterocolite necrosante); **E: ECNOHB1** (ECN + 1 dia de OHB); **F: ECNOHB2** (ECN + 2 dias de OHB). Observa-se aumento da área marcada pela I-FABP nos grupos C (setas pretas). Fonte: elaborado pelo autor.

5.4.3 SOD3

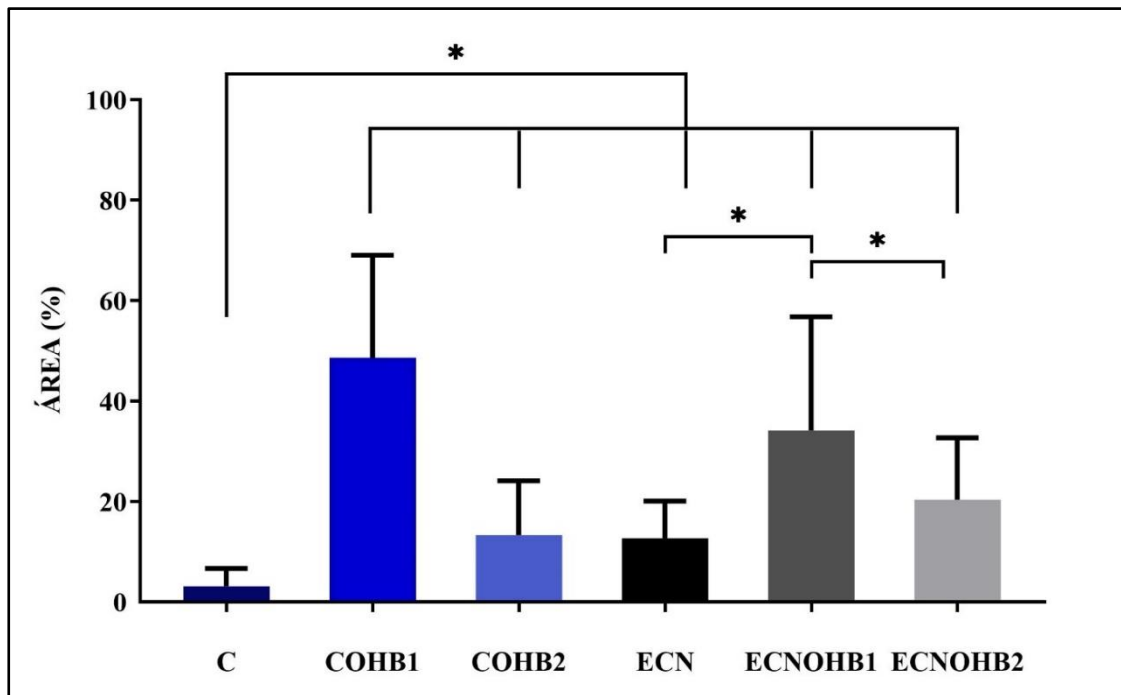
Na avaliação da expressão de SOD no íleo dos animais, todos os grupos tiveram maior área marcada quando comparados ao grupo C ($p < 0,05$). O grupo ECN teve expressão menor quando comparado aos grupos ECNOHB1 ($p < 0,05$), porém sem diferença significativa com o grupo ECNOHB2. Já a comparação entre os grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 mostrou maior área marcada no primeiro ($p < 0,05$). O grupo COHB1 teve maior marcação comparado a todos os grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa comparando o grupo COHB2 com grupo ECN e com o ECNOHB2 (Tabela 4, Gráfico 7, Figura 16) (Apêndice E).

Tabela 4 - Avaliação imuno-histoquímica da SOD3.

	C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
Média (%)	3,12*	48,57*	13,29	12,66	34,12*	20,38
Desvio Padrão	3,56	20,45	10,83	7,44	22,62	12,27

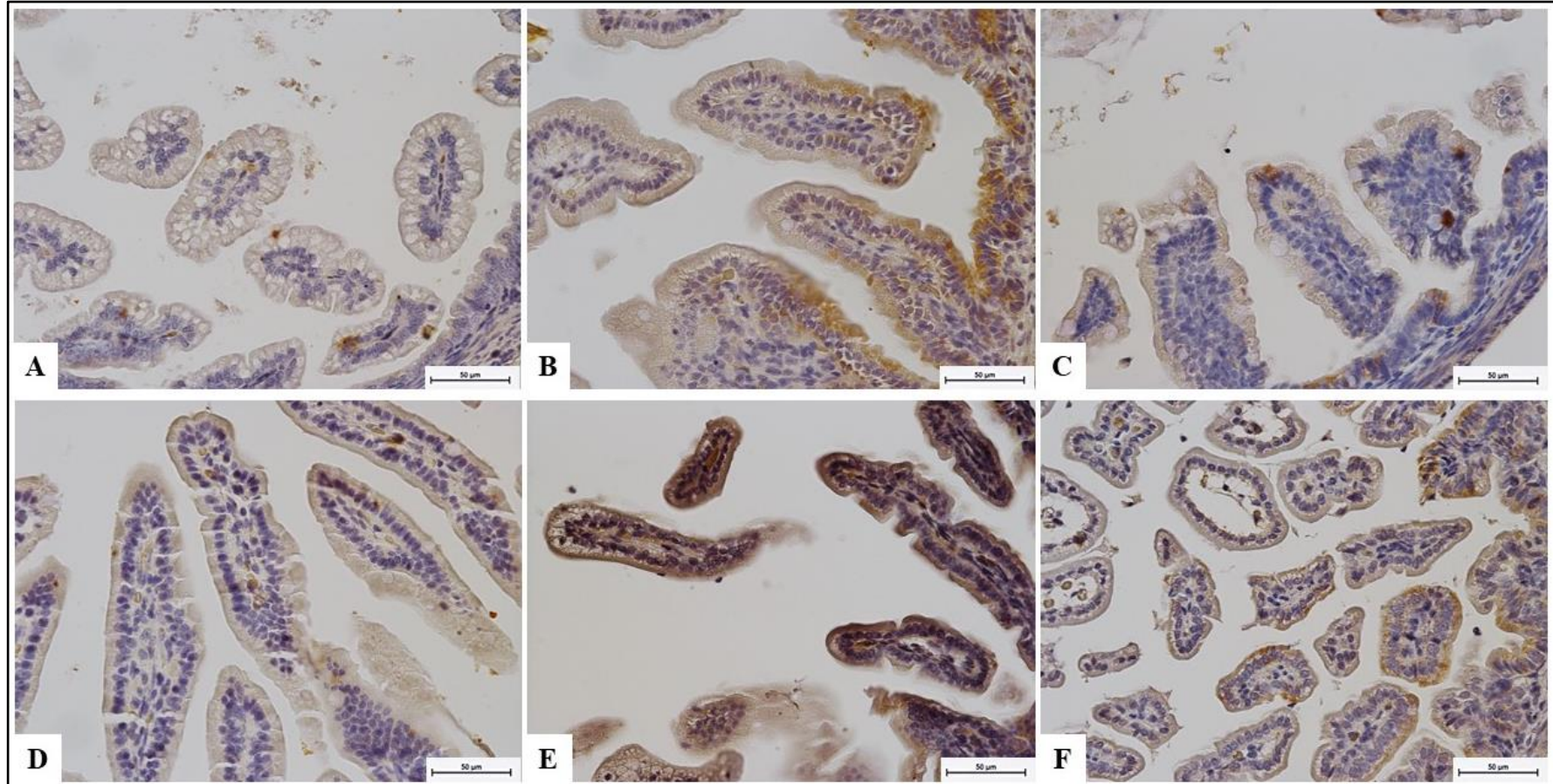
Valores de média e desvio padrão da análise por porcentagem de área marcada no corte pela SOD3 no íleo. *: diferença significativa com o grupo ECN ($p < 0,05$). C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Gráfico 7 – Avaliação imuno-histoquímica da SOD3



Valores expressos em média e DP da porcentagem da área do corte marcada pela SOD3 no íleo. A área marcada do grupo C foi menor que de todos os demais grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos ECN e ECNOHB2, COHB2 e ECN, COHB2 e ECNOHB2. $*p < 0,05$. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN + 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 16 - Análise imuno-histoquímica intestinal da SOD3

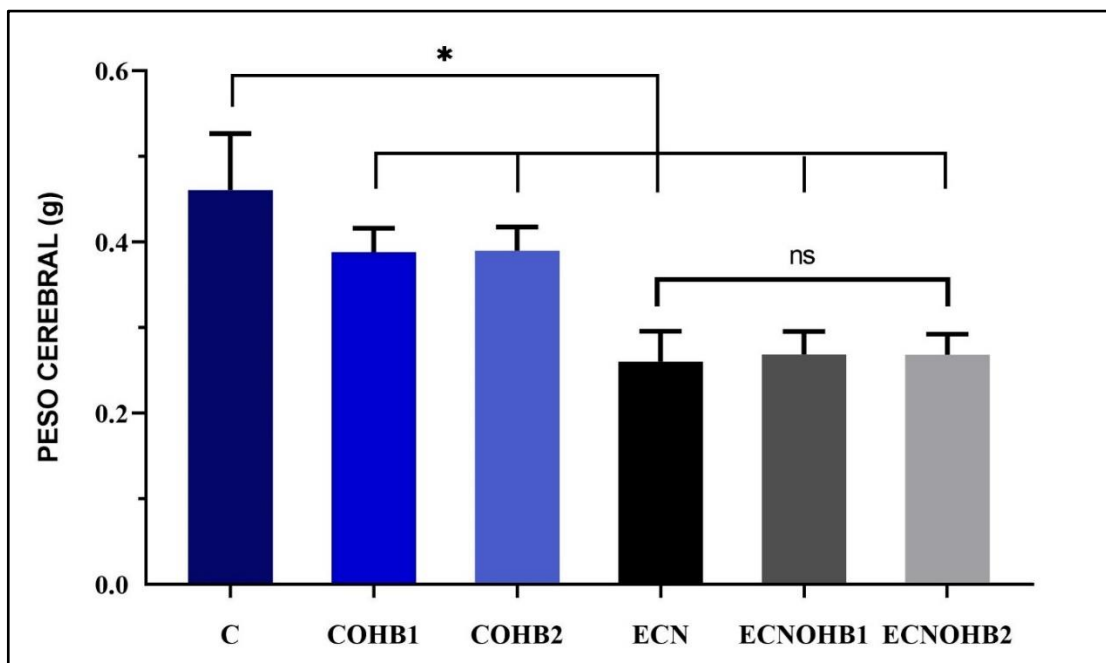


Cortes de íleo com imunomarcção para SOD3. Aumento 40x. Barra de escala = 50µm. **A:** C (Controle); **B:** COHB1 (Controle + 1 dia de OHB); **C:** COHB2 (Controle+ 2 dias de OHB); **D:** ECN (enterocolite necrosante); **E:** ECNOHB1 (ECN + 1 dia de OHB); **F:** ECNOHB2 (ECN + 2 dias de OHB). Fonte: elaborado pelo autor.

5.5 ANÁLISE DO PESO CEREBRAL

Todos os animais tiveram os cérebros pesados na coleta no D3. As médias dos Pcer apresentaram diferenças entre os grupos controle e doença ($p < 0,05$). A média do grupo C foi de 0,46g ($\pm 0,07$), COHB1 de 0,39g ($\pm 0,03$ g), COHB2 de 0,39g ($\pm 0,03$ g), ECN de 0,26g ($\pm 0,04$ g), ECNOHB1 de 0,27g ($\pm 0,03$ g) e ECNOHB2 de 0,27g ($\pm 0,02$ g). As comparações entre o grupo C com todos os demais grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). COHB1 e COHB2 tiveram a mesma média de peso cerebral. Já as comparações entre os grupos ECN e ECNOHB1 e ECOHB2, e ECNOHB1 e ECNOHB2 não foram significativas (Gráfico 8) (Apêndice A).

Gráfico 8 – Peso cerebral



Valores expressos em média e DP. * $p < 0,05$, ns: não significativo. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

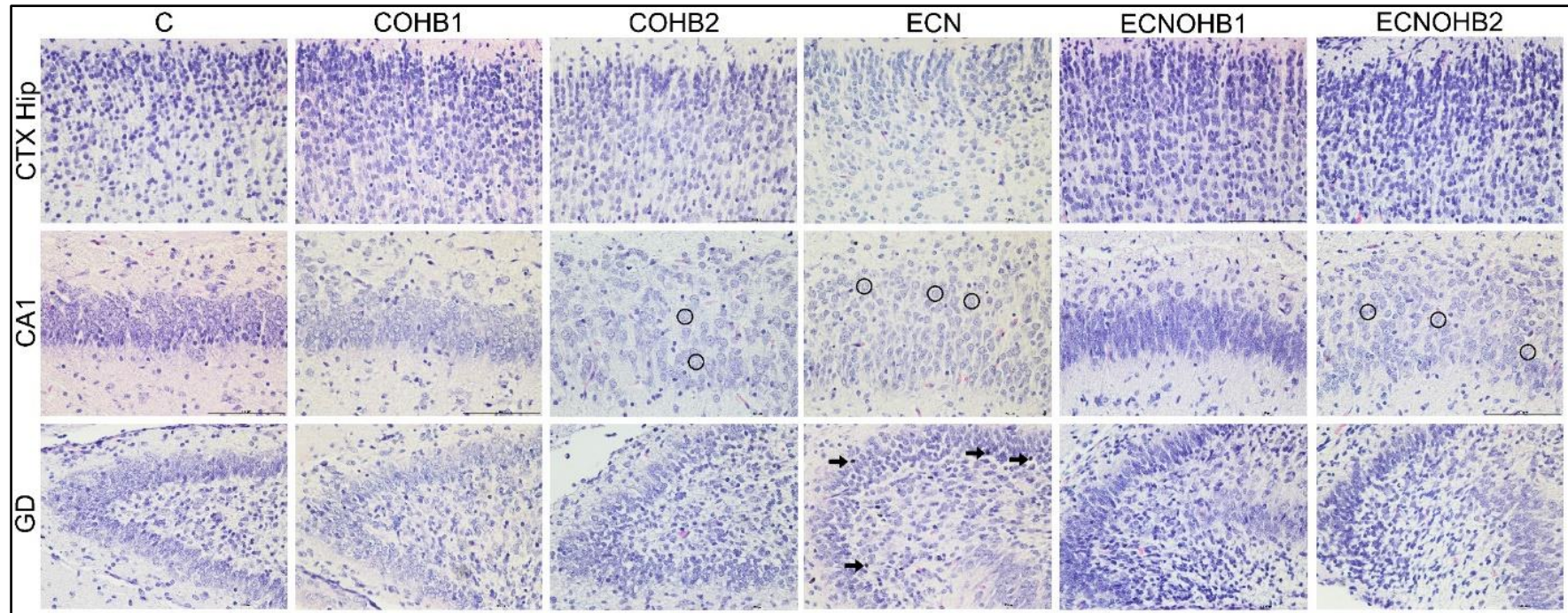
A razão Pcer/PC não teve diferença significativa na comparação entre os grupos ECN ($0,059 \pm 0,008$), ECNOHB1 ($0,06 \pm 0,006$) e ECNOHB2 ($0,059 \pm 0,004$). COHB1 ($0,041 \pm 0,002$)

vs. COHB2 ($0,045 \pm 0,004$) e C ($0,053 \pm 0,007$) vs. ECN também não mostraram diferença significativa. As demais comparações intergrupos foram estatisticamente significativas.

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA CEREBRAL

Na avaliação da histologia cerebral, a sub-região hipocampal do GD foi a que se mostrou mais comprometida no grupo ECN. Em muitos animais, a região estava sem a forma comum do giro, com sua morfologia comprometida. Observamos também muitos neurônios em picnose (processo de degeneração), o que sugere maiores danos na região, além de uma menor população celular. Em CA1, foi observado que a camada celular era mais esparsa e desorganizada. No córtex cerebral não observamos alterações entre os grupos. A laminação cortical estava preservada e as células com aspectos morfológicos normais. Quando comparamos os cortes do grupo ECN com os do grupo ECNOHB1, observamos nitidamente uma maior quantidade de células presentes no grupo tratado. No grupo ECNOHB2, foram vistas menos células preservadas que o grupo C e mais células que o grupo ECN. Na região de CA1 desse grupo, observamos que os neurônios estavam esparsos, assim como no grupo ECN, perdendo a organização morfológica. No GD, observaram-se maiores danos no grupo ECNOHB2 quando comparado ao grupo ECNOHB1. As células apresentavam-se em menor quantidade e com aspecto espumoso, de certa forma, bem semelhantes ao grupo ECN (Figura 17).

Figura 17 - Análise histológica cerebral



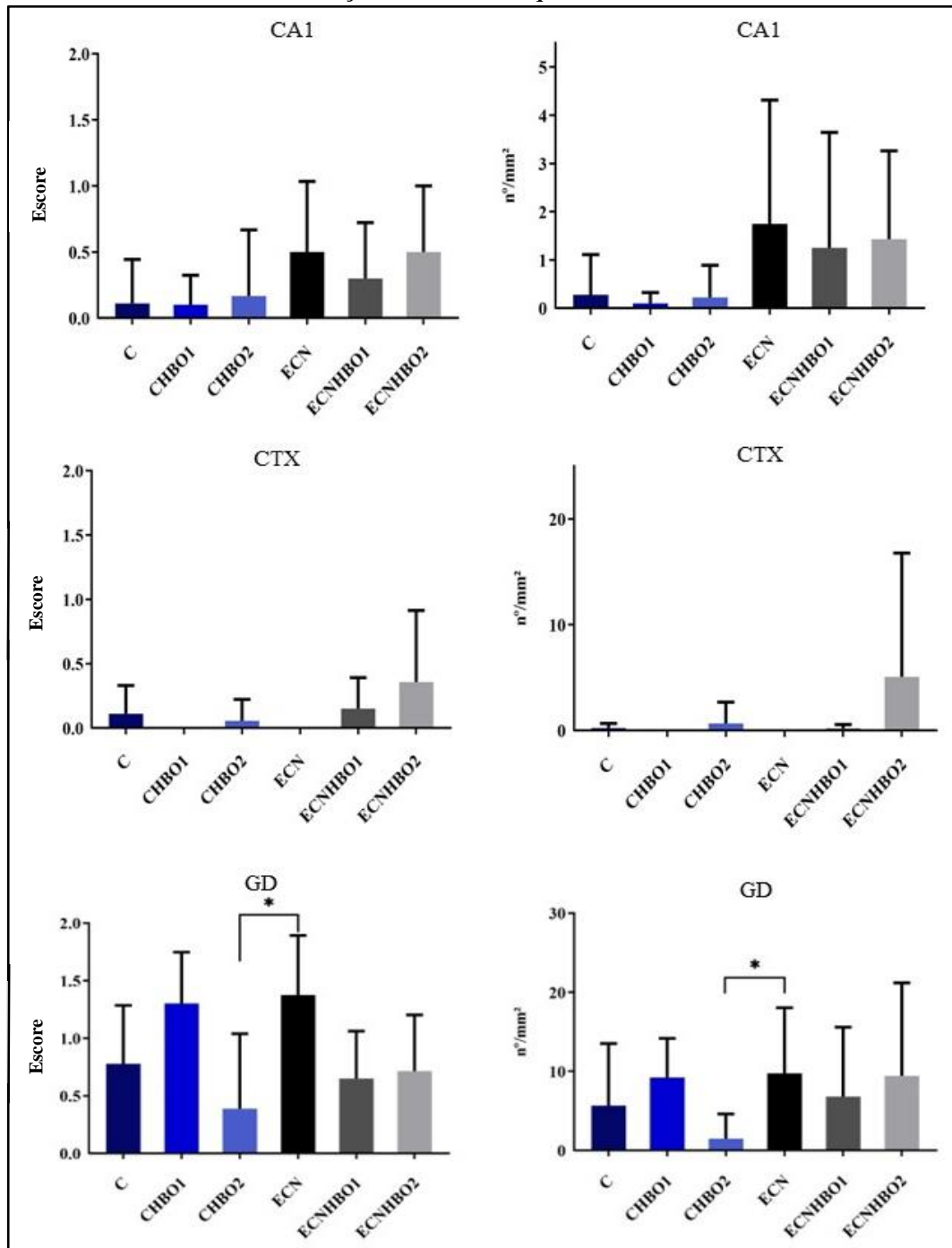
Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento de 40x. Barra de escala: 100 μ m. CTX Hip: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro denteado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Em CA1, observa-se que os grupos COHB2, ECN e ECNOHB2 apresentam a camada celular esparsa, desorganizada e células com aspecto espumoso (círculos) em comparação aos demais grupos. No GD, presença de células em processo de picnose (setas).
Fonte: elaborada pelo autor.

5.7 Análise por imuno-histoquímica cerebral

5.7.1 GFAP

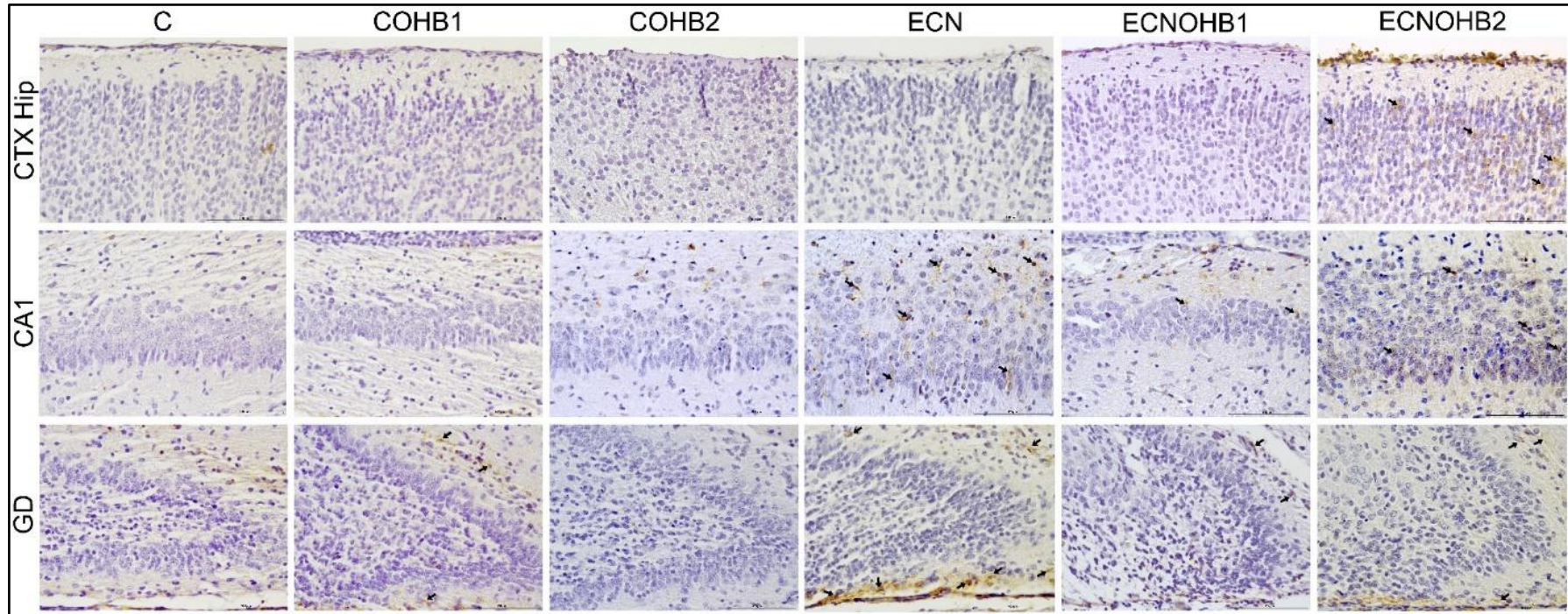
Na análise da proteína GFAP, observamos que a ECN parece não afetar diretamente o córtex cerebral a nível de inflamação, visto que o grupo ECN não apresentou astrogliose reativa. Já no hipocampo, os resultados mostram que a doença afetou as regiões de CA1 e do GD, com a maior quantidade de astrócitos reativos presentes no grupo ECN. Diferenças foram encontradas entre o grupo ECN e o grupo COHB2 ($p < 0,05$), sendo o grupo doente com a maior taxa de marcação e intensidade (Gráfico 9, Figura 18, Tabela 5) (Apêndices F-K).

Gráfico 9 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP



Valores expressos em média e DP. *: $p < 0,05$. CTX: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro dentado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18 - Análise imuno-histoquímica cerebral da GFAP

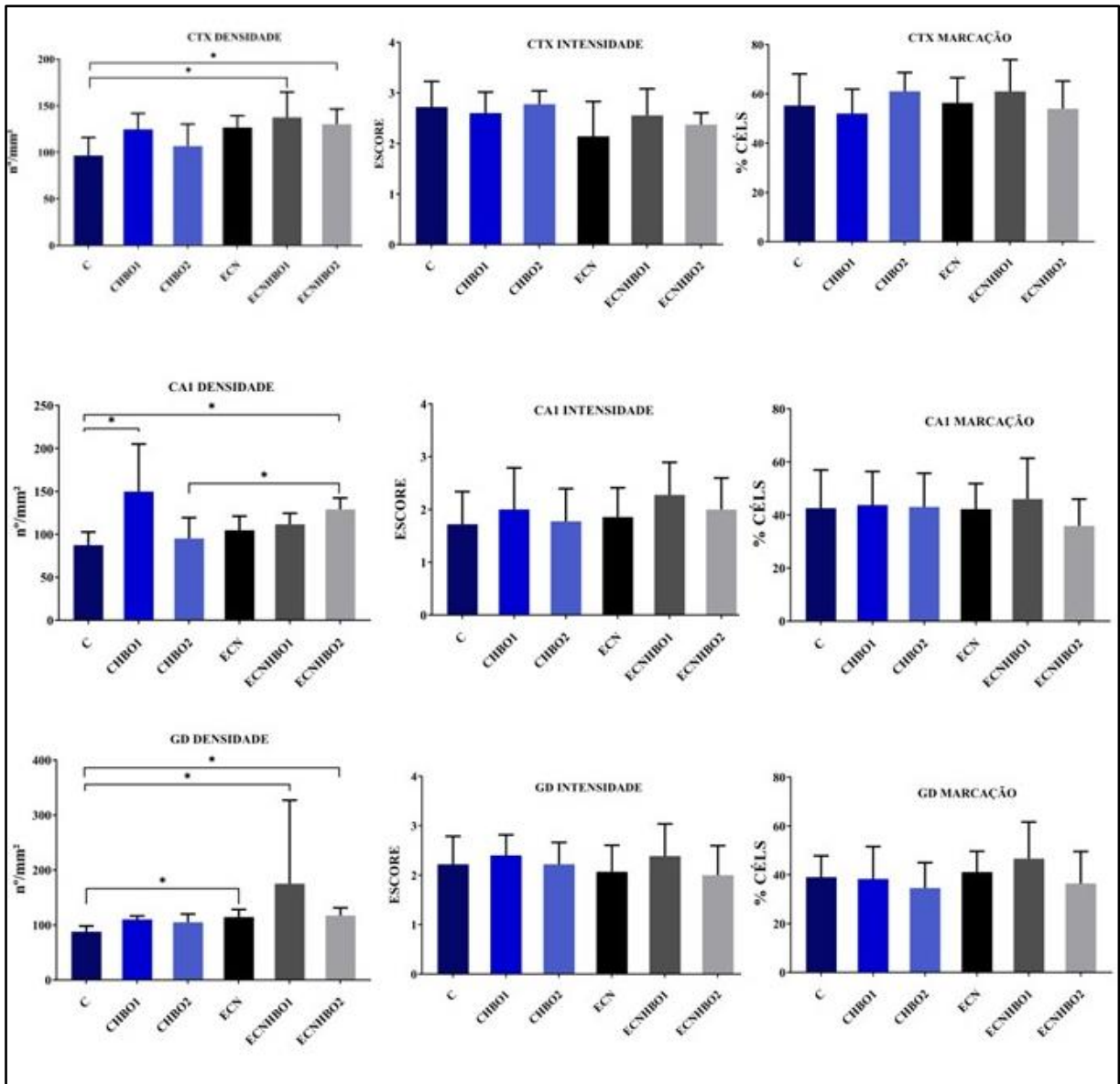


Cortes de cérebro com imunomarcção para GFAP. Aumento 40x. Barra de escala: 100 µm. Setas: astrócitos reativos. CTX Hip: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro denteado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

5.7.2 NeuN

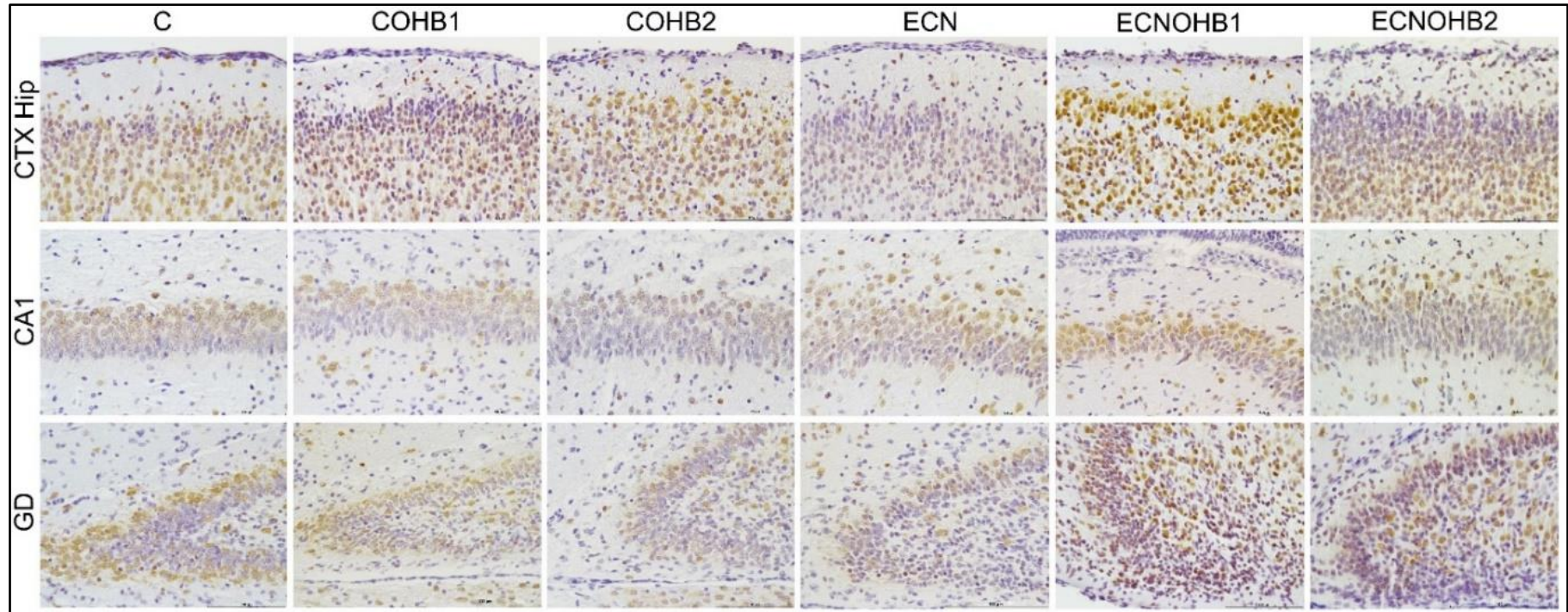
A análise IHQ de NeuN no CTX mostrou que os grupos tratados com OHB apresentaram uma preservação na densidade da população neuronal cortical um pouco maior que o grupo ECN, sem diferença significativa. Diferenças foram encontradas entre o grupo C e os grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 ($p < 0,05$), sendo o grupo controle o que apresentou menor densidade celular. A taxa de marcação foi bem semelhante entre os grupos, nas três áreas avaliadas. A intensidade de marcação no grupo ECN apresentou o menor escore em todas as áreas, e o grupo com a intensidade mais alta dentre os animais tratados foi o ECNOHB1, porém sem diferenças significativas. No CA1, houve diferenças nas comparações dos grupos C *vs.* COHB1, C *vs.* ECNOHB2 e COHB2 *vs.* ECNOHB2 ($p < 0,05$). Na avaliação do GD, a densidade celular foi menor nas comparações C *vs.* ECN, ECNOHB1 e ECNOHB2 ($p < 0,05$). Nessa área, o grupo ECNOHB1 apresentou médias de densidade, intensidade e marcação maiores que o grupo ECN e ECNOHB2, mas sem diferença estatisticamente significativa. (Gráfico 10, figura 19, Tabelas 5 e 6) (Apêndices L-T).

Gráfico 10 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da NeuN



Valores expressos em média e DP. *: $p < 0,05$. CTX: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro dentado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19 - Análise imuno-histoquímica cerebral da NeuN

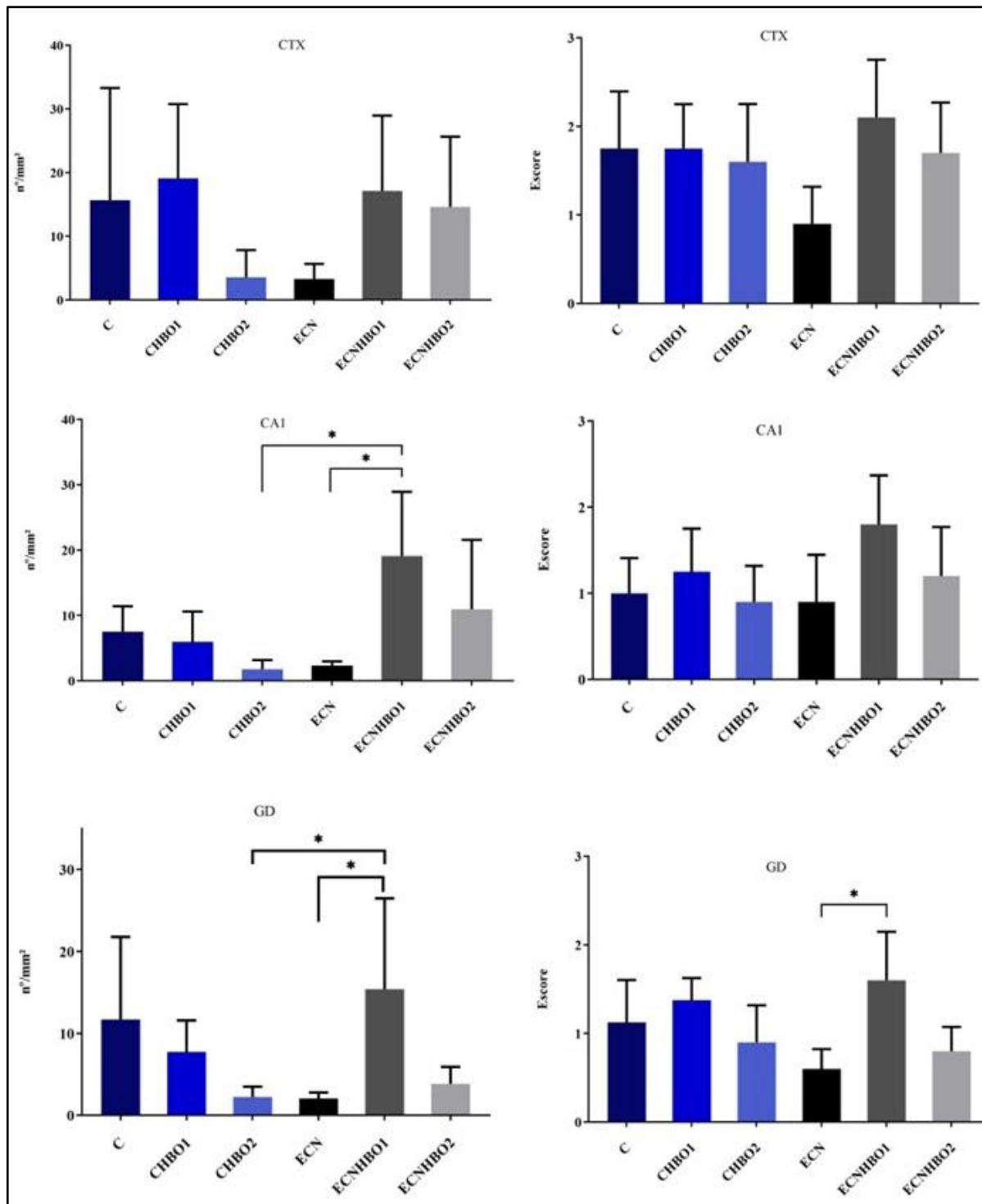


Cortes de cérebro com imunomarcção para NeuN. Aumento 40x. Barra de escala: 100 μ m. CTX Hip: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro dentado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

5.7.3 SOD3

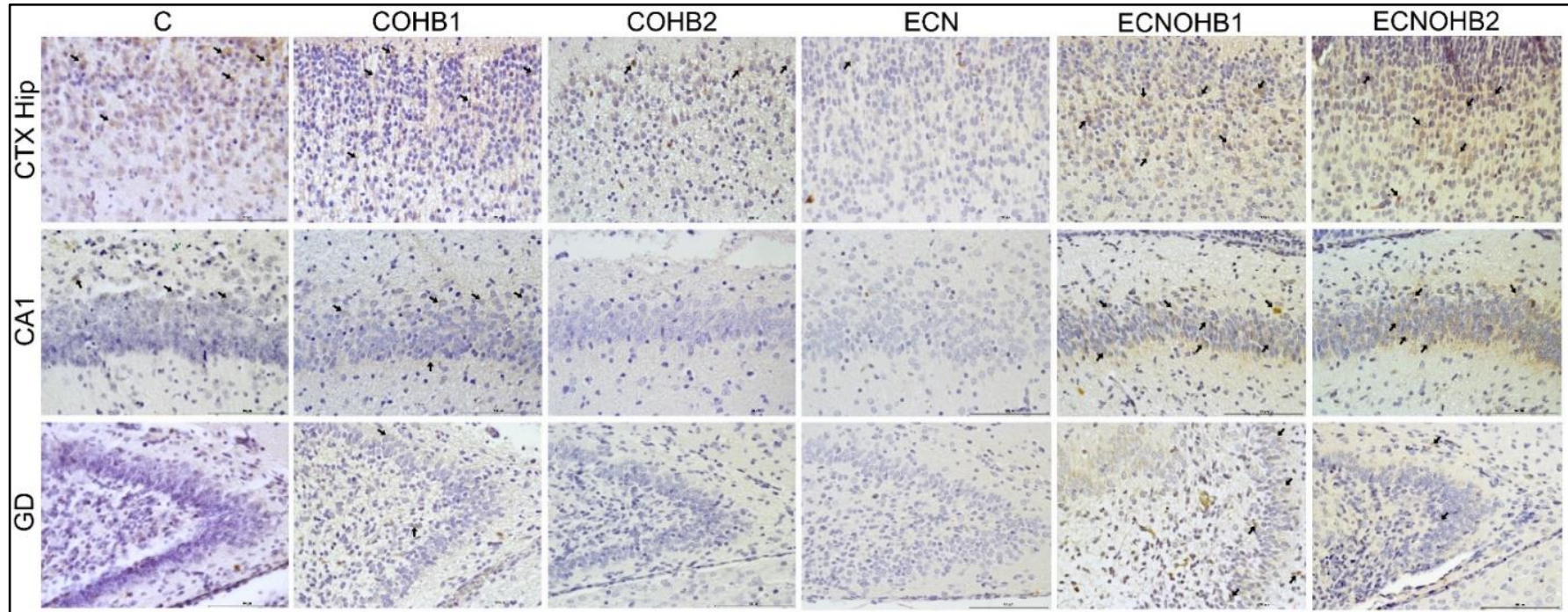
A análise por SOD3 mostra que, na região do córtex dorsal ao hipocampo, os grupos C, COHB1, ECNOHB1 e ECNOHB2 apresentaram maiores densidades de células imunomarcadas, enquanto os grupos COHB2 e ECN, as menores. O mesmo foi encontrado na avaliação por escore, porém, sem diferenças significativas. Em CA1, a maior quantidade de células positivas para SOD3 foi no grupo ECNOHB1. Diferenças foram encontradas entre os grupos ECNOHB1 vs. COHB2 ($p < 0,05$) e ECNOHB1 vs. ECN ($p < 0,05$). Já no escore de intensidade, não foi encontrada nenhuma diferença. Por fim, na avaliação da densidade celular no GD, os grupos C e ECNOHB1 foram os que apresentaram o maior número de células marcadas, enquanto o grupo ECN apresentou a menor densidade. Diferenças foram encontradas entre o grupo ECNOHB1 com os grupos COHB2 e ECN ($p < 0,05$). Na avaliação da intensidade no GD, o grupo com maior escore foi o ECNOHB1 e o com a menor, foi o ECN, com diferença significativa entre eles ($p < 0,05$) (Figura 20, gráfico 11 e tabela 5) (Apêndices U-Z).

Gráfico 11 – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3



Valores expressos em média e DP. *: $p < 0,05$. CTX: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro dentado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 20 - Análise imuno-histoquímica cerebral da SOD3



Cortes de cérebro com imunomarcção para SOD3. Aumento 40x. Barra de escala: 100 μ m. Setas: imunomarcção para SOD3. CTX Hip: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro denteado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Resultados das análises Imuno-histoquímicas cerebrais.

GRUPOS	NÚMERO DE CÉLULAS MARCADAS/ MM ²			ESCORE			
	CTX	CA1	GD	CTX	CA1	GD	
	C	0.22 ± 0.4	0.27 ± 0.8	5.66 ± 7.8	0.1 ± 0.2	0.11 ± 0.3	0.77 ± 0.5
	COHB1	0	0.1 ± 0.2	9.2 ± 4.9	0	0.1 ± 0.2	1.3 ± 0.4
GFAP	COHB2	0.66 ± 2	0.22 ± 0.6	1.5 ± 3.1	0.05 ± 0.1	0.16 ± 0.5	0.38 ± 0.6
	ECN	0	1.75 ± 2.5	9.75 ± 8.2	0	0.5 ± 0.5	1.37 ± 0.5
	ECNOHB1	0.2 ± 0.3	1.25 ± 2.3	6.8 ± 8.7	0.15 ± 0.2	0.3 ± 0.4	0.65 ± 0.4
	ECNOHB2	5 ± 11.7	1.42 ± 1.8	9.4 ± 11.76	0.35 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.71 ± 0.4
	C	96.5 ± 19.4	87.48 ± 15.2	87.89 ± 10.4	2.72 ± 0.5	1.72 ± 0.6	2.22 ± 0.5
	COHB1	124.5 ± 17.2	149.7 ± 55.3	110.2 ± 6.3	2.6 ± 0.4	2 ± 0.7	2.4 ± 0.4
NeuN	COHB2	106.6 ± 23.5	95.31 ± 24	105.1 ± 15	2.77 ± 0.2	1.77 ± 0.6	2.22 ± 0.4
	ECN	126.5 ± 12.6	104.8 ± 16.3	114.4 ± 13.8	2.1 ± 0.6	1.85 ± 0.5	2 ± 0.5
	ECNOHB1	137.5 ± 27.2	118 ± 12.7	175.3 ± 151.7	2.55 ± 0.5	2.27 ± 0.6	2.38 ± 0.6
	ECNOHB2	130.3 ± 16.1	129.1 ± 13.2	117.3 ± 14	2.37 ± 0.2	2 ± 0.5	2 ± 0.5
	C	15.6 ± 17.6	7.5 ± 3.8	11.6 ± 10	1.7 ± 0.6	1 ± 0.4	1.1 ± 0.4
	COHB1	19.1 ± 11.6	5.9 ± 4.6	7.7 ± 3.8	1.7 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.2
SOD3	COHB2	3.5 ± 4.2	1.7 ± 1.4	2.2 ± 1.2	1.6 ± 0.6	0.9 ± 0.	0.9 ± 0.4
	ECN	3.3 ± 2.3	2.3 ± 0.6	2 ± 0.7	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.6 ± 0.2
	ECNOHB1	17.1 ± 11.8	19.1 ± 9.8	15.4 ± 11	2.1 ± 0.6	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.5
	ECNOHB2	14.6 ± 11	10.9 ± 10.6	3.8 ± 2	1.7 ± 0.5	1.2 ± 0.5	0.8 ± 0.2

Valores expressos em média do número de células no campo por mm² ± DP e média do escore de intensidade de imunomarcção ± DP. CTX: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro denteado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 – Taxa de marcação pela NeuN na imuno-histoquímica cerebral

	GRUPO	CTX	CA1	DG
NeuN	C	55.2 ± 12.8	42.6 ± 14.4	39.1 ± 8.6
	COHB1	52 ± 9.9	43.7 ± 12.6	38.3 ± 13,2
	COHB2	61 ± 7.6	43 ± 12.7	34.6 ± 10.4
	ECN	56.3 ± 10.2	42.2 ± 9.6	41.1 ± 8.5
	ECNOHB1	61 ± 12.8	46 ± 15.3	46.6 ± 14.9
	ECNOHB2	54 ± 11.2	35.9 ± 10.1	38.5 ± 13

Valores da média da taxa de marcação pela análise IHQ do NeuN (células positivas/total de células x100), expresso em porcentagem ± desvio padrão (DP). CTX: córtex dorsal ao hipocampo; CA1: corno de Amon 1; GD: giro denteado. C: controle; COHB1: controle + 1 dia de OHB; COHB2: controle + 2 dias de OHB; ECN: enterocolite necrosante; ECNOHB1: ECN+ 1 dia de OHB; ECNOHB2: ECN + 2 dias de OHB. Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A ECN, apesar de não ser uma doença nova, continua a ser um desafio. A indefinição da fisiopatologia dificulta a criação de estratégias de prevenção e de tratamento. O desenvolvimento de modelos experimentais para estudo da ECN foi importante para melhor compreensão da patologia. Sabe-se que a hipóxia, a hipotermia, o uso de fórmula hiperosmolar, a prematuridade e a colonização bacteriana são importantes fatores no desenvolvimento da doença (18,80).

Considerando a ECN como uma doença inflamatória do intestino do RNs, altamente associada à hipóxia e à colonização bacteriana, propusemos o estudo da OHB como método terapêutico. A OHB promove a hiperoxigenação dos tecidos através do aumento da solubilidade do O₂ no plasma. O fornecimento de O₂ a 100% à pressão de 2 ATA aumenta para 4,4ml a quantidade de O₂ em cada 100ml de sangue, contra 0,32ml a 1 ATA em ar ambiente (81). Isso promove a estimulação do sistema imunológico através da ativação de macrófagos, acelera a neovascularização pela ativação de fibroblastos e inibe a proliferação de bactérias aeróbias e anaeróbias (81).

Na prática clínica, o uso da OHB em RN ainda é um pouco restrito, pelo baixo acesso à terapia e pela difícil adaptação das câmaras aos materiais de suporte de vida ao RN (ventiladores, tubos, bombas de infusão), especialmente os EBP. Apesar disso, vários pesquisadores se empenham em demonstrar a segurança da aplicação da OHB nessa população. É descrito o uso principalmente em lesões isquêmicas de partes moles e no tratamento da hipóxia cerebral neonatal (65,66).

Em nosso estudo, observamos uma mortalidade no grupo ECN pouco menor que o modelo de *Caplan*(80), 30,77 contra 38%. Nos grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 a mortalidade foi reduzida praticamente pela metade. Devido ao número pequeno de animais, esse resultado não mostrou significância estatística. Em modelo experimental de sepse em ratos, foi demonstrado que a OHB reduz a mortalidade se aplicada precocemente, a 2.5atm a cada 12h (82) . A aplicação da OHB durante a chamada *golden hour* no tratamento da sepse reduz a liberação precoce de citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-10 e TNF α (83), reduzindo a gravidade do quadro e, assim, diminuindo a mortalidade(83).

Na avaliação do PC, os animais dos grupos COHB1 e COHB2 tiveram variação positiva maior que a do controle. Isso pode ser explicado pelo efeito da OHB em aumentar a capacidade cognitiva dos animais, levando-os a se alimentarem mais e, portanto, ganharem

mais peso. Estudos que avaliaram o impacto comportamental da OHB em ratos submetidos a modelo experimental de hipóxia neonatal, demonstraram que todos os animais, inclusive os controles, apresentaram melhora nos testes cognitivo-comportamentais, ao menos temporariamente (84). Da Silva *et al.* (2018), na avaliação dos efeitos da OHB aplicada em modelo experimental de hipertensão intracraniana em ratos, observaram melhor desempenho no comportamento e na atividade nos animais que receberam a terapia (85). Os grupos que receberam fórmula enteral, grupos ECN, tiveram redução na média de PC ao longo do experimento, o que está de acordo com a literatura, justificado pela desnutrição (70,86). A OHB, em nosso modelo, não foi capaz reverter a perda ponderal nos animais doentes.

As médias de PI apresentaram-se menores nos grupos ECN quando comparadas com as dos grupos C. Dvorak *et al.* (2003) e Barlow *et al.* (1975) demonstraram que o leite materno atua como protetor contra doenças do trato gastrointestinal, à medida que promove o trofismo da mucosa intestinal, a regulação hormonal local, melhora o fluxo sanguíneo e o peristaltismo e controla a microbiota (31,86,87). É esperado, portanto, que os grupos que não receberam leite materno, os grupos ECN, tenham o crescimento intestinal prejudicado.

Na avaliação histológica, considerando-se graduação ≥ 2 significativo de ECN, constatamos que o modelo foi de fato efetivo, uma vez que, exceto por um único animal, todos os animais analisados do grupo ECN tiveram graduação nessa faixa. Não encontramos explicação na literatura para as alterações histológicas encontradas nos grupos COHB1 e COHB2, como pequeno edema de submucosa e até separação da lâmina própria. Apesar dessas alterações, as médias \pm desvios padrões dos animais dos grupos C permaneceram abaixo do escore considerado como ECN. Os grupos tratados tiveram uma redução significativa no escore de lesão comparados ao grupo ECN. Sendo a hipóxia o principal fator fisiopatologia da doença(80), a OHB mostrou-se eficaz na melhora da perfusão da alça, preservando a histologia.

Além da isquemia, o desenvolvimento da doença envolve o supercrescimento bacteriano (88). LPS são endotoxinas da parede de bactérias gram negativas que geram estímulo pró-inflamatório no trato gastrointestinal. Além da geração de mediadores inflamatórios, como fator ativador de plaquetas (PAF), TNF- α , IL-8, IFN- γ e iNOS, a ativação dos TLR4 pelos LPS levam a retardo na migração de enterócitos que promovem a cicatrização da mucosa intestinal lesada (11,18). Em modelo experimental de obstrução intestinal em ratos, a OHB se mostrou eficaz no controle da proliferação bacteriana intestinal e na redução da translocação (89). A ação da OHB sobre o supercrescimento bacteriano pode reduzir o componente inflamatório da

ECN, atenuando a lesão histológica intestinal. O grupo ECOHB1, que recebeu OHB somente no terceiro dia, ou seja, quando a ECN já estava estabelecida no modelo experimental, teve melhor preservação da histologia com relação ao grupo ECNOHB2, o que sugere que a aplicação precoce da terapia não gerou um efeito preventivo no desenvolvimento da doença. Um dos paradigmas da doença é a evolução de necrose para perfuração da alça intestinal. A preservação histológica intestinal diminui o risco de necrose e perfuração de alça, o que poderia reduzir o risco de sepse e a necessidade de intervenção cirúrgica nos RN(90).

Dentre os biomarcadores estudados na fisiopatologia da ECN, tais como calprotectina, TGF- β , proteína C reativa, IL-6, IL-8, PAF, a I-FABP se apresenta como o mais específico para ECN. Ela é uma pequena proteína citosólica do enterócito maduro. Ácido graxos intracelulares são importantes na distribuição de energia e para a síntese de membranas lipídeas, bem como na produção de moléculas como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (91). Quando ocorre a morte de enterócitos, há liberação da proteína, com possibilidade de aferição plasmática e urinária, por ter filtração glomerular, constituindo, assim, um marcador de lesão intestinal (92,93). Em estudo prévio em nosso laboratório, foi demonstrado que a I-FABPI diminui a nível intestinal em modelo experimental de ECN, quando comparado ao controle, devido à lesão celular com consequente perda da proteína (94). Os animais dos grupos ECN tiveram menor área de marcação pela I-FABP quando comparados aos dos grupos C. Os grupos ECNOHB1 e ECNOHB2 tiveram maior área média de marcação pela proteína, o que confirma o efeito citoprotetor da terapia nos enterócitos, visto também na histologia.

O fato de a lesão intestinal tratar-se de uma necrose de coagulação confirma que há um processo de isquemia primário envolvido. O fluxo sanguíneo intestinal fetal sofre drástica mudança no período neonatal, com queda na resistência vascular. O intestino passa de um órgão quiescente para um local de alto metabolismo e crescimento rápido. Três mecanismos controlam a resistência vascular basal nessa fase: NO, resposta miogênica e endotelina 1 (95). Chan *et al.* (2002) demonstraram em modelo experimental de isquemia-reperfusão (IR) que o intestino de ratos RN tem baixos níveis basais de iNOS, mesmo após submetidos a diferentes tempos de isquemia (59). Porém, o processo inflamatório da ECN leva a um aumento de NO e iNOS, o que já demonstrado em bebês e em modelos experimentais (22,96). A presença de LPS no intestino estimula a produção de iNOS e de seu mRNA. Isso gera maior produção de NO e, conseqüentemente, mais ONOO⁻, o qual lesa a barreira intestinal, facilitando a translocação bacteriana (97).

Confirmamos em nosso estudo o aumento da iNOS nos grupos ECN, porém com expressão maior da proteína nos grupos que receberam OHB. Há estudos que demonstram a redução de NO e de INOS no cólon de ratos adultos submetidos a modelo experimental de colite tratados com OHB (98,99). Em modelo de ECN em ratos, um estudo mostrou redução de produtos da degradação do NO (nitrito mais nitrato) tratados com OHB, mas faltam evidências do comportamento da iNOS e das demais sintases do NO. Em modelo utilizando a IR de músculo esquelético, Baynosa *et al.* (2013) demonstraram aumento da expressão e da atividade da eNOS após aplicação da OHB (100). Também já foi demonstrado que o aumento da PaO₂ eleva a expressão da eNOS a nível vascular pulmonar em modelo ovino (101). A avaliação do comportamento da enzima frente ao tratamento com OHB em animais adultos ou no cólon, bem como das demais sintases, não necessariamente oferecem uma comparação fidedigna com nossos achados sobre a iNOS. Talvez o aumento da expressão de iNOS nos enterócitos dos grupos que receberam OHB se justifique pela preservação celular demonstrada na análise histológica. Mais estudos, com outros métodos de análise, seriam necessários para confirmar o achado.

Para a manutenção da homeostasia, é necessário um balanço entre a produção de radicais livres e a ação de antioxidantes. O EO ocorre quando a capacidade de neutralização dos antioxidantes é superada pelo excesso de radicais livres tóxicos (60). RNs e prematuros são mais propensos ao EO e, dentre as causas, estão a deficiência do sistema antioxidante, a susceptibilidade à infecção, a exposição a altas tensões de oxigênio e aos altos níveis de ferro sério livre (60,102). Como já foi dito, o insulto inflamatório somado à isquemia no início do processo fisiopatológico da ECN, levam à migração de neutrófilos e liberação de ERO/ERN, lesando a mucosa intestinal (103).

A administração de substâncias com ação antioxidante, como melatonina e N-acetilcisteína, já foi demonstrada como redutora da lesão intestinal na ECN (104,105). A SOD3 é o principal antioxidante extracelular conhecido. Encontramos em nosso estudo aumento da SOD3 no grupo ECN, em resposta ao EO que ocorre no modelo da doença, já demonstrado previamente pelo aumento de marcadores de peroxidação lipídica (70,106). Sabe-se que a hiperóxia pode levar ao aumento de ERO, porém, a OHB é capaz de aumentar a atividade da SOD (107). A OHB aumentou a SOD nos grupos controles e doentes, sendo o aumento mais expressivo nos grupos que receberam somente 2 sessões (COHB1 e ECNOHB1). Isso talvez possa estar relacionado a uma resposta mais precoce ao EO, através do aumento da atividade

antioxidante da SOD. Guven *et al.* (2009) também demonstraram aumento da SOD, redução de nitrato, da MDA e da GPX, o que demonstra a ação antioxidante da terapia em modelo de ECN (70). A OHB também combate o EO pela redução de HIF-1 α e de mecanismos pró-apoptose, reduzindo C3 e proteínas sinalizadoras como p53 e BNip3, porém de forma mais tardia (108). Oter *et al.* (2005) demonstraram aumento da SOD no cérebro, pulmão e eritrócitos após exposição de ratos a OHB de forma segura, utilizando pressões compatíveis com o que é preconizado nos tratamentos (109).

O EIC compreende um sistema de comunicação entre o cérebro e o intestino. Essa comunicação se dá via sistema nervoso autônomo (SNA) (fibras simpáticas e parassimpáticas), o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e eixo simpático-adrenal(43,44).

A análise do Pcer mostrou que os animais doentes tiveram menores médias do que os animais controles, corroborando com o que foi encontrado em modelo experimental da doença por Biouss *et al.* (2019)(51). Alterações na morfologia cerebral pela análise por ressonância magnética de crianças com ECN já foram descritas na literatura. Merhar *et al.* (2014) relataram diferenças na substância branca, hemorragia intraventricular e aumento no escore de injúria cerebral em crianças com ECN, inclusive com piora dos achados naquelas submetidas a tratamento cirúrgico, ou seja, com doença mais grave (53). No contexto da doença, a redução da massa cerebral se dá pela menor mielinização, pelo aumento de apoptose e pela desnutrição (110). Não encontramos alteração no Pcer nos grupos tratados com OHB, talvez pelo curto tempo de protocolo. Na relação Pcer/PC, os grupos ECN apresentaram média de valores maiores que os dos grupos C. Esse achado pode ter relação com a subnutrição dos animais doentes, o que reduziu consideravelmente o PC.

Na avaliação histológica cerebral, encontramos redução de neurônios principalmente nas áreas do hipocampo (GD e CA1) do grupo ECN. O córtex mostrou-se mais preservado, o está de acordo com a literatura. Em modelo experimental de ECN, foram encontrados menos neurônios maduros e aumento da C3, principalmente no hipocampo e no tálamo, sendo o córtex a região menos alterada (51). A OHB mostra-se como uma terapia possível na neuroproteção ao insulto isquêmico. Ela reduz a C3, a fragmentação do DNA e o fator indutor de apoptose (AIF) a nível cerebral (84). Todos esses mecanismos preservam o tecido neuronal à medida que são anti-apoptóticos. A inflamação e a isquemia intestinal produzem citocinas pró-inflamatórias que rompem a barreira hematoencefálica, causando disfunções no SNC. Na IR intestinal, a OHB mostra-se eficaz na redução do TNF- α e a migração de neutrófilos,

diminuindo o processo inflamatório e liberação de citocinas (111). O grupo ECNOHB1 teve a histologia cerebral mais preservada em relação ao grupo ECN. Já o grupo que recebeu 4 sessões de OHB apresentou alterações histológicas que podem sugerir sofrimento neuronal por toxicidade secundária a hiperoxigenação. Ainda existe preocupação quanto à segurança na aplicação da OHB para o SNC, principalmente para RN, seja em termos de número de sessões, de duração e de pressurização.

A astrogliose, avaliada pela GFAP, mostrou-se maior no grupo ECN nas áreas hipocámpais, mas não no CTX. Os astrócitos são os principais responsáveis pelo reparo celular neuronal após lesão, e a GFAP é um marcador de astrócitos maduros. A presença dessas células a longo prazo leva a alterações estruturais (cicatrices) e metabólicas no hipocampo, que barram a recuperação da função cognitiva (85,112). O processo de cicatrização neuronal não é completamente entendido, mas estima-se que os astrócitos possam se diferenciar em células progenitoras multipotentes (113). É esperado que nas áreas onde ocorreu maior dano haja maior ativação do processo cicatricial, portanto, mais astrócitos. A OHB reduziu a astrogliose na região do GD nos grupos ECNOHB1 e ECNOHB2, principalmente no primeiro. Apesar de não ter sido significativa, essa tendência à redução sugere um impacto positivo na preservação do tecido neural produzido pela OHB nos animais doentes. Já foi demonstrado aumento de astrócitos e da ativação da micróglia na ECN, inclusive correlacionado à gravidade da doença(51). Em modelos experimentais de trauma e de hidrocefalia, foi visto aumento de astrócitos e a OHB também reduziu a expressão de GFAP (85,112).

Na avaliação de neurônios maduros pela proteína NeuN, houve uma leve tendência no aumento da densidade celular no grupo ECN, o que não foi observado anteriormente(51), porém sem impacto estatístico e também não visto nas avaliações por marcação e escore de intensidade. Encontramos aumento da densidade celular entre os grupos que receberam OHB, principalmente no grupo ECNOHB1. O grupo COHB1 também apresentou aumento significativo na densidade neuronal em CA1. Em modelo de trauma cerebral, a OHB mostrou-se eficaz na preservação de neurônios, seja ela aplicada precoce ou tardiamente (114). O mesmo estudo demonstrou recuperação de habilidades cognitivas relacionadas ao córtex e ao hipocampo nos animais que receberam a terapia. Em modelo de trauma espinhal, foi demonstrado que a OHB aumentou a expressão do gene da GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*), proteína relacionada à inibição da apoptose neuronal induzida por isquemia (115). A preservação de neurônios pela aplicação a OHB nos pacientes com ECN é um ganho

secundário muito importante. A região do hipocampo, além de estar relacionada a funções de memória e aprendizado, contém grande quantidade de células progenitoras neuronais. Ou seja, sua preservação garante a manutenção do processo de neuroregeneração e de proliferação celular (74). Apesar de não ter sido demonstrada no modelo a redução neuronal pela doença, talvez pelo tempo curto de protocolo, o aumento de células pela OHB significa que a terapia preserva e talvez até estimule a diferenciação neuronal. Dessa forma, além do efeito direto da terapia na redução da lesão intestinal, ela também pode contribuir para preservação do SNC.

Diferentemente do intestino, a SOD3 apresentou-se reduzida no cérebro no grupo ECN. A aplicação da OHB aumentou a SOD, principalmente no grupo que recebeu apenas 2 sessões. O aumento do número de sessões não trouxe melhora no controle do EO a nível cerebral, bem como no intestino. Neurônios são muito suscetíveis aos radicais livres por terem alto metabolismo com grande *turnover* de O₂. Além disso, as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, tornando-se alvo para a peroxidação lipídica causada pelo EO (49). Ratos submetidos a hipóxia tiveram aumento do EO, aferido através do aumento da MDA no cérebro e no intestino e da C3 a nível cerebral (116). No traumatismo cerebral, a OHB reduz os níveis do TNF- α e de mieloperoxidases, o que significa redução no acúmulo local de neutrófilos, resultando em menor liberação de radicais livres (117). Neutrófilos são responsáveis por liberação de citocinas e EROs, que ativam a resposta inflamatória através do NF- κ B, provocam lesão celular pela oxidação de lipídeos da membrana e desnaturam proteínas e o DNA(118). Em modelo experimental de lesão da medula espinhal, semelhante ao nosso achado na ECN, a OHB levou a aumento da SOD e redução da MDA (119). Também houve aumento da SOD no tratamento da hidrocefalia em ratos (85). Clinicamente, surgem mais estudos sobre a aplicação da OHB na encefalopatia isquêmica neonatal. Gong *et al.* realizaram uma metanálise de ensaios clínicos controlados sobre OHB no tratamento da encefalopatia isquêmica neonatal. Reuniram 46 estudos, com melhores resultados da OHB em comparação com os tratamentos convencionais, demonstrado por redução do risco de sequela e melhora nos escores neurológicos(120). Em nosso estudo, demonstramos que, além de aumentar a oferta de oxigênio a tecidos com déficit de perfusão, a OHB combate o EO no hipocampo através da ativação do sistema antioxidante. Novamente, a aplicação de 2 sessões mostrou-se mais efetiva.

7 CONCLUSÃO

7.1 Geral

O efeito do tratamento da OHB mostrou uma tendência na redução da mortalidade e atenuação significativa da severidade das lesões intestinal e cerebral em modelo experimental de ECN. Houve melhora no escore de lesão histológica intestinal pela terapia. No hipocampo, a doença provocou alterações histológicas e alterou a morfologia. A OHB preservou o arranjo e a quantidade de neurônios nas áreas hipocampais avaliadas.

7.2 Específica

Foi demonstrada a preservação da integridade celular inferida pelo aumento da I-FABP nos grupos ECN tratados com OHB. Também houve efeito antioxidante intestinal pela terapia demonstrado pelo aumento da SOD3. Houve uma tendência à redução da astrogliose e ao incremento de neurônios maduros pela OHB, com significativa ativação o sistema antioxidante no hipocampo. Aparentemente, a aplicação da terapia antes do estabelecimento da doença no modelo proposto não levou a melhores resultados. Pelo contrário, a aplicação mais tardia e em menos sessões de OHB mostrou efeitos melhores em quase todos os parâmetros analisados. Nesse estudo não foram avaliados diretamente os efeitos colaterais da OHB. Portanto, concluímos que a OHB pode ser considerada uma modalidade terapêutica potencialmente eficaz e promissora no tratamento de RNs com ECN.

REFERÊNCIAS

1. Dominguez KM, Moss RL. Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol.* 2012;39(2):387–401.
2. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan X Di, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. Vol. 6, *Pediatric and Developmental Pathology.* 2003. p. 6–23.
3. Bell MJ, Ternberg JL, Feigin RD, Keating JP, Marshall R, Barton L, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.* 1978;187(1):1–7.
4. Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl.* 1994;396(1 7):2–7.
5. Holman RC, Stehr-Green JK, Zelasky MT. Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am J Public Health.* 1989;79(8):987–9.
6. Battersby C, Santhalingam T, Costeloe K, Modi N. Incidence of neonatal necrotising enterocolitis in high-income countries: A systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018;103(2):F182–9.
7. Moss RL, Dimmitt R a, Barnhart DC, Sylvester KG, Brown RL, Powell DM, et al. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis and perforation. *N Engl J Med.* 2006;354(21):2225–34.
8. Hong CR, Han SM, Jaksic T. Surgical considerations for neonates with necrotizing enterocolitis. Vol. 23, *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine.* W.B. Saunders Ltd; 2018. p. 420–5.
9. Hintz SR. Neurodevelopmental and Growth Outcomes of Extremely Low Birth Weight Infants After Necrotizing Enterocolitis. *Pediatrics.* 2005;115(3):696–703.
10. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet.* 2006;368(9543):1271–83.
11. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. Vol. 27, *Shock.* 2007. p. 124–33.
12. Bein A, Eventov-Friedman S, Arbell D, Schwartz B. Intestinal tight junctions are severely altered in NEC preterm neonates. *Pediatr Neonatol.* 2017;1–10.
13. Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis: An update. In: *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement.* 2005. p. 100–5.
14. Ostlie B DJ, Spilde TL, Peter SDS, Sexton N, Miller KA, Sharp RJ, et al. Necrotizing Enterocolitis in Full-Term Infants. 2003;3468(03):1039–42.
15. Clark DA, Fornabaio DM, McNeill H, Mullane KM, Caravella SJ, Miller MJS. Contribution of oxygen-derived free radicals to experimental necrotizing enterocolitis. *American Journal of Pathology.* 1988;130(3):537–42.

16. Maheshwari A. Immunologic and Hematological Abnormalities in Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol*. 2015;42(3):567–85.
17. Kim M, Christley S, Alverdy JC, Liu D, An G. Immature Oxidative Stress Management as a Unifying Principle in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis : Insights from an Agent-Based Model. 2012;13(1):18–32.
18. Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, et al. The Roles of Bacteria and TLR4 in Rat and Murine Models of Necrotizing Enterocolitis 1. Vol. 177, *J Immunol*. 2006.
19. Yazji I, Sodhi CP, Lee EK, Good M, Egan CE, Afrazi A, et al. Endothelial TLR4 activation impairs intestinal microcirculatory perfusion in necrotizing enterocolitis via eNOS–NO–nitrite signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(23):9451–6.
20. Role of NO and other vascular mediators in the etiopathogenesis of necrotizing enterocolitis Jayasree Nair 1 , Satyan Lakshminrusimha 2 1. 2019;9–28.
21. Eaton S, Rees CM, Hall NJ. Current research in necrotizing enterocolitis. Vol. 97, *Early Human Development*. Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 33–9.
22. Ford H, Watkins S, Reblock K, Pittsburgh MR. The Role of Inflammatory Cytokines and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis.
23. Morecroft J, Spitz L, Hamilton P, Holmes S. Necrotizing enterocolitis - multisystem organ failure of the newborn? *Acta Paediatr*. 1994;83(0803–5326):21–3.
24. Sántulli, TV. Schullinger, JN. Heird, WC. Gongaware, RD. Wigger, J. Barlow B. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics*. 1975;55(3):376-.
25. Cuna AC, Reddy N, Robinson AL, Chan SS. Bowel ultrasound for predicting surgical management of necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Radiol*. 2018;48(5):658–66.
26. Agakidou E, Agakidis C, Gika H, Sarafidis K. Emerging Biomarkers for Prediction and Early Diagnosis of Necrotizing Enterocolitis in the Era of Metabolomics and Proteomics. Vol. 8, *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.; 2020.
27. Mary Edelson BB, Sonnino RE, Bagwell CE, Lieberman JM, Marks WH, Rozycki Richmond HJ. Plasma Intestinal Fatty Acid Binding Protein in Neonates With Necrotizing Enterocolitis: A Pilot Study.
28. Schurink M, Kooi EMW, Hulzebos C V., Kox RG, Groen H, Heineman E, et al. Intestinal fatty acid-binding protein as a diagnostic marker for complicated and uncomplicated necrotizing enterocolitis: A prospective cohort study. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3).
29. Walsh MC, Kliegman RM, D M. Necrotizing Enterocolitis: Treatment Based on Staging Criteria. *The Newborn I*. 1986;33(1):179–201.
30. Jin YT, Duan Y, Deng XK, Lin J. Prevention of necrotizing enterocolitis in premature infants – an updated review. *World J Clin Pediatr*. 2019;8(2):23–32.
31. McClure RJ. Trophic feeding of the preterm infant. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement*. 2001;90(436):19–21.

32. Sodhi C, Richardson W, Gripar S, Hackam DJ. The development of animal models for the study of necrotizing enterocolitis. *Dis Model Mech.* 2008;1(2–3):94–8.
33. Cohen IT, Nelson SD, Moxley RA, Hirsh MP, Counihan TC, Martin RF. Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. *J Pediatr Surg.* 1991;26(5):598–601.
34. Crissinger KD, Burney DL, Velasquez OR, Gonzalez E. An animal model of necrotizing enterocolitis induced by infant formula and ischemia in developing piglets. *Gastroenterology.* 1994;106(5):1215–22.
35. Crissinger KD, Tso P. The role of lipids in ischemia/reperfusion-induced changes in mucosal permeability in developing piglets. *Gastroenterology.* 1992;102(5):1693–9.
36. Barlow B, Santulli T V., Heird WC, Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN. An experimental study of acute neonatal enterocolitis-the importance of breast milk. *J Pediatr Surg.* 1974;9(5):587–95.
37. Ganapathy V, Hay JW, Kim JH. Costs of necrotizing enterocolitis and cost-effectiveness of exclusively human milk-based products in feeding extremely premature infants. *Breastfeeding Medicine.* 2012;7(1):29–37.
38. Ss K, Jb A, Goulet BA, Langnas GD, Kaufman SS, Atkinson JB, et al. Indications for pediatric intestinal transplantation: A position paper of the American Society of Transplantation.
39. Wales PW, De Silva N, Kim J, Lecce L, To T, Moore A. Neonatal Short Bowel Syndrome: Population-Based Estimates of Incidence and Mortality Rates. *J Pediatr Surg.* 2004;39(5):690–5.
40. Olivier J, Revillon Y, Jan D. Neonatal short bowel syndrome. 1988;
41. Longworth L, Young T, Beath S V., Kelly DA, Mistry H, Protheroe SM, et al. An economic evaluation of pediatric small bowel transplantation in the United Kingdom. *Transplantation.* 2006 Aug;82(4):508–15.
42. Niemarkt HJ, de Meij TG, van Ganzewinkel CJ, de Boer NKH, Andriessen P, Hütten MC, et al. Necrotizing Enterocolitis, Gut Microbiota, and Brain Development: Role of the Brain-Gut Axis. *Neonatology.* 2019 Jun 1;115(4):423–31.
43. Mayer EA. Gut feelings: The emerging biology of gut-"brain communication. Vol. 12, *Nature Reviews Neuroscience.* 2011. p. 453–66.
44. Collins SM, Surette M, Bercik P. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. Vol. 10, *Nature Reviews Microbiology.* 2012. p. 735–42.
45. Sherman MP, Zaghouani H, Niklas V. Gut microbiota, the immune system, and diet influence the neonatal gut-brain axis. Vol. 77, *Pediatric Research.* Nature Publishing Group; 2015. p. 127–35.
46. Moschopoulos C, Kratimenos P, Koutroulis I, Shah B V., Mowes A, Bhandari V. The neurodevelopmental perspective of surgical necrotizing enterocolitis: the role of the gut-brain axis. Vol. 2018, *Mediators of Inflammation.* Hindawi Limited; 2018.
47. McEwen Harold BS, Milliken M. Stress and hippocampal plasticity. Vol. 22, *Annu. Rev. Neurosci.* 1999.

48. Perlman JM. The genesis of cognitive and behavioral deficits in premature graduates of intensive care. *Minerva Pediatr.* 2003 Apr;55(2):89-101.
49. Behl C, Lezoualc'h F, Trapp T, Widmann M, Skutella T, Holsboer F. Glucocorticoids Enhance Oxidative Stress-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons in Vitro. Vol. 138, *Endocrinology.* 1997.
50. Jones MP, Dilley JB, Drossman D, Crowell MD. Brain-gut connections in functional GI disorders: Anatomic and physiologic relationships. Vol. 18, *Neurogastroenterology and Motility.* Blackwell Publishing Ltd; 2006. p. 91–103.
51. Biouss G, Antounians L, Li B, O'Connell JS, Seo S, Catania VD, et al. Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain. *J Neuroinflammation.* 2019 May 10;16(1).
52. Matei A, Montalva L, Goodbaum A, Lauriti G, Zani A. Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2020 Jul;105(4):432-439.
53. Merhar SL, Ramos Y, Meinzen-Derr J, Kline-Fath BM. Brain magnetic resonance imaging in infants with surgical necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation versus medical necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatrics.* 2014;164(2).
54. Undersea and Hyperbaric Medical Society. Hyperbaric Oxygen Committee, Weaver LK. Hyperbaric oxygen therapy indications: the Hyperbaric Oxygen Therapy Committee report. 13th ed. 415 p.
55. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM.* 2004 Jul;97(7):385-95.
56. Korhonen K, Kuttilla K, Niinikoski J. Tissue gas tensions in patients with necrotising fasciitis and healthy controls during treatment with hyperbaric oxygen: a clinical study. *Eur J Surg.* 2000 Jul;166(7):530-4.
57. Geiderman JM, Ault MJ. Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med.* 1996 Nov 28;335(22):1684; author reply 1685-6.
58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Vol. 39, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2007. p. 44–84.
59. Chan KL, Hui CWC, Chan KW, Fung PCW, Wo JYH, Tipoe G, et al. Revisiting ischemia and reperfusion injury as a possible cause of necrotizing enterocolitis: Role of nitric oxide and superoxide dismutase. *J Pediatr Surg.* 2002;37(6):828–34.
60. Ozsurekci Y, Aykac K. Oxidative Stress Related Diseases in Newborns. Vol. 2016, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* Hindawi Limited; 2016.
61. Schottlender N, Gottfried I, Ashery U. Hyperbaric oxygen treatment: Effects on mitochondrial function and oxidative stress. Vol. 11, *Biomolecules.* MDPI; 2021.
62. Godman CA, Joshi R, Giardina C, Perdrizet G, Hightower LE. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Blackwell Publishing Inc.; 2010. p. 178–83.

63. Leach RM, Rees PJ, Wilmshurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ*. 1998;317(0831).
64. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth european consensus conference on hyperbaric medicine: Recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med*. 2017;47(1):24–31.
65. E. Cuauhtemoc Sánchez M. Use of Hyperbaric Oxygenation in Neonatal Patients. *Critical Care Nurs Q*. 2013;36(3):280–9.
66. Vazquez RL, Spahr RC. Hyperbaric Oxygen Use in Neonates. *Am J Dis Child*. 1990;144:1022-4.
67. Torbati D, Wafapoor H, Gholam A. Peyman, Hyperbaric oxygne tolerance in newborn mammals-hypothesis on mechanisms and outcome, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.14, Issue 6, 1993, 695-703.
68. Ricci B, Calogero G. Oxygen-induced retinopathy in newborn rats: effects of prolonged normobaric and hyperbaric oxygen supplementation. *Pediatrics*. 1988;82(2):193–8.
69. Smith B, Okamoto E, Clatworthy HW. Hyperbaric Oxygen in the Treatment of Volvulus of the Midgut: An Experimental Study. *Journal of Pediatric Surgery*, Vol 3, Issue 1, Part 1, 1968, 32-35,
70. Guven A, Gundogdu G, Uysal B, Cermik H, Kul M, Demirbag S, et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg*. 2009 Mar;44(3):534–40.
71. Wiebers J, Purdy I, Lieber M, Milisavljevic V. Hyperbaric oxygen in treatment of neonatal arterial thromboembolism of lower extremities. *Journal of Perinatology*. 2006;26(12):777–9.
72. Mirasoglu B, Cetin H, Akgun SO, Aktas S. Hyperbaric oxygen treatment for intrauterine limb ischaemia: A newborn in the chamber. *Diving Hyperb Med*. 2021 Jun 1;51(2):220–3.
73. Waisman D, Shupak A, Weisz G, Melamed Y. Hyperbaric oxygen therapy in the pediatric patient: the experience of the Israel Naval Medical Institute. *Pediatrics*. 1998;102(5).
74. Wei L, Wang J, Cao Y, Ren Q, Zhao L, Li X, et al. Hyperbaric oxygenation promotes neural stem cell proliferation and protects the learning and memory ability in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1752–9.
75. Wei L, Ren Q, Zhang Y, Wang J. Effects of hyperbaric oxygen and nerve growth factor on the long-term neural behavior of neonatal rats with hypoxic ischemic brain damage. *Acta Cir Bras*. 2017;32(4):270–9.
76. Zhu M, Lu M, Li QJ, Zhang Z, Wu ZZ, Li J, et al. Hyperbaric oxygen suppresses hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *J Child Neurol*. 2015 Jan 1;30(1):75–82.
77. Simões ALB. Avaliação da expressão de FABP-I como marcador de lesão intestinal no modelo experimental de enterocolite necrosante em neonatos de ratos. 2014.
78. Gonçalves FLL, Gallindo RM, Soares LMM, Figueira RL, Volpe FAP, Pereira-da-Silva MA, Sbragia L. Validation of protocol of experimental necrotizing enterocolitis in rats and the pitfalls during the procedure [Internet]. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2013 ; 28 19-25.

79. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, et al. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* .2002;282:156–64.
80. Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol*. 1994 Nov-Dec;14(6):1017-28.
81. Sahni T, Singh P, John MJ. Hyperbaric oxygen therapy: current trends and applications. *J Assoc Physicians India*. 2003 Mar;51:280-4.
82. Buras JA, Holt D, Orlow D, Belikoff B, Pavlides S, Reenstra WR. Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. *Crit Care Med*. 2006 Oct;34(10):2624–9.
83. Halbach JL, Prieto JM, Wang AW, Hawisher D, Cauvi DM, Reyes T, et al. Early hyperbaric oxygen therapy improves survival in a model of severe sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2019;317:160–8.
84. Liu XH, Yan H, Xu M, Zhao YL, Li LM, Zhou XH, et al. Hyperbaric oxygenation reduces long-term brain injury and ameliorates behavioral function by suppression of apoptosis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. *Neurochem Int*. 2013 Jun;62(7):922–30.
85. da Silva SC, Feres O, da Silva Beggiora P, Machado HR, Menezes-Reis R, Araújo JE, et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces astrogliosis and helps to recovery brain damage in hydrocephalic young rats. *Child’s Nervous System*. 2018 Jun 1;34(6):1125–34.
86. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS, et al. Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2003;53(3):426–33.
87. Barlow, B. Santulli TV. Importance of Multiple Episodes of Hypoxia or Cold Stress on the Development of Enterocolitis in an Animal Model. *Surgery*. 1975;77:687–90.
88. Neu J, Walker WA. Necrotizing Enterocolitis. *New England Journal of Medicine* .2011 Jan 20;364(3):255–64.
89. Akin ML, Uluutku H, Erenoglu C, Ilicak EN, Elbuken E, Erdemoglu A, Celenk T. Hyperbaric oxygen ameliorates bacterial translocation in rats with mechanical intestinal obstruction. *Dis Colon Rectum*. 2002 Jul;45(7):967-72.
90. Rao SC, Basani L, Simmer K, Samnakay N, Deshpande G. Peritoneal drainage versus laparotomy as initial surgical treatment for perforated necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation in preterm low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011 Jun 15;
91. Veerkamp JH, Peeters RA, Maatman RG. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Jan 4;1081(1):1-24.
92. Gollin G, Marks WH. Elevation of circulating intestinal fatty acid binding protein in a luminal contents-initiated model of NEC. *J Pediatr Surg*. 1993;28(3):367–71.

93. Yang G, Wang Y, Jiang X. Diagnostic Value of Intestinal Fatty-Acid-Binding Protein in Necrotizing Enterocolitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Indian J Pediatr.* 2016;83(12–13):1410–9.
94. Gonçalves FLL, Soares LMM, Figueira RL, Simões ALB, Gallindo RM, Sbragia L. Evaluation of the expression of I-FABP and L-FABP in a necrotizing enterocolitis model after the use of *Lactobacillus acidophilus*. *J Pediatr Surg.* 2015 Apr 1;50(4):543–9.
95. Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. *Physiology and pathophysiology.* *Clin Perinatol.* 2002 Mar;29(1):23-39.
96. Whitehouse JS, Xu H, Shi Y, Noll LA, Kaul S, Jones DW, et al. Mesenteric Nitric Oxide and Superoxide Production in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Surgical Research.* 2010 Jun 1;161(1):1–8.
97. Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2008 Apr;32(2):92-9.
98. Ercin CN, Yesilova Z, Korkmaz A, Ozcan A, Oktenli C, Uygun A. The effect of iNOS inhibitors and hyperbaric oxygen treatment in a rat model of experimental colitis. *Dig Dis Sci.* 2009 Jan;54(1):75–9.
99. Parra RS, Lopes AH, Carreira EU, Feitosa MR, Cunha FQ, Garcia SB, et al. Hyperbaric oxygen therapy ameliorates TNBS-induced acute distal colitis in rats. *Med Gas Res.* 2015 Apr 1;5.
100. Baynosa RC, Naig AL, Murphy PS, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, et al. The effect of hyperbaric oxygen on nitric oxide synthase activity and expression in ischemia-reperfusion injury. *Journal of Surgical Research.* 2013 Jul;183(1):355–61.
101. North AJ, Lau KS, Brannon TS, Wu LC, Wells LB, German Z, Shaul PW. Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996 Apr;270(4 Pt 1):L643-9.
102. Gitto E, Pellegrino S, D'Arrigo S, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stress in resuscitation and in ventilation of newborns. Vol. 34, *European Respiratory Journal.* 2009. p. 1461–9.
103. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Aversa S, Reiter RJ, Antonuccio P, et al. Oxidative Stress-Mediated Damage in Newborns with Necrotizing Enterocolitis: A Possible Role of Melatonin. *Am J Perinatol.* 2015 Mar 4;32(10):905–9.
104. Guven A, Uysal B, Gundogdu G, Oztas E, Ozturk H, Korkmaz A. Melatonin ameliorates necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg.* 2011 Nov;46(11):2101–7.
105. Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu IM, Uysal S, Haltas H, et al. N-acetylcysteine may prevent severe intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2012 Mar;47(3):540–50.
106. Guven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Oztas E, Ozturk H, et al. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats. *J Pediatr Surg.* 2009 Sep;44(9):1730–5.

107. Kaelin CM, Im MJ, Myers RA, Manson PN, Hoopes JE. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats. *Arch Surg*. 1990 May;125(5):607-9.
108. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(8):2102–12.
109. Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, et al. Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem*. 2005 Aug;38(8):706–11.
110. Zhou Q, Niño DF, Yamaguchi Y, Wang S, Fulton WB, Jia H, et al. Necrotizing enterocolitis induces T lymphocyte-mediated injury in the developing mammalian brain. Vol. 13, *Sci. Transl. Med*. 2021.
111. Yang ZJ, Bosco G, Montante A, Ou XL, Camporesi EM. Hyperbaric O₂ reduces intestinal ischemia-reperfusion-induced TNF- α production and lung neutrophil sequestration. *Eur J Appl Physiol*. 2001;85(1–2):96–103.
112. Liu S, Shen GY, Deng SK, Wang X bin, Wu QF, Guo AS. Hyperbaric oxygen therapy improves cognitive functioning after brain injury. *Neural Regen Res*. 2013 Dec 15;8(35):3334–43.
113. Lee HH, Park SC, Choe IS, Kim Y, Ha YS. Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. *Korean J Neurotrauma*. 2015;11(2):44.
114. Baratz-Goldstein R, Toussia-Cohen S, Elpaz A, Rubovitch V, Pick CG. Immediate and delayed hyperbaric oxygen therapy as a neuroprotective treatment for traumatic brain injury in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2017 Sep 1;83:74–82.
115. Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, Ito S, Adachi K, Satake K, Ishiguro N, Kiuchi K. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport*. 2004 Oct 25;15(15):2369-73.
116. Figueira RL, Gonçalves FL, Simões AL, Bernardino CA, Lopes LS, Castro E Silva O, et al. Brain caspase-3 and intestinal FABP responses in preterm and term rats submitted to birth asphyxia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016 Jun 23;49(7).
117. Lin KC, Niu KC, Tsai KJ, Kuo JR, Wang LC, Chio CC, et al. Attenuating inflammation but stimulating both angiogenesis and neurogenesis using hyperbaric oxygen in rats with traumatic brain injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012 Mar;72(3):650–9.
118. Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. Vol. 24, *Experimental Neurobiology*. Korean Society for Neurodegenerative Disease; 2015. p. 325–40.
119. Sun Y, Liu D, Wang Q, Su P, Tang Q. Hyperbaric oxygen treatment of spinal cord injury in rat model. *BMC Neurol*. 2017 Jul 3;17(1).
120. Gong XB, Feng RH, Dong HM, Liu WH, Gu YN, Jiang XY, et al. Efficacy and Prognosis of Hyperbaric Oxygen as Adjuvant Therapy for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Meta-Analysis Study. *Front Pediatr*. 2022 Apr 21;10.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Avaliação biométrica: média \pm desvio padrão do peso corporal (PC) ao nascimento e com 72h (coleta); peso intestinal (PI); razão PI/PC; peso cerebral (Pcer). g: gramas.

Grupo	PC NASCIMENTO(g)	PC 72h(g)	PI(g)	PI/PC	Pcer(g)
C	7,196 (\pm 0,77)	8,710 (\pm 1,16)	0,421 (\pm 0,07)	0,048 (\pm 0,008)	0,46 (\pm 0,06)
COHB1	6,634 (\pm 0,39)	9,517 (\pm 0,6)	0,474 (\pm 0,06)	0,049 (\pm 0,004)	0,388 (\pm 0,02)
COHB2	6,361 (\pm 0,47)	8,79 (\pm 1,18)	0,459 (\pm 0,08)	0,052 (0,004)	0,39 (\pm 0,02)
ECN	6,126 (\pm 0,57)	4,637 (\pm 0,43)	0,21 (\pm 0,02)	0,047 (\pm 0,004)	0,26 (\pm 0,03)
ECNOHB1	6,440 (\pm 0,59)	4,547 (\pm 0,75)	0,229 (\pm 0,04)	0,05 (\pm 0,008)	0,268 (\pm 0,02)
ECNOHB2	6,694 (\pm 0,35)	4,742 (\pm 0,48)	0,228 (\pm 0,05)	0,049 (\pm 0,008)	0,268 (\pm 0,02)

APÊNDICE B: Avaliação do escore de lesão intestinal por grupo.

GRUPO/ ANIMAL	EXAMINADOR 1			EXAMINADOR 2			EXAMINADOR 3		
C									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0,5	0	0	0	0	0,5	0,5
3	1	2	2	0	0	0	2	1,5	1,5
4	0	0,5	1	0	0	0	0	0,5	0,5
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5
7	0	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COHB1									
1	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0
2	0	1	1	0	0	0	0	0	1
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	2	2	2	2	2
5	2	3	3	1	0,5	0,5	1,5	1,5	1
6	0	0,5	0,5	1	0,5	0,5	0	0,5	0,5
7	1	0,5	0,5	0	0	0	0	0,5	0,5
COHB2									
1	0	2	2	0,5	2	2	1	2	2
2	1	1	1	1	0,5	1	1	1	1
3	1	0,5	1	1	1	0,5	1	0,5	0
4	0	0	1	0	0	1	0	0	1
5	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6	0	0	0	1	1,5	1,5	0	0	0
7	2	2	2	1	0,5	0	0,5	1	1
8	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0
9	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	1
10	0,5	0,5	1	0,5	1	0,5	0,5	0,5	0,5
11	0	0,5	0	1	1	0,5	0	0,5	0,5

continua

Conclusão

GRUPO/ ANIMAL	EXAMINADOR 1			EXAMINADOR 2			EXAMINADOR 3		
ECN									
1	3	4	4	2,5	2,5	3,5	3	4	4
2	4	4	4	4	3,5	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5	1,5	3,5	3	2	2	2,5	3	3,5	2,5
6	2	2	2,5	1,5	2	2	1,5	2	2,5
7	4	2,5	4	3,5	2,5	4	3,5	2	3
8	3,5	3	3,5	4	2	3	4	2	3
9	4	3	3,5	4	4	3,5	4	4	3
10	3,5	3,5	3,5	3	3,5	3	4	3	2
11	4	4	4	3	3	3,5	3	4	3
12	3	4	3,5	4	4	3,5	4	4	3
ECNOHB1									
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
3	3,5	3,5	4	3,5	3	3,5	3	3	3
4	2	2	2	2,5	2,5	3	2	2	3
5	0	0	0	0,5	0	0,5	0	0	0
6	0,5	1	0,5	2	2	2,5	1	2	1
7	3	3	2	3	2	2,5	1,5	2	2
8	1,5	2	1,5	1	1,5	1,5	0,5	0,5	1
9	2	2	2	2	2	3	2,5	2	3
10	2	3	2	2,5	3	2,5	2	2	2
ECNOHB1									
1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	0	0	1	1	1	0	1	1	2
3	2	0	0	1	1	0	2	1	1
4	3	3	3	2,5	2,5	2	3	3	3
5	0,5	1	1,5	2,5	2,5	2,5	2	1,5	2
6	2	3	3	1,5	1,5	1,5	2,5	2,5	2,5
7	2	2	2	0,5	1	1	1	1,5	1,5
8	1	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	1,5	1,5
9	2	2,5	2	2	2	2	2,5	2	2
10	2	1,5	1,5	2	1,5	1,5	2	1,5	2,5

APÊNDICE C – Imuno-histoquímica da iNOS. Área marcada em cada corte em porcentagem por grupo.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
1,82	38,66	50,89	13,55	35,12	30,10
10,03	32,91	33,80	24,58	24,65	59,48
10,41	42,57	26,79	25,65	27,70	35,90
2,51	33,50	36,23	28,28	41,03	52,86
4,78	39,80	29,47	25,20	38,47	50,91
6,62	1,69	25,86	19,90	37,44	56,99
6,56	11,75	19,87	13,83	50,09	42,16
5,48	25,16	25,70	23,56	44,06	62,12
4,37	18,78	29,47	53,00	43,55	55,66
3,46	24,10	35,80	29,70	45,88	43,12
5,91	16,89	18,60	20,98	50,68	33,74
5,03	6,92	22,88	25,90	47,18	39,83
2,81	20,14	32,78	26,22	55,59	46,11
1,68	6,33	16,42	27,45	41,58	42,50
2,43	20,83	26,50	19,01	51,29	39,79
4,67	2,98	9,19	24,62	51,11	50,12
0,23	8,96	17,38	25,19	49,13	46,25
0,01	6,51	23,58	26,62	51,45	57,23
2,89	7,76	19,46	28,84	52,74	48,64
1,81	5,66	41,43	39,48	47,72	53,62
11,18	6,52	7,29	21,64	52,11	5,37
16,88	11,26	15,75	17,07	61,03	33,69
18,53	8,53	16,11	27,81	64,36	32,40
15,36	10,21	19,66	36,91	65,81	35,91
17,61	12,45	13,47	14,72	58,00	31,61
12,50	5,10	6,15	17,02	58,58	26,27
17,58	10,53	8,05	14,79	60,21	28,60
19,06	9,13	14,59	20,58	60,09	22,43
10,30	17,17	14,45	26,99	53,07	22,43
16,28	1,24	22,13	12,24	54,35	39,12
11,15	8,57	20,16	19,43	61,45	59,09
13,32	15,46	18,31	27,34	57,73	60,99
20,42	16,41	22,71	32,89	61,38	59,04
21,73	13,18	29,00	30,54	54,56	52,58

continua

conclusão

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
27,93	20,16	37,81	10,15	66,37	47,09
16,16	9,74	31,24	16,28	63,29	53,50
17,58	16,67	26,85	22,00	86,40	37,30
26,01	19,23	17,23	21,61	62,77	31,93
29,87	11,74	43,28	18,46	61,97	45,90
26,25	12,23	33,31	18,73	65,36	31,31

APÊNDICE D – Imuno-histoquímica da I-FABP. Área marcada em cada corte em porcentagem por grupo.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
49,59	69,67	52,25	26,98	29,37	32,69
53,17	57,71	52,60	28,96	33,14	32,28
34,33	64,42	52,01	27,27	25,19	41,86
43,52	61,70	58,86	32,53	25,84	53,68
71,51	67,19	52,27	33,67	32,37	45,22
84,62	83,02	67,00	26,31	32,89	54,06
80,84	55,70	63,48	24,27	31,81	35,07
82,51	50,37	58,20	32,80	24,43	30,59
85,78	59,73	56,23	30,57	19,23	28,26
89,22	45,63	54,96	20,42	35,67	32,96
71,62	63,48	63,43	15,49	36,34	27,58
66,77	63,83	74,32	22,04	36,87	37,34
70,91	59,93	72,11	1,89	43,06	39,83
68,21	50,34	91,01	6,89	45,16	50,40
69,73	54,27	79,82	5,53	42,40	42,75
67,99	62,11	74,67	2,16	28,56	38,39
62,33	65,29	72,98	10,46	22,86	40,15
75,54	65,74	68,09	12,04	23,93	43,34
75,87	68,24	88,15	7,59	37,20	53,13
63,11	62,96	82,67	3,51	34,79	40,13
85,47	27,52	69,59	20,70	48,35	53,00
88,30	26,43	77,24	25,16	60,84	42,88
79,78	38,76	72,65	26,84	51,60	45,13
87,24	46,56	69,07	48,29	66,04	34,95

continua

conclusão

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
89,34	45,53	56,75	23,75	48,61	41,55
83,19	59,44	54,18	39,38	44,58	52,95
86,58	50,51	60,83	30,06	57,10	45,48
83,98	60,69	74,37	35,75	52,26	54,58
76,46	37,43	53,46	34,34	55,14	56,38
78,75	34,39	60,63	40,90	44,56	61,42
47,10	53,54	71,51	9,55	39,86	53,98
48,10	45,37	70,11	13,13	47,68	51,78
40,43	46,25	70,84	16,05	33,19	58,13
38,45	59,26	75,50	13,35	34,33	53,81
53,65	50,93	78,49	11,90	41,41	44,22
38,85	48,53	78,92	15,51	33,22	53,25
43,48	42,07	56,71	18,50	29,07	50,49
43,84	58,04	62,55	8,44	25,00	56,51
53,43	54,52	53,09	21,33	25,19	51,38
40,43	52,85	56,40	26,17	31,39	56,97

APÊNDICE E – Imuno-histoquímica da SOD3. Área marcada em cada corte em porcentagem por grupo.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
12,82	33,37	4,28	20,94	31,47	13,78
8,60	22,33	11,23	17,76	37,28	20,35
10,22	30,99	10,49	14,21	34,02	11,58
9,01	39,92	4,63	13,55	35,78	21,81
0,41	39,03	4,71	15,26	27,90	10,91
0,24	10,65	9,73	11,37	42,93	10,89
0,48	13,51	6,38	13,32	4,43	18,74
3,50	24,18	2,56	19,26	3,47	14,92
1,19	16,01	10,79	15,59	8,59	10,70
0,49	10,88	2,07	8,36	27,46	19,98
1,38	46,82	2,01	17,79	8,92	40,64
3,06	47,35	4,22	12,10	11,86	35,23
4,56	42,90	4,15	5,78	13,80	41,45
5,47	38,41	3,09	12,42	11,67	42,89

continua

conclusão

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0,19	49,55	10,15	0,27	9,04	37,85
0,18	51,61	24,12	5,49	8,07	30,03
2,38	67,51	15,79	15,92	72,26	10,76
5,38	61,96	27,30	16,77	68,93	13,13
3,24	70,82	30,38	22,27	72,88	3,41
2,27	72,93	12,65	8,43	79,17	3,54
1,53	45,88	4,10	6,55	80,17	6,75
6,92	74,57	8,69	3,11	42,64	5,07
0,99	46,76	4,01	13,84	46,12	6,67
0,51	40,83	10,18	5,94	61,85	12,58
0,19	43,00	4,06	4,69	59,65	19,07
0,18	36,84	38,06	27,67	58,14	6,52
3,71	75,91	10,43	2,09	25,28	7,25
2,07	76,89	41,30	14,67	34,55	15,26
0,86	73,56	19,06	5,24	34,94	20,88
2,24	77,38	27,40	14,26	50,05	28,56
0,64	68,89	21,00	24,84	52,22	17,29
0,84	73,07	9,35	10,60	46,61	12,36
1,21	68,64	27,93	17,82	26,83	25,05
2,98	60,26	14,22	35,78	35,00	28,27
0,39	71,05	29,79	10,31	38,67	25,68
0,83	64,50	8,90	4,09	23,91	12,55
11,15	24,58	4,25	15,00	7,91	35,53
10,91	45,30	15,63	7,26	9,32	31,19
0,21	57,96	30,22	2,53	8,49	41,46
1,28	26,31	2,21	13,10	12,60	44,54

APÊNDICE F– Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do CA1 (Corno de Amon 1), expresso pela média da densidade celular (nº/mm²) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuída por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	0	0	0	1	0
0	0,5	0	7,5	1	0
0	0	0	0,5	0	2,5
0	0	0	0	3	0
0	0	0	1	7,5	1,5
0		0	2	0	5
0		0	0	0	1
0		0	3	0	
2,5		2		0	

APÊNDICE G – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do CA1 (Corno de Amon 1), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	0	0	0	0,5	0
0	0,5	0	1,5	0,5	0
0	0	0	0,5	0	1
0	0	0	0	1	0
0	0	0	0,5	1	0,5
0		0	0,5	0	1
0		0	0	0	1
0		0	1	0	
1		1,5		0	
				0	

APÊNDICE H – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do CTX (córtex), expressa pela média da densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuída por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0,5	0
0	0	0	0	0	0
0	0	6	0	0	3
0		0	0	1	31,5
1		0	0	0	1
0		0	0	0	
1		0		0	
				0,5	

APÊNDICE I – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do CTX (Córtex cerebral), expressas pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0,5	0
0	0	0	0	0	0
0	0	0,5	0	0	0,5
0		0	0	0,5	1,5
0,5		0	0	0	0,5
0		0	0	0	
0,5		0		0	
				0,5	

APÊNDICE J – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do GD (giro denteado), expressa pela densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuída por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	17,5	0	6,5	7,5	0
0	7	0	14	16	4
1	6,5	0	7,5	0	34
9	10	0,5	1,5	26,5	0
4	5	0	3,5	2,5	10
1,5		4	10	1	12
6		0	28	0,5	6
4,5		0	7	11,5	
25		9		1	
				1,5	

APÊNDICE K - Avaliação imuno-histoquímica cerebral da GFAP na região do CTX (córtex), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
0	1	0	2	1	0
0	2	0	1,5	0,5	1
0,5	1,5	0	1,5	0	1
1	1	0,5	1	1,5	0
1	1	0	0,5	0,5	1
1,5		1,5	2	0,5	1
1		0	1,5	0,5	1
1		0	1	1	
1		1,5		0,5	
				0,5	

APÊNDICE L – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da NeuN na região do CTX (córtex), expressa pela média da taxa de marcação (células positivas/total de células x100) no corte avaliado. Cada valor representa a média das taxas atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
61,12	38,58	71,57	52,59	36,68	35,08
66,82	46,73	58,19	59,66	69,74	59,13
70,62	56,37	53,38	73,03	75,06	49,53
67,82	64,74	50,32	39,45	61,19	46,3
44,4	53,8	55,1	60,56	72,26	66,71
33,18		59,56	57,13	50,45	62,59
43,63		64,21	52,17	69,28	47,13
52,42		71,33		65,34	65,63
57,63		65,67		49,29	

APÊNDICE M – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN na região do CTX (córtex), expressa pela densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
97,18	148,32	64,28	121,92	153,35	157,14
53,73	129,33	100,56	106,91	96,1	133,64
92,65	109,53	115,35	133,52	115,38	138,55
83,01	105,81	114,02	113,83	169	101,07
100,16	129,46	93,55	136,07	103,37	123,04
119,38		117,11	141,74	127,88	121,06
101,24		124,32	131,84	161,29	130,72
109,13		85,69		153,49	136,9
112,85		144,78		157,63	

APÊNDICE N - Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN na região do CTX (córtex cerebral), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
3	2	2,5	1,5	2	2
3	2,5	2,5	1,5	3	2,5
3	3	2,5	3	3	2,5
2,5	3	2,5	1,5	2	2,5
3	2,5	3	2,5	3	2,5
1,5		3	3	2	2,5
3		3	2	3	2
3		3		3	2,5
2,5		3		2	

APÊNDICE O - Avaliação imuno-histoquímica cerebral da NeuN na região do CA1 (corno de Amon 1), expressa pela média da taxa de marcação (células positivas/total de células x100) no corte avaliado. Cada valor representa a média das taxas atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
32,96	27,55	35,11	38,99	24,44	20,66
68,47	35,05	31,9	45,18	45,08	33,8
51,92	52,91	31,7	56,48	69,4	28,95
37,79	58,56	38,22	29,66	46,9	34,4
49,17	44,79	43,06	51,94	70,79	50,38
29,73		43,71	33,57	32,43	37,63
56,22		73,29	39,94	45,38	31,56
29,59		41,2		41,94	49,95
27,51		49,17		38,1	

APÊNDICE P – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN na região do CA1 (corno de Amon 1), expressa pela densidade celular (nº/mm²) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
75,67	126,64	93,72	105,19	118,22	140,66
57,96	123,49	99,9	109,4	103,02	127,11
93,59	116,4	112,17	111,93	126,71	138,48
100,98	133,98	95,21	86,74	94,96	131,96
90,16	248,12	107,11	83,04	105,56	116,21
81,64		41,68	131,93	100,49	108,02
80,86		78,41	105,31	104,03	122,85
97,76		126,47		129,66	147,64
108,69		103,13		123,59	

APÊNDICE Q – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN na região do CA1 (corno de Amon 1), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
3	1	1	2,5	1	1
2	2	1,5	2	2	2
1,5	3	2	2,5	3	1,5
1	1,5	1	1	2	2,5
1,5	2,5	2	1,5	2,5	3
1		1,5	2	2	2
2		3	1,5	2,5	2
1,5		2		2,5	2
2		2		3	

APÊNDICE R – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN no GD (giro denteado), expressa pela densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
67,1	115,56	98,57	110,13	112,19	119,36
97,1	114,42	114	123,2	132,83	107,17
82,9	111,07	113,75	125,71	578,53	117,89
88,9	110,46	98,54	98,53	127,31	145,89
89,1	99,47	93,61	95,77	126,16	113,98
93		107,08	132,41	107,83	96,55
80,2		81,69	115,34	147,58	120,74
89,1		134,79		129,29	116,87
103,6		103,49		116,31	

APÊNDICE S – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do NeuN no GD (giro denteado), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
3	2	2,5	2	1	1
2	2	1,5	1,5	2	2
1,5	3	2	3	3	1,5
2,5	2,5	2	1,5	3	2,5
2	2,5	2,5	2	2,5	3
2		2	2,5	2,5	2
3		3	2	2	2
1,5		2		3	2
2,5		2,5		2,5	

APÊNDICE T – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da NeuN no GD (giro denteado), expressa pela média da taxa de marcação (células positivas/total de células x100) no corte avaliado. Cada valor representa a média das taxas atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
46,01	18,44	23,8	38,38	19,75	18,76
58,17	33,58	24,09	33,37	49,35	31,63
30,67	46,39	32,37	49,93	72,81	27,29
30,48	53,15	29,15	26,97	42,38	40,04
35,11	40,08	53,89	47,03	59,29	55,91
35,9		33,39	45,74	33,06	32,47
41,18		46,86	46,79	48,26	31,05
35,19		27,58		49,96	54,9
39,21		40,34		45,15	

APÊNDICE U – Avaliação imuno-histoquímica cerebral do SOD3 no CA1 (corno de Amon 1), expressa pela densidade celular (nº/mm²) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
9,08	5,21	1,06	2,66	2,71	5,66
12,28	11,98	0,23	1,58	23,23	29,11
4,01	0,69	1,20	1,71	22,90	7,82
4,70	5,96	2,43	2,96	18,36	1,90
		3,88	2,76	28,27	10,34

APÊNDICE V – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3 no CA1 (corno de Amon 1), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
1,50	1,50	1,00	0,50	1,00	1,00
1,00	1,50	0,50	0,50	1,50	2,00
1,00	0,50	1,00	0,50	2,00	1,00
0,50	1,50	0,50	1,50	2,00	0,50
		1,50	1,50	2,50	1,50

APÊNDICE W – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3 no CTX (córtex), expressa pela densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
5,20	26,62	0,86	7,28	10,30	24,95
13,68	28,05	1,04	2,51	2,93	10,12
41,17	2,63	0,11	1,05	13,78	8,62
2,58	19,10	10,01	2,63	29,35	1,97
		5,88	3,08	29,34	27,40

APÊNDICE X - Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3 no CTX (córtex), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
1,50	2,00	1,50	1,00	2,00	2,00
2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,50
2,50	1,00	1,00	0,50	2,50	1,50
1,00	2,00	2,50	1,50	2,50	1,00
		2,00	0,50	2,50	2,50

APÊNDICE Y - Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3 no GD (giro denteado), expressa pela densidade celular (n°/mm^2) no corte avaliado. Cada valor representa a média das contagens atribuídas por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
7,35	7,23	2,59	3,12	22,26	6,16
15,18	12,69	1,85	1,87	3,92	4,03
23,80	3,28	0,23	1,86	3,37	4,84
0,43	7,73	3,29	1,11	27,47	0,57
		3,22	2,30	19,99	3,61

APÊNDICE Z – Avaliação imuno-histoquímica cerebral da SOD3 no GD (giro denteado), expressa pela média do escore de intensidade de marcação no corte avaliado. Cada valor representa a média dos escores atribuídos por 3 avaliadores cegos na análise de um animal, separados por grupos.

C	COHB1	COHB2	ECN	ECNOHB1	ECNOHB2
1,50	1,50	1,00	0,50	2,00	1,00
1,00	1,50	0,50	0,50	1,00	1,00
1,50	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00
0,50	1,50	1,50	0,50	2,00	0,50
		1,00	0,50	2,00	0,50

APÊNDICE AA – Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

Declaramos que o adendo do Protocolo para Uso de Animais em Experimentação número **102/2017** sobre o projeto intitulado "*Efeito da oxigenoterapia hiperbárica sobre o intestino de ratos submetidos a modelo experimental de enterocolite necrosante*", sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de novembro de 2017.

We declare that the Addendum to the Protocol n° 102/2017, entitled "*Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestine of rats submitted to an experimental model of necrotizing enterocolitis*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 11/27/2017.

Ribeirão Preto, 27 de novembro de 2017


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

APÊNDICE BB – Artigo enviado para publicação.

World Journal of Pediatrics Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestine and brain in experimental necrotizing enterocolitis --Manuscript Draft--	
Manuscript Number:	WJOP-D-23-00502
Full Title:	Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestine and brain in experimental necrotizing enterocolitis
Article Type:	Original Article
Funding Information:	
Abstract:	<p>Background: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common emergence of the gastrointestinal tract in newborns with multifactorial etiology, such as bacterial colonization, enteral formula feeding, and hypoxic-ischemic injury. The pathology of NEC consists of coagulative necrosis and super bacterial colonization with very few preventive methods. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a successful treatment for many anaerobic infections and could be a possible strategy for the treatment of NEC. We aimed to evaluate the effect of HBOT on the intestine and brain of an experimental NEC rat model. Methods: Newborn rats were subdivided into 6 groups: 1) Control (C), 2) Control + 1 day of HBO (CHB1), 3) Control + 2 days of HBO (CHB2), 4) Necrotizing enterocolitis (NEC), 5) NEC + 1 day of HBO (NECHB1), and 6) NEC + 2 days of HBO (NECHB2). Morphometrical, histological, and immunohistochemical analyses were performed in the intestine and the brain to identify the damage. Results: Morphometrical: the mortality rate was NEC (30,8%), NECHB1 (20%), NECHB2 (14%), and no death in the others. Body weight (BW) and intestine weight (IW) in the C groups were higher than in the NEC groups. HBOT reduced histological damage in the intestine. It increased the I-FABP, iNOS, and SOD3 expressions. In the hippocampus, HBOT improved the morphology and the cellular density and reduced astrogliosis and oxidative stress by raising SOD3. Conclusion: HBOT demonstrated efficacy in reducing mortality and severity of intestinal and brain injury in experimental NEC by preserving cell integrity and increasing antioxidant mechanisms.</p>
Corresponding Author:	Lourenço Sbragia, MD, PhD Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto Ribeirao Preto, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirao Preto
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Ana Laura Ferreira Mársico Dalto
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Ana Laura Ferreira Mársico Dalto Stephanya Covas Silva, PhD Pamella da Silva Beggiora Marques, PhD Omar Feres, PhD Luiza da Silva Lopes, PhD Lourenço Sbragia, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Dear editors and reviewers of this prestigious journal. This work presents unprecedented results on the effects of hyperbaric oxygen therapy on experimental necrotizing enterocolitis (NEC) associated with an analysis of brain disorders resulting from a possible alteration of the intestinal microbiota caused by the pathophysiology of

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

**Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestine and brain in experimental
necrotizing enterocolitis**

An approach to the gut-brain axis

Ana Laura Ferreira Marsico Dalto¹, Stephanya Costa da Silva² PhD, Pamella da Silva
Beggiora Marques³ PhD, Omar Feres⁴ PhD, Luiza da Silva Lopes⁵ PhD, Lourenço Sbragia⁶
PhD

(ORIGINAL ARTICLE)

¹ Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

² Division of Anatomy, Department of Morphology and Pathology, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos, Brazil.

³ Division of Neuroanatomy, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

⁴ Division of Coloproctology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

⁵ Division of Neuroanatomy, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

⁶ Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

*Corresponding author:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia

E-mail: sbragia@fmrp.usp.br

<https://orcid.org/0000-0002-1881-6345>

Division of Pediatric Surgery – Department of Surgery and Anatomy
Ribeirao Preto Medical School – University of Sao Paulo

Phone: +55 16 3615-2593 (Department) / 3615-0440 (Laboratory), FAX: +55 16 3633-0836

Av. Bandeirantes 3900 - Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil. 14049-900.

ABSTRACT

Background: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common emergence of the gastrointestinal tract in newborns with multifactorial etiology, such as bacterial colonization, enteral formula feeding, and hypoxic-ischemic injury. The pathology of NEC consists of coagulative necrosis and super bacterial colonization with very few preventive methods. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is a successful treatment for many anaerobic infections and could be a possible strategy for the treatment of NEC. We aimed to evaluate the effect of HBOT on the intestine and brain of an experimental NEC rat model.

Methods: Newborn rats were subdivided into 6 groups: 1) Control (C), 2) Control + 1 day of HBO (CHB1), 3) Control + 2 days of HBO (CHB2), 4) Necrotizing enterocolitis (NEC), 5) NEC + 1 day of HBO (NECHB1), and 6) NEC + 2 days of HBO (NECHB2). Morphometrical, histological, and immunohistochemical analyses were performed in the intestine and the brain to identify the damage.

Results: Morphometrical: the mortality rate was NEC (30.8%), NECHB1 (15.8%), NECHB2 (14.3%), and no death in the others. Body weight (BW) and intestine weight (IW) in the C groups were higher than in the NEC groups. HBOT reduced histological damage in the intestine. It increased the I-FABP, iNOS, and SOD3 expressions. In the hippocampus, HBOT improved the morphology and the cellular density and reduced astrogliosis and oxidative stress by raising SOD3. **Conclusion:** HBOT demonstrated efficacy in reducing mortality and severity of intestinal and brain injury in experimental NEC by preserving cell integrity and increasing antioxidant mechanisms.

Keywords: Brain injury, Gut-Brain Axis, Hyperbaric Oxygen Therapy, Necrotizing Enterocolitis, Oxidative Stress.

INTRODUCTION

Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common gastrointestinal tract emergency in newborns. NEC is a severe inflammatory disease that can occur in any part of the gastrointestinal tract, most typically in the terminal ileum and ascending colon (1). It occurs in 1-3 patients for every 1000 live births, affecting 7-11% of very low birth weight neonates (<1500g) (2,3) and predominantly in preterms (4,5).

The pathogenesis of NEC involves the breakdown of the intestinal barrier, composed of the interaction of a series of mechanisms such as tight junctions, peristalsis, and mucous, including secretory IgA (6). Intestinal colonization by pathogenic bacteria, use of hyperosmolar formula, and hypoxia are the main factors involved in the pathophysiology of NEC (4). The mortality ranges from 15-30% (3,5,7).

The treatment of NEC is clinical and can become surgical when there is disease progression or perforation. In 35% of those operated on, the resection can be very extensive and cause short bowel syndrome (SBS) (8,9).

Newborns surviving NEC are at increased risk of cerebral palsy, visual impairment, and cognitive and psychomotor deficits (10). Brain damage is proportional to the severity of the disease (11,12). The gut-brain axis comprises neural, hormonal, and immunological integration between the gut and brain. It allows the microbiota and its metabolites to interfere with brain development and function (13,14).

Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) supplies 100% oxygen in a chamber that reaches pressures greater than sea level (1 absolute atmosphere, ATA). It promotes an increase in oxygen tension at the tissue level, an increase in angiogenesis, decreased leukocyte adhesion during reperfusion, decreased bacterial proliferation, and activates the antioxidant system (15). Hypoxia is an important factor in the pathogenesis of NEC. HBOT has already been tested experimentally and may emerge as a possible modality to be applied in the treatment of NEC (16). Our objective was to evaluate the effects of HBOT on the intestine and brain in a rat model of NEC.

METHODS

This experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Ribeirao Preto Medical School (CEUA - Ribeirao Preto Medical School-USP) #102/2017.

NEC was induced as previously published (17,18). Newborn Sprague-Dawley rats were fed with 0.1mL Esbilac artificial milk (PetAg, Hampshire, IL, USA) every 3h, seven times/day, using as an orogastric tube an adapted catheter (PICC, 1.9 Fr 26G, monolumen, BD®, Sandy, UT, USA). Hypoxia was induced by exposing the animals to 35 L/min of 100% nitrogen (N₂) in an anoxic acrylic chamber for 70 s, followed by hypothermia (4°C) in a refrigerator for 10min, twice a day, for three days.

All rats were born spontaneously at term. Neonates were weighed at birth and randomly assigned to 6 groups: 1) Control C: breastfeeding (n=18); 2) CHB1: breastfeeding with 1 day of HBOT on the 3rd day (2 sessions) (n=14); 3) CHB2: breastfeeding with 2 days of HBOT on the 2nd and 3rd days (4 sessions) (n=17); 4) NEC: neonates submitted to NEC protocol (n=26), 5) NECHB1: NEC with 1 day of HBOT on the 3rd day (2 sessions) (n=19) and 6) NECHB2: NEC with 2 days of HBOT on the 2nd and 3rd days (4 sessions) (n=21). Animals were placed in a cage box, inside the experimental hyperbaric chamber and inspired pure O₂ at 2ATA/2h/day. The sessions consisted of 15 min of slow pressurization, 90 min of stable pressure, and 15 min of depressurizing. After treatment, the animals were returned to their cages.

SAMPLE COLLECTION AND HISTOLOGICAL PROCESSING

All animals were weighed and sacrificed by decapitation on the 4th day. The intestine was dissected and weighed. The terminal ileum and the brain were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Transverse 5µm sections of the ileum and 4µm sections in the coronal plane of the brain at the -3.72 bregma level (19) were cut using a rotary microtome. The cortex (CTX) and the hippocampal subareas CA1 and dentate gyrus (DG) were evaluated. Intestinal sections were stained with Masson's trichrome and brain sections with hematoxylin-eosin (HE) or separated for immunohistochemical (IHC). The sections were photographed with a NIKON Eclipse 80i photomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan), magnifying 40x for IHC and 20x for intestinal histology. The images were captured by the NIS-Elements

program (Nikon Corporation, Tochigi, Japan) and treated by the Image Pro Plus 6.0 (IPP; produced by Media Cybernetics Corporation, USA). Each section was analyzed by 3 blinded evaluators. The intestinal grading was performed as described by *Dvorak et al.* (20).

IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSAY

The protein biomarkers studied were: iNOS for intestinal inflammation; I-FABP for intestinal injury; SOD3 for intestinal and brain cellular oxidative stress (OS); GFAP to assess the morphological aspect of astroglia and NeuN to observe neuronal preservation. After deparaffinization and hydration in an ethanol series, the sections were placed in a sodium citrate solution (10mM, pH 6.0) in a steam pan for 40min. Blockade of endogenous peroxidase was performed with 3% hydrogen peroxide in methanol (Dinâmica®, Indaiatuba, Brazil). Subsequently, the blockade was performed with adequate 10% serum (Ab7481, Abcam, Cambridge, United Kingdom) diluted in PBS for 30min in a humid chamber. The sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies anti-I-FABP sc-16063, anti-NOS2 sc-7271, anti-SOD3 sc-101338 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-GFAP Z0334 1:2000 (DAKO, Santa Clara, USA), and anti-NeuN Ab104225 1:1000 (Abcam, Cambridge, UK). After washing the primary antibody, the appropriate secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit sc-2040, rabbit anti-rabbit sc-2768, or anti-mouse sc-2039, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluted 1:300 in BSA was added. Afterward, they were incubated with the streptavidin–HRP 405210 (BioLegend, CA, USA) diluted 1:400 in PBS. Next, they were developed with DAB 3,3-diaminobenzidine D8001 (Merck Millipore, Massachusetts, USA). Finally, slides were counterstained with Hematoxylin, rinsed in water, dehydrated by alcohol and xylene, and covered with coverslips mounted with Permount (Fisher Scientific, Hampton, USA).

The brain was analyzed through cell density and an intensity score from 0 to 3. For intestinal analysis, we used Image-Pro Plus software. From the selection of patterns of protein expression, the program calculated the marked area. Then, dividing by the total area in the cut and multiplying by 100 gave us a percentage value.

STATISTICAL ANALYSIS

ANOVA was used to evaluate the morphometry values. Histology and IHC were analyzed with the Tukey-Kramer post-test. Non-parametric tests were used for further comparisons (Kruskall-Wallis, followed by Dunn's post-test). considering $P < 0.05$. Results were expressed as mean \pm standard deviation. Descriptive statistics of the sample and morphometric data were performed using GraphPad Prism 9.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and Microsoft Excel (2010).

RESULTS

A total 133 of neonates were delivered, 20 were excluded due to failures along the protocol and 14 died during the experiment, thus leaving 101 animals collected. The mortality varied among the groups, NEC 30.77% (8/26), NECHB1 15.79% (3/19), and NECHB2 14.28% (3/21). Control groups had no deaths.

MORPHOMETRICS

Body weight (BW): Control groups showed similar BW, with no difference between them [C x CHB1 ($P=0.06$), C x CHB2 ($P=0.99$), CHB1 x CHB2 ($P=0.16$)]. No difference was found between NEC groups [NEC x NECHB1, NEC x NECHB2 ($P=0.999$), NECHB1 X NECHB2 ($P>0.999$)]. Intestinal Weight (IW): Control groups showed similar IW [C x CHB1 ($P=0.14$), C x CHB2 ($P=0.42$), CHB1 x CHB2 ($P=0.98$)]. HBOT didn't change significantly NEC groups IW [NEC x NECHB1, NEC x NECHB2 ($P=0.94$), NECHB1 X NECHB2 ($P>0.999$)]. All controls had higher BW and IW than NEC groups ($P<0.0001$). (Fig1).

HISTOLOGICAL GRADING OF INTESTINAL LESION

The score of intestinal damage showed mean values of C (0.197 ± 0.44), CHB1 (0.96 ± 0.9), and CHB2 (0.84 ± 0.66). CHB1 and CHB2 had a higher score than C ($P<0.0001$). NEC (3.36 ± 0.75), NECHB1 (1.71 ± 1.09), and NECHB2 (1.74 ± 0.92). NECHB1 and NECHB2 had lower scores than NEC ($P<0.0001$), but no difference between them ($P=0.98$). All C groups had lower graduation than the NEC groups [CHB1 x NECHB2 ($P=0.0004$), CHB2 x NECHB1 ($P=0.0003$), other comparisons ($P<0.0001$)]. (Fig2).

INTESTINE IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Results are shown in Table 1.

iNOS: CHB1, CHB2 and all the NECs had increased staining area in the ileum relative to group C ($P<0.0001$). CHB2 had higher expression than CHB1 ($P=0.002$), but no difference with NEC

($P > 0.999$). NECHB1 and NECHB2 staining areas were higher than NEC ($P < 0.0001$), and the first higher than the second ($P = 0.0002$).

I-FABP: All the NECs groups had decreased staining area in the ileum relative to the C ($P < 0.0001$). NEC was decreased from CHB1 and CHB2 ($P < 0.0001$), NECHB1 ($P = 0.036$), and NECHB2 ($P < 0.0001$). Other comparisons were no significant [C x CHB1 ($P = 0.438$), C x COHB2 ($P > 0.999$), CHB1 x CHB2 ($P = 0.095$), NECHB1 x NECHB2 ($P = 0.761$)].

SOD3: NEC staining area was lower than NECHB1 ($P < 0.0001$) but had no difference with NECHB2 ($P = 0.168$). NECHB1 was higher than NECHB2 ($P = 0.0005$). All the groups had higher staining areas than C (CHB1, NEC, NECHB1, and NECHB2 ($P < 0.0001$); CHB2 ($P = 0.023$), NEC ($P = 0.042$)). CHB2 had no difference with NEC ($P > 0.999$) and NECHB2 ($P = 0.247$).

HISTOLOGICAL DESCRIPTION OF BRAIN DAMAGE

In the NEC group, the DG lost its common gyrus morphology and shape. Many neurons presented pyknosis (degeneration process) and fewer with local damage. In CA1, the cell layer was sparser. In CTX, we didn't observe alterations between the groups. The cortical lamination was preserved, and the cells had normal morphological aspects. When we compare the cortical, CA1, and DG regions of NEC with NECHB1, we observed a greater number of cells in the treated group. The NECHB2 group had fewer preserved cells than C and more cells than NEC: In CA1, neurons were sparse and lost their morphological organization as well as NEC, and in DG, there was greater damage when compared to NECHB1, with a reduction in the cell population and cells foamy appearance.

BRAIN IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Results are shown in Table 2.

GFAP: The NEC group didn't show reactive astrogliosis in the cerebral CTX. In CA1 and DG, the NEC group had a greater number of reactive astrocytes present than all other groups, but no significant difference. In the DG, the density and the intensity were higher in NEC x CHB2 ($P = 0.003$ and $P = 0.015$, respectively).

NeuN: In CTX, the groups treated with HBOT showed more preservation in the neuronal density than NEC, but no significance ($P > 0.999$). In CA1, the density was higher in CHB1 x C ($P = 0.003$), NECHB2 x C ($P = 0.005$), and NECHB2 x CHB2 ($P = 0.023$). The number of immunostained neural cells and the intensity in this region were also very similar between the groups, with the NECHB2 group having the lowest rate of marked cells. In DG, the density was higher in NEC x C ($P = 0.046$), NECHB1 x C ($P < 0.001$), AND NECHB2 x C ($P = 0.007$). NECHB1 showed a greater volume of preserved neurons and higher intensity than NEC, but no significance ($P > 0.009$ and $P = 0.935$, respectively).

SOD3: In CTX, C, CHB1, NECHB1, and NECHB2 showed the highest density of immunostained cells, while CHB2 and NEC showed the lowest but without significance ($P > 0.27$). In CA1, the highest density was obtained in NECHB1. Differences were found between NECHB1 x CHB2 ($P = 0.032$) and NECHB1 x NEC ($P = 0.029$). No significant difference was found in intensity in the CTX and CA1 ($P > 0.05$ and $P > 0.278$, respectively). In DG, NECHB1 was the one that presented the highest number of labeled cells and intensity score, while NEC had the lowest ($P = 0.029$ and $P = 0.035$). NECHB1 density was higher than CHB2 ($P = 0.032$) (Fig3).

DISCUSSION

This is the first study that evaluates the intestinal and cerebral effects of HBOT in an experimental model of NEC. The treatment determined a significant improvement in the histology patterns in both areas.

NEC continues to be a challenge because it is a multifactorial disease. Considering that NEC is an inflammatory bowel disease highly associated with hypoxia and bacterial colonization, HBOT could be considered an effective therapeutic method. In clinical practice, the use of HBOT in newborns is still restricted by the low access to therapy and the difficult adaptation of the chambers to neonatal life support materials. Nevertheless, its use in ischemic lesions of soft parts and the treatment of neonatal cerebral hypoxia has been progressively advancing over time (21,22).

Our study observed a higher mortality rate of NEC than in control groups. Mortality in the NECHB2 group dropped by more than half (14,3%) compared to the NEC group. In an experimental model of sepsis in rats, it was demonstrated that HBOT reduces mortality if applied early (23). Being applied during the golden hour in the treatment, it reduces the early release of inflammatory cytokines such as IL-6, IL-10, and TNF α (24). In the NECHB1 and NECHB2 groups, greater immunostaining of I-FABP and SOD3 was observed in the ileum compared to the NEC group. Therefore, the reduction of inflammation and the increase of antioxidant agents in the intestine by HBOT may be responsible for the reduction in the mortality rate.

In the BW and IW evaluation, the control groups showed higher means than the NEC groups, and the therapy didn't significantly improve the results. Control groups received breast milk, which acts as a protector against diseases of the gastrointestinal tract, as it promotes mucosal trophism, local hormonal regulation, improves blood flow, peristalsis, and controls the microbiota (25). Low weight is probably associated with malnutrition and the inflammatory process.

In the intestinal histological evaluation, the tissue damage was higher in the NEC group and HBOT significantly reduced the score. The action of HBOT on bacterial overgrowth can reduce the inflammatory component of NEC, reducing intestinal histological damage (26). It has been observed that the use of probiotics is effective in preventing NEC, by controlling pathogenic bacteria and their

products (18,27). NECHB1 was only treated on the third day, which is when NEC was already established. It promoted better preservation of histology compared to NECHB2, which suggests that earlier application of therapy didn't generate a preventive effect on the development of the disease. Reducing bowel injury decreases the risk of loop necrosis and perforation, which may reduce sepsis and the need for surgical intervention (28). The IHC assessment for I-FABP also indicates that there was greater preservation of cell integrity in animals treated with HBOT, which complements the histological findings. This protein is responsible for the intracellular transport of long-chain fatty acids. I-FABP decreases at the intestinal level in an experimental model of NEC (18). When there is damage to the enterocyte, it is released, and its plasmatic level increase can be detected and can act as an early biomarker of the disease (29).

In the inflammatory process of NEC, there is an increase in nitric oxide (NO) and iNOS (30,31). NO, in addition to the vasodilator effect, can have a deleterious effect on the intestinal mucosa, acting as a potent oxidant by reacting with superoxide anions, forming peroxynitrite. This free radical leads to an increase in intestinal permeability and apoptosis of intestinal villous enterocytes (30). There is a reduction of NO in experimental models of colitis and NEC treated with HBOT (16,32), but there is a lack of evidence of the behavior of iNOS and other NO synthases in this process. In a skeletal muscle ischemia-reperfusion (IR) model, there was an increase in endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) after the application of HBOT (33). Perhaps the increase in iNOS expression in the enterocytes of the groups that received HBOT is justified by the cell preservation demonstrated in the histological analysis.

The inflammatory insult added to the initial ischemic process present in the NEC leads to the migration of neutrophils and the release of reactive oxygen species (ROS). They promote the peroxidation of membrane lipids, oxidizing DNA and denaturing enzymes, injuring the intestinal mucosa (34). Administration of substances with antioxidant action, such as melatonin and N-acetylcysteine, has been demonstrated to reduce intestinal damage in NEC (35,36). SOD3 is produced intracellularly and excreted extracellularly in various tissues. The presence of SODs is important in intestinal resistance to IR (37). In our study, HBOT increased SOD3 activity as a defense mechanism. The enzyme transforms superoxide radicals into H_2O_2 and O_2 . H_2O_2 is neutralized by catalase and

glutathione in water. HBOT increased SOD, with the most significant increase in the groups that received only two sessions. We believe that this may be related to an earlier response to OS. HBOT also fights the OS by reducing HIF-1 α and caspase-3 and signaling proteins such as p53 and BNip3 (38).

The pathological process is responsible for the degradation of the intestinal microbiota, and this affects the central nervous system (CNS). This fact occurs through the communication system between the brain and the intestine, the gut-brain axis (13). Studies in germ-free mice indicate that the intestinal microbiota influences the postnatal development of the hypothalamic–pituitary response to stress (39). The hippocampus is one of the main targets of changes in the microbiota, especially by increasing the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) involved with memory, learning, anxious behavior, and fear (40). NEC survivors have a higher incidence of neurodevelopmental delay (41). Also, greater brain damage at MRI has been seen in those who had to undergo surgical treatment, which correlates the severity of the disease with the degree of CNS injury (42). Sensorimotor deficits and learning difficulties were more common in this population. The need for surgical intervention proved to be an aggravating factor in neurological sequelae, which suggests a direct relationship between the severity of the and CNS impairment (41).

We found a reduction of neurons in the hippocampus in NEC. In experimental NEC, fewer mature neurons were found, mainly in the hippocampus and thalamus, with the CTX being the least altered region (43). HBOT is shown to be an alternative in neuroprotection against ischemic insult by reducing apoptosis, and DNA fragmentation, in addition to improving the performance of animals in cognitive tests (26,44). Groups that received four sessions showed cell changes that may suggest neuronal distress due to oxygen toxicity.

Astrogliosis was higher in the NEC group in the hippocampus. Astrocytes are responsible for neuronal cell repair after injury (45). It is expected, therefore, that in areas where more damage occurred, there will be greater activation of the healing process. HBOT reduced astrogliosis in the DG region, an important area for cell replication and neurological development. An increase in astrocytes and microglia activation has already been demonstrated in NEC and is related to the severity of the disease (43). HBOT reduced GFAP expression in experimental models of hydrocephalus and trauma. The

presence of astrocytes in the long term leads to structural (scarring) and metabolic alterations in the hippocampus, which restrain the recovery of cognitive function (26,44,46).

In the NeuN evaluation, we found an increase in cell density among the groups that received HBOT. In brain trauma, HBOT was effective in preserving neurons, applied early or late (47). There was a slight increase in cell density in the NEC which was not previously observed (43) but without statistical impact. We consider the preservation of neurons by the application of HBOT in the experimental NEC a secondary gain because, in addition to the direct effect of the therapy, it also contributed to the preservation of the CNS.

The reduction of SOD3 in the brain of the NEC group was also observed. HBOT increased SOD, mainly in NECHB1. Four sessions didn't improve OS control in the evaluated structures. In an experimental model of spinal cord injury, HBOT increased SOD and reduced malondialdehyde (48). In brain trauma, HBOT reduced the levels of TNF- α and myeloperoxidases, which means a reduction in the local accumulation of neutrophils and ROS (49). In addition to the greater offer of O₂ to tissues with perfusion deficiency, HBOT activated the antioxidant system, mainly in the hippocampus. Therefore, we believe that the antioxidant action permeates the microbiota-gut-brain axis and mechanisms like this may have a neuroprotective effect.

In conclusion, HBOT was shown to be effective in reducing mortality and the severity of intestinal and brain damage in an experimental model of NEC. It preserved cell integrity and increased antioxidant mechanisms. It is possible to say that the treatment with HBOT was more effective when applied after the development of the disease and in fewer sessions. We hypothesize that oxygen toxicity may have been responsible for worse outcomes in the NECHB2 group. This study didn't intend to evaluate the side effects of HBOT.

REFERENCES

1. Dominguez KM, Moss RL (2012) Necrotizing Enterocolitis. *Clin Perinatol* 39:387–401
2. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al (2010) National Institutes of Health Bethesda, Maryland Pediatrics. *Pediatrics* 126:443–456
3. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan X Di, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F (2003) Neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 6:6–23
4. Kosloske AM (1994) Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 396:2–7
5. Holman RC, Stehr-Green JK, Zelasky MT (1989) Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979–85. *Am J Public Health* 79:987–989
6. Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, Hackam DJ (2007) The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Shock* 27:124–133
7. Henry MCW, Moss RL (2006) Laparotomy Versus Peritoneal Drainage for Perforated Necrotizing Enterocolitis. *Neoreviews* 7:e456–e462
8. Hong CR, Han SM, Jaksic T (2018) Surgical considerations for neonates with necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 23:420–425
9. Goulet OJ, Revillon Y, Jan D, De Potter S, Maurage C, Lortat-Jacob S, Martelli H, Nihoul-Fekete C, Ricour C (1991) Neonatal short bowel syndrome. *J Pediatr* 119:18–23
10. Rees CM, Pierro A, Eaton S (2007) Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92:193–198
11. Zhou Q, Niño DF, Yamaguchi Y, et al (2021) Necrotizing enterocolitis induces T lymphocyte-mediated injury in the developing mammalian brain. *Sci Transl Med* 13:1–30
12. Hintz SR, Kendrick DE, Stoll BJ, Vohr BR, Fanaroff AA, Donovan EF, Poole WK, Blakely ML, Wright L, Higgins R (2005) Neurodevelopmental and growth outcomes of extremely low birth weight infants after necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 115:696–703

13. Niemarkt HJ, De Meij TG, Van Ganzewinkel CJ, De Boer NKH, Andriessen P, Hütten MC, Kramer BW (2019) Necrotizing Enterocolitis, Gut Microbiota, and Brain Development: Role of the Brain-Gut Axis. *Neonatology* 115:423–431
14. Moschopoulos C, Kratimenos P, Koutroulis I, Shah B V., Mowes A, Bhandari V (2018) The neurodevelopmental perspective of surgical necrotizing enterocolitis: the role of the gut-brain axis. *Mediators Inflamm.*
15. Gill AL, Bell CNA (2004) Hyperbaric oxygen: Its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM - Mon J Assoc Physicians* 97:385–395
16. Guven A, Gundogdu G, Uysal B, Cermik H, Kul M, Demirbag S, Ozturk H, Oter S (2009) Hyperbaric oxygen therapy reduces the severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg* 44:534–540
17. Jilling T, Simon D, Lu J, Meng FJ, Li D, Schy R, Thomson RB, Soliman A, Arditi M, Caplan MS (2006) The Roles of Bacteria and TLR4 in Rat and Murine Models of Necrotizing Enterocolitis. *J Immunol* 177:3273–3282
18. Gonçalves FLL, Soares LMM, Figueira RL, Simões ALB, Gallindo RM, Sbragia L (2015) Evaluation of the expression of I-FABP and L-FABP in a necrotizing enterocolitis model after the use of *Lactobacillus acidophilus*. *J Pediatr Surg* 50:543–549
19. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. Academic Press, San Diego
20. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, Mcwilliam DL, Dominguez JA, Stepankova R, Payne CM, Mccuskey RS (2002) Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 282:156–164
21. Vazquez RL, Spahr RC (1990) Hyperbaric Oxygen Use in Neonates: A Report of Four Patients. *Am J Dis Child* 144:1022–1024
22. Sánchez Cuauhtémoc E (2013) Use of hyperbaric oxygenation in neonatal patients: A pilot study of 8 patients. *Crit Care Nurs Q* 36:280–289

23. Buras JA, Holt D, Orlow D, Belikoff B, Pavlides S, Reenstra WR (2006) Hyperbaric oxygen protects from sepsis mortality via an interleukin-10-dependent mechanism. *Crit Care Med* 34:2624–2629
24. Halbach JL, Prieto JM, Wang AW, et al (2019) Early hyperbaric oxygen therapy improves survival in a model of severe sepsis. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 317:R160–R168
25. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS, Meza YG, Kozakova H, McCuskey RS (2003) Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 53:426–433
26. Akin ML, Uluutku H, Erenoglu C, Ilıcak EN, Elbuken E, Erdemoglu A, Celenk T (2002) Hyperbaric oxygen ameliorates bacterial translocation in rats with mechanical intestinal obstruction. *Dis Colon Rectum* 45:967–972
27. Underwood MA (2019) Probiotics and the prevention of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 54:405–412
28. Basani L, Rao SC, Simmer K (2006) Peritoneal drainage versus laparotomy as initial surgical treatment for perforated necrotizing enterocolitis in preterm and low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006182>
29. Schurink M, Kooi EMW, Hulzebos C V., Kox RG, Groen H, Heineman E, Bos AF, Hulscher JBF (2015) Intestinal fatty acid-binding protein as a diagnostic marker for complicated and uncomplicated necrotizing enterocolitis: A prospective cohort study. *PLoS One* 10:1–16
30. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M (1997) The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 32:275–282
31. Whitehouse JS, Xu H, Shi Y, Noll LA, Kaul S, Jones DW, Pritchard KA, Oldham KT, Gourlay DM (2010) Mesenteric Nitric Oxide and Superoxide Production in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J Surg Res* 161:1–8
32. Ercin CN, Yesilova Z, Korkmaz A, Ozcan A, Oktenli C, Uygun A (2009) The effect of iNOS inhibitors and hyperbaric oxygen treatment in a rat model of experimental colitis. *Dig Dis Sci* 54:75–79

33. Baynosa RC, Naig AL, Murphy PS, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Wang WZ, Zamboni WA (2013) The effect of hyperbaric oxygen on nitric oxide synthase activity and expression in ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 183:355–361
34. Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Aversa S, Reiter RJ, Antonuccio P, Centorrino A, Romeo C, Impellizzeri P, Gitto E (2015) Oxidative Stress-Mediated Damage in Newborns with Necrotizing Enterocolitis: A Possible Role of Melatonin. *Am J Perinatol* 32:905–909
35. Guven A, Uysal B, Gundogdu G, Oztas E, Ozturk H, Korkmaz A (2011) Melatonin ameliorates necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *J Pediatr Surg* 46:2101–2107
36. Tayman C, Tonbul A, Kosus A, Hirfanoglu IM, Uysal S, Haltas H, Tatli MM, Andiran F (2012) N-acetylcysteine may prevent severe intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 47:540–550
37. Chan KL, Hui CWC, Chan KW, Fung PCW, Wo JYH, Tipoe G, Tam PKH (2002) Revisiting ischemia and reperfusion injury as a possible cause of necrotizing enterocolitis: Role of nitric oxide and superoxide dismutase. *J Pediatr Surg* 37:828–834
38. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, Gong X, Gould LJ (2008) Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol* 128:2102–2112
39. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558:263–275
40. Bercik P, Denou E, Collins J, et al (2011) The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141:599–609
41. Matei A, Montalva L, Goodbaum A, Lauriti G, Lauriti G, Zani A (2020) Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: Systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 105:432–439
42. Merhar SL, Ramos Y, Meinzen-Derr J, Kline-Fath BM (2014) Brain magnetic resonance imaging in infants with surgical necrotizing enterocolitis or spontaneous intestinal perforation versus medical necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 164:410-412.e1

43. Biouss G, Antounians L, Li B, et al (2019) Experimental necrotizing enterocolitis induces neuroinflammation in the neonatal brain. *J Neuroinflammation* 16:1–14
44. Liu S, Shen GY, Deng SK, Wang X Bin, Wu QF, Guo AS (2013) Hyperbaric oxygen therapy improves cognitive functioning after brain injury. *Neural Regen Res* 8:3334–3343
45. Lee H-H, Park S-C, Choe I-S, Kim Y, Ha Y-S (2015) Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. *Korean J Neurotrauma* 11:44
46. da Silva SC, Beggiora P da S, Catalão CHR, Dutra M, Júnior IM, Santos MV, Machado, Hélio Rubens Lopes L da S (2022) Hyperbaric oxygen therapy associated with ventricular-subcutaneous shunt promotes neuroprotection in young hydrocephalic rats. *Neuroscience*.
47. Baratz-Goldstein R, Toussia-Cohen S, Elpaz A, Rubovitch V, Pick CG (2017) Immediate and delayed hyperbaric oxygen therapy as a neuroprotective treatment for traumatic brain injury in mice. *Mol Cell Neurosci* 83:74–82
48. Sun Y, Liu D, Wang Q, Su P, Tang Q (2017) Hyperbaric oxygen treatment of spinal cord injury in rat model. *BMC Neurol* 17:1–6
49. Lin KC, Niu KC, Tsai KJ, Kuo JR, Wang LC, Chio CC, Chang CP (2012) Attenuating inflammation but stimulating both angiogenesis and neurogenesis using hyperbaric oxygen in rats with traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg* 72:650–659

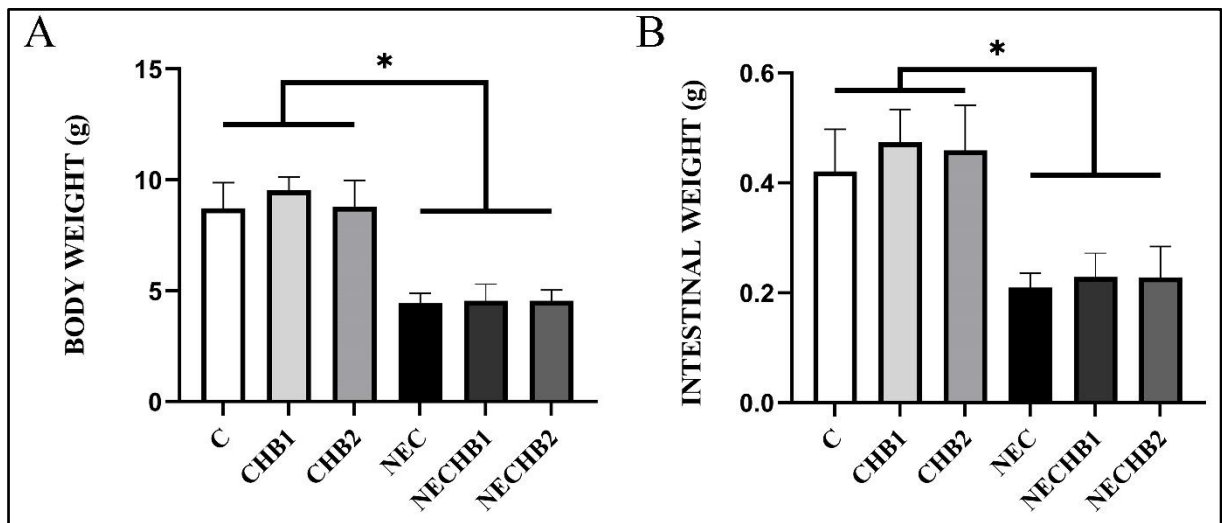


Fig 1. Body weight (BW) in (A) and intestinal weight (IW) in (B) per group. The values are expressed as mean and standard deviation. * $P < 0.0001$.

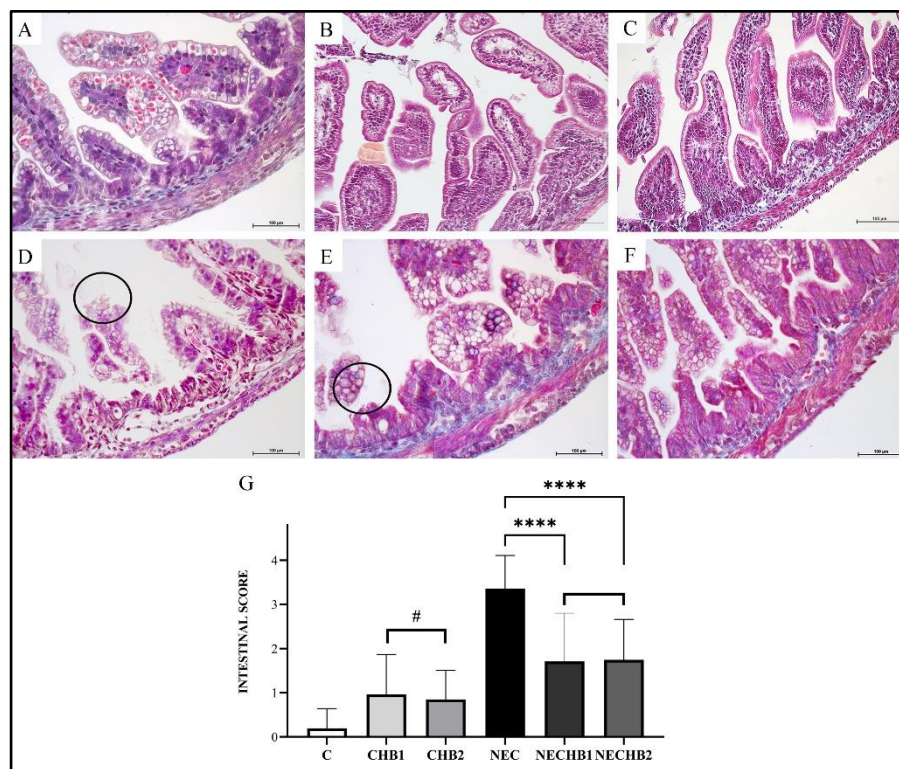


Fig 2. Photomicrographs of histological sections of the ileum stained with Masson's Trichomium. A: C; B: CHB1; C: CHB2; D: NEC; E: NECHB1; F: NECHB2. Arrows in D and F: separation of lamina propria. Circles in D and E: loss of villi. Objective: 20x. Scale bar: 100 μ m. G: Intestinal histological damage score graph. #: $P = 0.955$; ##: $P = 0.999$; ***: $P < 0.0001$. The other comparisons were also significant, with $P < 0.0001$.

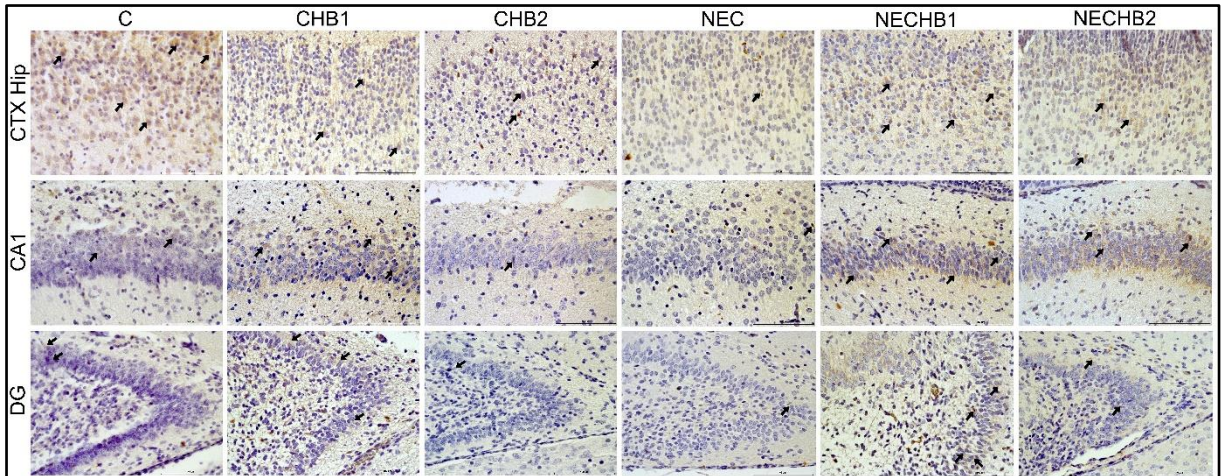


Fig 3. Photomicrographs of SOD3 immunohistochemical analysis in the cortex dorsal to the hippocampus and in the subareas CA1 and dentate gyrus. Note that the NEC group presented the lowest amount and intensity of SOD3 expression in the three evaluated regions (arrows). NECHB1 group showed the highest amount and intensity of immunostained cells, followed by the NECHB2 group. Objective: 40x. Scale bar: 100 μ m.