

VITOR YONAMINE LEE

**Efeitos da Alda nas injúrias provocadas pela anóxia neonatal
em camundongos C57BL/6 com e sem a mutação *ALDH2*2***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2022

VITOR YONAMINE LEE

**Efeitos da Alda nas injúrias provocadas pela anóxia neonatal
em camundongos C57BL/6 com e sem a mutação *ALDH2*2***

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em ciências.

Área de concentração: Programa de Biologia de Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira.

Coorientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira.

Versão original.

São Paulo
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Yonamine Lee, Vitor

Efeitos da Alda nas injúrias provocadas pela anóxia neonatal em camundongos C57BL/6 com e sem a mutação ALDH2*2 / Vitor Yonamine Lee; orientadora Maria Inês Nogueira; coorientador Julio Cesar Batista Ferreira. -- São Paulo, 2022.
92 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Anóxia neonatal. 2. Alda. 3. Aldeído desidrogenase 2. 4. Ansiedade. 5. Aldeídos. I. Nogueira, Maria Inês, orientador. II. Batista Ferreira, Julio Cesar, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeitos neurológicos da ativação e reativação da ALDH2 por Alda-1 em camundongos selvagens e mutantes submetidos à anóxia neonatal*", registrado sob o protocolo nº **20/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/02/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Maria Inês Nogueira**

- Departamento: *Anatomia*

- Membros da Equipe: *Kelly patricia Nery Borges (Técnico de Laboratório), Vitor Yonamine Lee (Pós-graduando), Julio Cesar Batista Ferreira (Pesquisador colaborador)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Neurological effects of ALDH2 activation and reactivation in wild and mutant mice subject to neonatal anoxia*", protocol nº **20/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **2/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

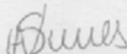
- Principal Investigator: **Dr.(a.) Maria Inês Nogueira**

- Team members: *Kelly patricia Nery Borges (Laboratory Technician), Vitor Yonamine Lee (Graduate Student), Julio Cesar Batista Ferreira (Colaborator Researcher)*

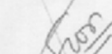
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C56bl/6	Macho/male	até 60 dias/days	80
	C56bl/6	Macho/male	até 60 dias/days	80

São Paulo, 13 de fevereiro de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-secretário CEUA-ICB/USP

Dedico esta tese à minha mãe, que sempre esteve comigo, aos meus amigos e colegas de profissão, sem os quais eu jamais conseguiria ter concluído esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa Dra Maria Inês Nogueira pelo acolhimento e pela companhia.

Agradeço ao meu coorientador Prof Dr Julio Cesar Batista Ferreira pela colaboração e pelo acolhimento no Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos.

Agradeço à colaboradora Profa Dra Silvia Honda Takada, da UFABC, pela amizade e pelo auxílio.

Agradeço à técnica de laboratório Kelly Patrícia Nery Borges, que sempre esteve com os alunos e nos deu muito suporte quando precisávamos.

Agradeço ao técnico de laboratório Ricardo Bandeira pelo auxílio com várias questões de ordem técnica no Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos.

Agradeço aos colaboradores e colegas de Departamento Márcio Augusto Campos Ribeiro, Lígia Akemi Kiyuna, Rudá Prestes e Albuquerque e Kátia Maria Gomes Andrade pela imensa ajuda com experimentos no Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Bruna Petrucelli Arruda, Ammir Yacoub Helou e Luana Angélica Janota de Carvalho pela amizade e pela ajuda.

Agradeço aos meus amigos e colegas de outros institutos da USP Livia Clemente Motta Teixeira, Zenaida Luisa Lauda Rodriguez, Matheus Torres Cruz, Daniel Giura da Silva e Victor Vasquez Matsuda pela companhia e pela ajuda teórica.

Agradeço ao Grupo de Pesquisa em Asfixia Perinatal e Neurodesenvolvimento (GAsPN) da UFABC pelo uso do microscópio.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Plasticidade Muscular do Prof Anselmo Sigari Moriscot pelo uso do criostato.

Agradeço ao pessoal do biotério Renivaldo de Souza e Fabio França Luiz por todo o cuidado com os animais do experimento.

Agradeço às técnicas do departamento de Anatomia Amanda Ribeiro de Oliveira, Marta Maria da Silva Righetti, Marina Fevereiro e Sônia Regina Yokomizo pela diligência quando foi necessário.

Agradeço ao pessoal da secretaria Patrícia R. C. Rocha, Luciana Monteiro Silva, Reginaldo Souza e Cláudio Roberto Celestino Júnior pela contínua orientação e apoio.

Por fim, agradeço à minha mãe, à minha família e aos meus amigos que compartilharam comigo nesta jornada.

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88882.377342/2019-01

"O ar é o princípio das coisas que existem; pois é dele que provêm todas as coisas e é nele que de novo se dissolvem. Tal como a nossa alma, [...] que é ar, nos mantém unidos e nos governa, assim também o vento (ou sopro) e o ar cercam o mundo inteiro" (Anaxímenes de Mileto¹ apud Kirk; Raven; Schoefield, 1994, p. 161)

1. *Sobre a natureza*

RESUMO

LEE, V. Y. **Efeitos da Alda nas injúrias provocadas pela anóxia neonatal em camundongos C57BL/6 com e sem a mutação ALDH2*2**. 2022. 78 p. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Mundialmente, cerca de 15-20% das crianças afetadas pela asfixia perinatal morrem e cerca de 25% dos sobreviventes apresentam problemas neurológicos. Com o objetivo de desenvolver tratamentos contra a asfixia perinatal, administramos o fármaco Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6 diclorobenzamida] em camundongos que sofreram anóxia neonatal para avaliar os efeitos neuroprotetores da substância. A Alda aumenta a atividade da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), que remove o 4-hidroxinonal (4-HNE) da célula, um aldeído tóxico resultante da anóxia. A anóxia foi realizada em filhotes com 36-48 h de vida, a 36,5°C, com nitrogênio gasoso 100% a um influxo de 1,5 L/minuto, durante 21 minutos. A Alda foi aplicada 30 minutos antes e depois da anóxia. Os experimentos foram realizados em camundongos com e sem a mutação E487K no gene ALDH2, que codifica a enzima de mesmo nome. A atividade da ALDH2 no encéfalo de mutantes que receberam Alda diminuiu 24 horas após a anóxia neonatal. A anóxia diminuiu o peso dos animais, mas nos mutantes a Alda impediu essa diminuição. A Alda também impediu que a anóxia atrasasse o surgimento de alguns reflexos sensoriomotores, que aumentasse os níveis de 4-HNE no hipocampo e que alterasse o desempenho em testes de memória, exploração e locomoção. Tais resultados indicam que a Alda promove proteção frente à anóxia neonatal. Porém, ela também se mostrou ansiogênica e tal efeito colateral deve ser observado.

Palavras-chave: Anóxia neonatal. Alda. Aldeído desidrogenase 2. Ansiedade. Aldeídos.

ABSTRACT

LEE, V. Y. **Effects of Alda on injuries caused by neonatal anoxia in C57BL/6 mice with and without the ALDH2*2 mutation.** 2022. 78 p. Thesis (Ph.D thesis in Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Worldwide, about 15-20% of children affected by perinatal asphyxia die and about 25% of survivors have neurological problems. In order to develop treatments against perinatal asphyxia, we administered the drug Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-2,6 dichlorobenzamide] in mice that suffered neonatal anoxia to evaluate the neuroprotective effects of the substance. Alda increases the activity of the enzyme aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), which removes 4-hydroxynonenal (4-HNE) from the cell, a toxic aldehyde resulting from anoxia. Anoxia was performed on pups with 36-48 h of life, at 36.5°C, with 100% nitrogen gas at an inflow of 1.5 L/minute, for 21 minutes. Alda was applied 30 minutes before and after anoxia. The experiments were carried out in mice with and without the E487K mutation in the ALDH2 gene, which encodes the enzyme of the same name. ALDH2 activity in the brain of mutants that received Alda decreased 24 hours after neonatal anoxia. Anoxia reduced the weight of the animals, but in the mutants, Alda prevented this decrease. Alda also prevented anoxia from delaying the onset of some sensorimotor reflexes, increasing 4-HNE levels in the hippocampus, and altering performance on tests of memory, exploration, and locomotion. Such results indicate that Alda promotes protection against neonatal anoxia. However, it also proved to be anxiogenic and such a side effect should be noted.

Keywords: Neonatal anoxia. Alda. Aldehyde dehydrogenase 2. Anxiety. Aldehydes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema simplificado dos dois principais padrões de lesão encefálica.....	34
Figura 2	Localização do hipocampo no cérebro humano.....	35
Figura 3	Estrutura química da molécula de Alda-1	37
Figura 4	Esquema da indução de morte celular pela asfixia perinatal via peroxidação lipídica no neurônio e ação da Alda-1	38
Figura 5	Desenho experimental.....	41
Figura 6	Modelo de anóxia neonatal utilizado nesta tese.....	45
Figura 7	Reação de oxidação do acetaldeído em ácido acético.....	49
Figura 8	Reflexos observados para avaliação do desenvolvimento sensoriomotor dos filhotes entre o DPN 4 e o 21.....	51
Figura 9	Esquema do campo aberto.....	53
Figura 10	Esquema do teste de reconhecimento de objeto novo.....	54
Figura 11	Esquema do labirinto em Y.....	55
Figura 12	Imagem do labirinto em cruz elevado.....	56
Figura 13	Esquema do teste de deslocamento de objeto	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Alda	ALDH activator
Aldi	Inibidor de Alda

LISTA DE SÍMBOLOS

Cu Cobre

Fe Ferro

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Expressão do 4-HNE	60
Gráfico 2	Atividade da ALDH2	62
Gráfico 3	Ganho de massa.....	65
Gráfico 4	Ontogenia dos reflexos.....	70
Gráfico 5	Campo aberto	74
Gráfico 6	Teste de reconhecimento de objeto novo, teste de deslocamento de objeto e alternação espontânea	76
Gráfico 7	Labirinto em cruz elevado.....	78

LISTA DE SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal	NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
5-HT2A	5-hidroxitriptamina		
ANOVA	Análise de variância	NMDA	N-metil-D-aspartato
ALDH	Aldeído desidrogenase	PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator
Bcl2	Linfoma de célula-B 2		
BSA	Albumina de soro bovino	PUFA	Ácido graxo poliinsaturado
CA1	Cornu Ammonis 1	RNA	Ácido ribonucleico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais	RNAm	RNA mensageiro
		ROS	Espécies reativas de oxigênio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal	SAA	Sedentário anóxia-Alda
		SAL	Sedentário Alda
DNA	Ácido desoxirribonucleico	SAN	Sedentário anóxia
DPN	Dia pós-natal	SC	Sedentário controle
EHI	Encefalopatia hipóxico-isquêmica	SDS	Dodecilsulfato de sódio
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas	SIRT3	Sirtruína 3
MAA	Mutante anóxia-Alda	TBS	Salina-tampão com TRIS
MAL	Mutante Alda	TDO	Teste de deslocamento de objeto
MAN	Mutante anóxia	TRON	Teste de reconhecimento de objeto novo
MC	Mutante controle	USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de animais reprodutores, divididos entre selvagens e mutantes, e entre machos e fêmeas.....	43
Tabela 2	Quantidade de animais selvagens e mutantes utilizados em cada experimento.....	44
Tabela 3	Grupos experimentais, estímulos que receberam e número amostral de sujeitos experimentais em cada grupo.....	46

SUMÁRIO

1 Introdução	33
1.1 <i>Asfixia perinatal</i>	33
1.2 <i>Alda-1</i>	36
1.3 <i>Objetivos</i>	40
2 Material e Métodos	43
2.1 <i>Animais</i>	43
2.2 <i>Acasalamento</i>	44
2.3 <i>Administração de Alda</i>	45
2.4 <i>Anóxia neonatal</i>	45
2.5 <i>Grupos experimentais</i>	46
2.6 <i>Expressão de adutos de 4-HNE</i>	47
2.7 <i>Atividade da ALDH2 24 h após a aplicação da Alda</i>	49
2.8 <i>Ganho de massa durante a amamentação e ontogenia dos reflexos</i>	50
2.9 <i>Ganho de massa após o desmame</i>	52
2.10 <i>Campo aberto</i>	52
2.11 <i>Teste de reconhecimento de objeto novo (TRON)</i>	53
2.12 <i>Teste de alternância espontânea</i>	55
2.13 <i>Teste no labirinto em cruz elevado</i>	56
2.14 <i>Teste de deslocamento de objeto (TDO)</i>	57
3 Resultados e discussão	59
3.1 <i>Expressão de adutos de 4-HNE</i>	59
3.2 <i>Atividade da ALDH2 24 h após a aplicação da Alda</i>	60
3.3 <i>Ganho de massa</i>	64
3.4 <i>Ontogenia dos reflexos</i>	69
3.5 <i>Testes de memória</i>	72
3.6 <i>Campo aberto e labirinto em cruz elevado</i>	75
3.6.1 <i>Avaliação da ansiedade</i>	78
3.6.2 <i>Avaliação da atividade locomotora e da exploração</i>	80
4 Conclusão	82
REFERÊNCIAS	83

1 Introdução

A asfixia perinatal é a diminuição do fluxo sanguíneo e de oxigênio para o feto ou o recém-nascido durante o período perinatal (Gillam-Krakauer; Gowen Jr, 2021). Em países desenvolvidos, a sua incidência é de 2/1000 nascimentos, mas em países em desenvolvimento ela é cerca de dez vezes maior. Aproximadamente 15-20% das crianças acometidas pela asfixia perinatal no mundo todo morrem e cerca de 25% dos sobreviventes apresentam problemas neurológicos persistentes (Odd et al., 2017).

A evolução dos cuidados perinatais e obstétricos das décadas de 80 e 90 elevaram a taxa de sobrevivência dos recém-nascidos, mas também aumentaram a taxa de crianças que passaram a apresentar encefalopatia neonatal (Wilson-Costello et al., 2007). Hoje, a asfixia perinatal ainda afeta cerca de 0,7-1,2 milhões de crianças por ano e é responsável por 23% da mortalidade infantil (Lawn et al., 2005).

O único tratamento autorizado para a asfixia perinatal é a hipotermia a 33 °C, mas ela ainda é insuficiente para se tratar todos os sintomas dessa enfermidade (Millar et al., 2017). Por isso, outros tratamentos precisam e estão sendo pesquisados, como aplicação de neuroserpina (Millar et al., 2017), melatonina (Arruda, 2019; Pang et al., 2021), xênon (Lobo et al., 2013), células-tronco (Castillo-Melendez et al., 2013) e exercício materno (Lee, 2015; Marcelino et al., 2015).

Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de tratamentos alternativos ou complementares contra a asfixia perinatal, apresentamos nesta tese a hipótese de que a substância Alda-1 [*N*-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6 diclorobenzamida], também chamada de *ALDH activator-1*, administrada em camundongos neonatos que sofreram insulto anóxico, seja capaz de diminuir alguns dos problemas neurais provocados pela asfixia perinatal.

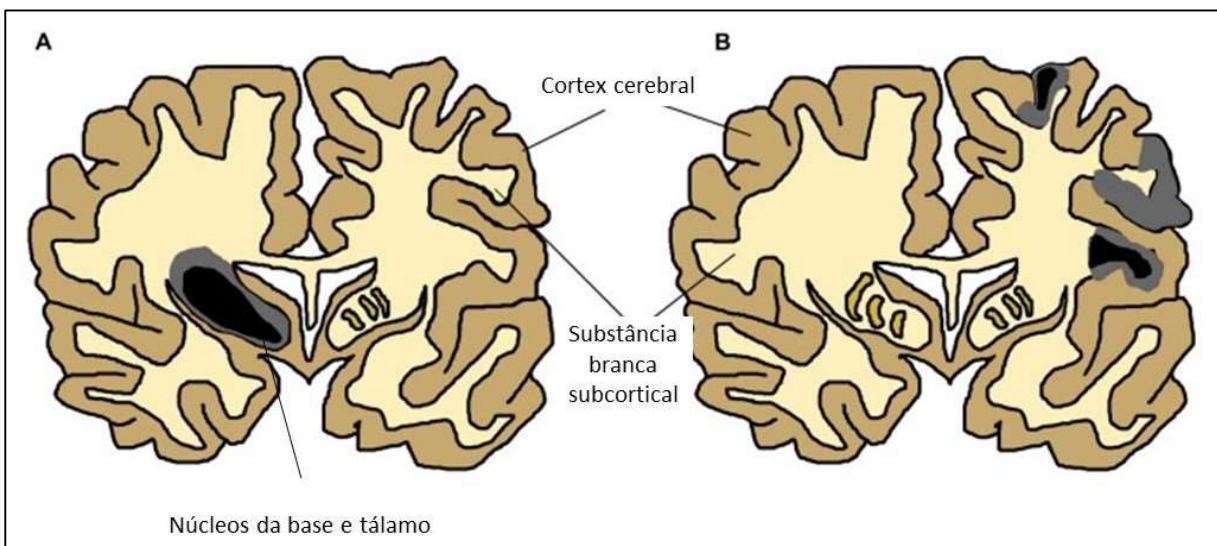
1.1 Asfixia perinatal

A patologia mais comum associada à asfixia perinatal é a encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI). A EHI abrange uma gama de alterações moleculares, celulares, histológicas, morfológicas e fisiológicas no encéfalo, assim como alterações comportamentais (Greco et al., 2020). As anomalias mais recorrentes da EHI são a paralisia cerebral (Vitrikas; Dalton; Breish,

2020) e a leucomalácia periventricular, que é um conjunto de lesões em várias regiões da substância branca do telencéfalo (Gilles; Leviton, 2020).

Cerca de 40-80% dos pacientes que sofrem asfixia perinatal exibem lesões nos núcleos da base e no tálamo (Millar et al., 2017), paralisia cerebral, epilepsia (Himmelman et al., 2007), problemas de linguagem (Martinez-Biarge et al., 2011) e são nascidos a termo (Ferriero, 2001, p. 199) (Fig. 1A). Já pacientes com lesões no córtex cerebral e na substância branca adjacente correspondem a 40-60% dos casos (Millar et al., 2017), geralmente apresentam prejuízos cognitivos (Gonzalez; Miller, 2006) e são frequentemente pretermos (Ferriero, 2001, p. 199) (Fig. 1B).

Figura 1 – Esquema simplificado dos dois principais padrões de lesão encefálica.



As regiões em preto são o centro da necrose e as regiões em cinza são áreas lesadas secundárias no nível do córtex primário sensorio-motor e córtex motor. (A) Padrão de injúria nos núcleos da base e no tálamo, geralmente encontrado em nascidos a termo. (B) Padrão de injúria no córtex cerebral e na substância branca adjacente, geralmente encontrado em pretermos. Adaptado Millar et al. (2017).

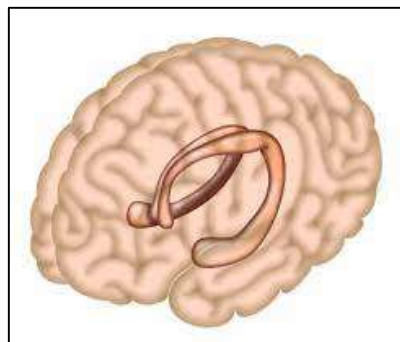
O atual entendimento da fisiopatologia da EHI foi possível graças a modelos de asfixia perinatal feitos em animais (Millar et al., 2017). Com o objetivo de compreender ainda mais a asfixia perinatal, o Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do ICB/USP adaptou e validou um modelo para ratos *Wistar* e camundongos *C57BL/6*, denominado como anóxia neonatal (Takada et al., 2011). Este modelo submete neonatos à anóxia em torno de 30 h de vida, idade em que o encéfalo do roedor é, em termos de maturação, comparável ao de um ser humano prematuro nascido com 24 semanas de gestação e baixo peso ao nascer (Nyakas;

Buwalda; Luiten, 1996; Rice; Barone, 2000). A prematuridade dos animais do modelo é importante porque ela é o principal fator de risco da asfixia perinatal e determina vários aspectos da evolução da sua injúria (Millar et al., 2017).

Millar et al. (2017) considera que o modelo de anóxia neonatal seja um “modelo somente de hipóxia” porque nele não se provoca isquemia por meio da oclusão da carótida, como ocorre nos modelos de hipóxia-isquemia neonatal. Millar et al. (2017) também afirma que as vantagens dos modelos “somente de hipóxia” residem em simular injúrias leves, em evitar interferência não fisiológica e em serem historicamente usados para a investigação de mecanismos moleculares.

Entretanto, há evidências de que até mesmo nos modelos “somente de hipóxia” ocorre uma isquemia provocada por falhas cardíacas e encefálicas devido á hipoxemia (Fineschi et al., 2017). Além disso, o modelo de anóxia neonatal também é capaz de gerar injúrias severas nos roedores, semelhantes àquelas encontradas em seres humanos. Por exemplo, Takada et al. (2015, 2016) mostrou que 24 horas após um insulto com o modelo de anóxia neonatal há aumento da neurodegeneração no hipocampo de ratos e que, no 60º dia de vida, há déficit na memória de referência espacial, na memória operacional, aumento da ansiedade e redução do volume e da neurogênese hipocampais. Kumar et al. (2019), usando o mesmo modelo, encontrou prejuízo na memória de referência espacial, aumento da ansiedade e danos no hipocampo em ratos jovens. O hipocampo é uma estrutura bilateral que se localiza no lobo temporal e é crucial para a consolidação da memória e da aprendizagem (Piešová; Mach, 2020), sendo também associado com o estresse e a emoção (Fanselow; Dong, 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Localização do hipocampo no cérebro humano.



Fonte: Medicalxpress.

A asfixia perinatal também promove alterações na composição da massa e do peso (Dell'anna et al., 1991; Raff et al., 2001; Grojean et al., 2003; Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Tang; Nakazawa, 2005; Brooks et al., 2011; Yan et al., 2016; Kumar et al., 2017; 2019; Menshanov; Bannova; Dygalo, 2017). Cruz-Ochoa et al. (2019) demonstrou que o modelo de anóxia neonatal de Takada et al. (2011) diminui o peso de ratos. No dia pós-natal (DPN) 35, a anóxia neonatal reduz a glicemia pós-prandial e aumenta a secreção de insulina, inibindo a alimentação (Loh et al., 2017). No DPN 95, a anóxia neonatal aumenta a perda de peso pós-jejum e diminui a glicemia, assim como a secreção de insulina e de leptina, que também inibe a alimentação (Park; Ahima, 2015).

Além disso, a asfixia perinatal também provoca alterações na ontogênese dos reflexos primitivos durante o neurodesenvolvimento (Dell'anna et al., 1991; Raff et al., 2001; Grojean et al., 2003; Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Tang; Nakazawa, 2005; Yan et al., 2016; Menshanov; Bannova; Dygalo, 2017). Os reflexos primitivos são reações estereotipadas durante a fase do desenvolvimento mediadas pela medula espinal e pelo tronco encefálico e desencadeadas por estímulos sensoriais específicos (Gesell, 1954, p. 114). Os reflexos são utilizados por neurologistas e pediatras na avaliação da integridade do sistema nervoso central de crianças e neonatos (Majnemer; Mazer, 1998; Zafeiriou, 2004). Kumar et al. (2017), utilizando o modelo de Takada et al. (2011), mostrou que a anóxia neonatal altera o dia do aparecimento de determinados reflexos, como a colocação pela vibrissa, a aversão ao precipício, a geotaxia negativa, o sobressalto acústico e a preensão palmar.

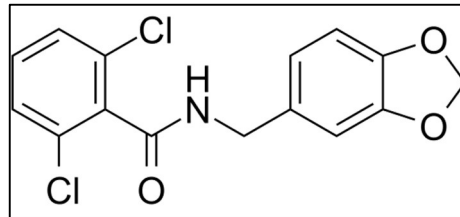
Por fim, além de ser usado para se compreender a asfixia perinatal, o modelo de anóxia neonatal também foi usado para se tratar ratos com hipotermia (Matsuda et al., 2021). Neste estudo, animais submetidos à anóxia neonatal e tratados com hipotermia exibiram diminuição da neurodegeneração hipocampal e redução de alterações no desempenho em testes de avaliação de risco, memória espacial, medo contextual e medo auditivo. Nesta tese, aplicamos a substância Alda-1 também como forma de visar tratamentos contra a anóxia neonatal.

1.2 Alda-1

A Alda-1 (Fig. 3) é uma molécula orgânica descoberta por meio de uma triagem de alto desempenho. Ela é capaz de aumentar a atividade da enzima aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) de corações de ratos em aproximadamente 2,1 vezes. Ela também é capaz de aumentar a

atividade de uma variação praticamente inativa da mesma enzima em cerca de 11 vezes. A Alda-1 age somente sobre a ALDH2, não atuando em enzimas similares, como a ALDH1 e a ALDH5 (Chen et al., 2008).

Figura 3 – Estrutura química da molécula de Alda-1.



Fonte: medchemexpress

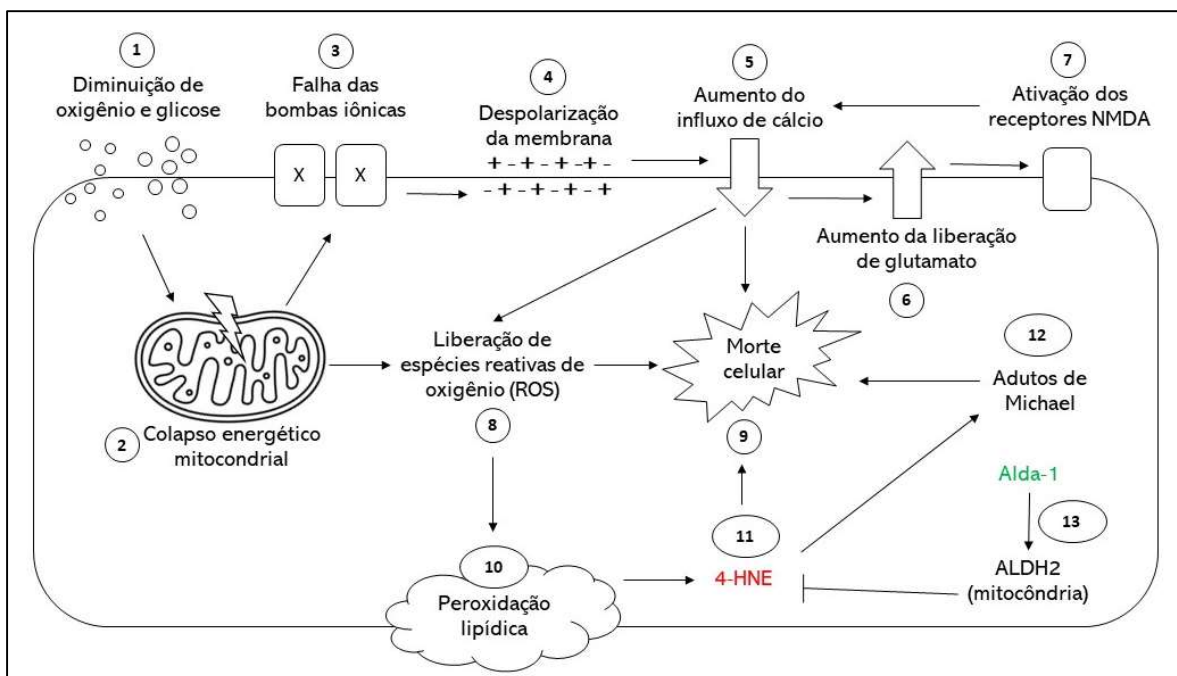
A enzima ALDH2 é responsável por oxidar aldeídos tóxicos resultantes do estresse oxidativo, principalmente o trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Figura 4). A ALDH2 também metaboliza aldeídos adquiridos do meio ambiente (Chen et al., 2014), aldeídos alifáticos de cadeia curta e aldeídos aromáticos e policíclicos (Klyosov, 1996, p. 4457). Além de atuar sobre aldeídos, a ALDH2 catalisa a hidrólise de vários ésteres e metaboliza o trinitrato de nitroglicerina (Beretta et al., 2010). Porém, o seu principal papel no organismo reside na transformação do acetaldeído em ácido acético, acetaldeído este que resulta da metabolização do etanol (Crabb et al., 2004).

O 4-HNE é uma das principais substâncias degenerativas produzidas pela hipóxia e pela isquemia (Fig. 4). Ele resulta da peroxidação lipídica, isto é, da reação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de membranas celulares (Jaganjac et al., 2021). Em altas concentrações, o 4-HNE aduz proteínas e altera a sua estrutura e a sua função, formando adutos de Michael (Zarkovic, 2003, p. 293). Ele também reage com bases nitrogenadas de ácidos nucleicos, modificando a estrutura do DNA e gerando mutações (Esterbauer et al., 1991). Além disso, o aldeído ativa a via intrínseca da apoptose e provoca inflamação (Xiao et al., 2017).

O primeiro estudo publicado com a Alda-1 demonstrou que a substância promove cardioproteção em ratos submetidos à isquemia cardíaca por meio do aumento da atividade da ALDH2 e da redução da concentração do 4-HNE, reduzindo o infarto miocárdico em até 60%

(Chen et al., 2008). Desde então, várias pesquisas visando a proteção cardíaca contra a isquemia foram realizadas com essa substância. Por exemplo, o Laboratório de Integração de Sistemas Biológicos do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP mostrou que a Alda-1 protege o miocárdio contra a progressão pós-infarto em camundongos com a enzima mutante (Sun et al., 2011; Gomes et al., 2014, 2015). Fu et al. (2014) mostrou que a administração da Alda-1 reduz as injúrias provocadas pela reperfusão da isquemia em ratos, removendo aldeídos reativos.

Figura 4 – Esquema da indução de morte celular pela asfíxia perinatal via peroxidação lipídica no neurônio e ação da Alda-1.



A redução de oxigênio e glicose (1) gera um colapso mitocondrial (2) que leva a uma falha das bombas iônicas (3) e despolariza a membrana (4). Com isso, ocorre grande influxo de cálcio (5), que aumenta a liberação de glutamato (6), estimulando os receptores NMDA (7) e aumentando ainda mais o influxo de cálcio (5). O colapso mitocondrial e o cálcio levam à produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) (8), que ativam morte celular (9). As ROS também reagem com os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das membranas (10), produzindo o 4-hidroxinonenal (4-HNE) (11). Este, reage com macromoléculas produzindo adutos de Michael, levando à morte celular (9). Fonte: autoria própria.

A ALDH2 é encontrada em todos os tecidos do corpo, mas em maior quantidade na mitocôndria de células do fígado, do coração e do encéfalo (Stewart; Malek; Crabb, 1996; Oyama et al., 2005). No encéfalo, ela é encontrada em maior proporção nas células de Purkinje do cerebelo, nas células piramidais do hipocampo e na oliva inferior (Zimatkin et al., 1992). Estudos mostram que o aumento da atividade da enzima protege a célula contra o acidente

vascular cerebral (Guo et al., 2013) e contra a excitotoxicidade induzida em neurônios hipocámpais de cultura (Bai; Mei, 2011). Stachowicz et al. (2016) observou que a ativação da ALDH2 pela Alda-1 promove melhoras cognitivas e diminui a depressão e a ansiedade em animais.

O encéfalo é especialmente vulnerável à asfixia perinatal porque a falta de oxigênio e de glicose gera um colapso energético na mitocôndria do neurônio e uma despolarização da membrana plasmática (Fig. 4). Com isso, ocorre um influxo excessivo de cálcio para dentro da célula, que estimula a liberação de neurotransmissores excitatórios, que, por sua vez, ativam excessivamente os receptores NMDA, retroalimentando o influxo de cálcio e engatilhando vários mecanismos de morte celular (Davidson et al., 2021). Dentro da célula, o cálcio promove a síntese do óxido nítrico, que eleva a produção de ROS na mitocôndria, produzindo 4-HNE (Blomgren; Hagberg, 2006). Outros fatores que tornam o encéfalo um grande produtor de 4-HNE são a grande quantidade de PUFA's em suas membranas, a menor concentração de alguns antioxidantes e a alta disponibilidade de metais redox ativos (como Fe^{2+} e Cu^{+}), que catalisam a peroxidação lipídica (Cobley; Fiorello; Bailey, 2018). O encéfalo imaturo é mais vulnerável ainda, pois apresenta uma concentração ainda menor de antioxidantes e maior quantidade de ferro livre (Ferriero, 2001, p. 198). Em decorrência destes fatores, o 4-HNE é bastante danoso para o encéfalo imaturo.

Indivíduos com variações mutantes da ALDH2 são ainda mais vulneráveis à asfixia perinatal. A ALDH2 é sintetizada a partir do gene *ALDH2*, que possui dois alelos: o alelo *ALDH2*1* e o *ALDH2*2*. O alelo *ALDH2*1* é selvagem e codifica uma enzima eficaz na remoção do 4-HNE, enquanto o alelo *ALDH2*2* possui a mutação E487K e codifica uma enzima praticamente ineficaz (Yoshida; Huang; Ikawa, 1984; Steinmetz et al., 1997). Indivíduos heterozigotos (*ALDH2*1/*2*) apresentam metade da atividade enzimática dos homozigotos selvagens (*ALDH2*1/*1*), enquanto homozigotos mutantes (*ALDH2*2/*2*) exibem menos de 1-4% da atividade dos homozigotos selvagens (Chen et al., 2014). De acordo com o estudo de Goedde et al. (1992), o alelo mutante é encontrado com maior frequência entre os japoneses (23%), os “caboclos” brasileiros (17,4%), os chineses (15,9%) e os coreanos (15,1%).

A presença da ALDH2 mutante provoca a síndrome do rubor facial, uma reação em que manchas avermelhadas aparecem no rosto e no corpo devido ao acúmulo de acetaldeído no corpo após a ingestão de etanol (Chen et al., 2021). A ALDH2 também está associada com a intoxicação alcóolica e o alcoolismo (Higuchi et al., 1995). Além disso, o acúmulo de aldeídos

é um dos fatores que podem gerar doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e derrame (Chen; Ferreira; Mochly-Rosen, 2019). Também há estudos que correlacionam o alelo *ALDH2*2* com o desenvolvimento de diabetes mellitus (Murata et al., 2004), câncer no trato aerodigestivo superior (Zhang; Fu, 2021), radiodermite (Ning et al., 2012), neuropatia periférica (Suzuki et al., 2004), osteoporose (Yamaguchi et al., 2006) e envelhecimento (Ohsawa et al., 2003, 2008). No encéfalo, há correlações entre o alelo *ALDH2*2* e a doença de Parkinson (Fujii et al., 1998) e a doença de Alzheimer (Hao et al., 2011). A peroxidação lipídica e a formação de 4-HNE no encéfalo também estão relacionadas à doença de Huntington e à esclerose lateral amiotrófica (Reed, 2011, p. 1302).

Portanto, além de avaliarmos as ações neuroprotetoras da Alda em animais selvagens que sofreram asfixia perinatal, também avaliaremos estes efeitos em animais mutantes com o genótipo (*ALDH2*2/*2*).

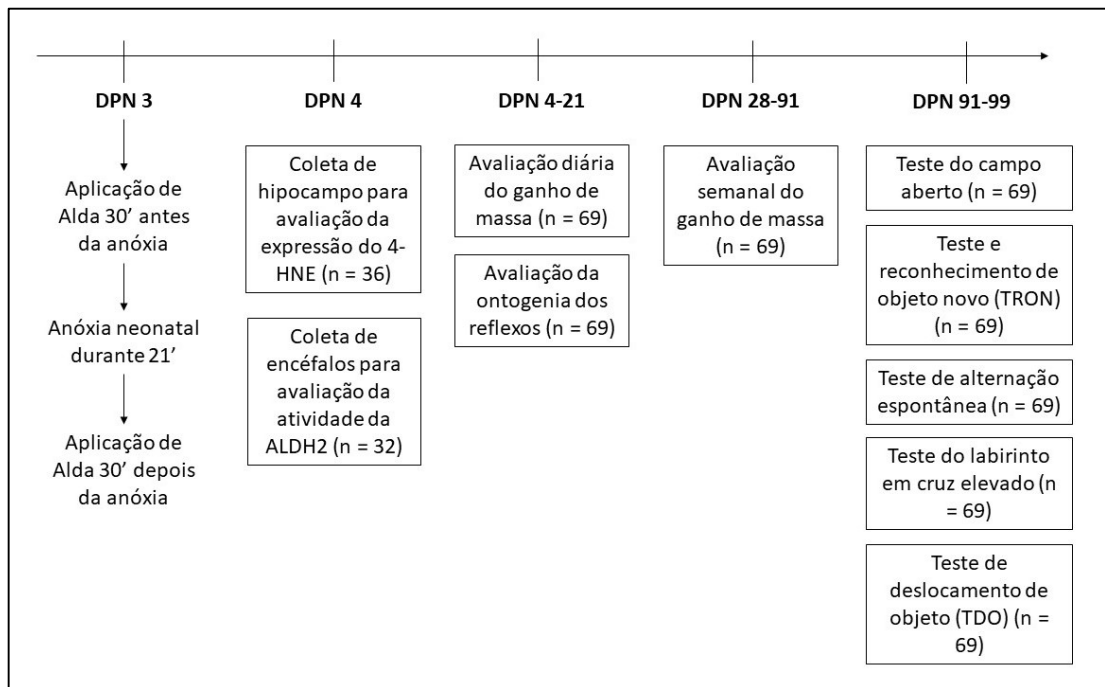
1.3 Objetivos

Os objetivos principais foram: (1) avaliar os efeitos protetores do tratamento da Alda em animais que sofreram anóxia neonatal e (2) as diferenças deste tratamento entre animais sem a mutação *ALDH2*2* (selvagens) e com a mutação (mutantes). Para isso, realizamos as seguintes análises, resumidas no desenho experimental (Fig. 5):

- a) Expressão do 4-HNE no hipocampo, no DPN 4;
- b) Atividade da ALDH2 no encéfalo, no DPN 4;
- c) Ganho de massa, do DPN 4 ao DPN 103;
- d) Ontogenia dos reflexos, do DPN 4 ao DPN 21;
- e) Desempenho no teste do campo aberto, no DPN 91, para avaliação da atividade locomotora, da exploração e da ansiedade;
- f) Desempenho no teste de reconhecimento de objeto novo (TRON), no DPN 94 e DPN 95, para avaliação da memória;
- g) Desempenho no teste de alternância espontânea, no DPN 96, para avaliação da memória;

- h) Desempenho no labirinto elevado em cruz, no DPN 97, para avaliação da ansiedade;
- i) Desempenho no teste de deslocamento de objeto, no DPN 98 e DPN 99, para avaliação da memória;

Figura 5 – Desenho experimental.



No dia pós-natal (DPN) 3 os animais receberam Alda com salina, ou somente salina, 30 ' antes da anóxia neonatal e 30' depois. No DPN 4 uma parte dos animais (n = 36) foi eutanasiada e teve os hipocampos bilateralmente dissecados e armazenados a -60 °C para avaliação da expressão de adutos de 4-HNE. Outra parte dos animais (n = 32) também foi eutanasiada e os seus encéfalos foram retirados e armazenados a -60 ° para avaliação da atividade da ALDH2. Do DPN4 ao 21, 69 animais foram pesados diariamente e observou-se o surgimento de determinados reflexos. Estes mesmos animais foram pesados semanalmente do DPN 28 ap 91 e submetidos a testes comportamentais do DPN 91 ao 99. Fonte: autoria própria.

2 Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP) (Protocolo nº 20/2017).

2.1 Animais

Foram utilizados 152 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6, dos quais 81 apresentavam a mutação E487K nos dois alelos do gene *ALDH2* (camundongos mutantes) e 71 não apresentavam a mutação (camundongos selvagens).

Dos 152 camundongos totais, 15 foram usados exclusivamente para reprodução, sendo que 8 eram selvagens e 7 eram mutantes, 4 eram machos e 11 eram fêmeas (Tabela 1). Os camundongos reprodutores selvagens foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os camundongos reprodutores mutantes vieram da Universidade de Stanford, do *Transgenic, Knockout and Tumor model Center*. Todos eles possuíam cerca de 90 dias de vida e pesavam entre 20 e 30 g quando foram recebidos.

Tabela 1 – Quantidade de animais reprodutores, divididos entre selvagens e mutantes, e entre machos e fêmeas.

Animais reprodutores	Machos	Fêmeas	Total
Selvagens	2	6	8
Mutantes	2	5	7
Total	4	11	15

Foram utilizados 137 camundongos machos para os experimentos e a obtenção dos resultados, todos descendentes dos animais reprodutores. Desses 137 camundongos, 63 eram selvagens e 74 eram mutantes. Além disso, 36 animais foram utilizados somente para avaliação da expressão do 4-HNE, 32 somente para avaliação da atividade da ALDH2 e os 69 animais restantes para todos os demais experimentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidade de animais selvagens e mutantes utilizados em cada experimento.

Animais experimentais	Expressão do 4-HNE	Atividade da ALDH2	Demais experimentos	Total
Selvagens	12	16	35	63
Mutantes	24	16	34	74
Total	36	32	69	137

Todos os animais foram alojados no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. No biotério, a temperatura variou entre 22 e 25 °C, o ciclo claro-escuro foi de 12:12 horas (início às 6h e término às 18h) e a água e a comida foram fornecidas *ad libitum*.

2.2 Acasalamento.

Antes do acasalamento, cada macho reprodutor foi colocado sozinho em uma caixa padrão durante dois ou três dias para que ele demarcasse o seu território. Depois desse período, até quatro fêmeas com o mesmo genótipo do macho foram adicionadas às gaiolas para o acasalamento. Então, as fêmeas foram pesadas semanalmente até o seu corpo atingir o peso, o tamanho e a forma característicos do final da gestação, cerca de 3 semanas após a fertilização. Depois da confirmação da proximidade do parto, cada fêmea foi realocada para outra gaiola, onde permaneceu sozinha até o nascimento dos filhotes.

Após o nascimento, foram retirados os filhotes fêmeas que excediam o número de oito filhotes vivos por ninhada. Esta decisão foi tomada para diminuir o risco de algum filhote não ingerir leite materno suficientemente, uma vez que as fêmeas de camundongos possuem, no geral, oito mamas.

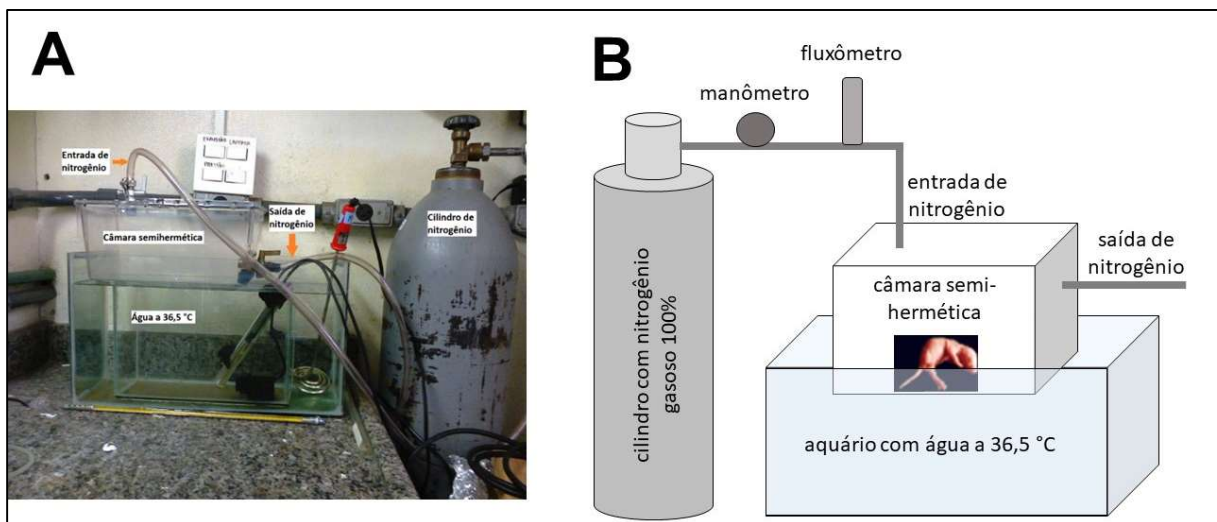
Após o desmame, no DPN 21, a fêmea reprodutora ou foi realocada para a gaiola de um dos machos de mesmo genótipo para nova reprodução ou foi realocada para gaiolas com outras fêmeas de mesmo genótipo. Nos períodos em que um macho não estava acompanhado de alguma fêmea, ele foi realocado para uma gaiola com outros machos.

2.3 Administração de Alda.

No DPN 3, ou entre 36 e 48 horas de vida, e pesando entre 1,4 e 1,9 g, 24 animais experimentais receberam injeção de solução de Alda. Para a preparação da solução, 16 mg/kg de Alda-6626 em pó (Foresee Pharmaceuticals Co., Ltd., Taipei, Taiwan) foram dissolvidos em salina 0,9%. Uma dose de 10 μ l foi injetada i.p. nos filhotes 30 minutos antes da anóxia neonatal ou da normóxia. Outra dose de mesma concentração e volume foi injetada i.p. 30 minutos após a anóxia ou a normóxia. Os animais dos grupos que não foram tratados com Alda receberam apenas injeção de salina 0,9% nas duas doses e foram denominados de “salina”.

2.4 Anóxia neonatal

Figura 6 – Modelo de anóxia neonatal utilizado nesta tese.



(A) Foto do modelo de anóxia neonatal. (B) Esquema do modelo de anóxia neonatal. Para a realização da anóxia neonatal, a água do aquário é aquecida a 36,5 °C, os filhotes são colocados dentro da câmara e então o fluxômetro do cilindro de nitrogênio 100% é aberto durante 21 minutos, permitindo que o gás entre na câmara. Fonte da imagem: autoria própria.

O modelo de anóxia neonatal (Fig. 6) foi construído e adaptado em nosso laboratório (Takada et al., 2009). Ele tem como componente principal uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 x 14,0 x 19,5 cm) onde os filhotes são colocados. A câmara possui uma válvula superior para a entrada de gás nitrogênio 100% e uma lateral para a saída dos gases do seu interior. A válvula superior é conectada a um cilindro com gás nitrogênio 100% por meio de uma cânula e um fluxômetro com manômetro. A base da câmara é parcialmente imersa na

água de um aquário a 36,5 °C. Imersos na água também se encontram um ebulidor, um termômetro para controle da temperatura e um homogeneizador.

Para a realização da anóxia, primeiramente a água foi aquecida a 36,5 °C. Depois, os filhotes foram colocados dentro da câmara, a câmara foi fechada e então o fluxômetro e a válvula superior foram abertos, permitindo que nitrogênio gasoso influísse para a câmara a um fluxo de 1,5 L/minuto, a uma pressão de 101,7 kPa e durante 21 minutos. Após este período, os animais que não se recuperaram do insulto anóxico, ou seja, aqueles que não voltaram a respirar, a se movimentar e a apresentar coloração rosada, foram revividos por ressuscitação cardiopulmonar.

O fluxo e a pressão da entrada do nitrogênio gasoso, a temperatura do sistema e a idade dos animais foram determinados com base na literatura (Tang; Nakazawa, 2005; Rogalska et al., 2006; Coq et al., 2008; Takada et al., 2011). O tempo de exposição à anóxia neonatal, a idade dos animais e o seu peso foram determinados experimentalmente no início do doutorado com base na taxa de mortalidade por anóxia e/ou Alda (dados em anexo) e de acordo com (Carvalho, 2018, p. 25).

Os animais dos grupos experimentais que não foram submetidos à anóxia neonatal foram simplesmente colocados dentro da câmara de anóxia durante o mesmo período e na mesma temperatura, sem a abertura do fluxômetro e da entrada de nitrogênio 100%. Eles foram denominados de “normóxia”.

2.5 Grupos experimentais

Tabela 3 – Grupos experimentais, estímulos que receberam e número amostral de sujeitos experimentais em cada grupo.

	Normóxia + salina	Anóxia + salina	Normóxia + Alda	Anóxia + Alda
Selvagens	Selvagem controle (SC) (n = 19)	Selvagem anóxia (SAN) (n = 18)	Selvagem Alda (SAL) (n = 13)	Selvagem anóxia-Alda (SAA) (n = 13)
Mutantes	Mutante controle (MC) (n = 19)	Mutante anóxia (MAN) (n = 19)	Mutante Alda (MAL) (n = 18)	Mutante anóxia-Alda (MAA) (n = 18)

A partir da presença ou da ausência da mutação, da exposição à anóxia neonatal ou à normóxia e da aplicação de Alda com salina ou somente salina, os animais experimentais foram divididos em 8 grupos experimentais, de acordo com a Tabela 3.

2.6 Expressão de adutos de 4-HNE

No DPN 4, 24 horas após a anóxia neonatal, 6 animais de cada grupo mutante e 6 animais dos grupos SC e SAN foram decapitados e seus hipocampos foram bilateralmente dissecados e triturados em manitol e Triton X-100 0,1% (3 µl/mg de tecido). A solução resultante permaneceu em repouso por 40 minutos para lise das membranas celulares e, em seguida, foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Então, o sobrenadante com as proteínas foi retirado e armazenado a -4° C até o momento do uso.

Para a estimativa da concentração de proteínas em cada sobrenadante, uma certa quantidade foi diluída em água destilada (1:40) e, depois, em azul de Comassie G-250 (reagente de Bradford) (1:20) em placa de microtitulação. Da mesma forma, determinadas quantidades de albumina de soro bovino (BSA) (1 µg/ml) foram diluídas em água destilada a 0%, 5%, 10%, 20%, 30% e 40% (soluções padrões) e, depois, no reagente de Bradford (1:20). Para cada amostra e solução padrão foram feitas triplicatas. Depois, no espectrofotômetro, foram obtidos os valores de absorvância das ondas eletromagnéticas de 595 nm de cada amostra, tiradas as médias dos valores das triplicatas, feita uma correlação entre estes valores de absorvância e a concentração de proteínas de cada solução padrão, e, a partir da equação da curva do gráfico, calculada a concentração de proteínas no sobrenadante de cada amostra. Como era necessário 30 µg de proteína de cada amostra para a eletroforese, e as amostras continham quantidade de proteína abaixo deste valor, duas amostras do mesmo grupo foram misturadas, resultando em 3 amostras por grupo na eletroforese e na membrana.

Para realização da eletroforese, 30 µg de proteína do sobrenadante de cada amostra foram diluídas em solução-tampão de Laemmli (240 mM de Tris-HCl, 0,8% de SDS [dodecilsulfato de sódio], 40% de glicerol, 0,04% de azul de bromofenol e 200mM de β-mercaptoetanol) e aquecidas a 95° C por 5 minutos para desnaturação das proteínas. Então, 10 µl das soluções resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE) no aparelho Mini-PROTEAN Tetra Cell® (Bio-Rad) entre 80 e 120 V, e em

solução-tampão de corrida pH 8,3. O gel de empilhamento apresentava 8% de acrilamida e pH 6,8. O gel de resolução apresentava 12% de acrilamida e pH 8,8.

Após a migração no gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) utilizando o aparelho Mini Trans-Blot Cell® (Bio-Rad) e solução-tampão de transferência com metanol 20%. As membranas foram coradas com Ponceau S 0,1% para verificação da qualidade das amostras, eficácia da transferência e mensuração da intensidade da banda 56 kDa no programa Image J (Scion Corporation based on NIH image). Posteriormente, elas foram lavadas com TBS (50 mM de Tris-Base e 0,9% de NaCl) e ácido acético 1%.

A ligação inespecífica das proteínas na membrana foi diminuída pela incubação de 10 ml de solução bloqueadora (5% BSA em TBS) por 1 hora em temperatura ambiente. Então, as membranas foram incubadas com anticorpo primário de anti-adutos de *Michael* (anti-4-HNE) (Calbiochem, Millipore) diluído em solução bloqueadora (1:1.000) a 4°C, durante a noite. Na sequência, elas foram lavadas 3 vezes por 5 min com TBS-T (TBS com 0,1% de Tween 20) e incubadas por 1 hora com anticorpo anti-IgG (Calbiochem, Millipore) marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:10.000).

Por fim, as membranas foram imersas em intensificador de quimiluminescência por 1 minuto (2 ml de Tris 1 M + 88 µl de ácido p-cumárico 400 µM + 200 µl de luminol 2,5 mM + 6,1 µl de H₂O₂ 30% 5,4 mM + água destilada até completar 20 ml) e a luminescência da banda 56 kDa foi detectada com o programa UNI-TEC. A mensuração da intensidade de marcação das imagens foi realizada com o programa Image J (Scion Corporation based on NIH image).

A intensidade de luminescência da banda de massa 56 kDa de cada amostra foi dividida pela intensidade média das bandas de mesmo tamanho da mesma membrana (intensidade relativa de 4-HNE). Da mesma maneira a intensidade de Ponceau da banda de 56 kDa de cada amostra foi dividida pela intensidade média das mesmas bandas da mesma membrana (intensidade relativa de Ponceau). Finalmente, a intensidade relativa de 4-HNE foi dividida pela intensidade relativa de Ponceau, resultando na porcentagem de expressão de 4-HNE.

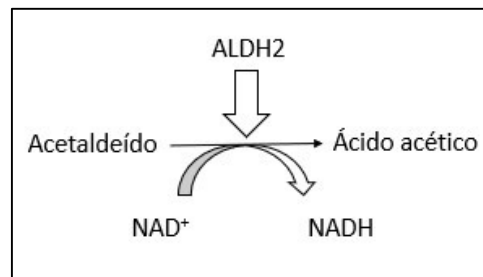
Os dados da expressão do 4-HNE foram analisados por ANOVA de duas vias ($p \leq 0,05$) para avaliação dos efeitos da anóxia e da Alda nos grupos mutantes. Também foi realizada ANOVA de duas vias ($p \leq 0,05$) para avaliar os efeitos da mutação e da anóxia com os grupos SC, SAN, MC e MAN. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer.

2.7 Atividade da ALDH2 24 h após a aplicação da Alda

No DPN 4, ou 24 horas após a anóxia neonatal, a atividade da enzima ALDH2 dos encéfalos de 4 animais por grupo foi avaliada por espectrofotometria, de acordo com os procedimentos de Chen et al. (2008).

Neste ensaio, a ALDH2 do tecido catalisa a oxidação do acetaldeído em ácido acético com o auxílio da coenzima NAD^+ , que recebe um próton (H^+) do acetaldeído e é reduzida a NADH (Fig. 7). O aumento da produção de NADH ao longo do tempo é calculado a partir da intensidade da absorvância do seu comprimento de onda ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$) a cada minuto, durante todo o tempo do ensaio, que foi de 60 minutos neste experimento.

Figura 7. Reação de oxidação do acetaldeído em ácido acético.



Fonte da imagem: autoria própria

No preparo dos tecidos, os encéfalos foram retirados e macerados, e uma quantidade de solução contendo $100 \mu\text{g}$ de proteína de cada encéfalo foi submetida à reação com pirofosfato de sódio (100 mM , $\text{pH } 9,5$), β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+ ; 10 mM), acetaldeído ($300 \mu\text{M}$) e Triton $0,1\%$, em volume final de 1 ml .

A partir dos dados da intensidade da absorvância em cada minuto foi calculada a inclinação da reta de regressão, que indica a média do aumento da intensidade de absorvância por minuto. Quanto maior for o valor da inclinação, maior é a atividade da ALDH2 dentro do tempo de ensaio avaliado.

Além dos ensaios enzimáticos somente com a ALDH2 dos tecidos, também foram realizados outros dois ensaios: um com adição de Alda para aumentar a atividade da ALDH2 e outro com a adição da substância Aldi, que inibe a atividade da ALDH2.

Todos os dados da atividade da ALDH2 sem adição posterior de Alda ou de Aldi, da atividade com adição posterior de Alda e da atividade com adição posterior de Aldi foram submetidos a ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$) para avaliação dos efeitos da mutação, da anóxia e da Alda. Também foram realizadas ANOVAs ($p \leq 0,05$) comparando a atividade da ALDH2 sozinha com a atividade com adição posterior de Alda, e comparando a atividade da ALDH2 sozinha com a atividade com adição posterior de Aldi, de animais selvagens e mutantes. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Tukey-Kramer.

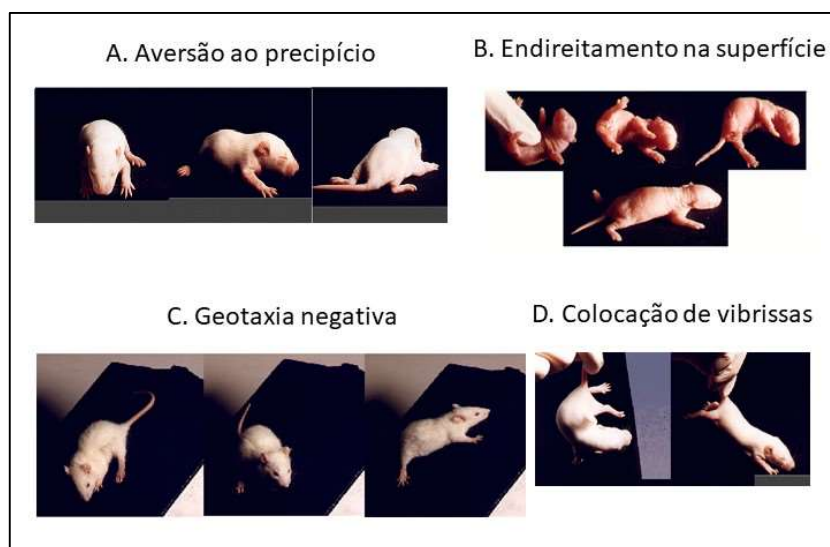
2.8 Ganho de massa durante a amamentação e ontogenia dos reflexos

Um dia após os tratamentos com anóxia/normóxia e salina/Alda, no DPN 4, os filhotes foram pesados diariamente até o desmame, no DPN 21. O peso dos filhotes dos quatro grupos selvagens foi submetido a ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$) para avaliação do efeito da anóxia, da alda e do DPN. Uma outra ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$) com os mesmos fatores foi realizada com o peso dos filhotes dos quatro grupos mutantes. Para comparar o peso dos filhotes selvagens com o dos mutantes, foram feitas ANOVAs de três vias (anóxia, alda e mutação) ($p \leq 0,05$) em duas idades – DPN 4 e DPN 21. As diferenças entre os grupos foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer. O número amostral foi de 9 nos grupos SC, SAL, SAA, MC e MAN e de 8 nos grupos SAN, SAL e SAA. Em cada grupo havia filhotes de pelo menos duas ninhadas.

Além do peso, foi observado diariamente, nos mesmos filhotes, e do DPN 4 ao 21, o aparecimento de reflexos (ontogenia), que serve como indicador indireto do grau de maturação do desenvolvimento sensoriomotor. Os reflexos foram diariamente estimulados nos filhotes, três dias antes do seu aparecimento normal até o seu aparecimento de fato. Considerou-se que um reflexo apareceu quando ele foi realizado até 10 s após a sua estimulação e de acordo com as descrições a seguir, baseadas em Fox (1965, p. 234), Deiró et al. (2004; 2006) e Kumar et al. (2019):

- A) Preensão palmar: colocou-se uma haste fina em contato com a palma da pata anterior do filhote, fazendo com que a pata prensasse a haste.
- B) Aversão ao precipício: em decúbito ventral, colocou-se as patas anteriores do filhote sobre uma borda, fazendo com que o corpo rotacionasse ao redor do eixo dorsoventral em pelo menos 90° (Fig. 8A).
- C) Endireitamento na superfície: colocou-se o filhote em decúbito dorsal, fazendo com que ele assumisse o decúbito ventral (Fig. 8B).
- D) Geotaxia negativa: colocou-se o filhote em uma rampa, com até 45° de inclinação, com o focinho apontando para baixo, fazendo com que ele girasse para cima (Fig. 8C).
- E) Colocação de vibrissas: suspendeu-se o filhote pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocassem a borda de uma mesa, fazendo com que a região anterior do corpo se movimentasse energicamente, tentando alcançar a borda (Fig. 8D).
- F) Endireitamento em queda livre: soltou-se o filhote em decúbito dorsal 30 cm acima de um leito macio, fazendo com que ele girasse o corpo para decúbito ventral antes de atingir o leito.
- G) Resposta ao sobressalto: produziu-se um estampido agudo pela percussão de duas estruturas metálicas a uma distância de 10 cm do filhote, fazendo com que ele se retraísse e se imobilizasse rapidamente.

Figura 8 – Reflexos observados para avaliação do desenvolvimento sensoriomotor dos filhotes entre o DPN 4 e o 21.



(A) Aversão ao precipício. (B) Endireitamento na superfície. (C) Geotaxia negativa. (D) Colocação de vibrissas. Fonte da imagem: Vasconcelos (2013).

O DPN de cada reflexo foi submetido a ANOVA ($p \leq 0,05$) de três vias com os fatores mutação, anóxia e alda. As diferenças entre os grupos foram reveladas pelo teste de Tukey-Kramer. A indução dos reflexos foi realizada nos mesmos animais pesados.

2.9 Ganho de massa após o desmame

Após o DPN 21, os mesmos animais utilizados para avaliação do ganho de massa e da ontogenia dos reflexos durante a amamentação foram pesados semanalmente até o DPN 91. O peso dos animais dos quatro grupos selvagens foi submetido a ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$) para avaliação do efeito da anóxia, da alda e do DPN. Uma outra ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$) com os mesmos fatores foi realizada com o peso dos animais dos quatro grupos mutantes. Para comparar o peso dos animais selvagens com o dos mutantes, foi feita uma ANOVAs de três vias (anóxia, alda e mutação) ($p \leq 0,05$) no DPN 91. As diferenças entre os grupos em todas as ANOVAs foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer.

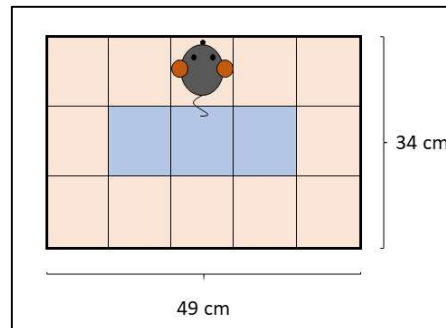
2.10 Campo aberto.

Do DPN 91 ao DPN 93, os sujeitos experimentais foram habituados ao experimentador e à sala de testes comportamentais. A habituação ocorreu manipulando-se os animais nesta sala, todo dia, por 5 minutos. No DPN 94, foi realizado o teste do campo aberto, que avalia o grau de atividade locomotora, de exploração e de ansiedade. O campo aberto foi realizado em uma caixa não coberta de 34 cm de largura, 49 cm de comprimento e 16 cm de altura (Fig. 9). O teste se iniciou colocando-se o sujeito experimental na caixa com o focinho rente ao meio de uma das paredes maiores. Depois, o animal ficou livre para explorar a caixa durante 5 minutos, sendo gravado por uma câmera posicionada acima da caixa. Para análise dos vídeos, a base da caixa foi dividida em 15 quadrantes distribuídos em 3 linhas e 5 colunas, sendo 12 de borda e 3 de centro.

Por meio do programa ToxTrac v2.60 (Department of Physics, Umeå University, 901 87 Umeå, Sweden) extraiu-se dos vídeos a **distância total percorrida**, a **velocidade média em**

movimento e a **taxa de exploração**. A taxa de exploração é a quantidade de quadrantes em que o sujeito experimental esteve durante a sessão dividida pela quantidade total de quadrantes.

Figura 9 – Esquema do campo aberto.



O campo é dividido em quadrantes de borda (rosa) e quadrantes centrais (azul). A figura do camundongo mostra onde e como os animais são colocados no início do teste. Fonte da imagem: autoria própria.

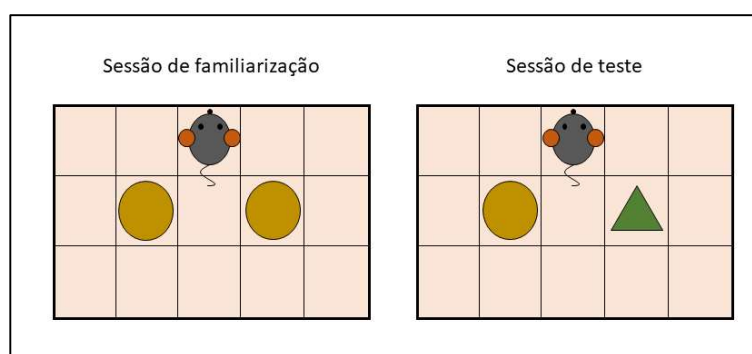
Por meio do programa X-Plo-Rat 2005 (Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Laboratório de Comportamento Exploratório) obteve-se o **tempo no centro do campo**. A distância total percorrida e a velocidade média em movimento são parâmetros de atividade locomotora. O tempo no centro do campo é um parâmetro de ansiedade, uma vez que os roedores com maior ansiedade tendem a ficar menos tempo no centro, porque ele é uma região mais exposta. A taxa de exploração é uma medida de comportamento exploratório. Cada parâmetro foi submetido a uma ANOVA de três vias, tendo como fatores a mutação, a anóxia e a alda ($p \leq 0,05$). As diferenças entre os grupos foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer.

2.11 Teste de reconhecimento de objeto novo (TRON)

O TRON avalia o aprendizado, a memória e o interesse por novidade. O teste consiste em duas sessões: uma sessão de familiarização, em que o sujeito experimental é exposto a dois objetos idênticos (objetos familiares), e uma sessão de teste, em que um dos objetos é trocado por outro totalmente diferente (objeto novo) (Fig. 10). Como os roedores dão maior atenção a elementos novos no meio ambiente, eles passam a maior parte do tempo explorando o objeto novo. Para isso, é necessário que o animal tenha aprendido qual é o objeto familiar na sessão de familiarização (Lueptow, 2017).

No DPN 95, na sessão de familiarização, duas pequenas garrafas de vidro marrons com água foram colocadas na linha central maior, equidistantes uma da outra e das paredes. Os animais foram colocados na caixa com o focinho rente ao meio de uma das paredes maiores (Fig. 7). Eles exploraram o ambiente por 5 minutos, sendo filmados e gravados por uma câmera acima da caixa. Foi considerado exploração do objeto quando o animal apontou o focinho para o objeto em ângulo reto, há uma distância de pelo menos 10 cm.

Figura 10 – Esquema do teste de reconhecimento de objeto novo.



Na sessão de familiarização dois objetos idênticos são colocados na caixa. Na sessão de teste, um deles é substituído por outro objeto, com forma e cor diferente. Fonte da imagem: autoria própria.

No DPN 96, foi realizada a sessão de teste, executada da mesma maneira e nas mesmas condições que a sessão de familiarização, exceto pela troca de um dos objetos por outro totalmente diferente (um pequeno pote de vidro branco e transparente com pequenos objetos coloridos dentro e tampa verde).

Posteriormente, por meio das gravações, foram obtidos no programa X-Plo-Rat 2005: o tempo de exploração no objeto esquerdo e o tempo de exploração no objeto direito na sessão de familiarização, e o tempo de exploração do objeto novo e o tempo de exploração no objeto familiar da sessão de teste.

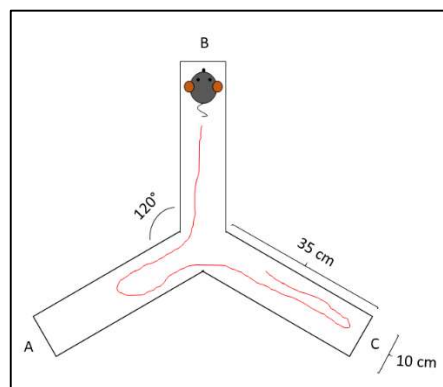
Para excluir a hipótese de que o animal apresentava preferência por algum dos objetos familiares na sessão de familiarização, foi calculado o **tempo relativo de exploração no objeto esquerdo**, que é o tempo de exploração no objeto esquerdo dividido pelo tempo de exploração total (nos dois objetos). Estes dados foram subordinados a uma ANOVA de três vias (mutação, anóxia e Alda) ($p \leq 0,05$).

Para avaliar a preferência pelo objeto novo em relação ao objeto familiar na sessão de teste, foi calculado o **índice de discriminação** = (tempo de exploração no objeto novo – tempo de exploração no objeto familiar) / (tempo de exploração no objeto novo + tempo de exploração no objeto familiar).. Este índice avalia com maior sensibilidade o grau de discriminação entre o objeto novo e o familiar. Estes dados também foram submetidos à ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$). As diferenças entre os grupos em todas as ANOVAs foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer.

2.12 Teste de alternância espontânea

O teste de alternância espontânea foi realizado no DPN 97. Este teste é executado em um labirinto em forma de Y com três braços iguais e avalia a memória operacional espacial (Fig. 11). O roedor é colocado inicialmente em um dos três braços e tende a explorar os braços ainda não visitados, alternando espontaneamente entre eles várias vezes. Para que o animal evite entrar em um braço já visitado é necessário que ele saiba quais braços ele já explorou.

Figura 11. Esquema do labirinto em Y.



No teste de alternância espontânea, o animal é colocado em um dos três braços e explora os demais. Na figura, o trajeto em vermelho indica que o animal esteve no braço C, depois foi para o braço A e então para o braço B. A entrada consecutiva em três braços diferentes constitui uma alternância. No caso, a alternância foi CAB. Fonte da imagem: autoria própria.

O labirinto em Y deste projeto possuía três braços (A, B e C) com 35 cm de comprimento, 5 cm de largura e 10 cm de altura, distantes 120° entre si (Fig. 11). A base do centro tinha o formato de um triângulo equilátero com 5 cm de aresta, com acesso aos três

braços. O fundo de cada braço foi pintado com um padrão de preto e branco específico para que o animal pudesse distinguir um braço do outro. No início do teste, o animal foi colocado no final do braço B com o focinho rente à parede menor. Durante 10 minutos, o animal ficou livre para explorar o labirinto, enquanto o experimentador anotava a sequência de entrada nos braços.

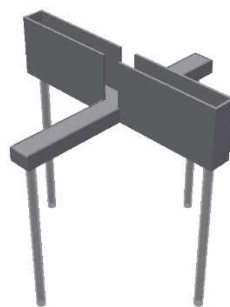
Uma alternância espontânea é uma sequência de entradas consecutivas em três braços diferentes (ABC, BCA e CBA) e a quantidade de entradas nos braços menos dois é a quantidade de tríades totais (alternadas ou não) realizadas pelo animal. Os dados foram analisados em função da porcentagem de alternâncias, ou seja, pela quantidade de alternâncias espontâneas dividida pelo total de tríades.

Os dados foram submetidos à ANOVA de três vias, tendo como fatores a mutação, a anóxia e a Alda. As diferenças entre os grupos em todas as ANOVAs foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

2.13 Teste no labirinto em cruz elevado

No DPN 98, foi realizado o teste no labirinto em cruz elevado, utilizado para avaliação da ansiedade. O labirinto em cruz elevado é um aparato com a forma de uma cruz, com quatro braços abertos e quatro braços fechados, onde o sujeito experimental pode explorá-los livremente (Fig. 12). Os roedores possuem aversão natural a espaços expostos e passam menos tempo nos braços abertos quanto maior for sua ansiedade (Rodgers e Dalvi, 1997).

Figura 12 – Imagem do labirinto em cruz elevado.



Fonte da imagem: <https://nbt ltd.com/>

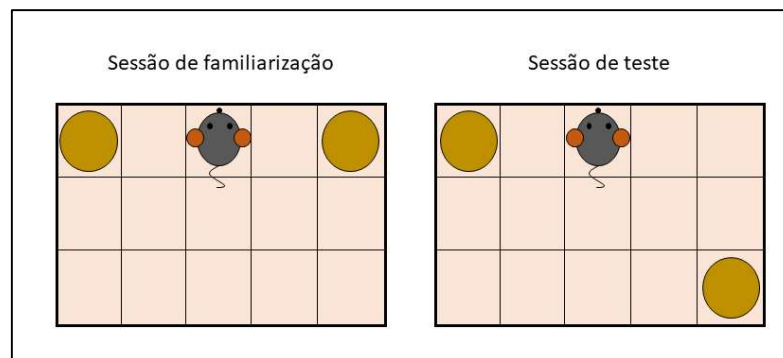
Neste projeto, o labirinto em cruz elevado possuía quatro braços, cada um com 25 cm de comprimento e 5 cm de largura. Os braços abertos tinham bordas de 0,5 cm de altura. Os braços fechados tinham paredes de 16 cm de altura. O centro da plataforma possuía 5 cm x 5 cm. O aparato ficou suspenso 1,30 m acima do chão. Uma câmera acima do labirinto filmou o trajeto do animal. No início do teste o animal foi colocado no centro do labirinto e em seguida foi permitido que ele o explorasse por 5 minutos.

Posteriormente, pelo programa X-Plo-Rat, foram mensurados os **tempos relativos** que os animais passaram nos **braços abertos**, nos **braços fechados** e no **centro**. Para cada um destes três parâmetros, foi realizada uma ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$), tendo como fatores a mutação, a anóxia e a Alda. As diferenças entre os grupos em todas as ANOVAs foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer.

2.14 Teste de deslocamento de objeto (TDO)

Nos DPNs 99 e 100, foi realizado o TDO. O TDO avalia a memória e o interesse por novidade. Neste teste, há uma sessão de familiarização, em que o sujeito experimental é exposto a dois objetos idênticos (objetos mantidos), e uma sessão de teste, em que um dos objetos é deslocado de sua posição inicial (objeto deslocado) (Fig. 13).

Figura 13. Esquema do teste de deslocamento de objeto.



Na sessão de familiarização, os objetos idênticos são colocados nos cantos como mostrado na figura. Na sessão de teste, um dos objetos é deslocado para outro canto. Fonte da imagem: autoria própria.

O TDO foi realizado na mesma caixa usada para o teste do campo aberto e o TRON. Na primeira sessão, o animal foi colocado na caixa e a explorou por 5 minutos. Nesta sessão, uma

das pequenas garrafas marrons com água estava num canto da caixa, enquanto a outra estava no canto oposto da mesma parede maior. Na sessão de teste, no dia seguinte, um dos objetos foi deslocado para o outro canto da parede menor em que estava. Uma câmera acima da caixa gravou o comportamento dos animais. Da mesma maneira que no TRON, considerou-se que o animal explorou um objeto ao apontar seu focinho em um ângulo reto em direção à garrafa.

Pelo programa X-Plo-Rat foi medido o tempo de exploração no objeto esquerdo e no objeto direito da sessão de familiarização para o cálculo do tempo de exploração relativa no objeto esquerdo. Também foi medido o tempo de exploração nos objetos mantido e deslocado da sessão de teste para o cálculo do **índice de discriminação** = (tempo de exploração no objeto deslocado – tempo de exploração no objeto mantido) / (tempo de exploração no objeto deslocado + tempo de exploração no objeto mantido).

Os dados foram submetidos a ANOVA de três vias, tendo como fatores a mutação, a anóxia e a Alda ($p \leq 0,05$). As diferenças entre os grupos em todas as ANOVAs foram discriminadas pelo teste de Tukey-Kramer.

3 Resultados e discussão

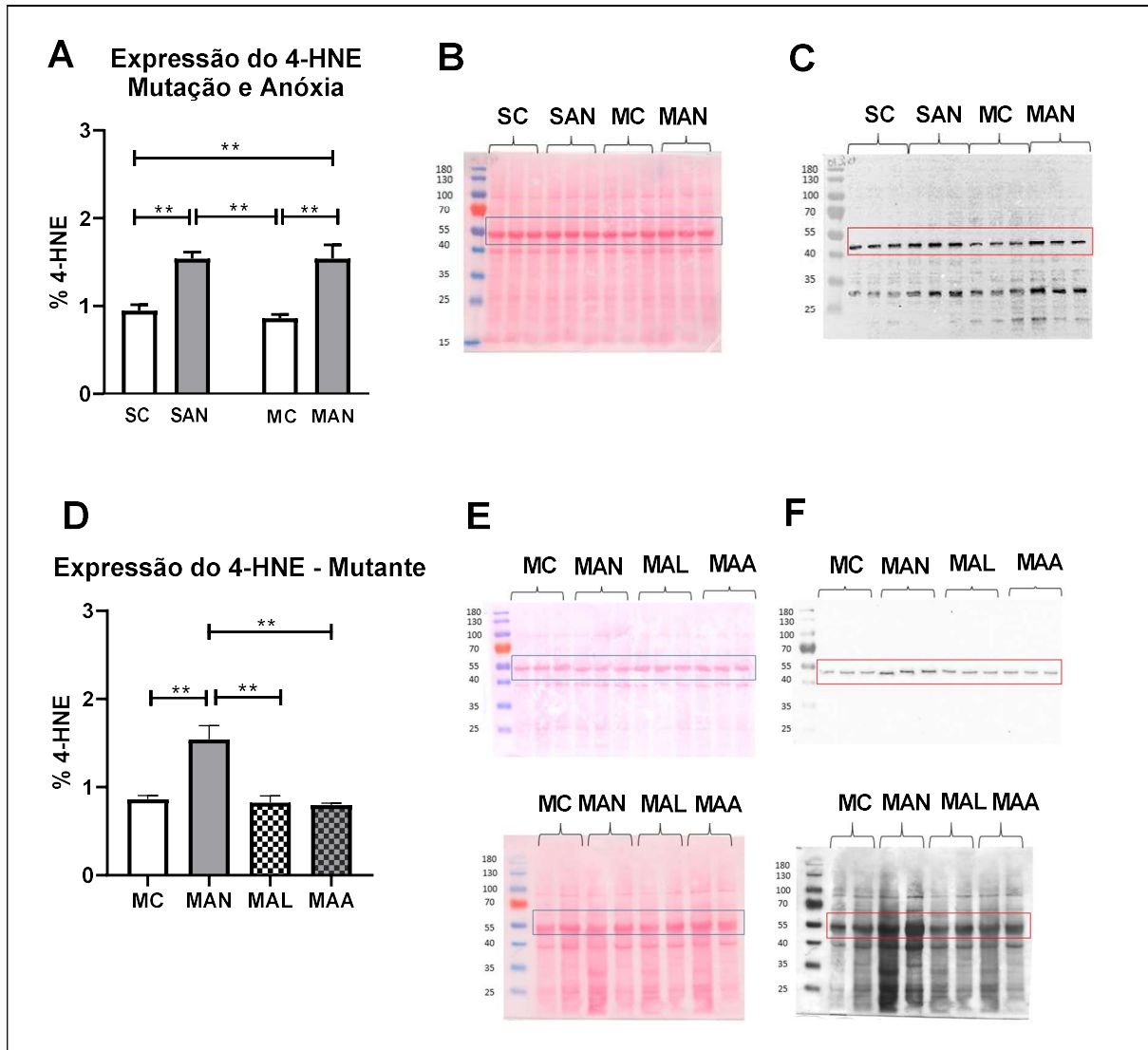
Os resultados e a discussão foram apresentados em conjuntos de temas para melhor análise, nem sempre aparecendo na mesma ordem que a da seção de Materiais e Métodos.

3.1 Expressão de adutos de 4-HNE

Os grupos anóxia (SAN e MAN) expressaram maior porcentagem de 4-HNE no hipocampo que os grupos controle (SC e MC) (Gráfico 1A), o que corresponde ao efeito da anóxia de aumentar a expressão do 4-HNE no hipocampo ($F_{(1,8)} = 45,60$; $p = 0,0001$). O aumento também foi igual tanto em animais selvagens quanto em animais mutantes. Mas, como a enzima ALDH2 selvagem é mais ativa que a enzima mutante, era esperado que os animais SAN apresentassem menor expressão de adutos de 4-HNE que os animais MAN. Porém, o 4-HNE também é metabolizado pela enzima glutaciona S-transferase (Zheng et al., 2014), pela enzima aldose redutase (Doorn; Srivastava; Petersen, 2003), pela família de enzimas aldo-ceto-redutases (Martin; Maser, 2009) e pelo sulfeto de hidrogênio (Schreier et al., 2010). Mesmo que a ALDH2 mutante tenha atividade reduzida, o 4-HNE pode ter sido removido, também, por outras enzimas, o que explicaria a falta de diferença entre os grupos SAN e MAN na expressão do 4-HNE após anóxia neonatal, ao menos no hipocampo.

O grupo mutante MAN apresentou maior expressão de 4-HNE que os demais grupos mutantes (Figura 1D), condizendo com o efeito da anóxia de aumentar tal expressão ($F_{(1,8)} = 13,13$; $p = 0,006$). Também houve efeito da Alda de reduzir a expressão do 4-HNE ($F_{(1,8)} = 18,82$; $p = 0,002$) e de impedir o aumento desta expressão gerada pela anóxia neonatal ($F_{(1,8)} = 15,51$; $p = 0,004$), indicando que ela teve um efeito neuroprotetor. Como a Alda aumenta a atividade somente da ALDH2 (Chen et al., 2008), e como foi levantada a hipótese de que outras enzimas também teriam papel importante na remoção do 4-HNE, é necessário investigar como a Alda promoveria efeito neuroprotetor por meio destas enzimas. Uma explicação é que o 4-HNE, por aduzir proteínas, diminua a ação das próprias enzimas que o removem. Com a restauração da atividade da ALDH2 pela Alda, a diminuição do 4-HNE poderia contribuir para a restauração da atividade das outras enzimas removedoras do 4-HNE.

Gráfico 1. Expressão do 4-HNE.



(A) Gráfico da análise dos grupos SC, SAN, MC e MAN (Mutação e Anóxia). Houve diferença entre os grupos controles (selvagens e mutantes) e os grupos anóxia (selvagens e mutantes). Também houve efeito da anóxia ($F_{(1,8)} = 45,60$; $p = 0,0001$). (B) Membrana da análise Mutação e Anóxia reagida com Ponceau. (C) Membrana da análise Mutação e Anóxia imunoreagida com anti-4-HNE. (D) Gráfico da análise dos grupos mutantes. Houve diferença entre o grupo MAN e os demais. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,8)} = 13,13$; $p = 0,006$), da alda ($F_{(1,8)} = 18,82$; $p = 0,002$) e da sua interação ($F_{(1,8)} = 15,51$; $p = 0,004$). (E) Membrana da análise dos grupos mutantes reagida com Ponceau. (F) Membrana da análise dos grupos mutantes imunoreagida com anti-4-HNE. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (** = $p < 0,01$). $n = 3$ por grupo, sendo que em cada grupo havia hipocampus de dois animais.

3.2 Atividade da ALDH2 24 h após a aplicação da Alda

A atividade da ALDH2 do grupo MC, sem adição posterior de Alda ou de Aldi, foi estatisticamente quase maior que as dos grupos mutantes Alda [MAL ($p = 0,056$) e MAA ($p = 0,068$)] (Gráfico 2A). Estas diferenças refletem o efeito quase estatístico da Alda de diminuir a

atividade da ALDH2 24 h após a sua aplicação ($F_{(1,24)} = 4,133$; $p = 0,053$). A interação estatística entre a mutação e Alda ($F_{(1,24)} = 4,54$; $p = 0,043$) mostra que a diminuição da atividade da ALDH2 promovida pela Alda afetou mais os grupos mutantes (MAL e MAA) do que os grupos selvagens (SAL e SAA).

Não houve diferença na atividade da ALDH2 entre os grupos selvagens e mutantes após a *adição posterior de Alda* (Gráfico 2B). Porém, houve efeito estatístico da mutação de diminuir a atividade da ALDH2 após a *adição posterior de Alda* ($F_{(1,24)} = 10,50$; $p = 0,003$).

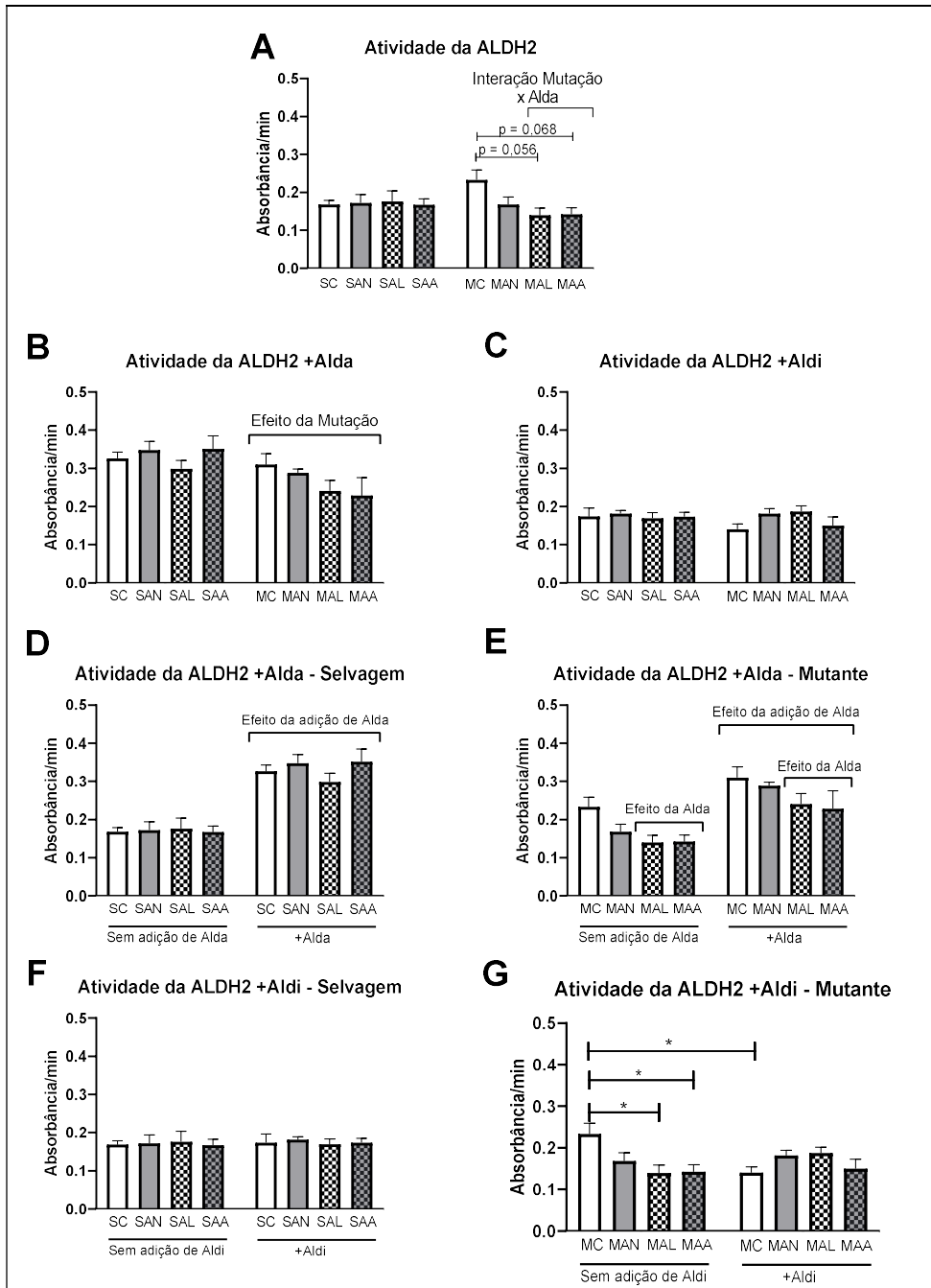
Também não houve diferença na atividade da ALDH2 entre os grupos selvagens e mutantes após a *adição posterior do inibidor Aldi* (Gráfico 2C). Também não houve efeito significativo dos fatores e das interações.

A *adição posterior de Alda* aumenta a atividade da ALDH2 no hipocampo de animais selvagens ($F_{(1,12)} = 71,44$; $p < 0,0001$) (Gráfico 2D) e mutantes ($F_{(1,12)} = 25,31$; $p = 0,0003$) (Fig. Gráfico 2E). Já nos animais mutantes, *Alda previamente aplicada* diminui a atividade da ALDH2 ($F_{(1,12)} = 11,53$; $p = 0,005$). Não houve diferenças significativas entre os grupos de mesmo genótipo e entre os grupos de mesmo estímulo.

A *adição posterior de Aldi* não altera a atividade da ALDH2 dos animais selvagens (Gráfico 2F), pois não houve diferença estatística entre os grupos nem efeito significativo de nenhum fator e das suas interações.

Porém, nos animais mutantes (Gráfico 2G), a atividade da ALDH2 foi menor nos grupos Alda sem Aldi (MAL sem Aldi e MAA sem Aldi) do que no grupo MC sem Aldi, sugerindo que a *aplicação prévia da Alda* diminui a atividade posterior da ALDH2, o que já foi apresentado na análise da Figura 15A. A atividade da ALDH2 também foi menor no grupo MC com Aldi do que no grupo MC sem Aldi. Os animais que receberam aplicação prévia de Alda exibiram menor atividade após a adição de Aldi (interação Alda-Aldi) ($F_{(1,12)} = 6,83$; $p = 0,02$). Os animais que, além de terem recebido aplicação prévia de Alda, também passaram pela anóxia neonatal, também exibiram atividade menor após a adição e Aldi (interação anóxia-Alda-Aldi) ($F_{(1,12)} = 7,98$; $p = 0,01$).

Gráfico 2. Atividade da ALDH2.



(A) Comparação da atividade da ALDH2 entre os grupos selvagens e mutantes. Houve efeito quase estatístico da Alda ($F_{(1,24)} = 4,133$; $p = 0,053$) e da interação mutação e Alda ($F_{(1,24)} = 4,54$; $p = 0,043$). (B) Atividade da ALDH2 com adição de Alda. Houve efeito da mutação ($F_{(1,24)} = 10,50$; $p = 0,003$). (C) Atividade da ALDH2 com adição de Aldi. (D) Atividade da ALDH2 entre grupos selvagens com e sem adição de Alda. Houve efeito da adição de Alda ($F_{(1,12)} = 71,44$; $p < 0,0001$). Todos os grupos sem Alda apresentaram atividade significativamente menor que todos os grupos com Alda ($p < 0,05$). (E) Atividade da ALDH2 entre grupos mutantes com e sem adição de Alda. Houve efeito da adição de Alda ($F_{(1,12)} = 25,31$; $p = 0,0003$) e da Alda previamente aplicada ($F_{(1,12)} = 11,53$; $p = 0,005$). (F) Atividade da ALDH2 de grupos selvagens com e sem Aldi. (G) Atividade da ALDH2 de grupos mutantes com e sem Aldi. Houve efeito da interação entre a Alda previamente aplicada e a adição de Aldi ($F_{(1,12)} = 6,83$; $p = 0,02$) e da interação entre a Alda previamente aplicada, a anóxia e a Aldi ($F_{(1,12)} = 7,98$; $p = 0,01$). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* = $p \leq 0,05$). $n = 4$ para todos os grupos.

Nos animais selvagens, a atividade da ALDH2 dos grupos que receberam Alda não foi maior que a dos animais que não receberam Alda (Gráfico 2A). Como a Alda aumenta a atividade da ALDH2 por meio de alterações na conformação estrutural da enzima (Cheng et al., 2020) e como a meia-vida da ALDH2 selvagem de células HeLa é de 22 h (Xiao; Weiner; Crabb, 1996), tal alterações estruturais talvez não sejam permanentes, pois, se fossem, esperaríamos que a ALDH2 apresentasse cerca de metade da atividade 24 h após a aplicação de Alda. Como a meia-vida da Alda-1 no plasma de ratos *Sprague-Dawley* (quando 10 mg/kg de Alda-1 são administrados i.v.) é de apenas cerca de 1,67 h (Taneja et al., 2015), talvez o aumento da atividade da ALDH2 e a alteração da sua estrutura só ocorram enquanto a Alda estiver no organismo ou dure menos que o tempo de vida da enzima selvagem. O aumento da atividade da ALDH2 com a adição posterior de Alda também embasa essas hipóteses.

Porém, nos animais mutantes que receberam Alda, a atividade da ALDH2 foi menor mesmo 24 horas após a aplicação (Gráfico 2A), mesmo após a adição posterior de Alda (Gráfico 2B) e mesmo após a sua inibição por Aldi (Gráfico 2C), sugerindo que a Alda tenha um efeito a longo prazo na atividade da ALDH2 dos animais mutantes, ao contrário do que ocorre nos animais selvagens. Estruturalmente, a enzima mutante E487K possui uma lisina na posição 487, enquanto a enzima selvagem possui um glutamato. Aparentemente, também há diferenças na forma como a Alda aumenta/restaura a atividade das duas enzimas (Cheng et al., 2020). Como a meia-vida da ALDH2 com a mutação E487K é de 14 h (Xiao; Weiner; Crabb, 1996), é provável que as enzimas mutantes que sofreram a ação da Alda ainda estejam nas células 24 horas após a aplicação da droga e que ainda apresentem alterações estruturais, diferentemente do que talvez ocorra com as enzimas selvagens.

Outro ponto a se considerar é que o aumento da atividade da ALDH2, seja selvagem ou mutante, promovido pela Alda se dá por meio do aumento da afinidade da enzima com o cofator NAD^+ (Cheng et al., 2020), que é o reagente limitante da reação. Talvez nos animais mutantes, a aplicação prévia de Alda diminua a disponibilidade posterior desse cofator, diminuindo a ação da Alda posteriormente aplicada.

Além de provocar alterações na estrutura da enzima, sabe-se que a Alda-1 é capaz de regular a expressão do RNAm de proteínas no córtex pré-frontal e no hipocampo, como a PGC-1 α , que regula a biogênese mitocondrial, e a Bcl2, uma proteína antiapoptótica (Stachowicz et al., 2015). Talvez a presença da mutação influencie a Alda-1 a promover uma expressão a longo prazo diferenciada destas proteínas, que podem estar relacionadas à eficiência da atividade da ALDH2, ou talvez a Alda-1 tenha a capacidade de alterar a expressão da própria ALDH2.

Além de regular a transcrição de proteínas, a Alda também poderia estar envolvida em processos pós-transcricionais. Humanos com um alelo mutante expressam no fígado apenas 27% da ADLH2 em relação a indivíduos selvagens, o que também contribui para a menor atividade da enzima mutante (Jin et al., 2015). Como a quantidade de RNAm é a mesma nos selvagens e nos mutantes, supõe-se que a diferença na expressão enzimática ocorra em etapas pós-transcricionais. Talvez a Alda também possa ter algum papel nestas etapas que envolvam o RNAm transcrito a partir do alelo mutante.

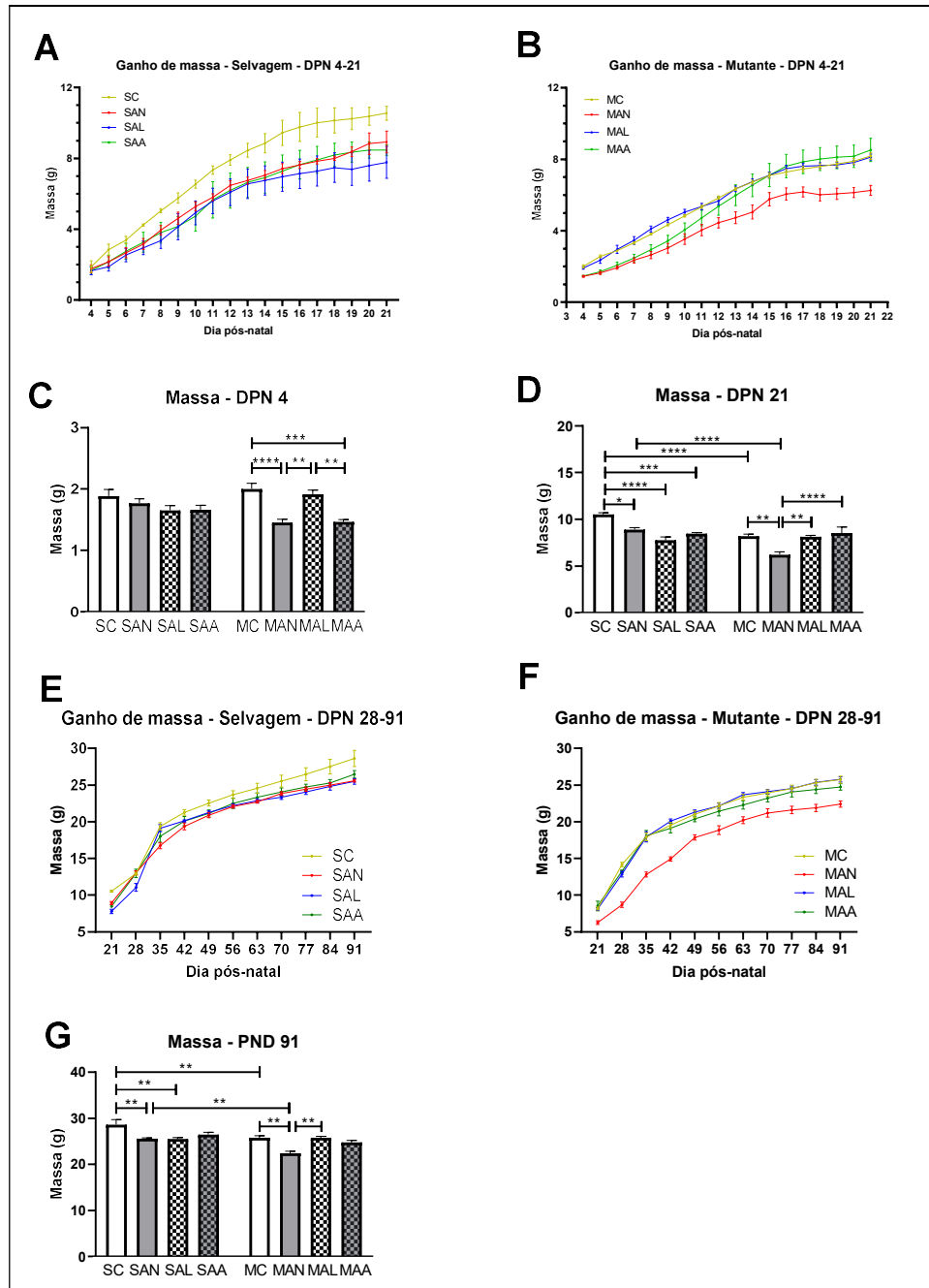
Por fim, sabe-se também que a atividade da ALDH2 mitocondrial é regulada pela proteína sirtuína 3 (SIRT3). A SIRT3 é uma enzima desacetiladora e a sua inibição em células endoteliais aórticas hiperacetila a ALDH2, aumentando a sua atividade (Xue et al., 2012). Curiosamente, a inibição da SIRT3 também anula a proteção promovida pela Alda-1 no tecido cardíaco contra a disfunção cardíaca induzida por altas doses de insulina (Hu; Ren; Zhang, 2016). Porém, como a Alda-1 regularia a atividade da ALDH2 mutante por meio da SIRT3 é algo a ser melhor investigado.

Obviamente, muitos estudos precisam ser realizados para se entender melhor a relação entre a aplicação da Alda e a atividade da ALDH2 24 h após a aplicação, e qual é o papel da mutação nesta relação. Mas a partir destes resultados, muitas pesquisas podem ser realizadas com o objetivo de se entender os efeitos a longo prazo da Alda-1.

3.3 Ganho de massa

Na análise do ganho de massa dos filhotes dos grupos selvagens ao longo do período de amamentação (Gráfico 3A), houve efeito da anóxia em reduzir o ganho de massa ($F_{(1,31)} = 11,80$; $p = 0,001$), efeito da Alda em também reduzir o ganho de massa ($F_{(1, 31)} = 41,45$; $p < 0,0001$) e interação entre estes dois fatores, resultando também na diminuição do ganho de massa ($F_{(1, 31)} = 31,16$; $p < 0,0001$). Porém, a interação da anóxia com a Alda não foi cumulativa, ou seja, os filhotes do grupo SAA não apresentaram ganho de massa menor que os filhotes dos grupos SAN e SAL.

Gráfico 3. Ganho de massa.



(A) Ganho de massa dos grupos selvagens, DPN 4-21. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,31)} = 11,80$; $p = 0,001$), da Alda ($F_{(1,31)} = 41,45$; $p < 0,0001$) e interação anóxia-Alda ($F_{(1,31)} = 31,16$; $p < 0,0001$). (B) Ganho de massa dos grupos mutantes, DPN 4-21. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,30)} = 10,02$; $p = 0,003$) e quase interação anóxia-Alda ($F_{(1,30)} = 3,686$; $p = 0,06$). (C) Massa no DPN 4. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,61)} = 25,58$; $p < 0,0001$) e interação mutação-anóxia ($F_{(1,61)} = 16,62$; $p = 0,0001$). (D) Massa no DPN 21. Houve efeito da mutação ($F_{(1,56)} = 27,10$; $p < 0,0001$), da anóxia ($F_{(1,56)} = 7,816$; $p = 0,007$), interação mutação-Alda ($F_{(1,56)} = 37,59$; $p < 0,0001$) e interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 27,87$; $p < 0,0001$). (E) Ganho de massa dos grupos selvagens, DPN 21-91. Houve interação anóxia-DPN ($F_{(10,310)} = 6,03$; $p < 0,0001$), Alda-DPN ($F_{(10,310)} = 4,205$; $p < 0,0001$) e anóxia-Alda ($F_{(1,31)} = 7,148$; $p = 0,01$). (F) Ganho de massa dos grupos mutantes, DPN 21-91. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,30)} = 29,80$; $p < 0,0001$), da Alda ($F_{(1,30)} = 15,42$; $p = 0,0005$) e interação anóxia-Alda ($F_{(1,30)} = 15,30$; $p = 0,0005$). (G) Massa no DPN 91. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 22,01$; $p < 0,0001$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 16,15$; $p = 0,0002$), da interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 15,74$; $p = 0,0002$) e da interação mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 8,304$; $p = 0,005$). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$). $n = 9$ nos grupos SC, SAL, SAA, MC e MAN. $n = 8$ nos grupos SAN, SAL e SAA.

Na análise do ganho de massa dos filhotes dos grupos mutantes ao longo do período de amamentação (Gráfico 3B) houve efeito da anóxia em reduzir o ganho de massa ($F_{(1,30)} = 10,02$; $p = 0,003$). Porém, diferentemente do que ocorreu com os animais selvagens, nos animais mutantes a aplicação de Alda não alterou o ganho de massa ($F_{(1,30)} = 4,378$; $p = 0,04$) e ainda restaurou o ganho de massa normal dos animais que sofreram anóxia ao longo do período de amamentação, do ponto de vista prático ($F_{(1,30)} = 3,686$; $p = 0,06$).

Na análise das massas dos filhotes no DPN 4 (Gráfico 3C), observa-se que ainda não há diferença de massa entre os animais dos grupos selvagens. Porém, nos animais mutantes, os grupos submetidos à anóxia neonatal (MAN e MAA) já apresentam massa menor que os grupos normóxia (MC e MAL), o que contribui para que seja apontado efeito da anóxia de reduzir o ganho de massa já nesta idade ($F_{(1,61)} = 25,58$; $p < 0,0001$). Além disso, os animais mutantes que sofreram anóxia apresentam menor massa que os animais selvagens que também sofreram anóxia, o que é indicado pela interação entre os fatores anóxia e mutação ($F_{(1,61)} = 16,62$; $p = 0,0001$).

No DPN 21 (Gráfico 3D) já é possível notar que os grupos SAN, SAL e SAA apresentam massa menor que o grupo SC. Também é possível observar que o grupo MAA não apresenta mais massa menor que os grupos MC e MAL, refletindo o efeito da Alda de restaurar o ganho de massa dos animais que sofreram anóxia. Além disso, o grupo MAN foi o único que apresentou massa menor em DPN 21 em relação ao seu correspondente selvagem, sugerindo que os animais mutantes são mais suscetíveis à anóxia neonatal que os selvagens. No DPN 21 houve efeito da mutação em diminuir o ganho de massa, ou seja, os animais mutantes são naturalmente menos pesados que os selvagens a partir de certa idade ($F_{(1,56)} = 27,10$; $p < 0,0001$). A anóxia também é um fator que diminuiu a massa no DPN 21, tanto nos animais selvagens quanto nos mutantes ($F_{(1,56)} = 7,816$; $p = 0,007$). Embora não se tenha identificado efeito da Alda sozinha, houve interação entre a mutação e a Alda ($F_{(1,56)} = 37,59$; $p < 0,0001$), o que significa que, dentre os grupos mutantes, aqueles que receberam Alda apresentaram massa maior. Também se identificou interação entre a anóxia e a Alda ($F_{(1,56)} = 27,87$; $p < 0,0001$).

No ganho de massa dos grupos selvagens do DPN 21 ao DPN 91 (Gráfico 3E) houve interação entre a anóxia e o DPN ($F_{(10,310)} = 6,03$; $p < 0,0001$), a Alda e o DPN ($F_{(10,310)} = 4,205$; $p < 0,0001$) e a anóxia e a Alda ($F_{(1,31)} = 7,148$; $p = 0,01$). Ou seja, em certos DPNs animais dos grupos SAN, SAL e SAA ainda apresentam massas menores que o grupo SC.

Na análise do ganho de massa dos animais mutantes no mesmo período (Gráfico 3F), houve efeito da anóxia em manter a redução do ganho de massa ($F_{(1,30)} = 29,80$; $p < 0,0001$), da Alda em manter o ganho de massa inalterado ($F_{(1,30)} = 15,42$; $p = 0,0005$) e da Alda em manter a restauração do ganho de massa ($F_{(1,30)} = 15,30$; $p = 0,0005$).

No DPN 91 (Gráfico 3G), os grupos SAN e SAL exibiram massa menor que SC, indicando que o efeito da anóxia e da Alda de diminuir o ganho de massa permaneceu. O grupo MC também apresentou massa menor que SC, mostrando que o efeito da mutação de diminuir o crescimento também se manteve na idade adulta. Da mesma forma, o grupo MAN teve peso menor que SAN, dando suporte à ideia de que os animais mutantes são ainda mais suscetíveis à anóxia. O grupo MAN apresentou massa menor que MAL e igual a MAA, indicando que nos mutantes a anóxia diminui o peso, mas a Alda não. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 22,01$; $p < 0,0001$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 16,15$; $p = 0,0002$), da interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 15,74$; $p = 0,0002$) e da interação mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 8,304$; $p = 0,005$).

A anóxia neonatal foi um fator que reduziu o peso dos animais selvagens, como visto em muitos estudos (Dell'anna et al., 1991; Raff et al., 2001; Grojean et al., 2003; Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Tang; Nakazawa, 2005; Brooks et al., 2011; Yan et al., 2016; Kumar et al., 2017; 2019; Menshanov; Bannova; Dygalo, 2017). Cruz-Ochoa et al. (2019), usando o mesmo modelo desta tese em ratos *Wistar*, também observou redução de peso, associada à regulação da ingestão alimentar pelo hipotálamo, cujas principais regiões envolvidas nesta regulação são o núcleo arqueado, o núcleo paraventricular, o núcleo ventromedial e o núcleo dorsomedial (Schwartz et al., 2000). No DPN 35, Cruz-Ochoa et al. (2019) observou que animais submetidos à anóxia neonatal apresentaram glicemia pós-prandial reduzida e aumento da secreção de insulina, um hormônio que inibe a alimentação (Loh et al., 2017). No DPN 95, os animais anoxiados perderam mais peso pós-jejum que animais controle. Além disso, a glicemia destes animais diminuiu, assim como a secreção de insulina e de leptina, outro hormônio que também inibe a alimentação (Park; Ahima, 2015).

A mutação também foi um fator que reduziu o ganho de massa nos filhotes e nos adultos. Kobayashi et al. (2021) observaram que camundongos com o alelo *ALDH2*2* apresentam atrofia dos músculos gastrocnêmio e quadríceps, com reduzido diâmetro das fibras musculares e acúmulo de 4-HNE, e que a diminuição do peso nestes animais se deve à diminuição da massa muscular. Além disso, Hoshi et al. (2012) encontraram osteoporose nestes animais mutantes, resultante de uma debilidade na osteoblastogênese promovida pelo 4-HNE, o que também diminuiu a massa do animal. Outro ponto a se levar em consideração é a correlação positiva

entre o 4-HNE, a obesidade gerada por processos lipolíticos e as síndromes metabólicas (Mattson, 2009, p. 625), mas, neste caso, o 4-HNE, a princípio, aumentaria a massa dos animais.

Estas pesquisas indicam que a presença da mutação e a anóxia neonatal diminuem o ganho de massa por vias diferentes; enquanto a primeira parece diminuir diretamente a massa dos músculos e dos ossos, a segunda altera a massa por meio da diminuição da ingestão alimentar e da desregulação do metabolismo alimentar. Os animais do grupo MAN, que estiveram sob os efeitos tanto da mutação quanto da anóxia neonatal, exibiram a maior redução de ganho de massa de todos os grupos (Gráfico 3C, 3D e 3G), mostrando que os efeitos destes fatores são cumulativos e reforçando ainda mais a ideia de que a mutação e a anóxia atuam por mecanismos distintos em relação à perda de massa.

A aplicação de Alda sem o estímulo anóxico diminuiu o ganho de massa nos animais selvagens (Gráfico 3A e 3E), mas não alterou o ganho de massa nos animais mutantes (Gráfico 3B e 3F). Como discutido anteriormente, a diminuição do ganho de massa nos animais mutantes está relacionada à incapacidade que a enzima mutante tem de remover o excesso de 4-HNE celular; com a aplicação da Alda este quadro se reverte porque a ativação da ALDH2 mutante a tornaria capaz de remover os aldeídos excedentes que prejudicam a integridade dos músculos e dos ossos.

Nos animais selvagens que não sofreram anóxia, entretanto, a aplicação de Alda foi prejudicial para o ganho de massa (Fig. 16A e E), talvez porque a ativação da ALDH2 tenha sido excessiva e/ou desnecessária, sendo incompatível com o funcionamento normal da célula. O 4-HNE, além de estar envolvido em muitas patologias, é encontrado naturalmente nas células em certas concentrações e possui papel na regulação do crescimento, da proliferação e da diferenciação celulares, na sinalização de vias de transdução, na ativação de genes (muitos dos quais com papel antioxidante), na estimulação da quimiotaxia de neutrófilos e na ativação de tirosina-quinases (Dubinina; Vadali, 2010). A remoção do 4-HNE pela ALDH2 em situações não-anóxicas poderia comprometer a função do 4-HNE na célula. Além disso, as diferenças encontradas nos animais selvagens e mutantes também podem estar relacionadas aos diferentes efeitos da Alda na presença ou ausência da mutação, como discutido no item anterior.

Já nos animais selvagens e mutantes que sofreram anóxia neonatal, a Alda impediu, em ambos, a diminuição do ganho de massa induzida pela anóxia (Gráfico 3C, 3D e 3G). Nos animais selvagens, a Alda provavelmente aumentou a atividade da ALDH2, permitindo que ela removesse o excesso de 4-HNE produzido pelo estresse oxidativo. Ao contrário do que ocorreu

no caso da aplicação da Alda sem a anóxia, é provável que neste caso o aumento da atividade da enzima tenha diminuído a excessiva quantidade de 4-HNE produzida pela anóxia, retornando-a para níveis normais. Nos animais mutantes, a Alda, além de recuperar a atividade da enzima, também impediu o aumento excessivo das concentrações de 4-HNE (Gráfico 3D), o que também protegeu os animais contra a perda de massa ao longo do crescimento, tanto por conta da mutação, quanto por conta da anóxia neonatal.

3.4 Ontogenia dos reflexos

No DPN do aparecimento da preensão palmar (Gráfico 4A) não houve diferença entre os grupos nem efeito da mutação, da anóxia, da Alda ou de qualquer interação entre estes fatores.

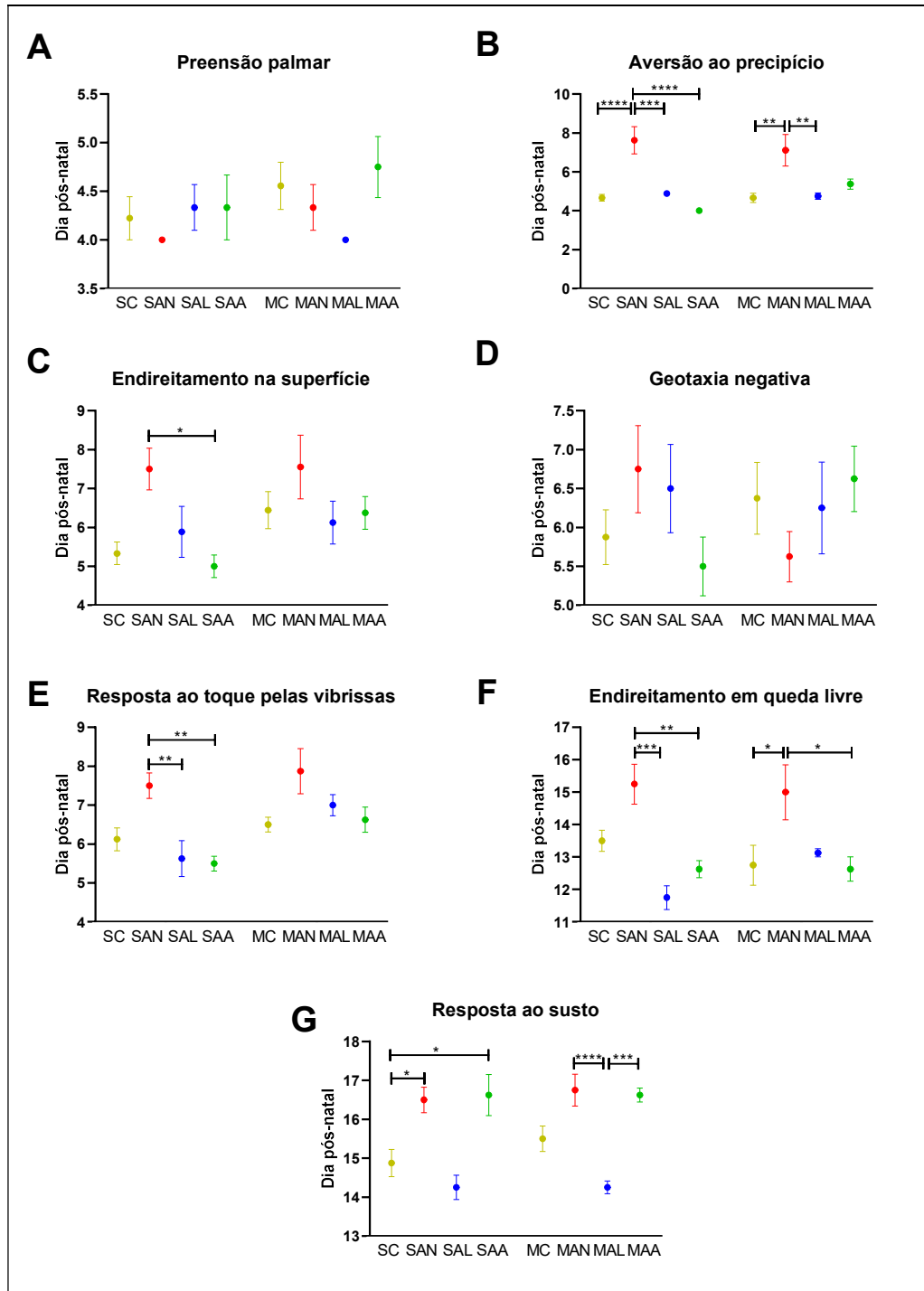
Em relação à aversão ao precipício (Gráfico 4B), a anóxia atrasou o aparecimento do reflexo ($F_{(1,61)} = 19,89$; $p < 0,0001$) e a Alda impediu este atraso ($F_{(1,61)} = 19,25$; $p < 0,0001$), o que também é mostrado na interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 24,19$; $p < 0,0001$). A aversão ao precipício surgiu atrasada no grupo SAN em relação aos demais grupos selvagens e no grupo MAN em relação aos demais grupos mutantes.

Houve efeito da Alda no dia do aparecimento do endireitamento na superfície ($F_{(1,61)} = 5,18$; $p = 0,02$) e interação entre a anóxia e a Alda ($F_{(1,61)} = 6,7$; $p = 0,01$). No grupo SAN o endireitamento só foi observado dias após o aparecimento no grupo SAA (Gráfico 4C). Estes resultados indicam que a Alda protegeu os animais que sofreram anóxia de apresentarem atraso no desenvolvimento sensoriomotor.

Quanto à geotaxia negativa (Gráfico 4D), não houve diferença entre os grupos e só houve efeito da interação entre a mutação, a anóxia e a Alda ($F_{(1,56)} = 5,169$; $p = 0,02$).

Já na resposta ao toque pelas vibrissas (Gráfico 4E), a mutação atrasou o seu aparecimento ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$), assim como a anóxia ($F_{(1,56)} = 5,10$; $p = 0,02$). Também houve efeito da Alda ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$). Junto com o atraso do grupo SAN em relação aos grupos SAL e SAA, é possível afirmar que a Alda também impediu o atraso da anóxia no aparecimento deste reflexo.

Gráfico 4. Ontogenia dos reflexos.



(A) Preensão palmar. (B) Aversão ao precipício. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,61)} = 19,89$; $p < 0,0001$), da Alda ($F_{(1,61)} = 19,25$; $p < 0,0001$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 24,19$; $p < 0,0001$). (C) Endireitamento na superfície. Houve efeito da Alda ($F_{(1,61)} = 5,18$; $p = 0,02$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 6,7$; $p = 0,01$). (D) Geotaxia negativa. Houve efeito da interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 5,169$; $p = 0,02$). (E) Resposta ao toque pelas vibrissas. Houve efeito da mutação ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$), da anóxia ($F_{(1,56)} = 5,10$; $p = 0,02$), da Alda ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 10,66$; $p = 0,001$). (F) Endireitamento em queda livre. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,56)} = 9,82$; $p = 0,002$), da Alda ($F_{(1,56)} = 20,86$; $p < 0,0001$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 6,74$; $p = 0,01$). (G) Resposta ao susto. Houve efeito da anóxia ($F_{(1,56)} = 61,29$; $p < 0,0001$) e efeito praticamente estatístico da Alda ($F_{(1,56)} = 3,70$; $p = 0,059$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 3,70$; $p = 0,059$). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$). $n = 9$ nos grupos SC, SAL, SAA, MC e MAN. $n = 8$ nos grupos SAN, SAL e SAA.

No endireitamento em queda livre (Gráfico 4F), houve efeito da anóxia em atrasar o DPN ($F_{(1,56)} = 9,82$; $p = 0,002$), efeito da Alda ($F_{(1,56)} = 20,86$; $p < 0,0001$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 6,74$; $p = 0,01$). O grupo SAN exibiu o reflexo tardiamente em relação aos grupos SAL e SAA, e o grupo MAN, em relação aos grupos MC e MAA, indicando novamente que a Alda foi neuroprotetora na ontogenia dos reflexos frente à anóxia neonatal e que ela também teve um efeito de adiantamento no aparecimento do reflexo.

Por fim, na resposta ao susto (Gráfico 4G), a anóxia atrasou o aparecimento do reflexo ($F_{(1,56)} = 61,29$; $p < 0,0001$) e houve efeito praticamente estatístico da Alda ($F_{(1,56)} = 3,70$; $p = 0,059$) e da interação anóxia-Alda ($F_{(1,56)} = 3,70$; $p = 0,059$). Os grupos selvagens anóxia, SAN e SAA, exibiram resposta ao susto dias após o grupo SC. Da mesma forma, os grupos mutantes anóxia, MAN e MAA, apresentaram o reflexo somente dias depois do grupo SAL. Neste caso, a Alda adiantou o aparecimento da resposta ao susto e não foi capaz de impedir o atraso promovido pela anóxia neonatal.

A ontogenia de cada reflexo resulta da maturação simultânea ou sucessiva de várias regiões do sistema nervoso (Fox, 1965, p. 234). A geotaxia negativa, o endireitamento na superfície e o endireitamento em queda livre ocorrem quando o indivíduo é capaz de detectar e corrigir a posição corporal, o que depende da maturação do sistema vestibular, do sistema exteroceptivo e do sistema proprioceptivo (Altman; Sudarshan, 1975); a resposta à colocação pelas vibrissas aparece quando o córtex barril dos roedores alcança certo estágio de maturação (Polley et al., 2004); a resposta de sobressalto depende do desenvolvimento de estruturas e de regiões vestibulares e cocleares (Ernfors et al., 1995); e todos os reflexos avaliados requerem a sensibilização e/ou a mobilização dos membros e do tronco, que ocorrem conforme o desenvolvimento das áreas somatossensoriais, das áreas motoras, da medula espinal e dos nervos periféricos (Fox, 1965, p. 234). Portanto, a avaliação geral da ontogenia de diferentes reflexos é uma avaliação que abrange a maturação de diferentes regiões do sistema nervoso e serve como um indicador geral do seu desenvolvimento.

Assim, de forma geral, a anóxia neonatal foi um fator que atrasou o aparecimento dos reflexos, enquanto a aplicação da Alda acelerou estes aparecimentos e/ou protegeu os atrasos gerados pela anóxia. Muitos estudos já mostraram o efeito debilitante da asfíxia perinatal na ontogenia dos reflexos (Dell'anna et al., 1991; Raff et al., 2001; Grojean et al., 2003; Ten et al., 2003; Lubics et al., 2005; Tang; Nakazawa, 2005; Yan et al., 2016; Menshanov; Bannova;

Dygalo, 2017), mas este é o primeiro a demonstrar que a mutação pode atrasar a expressão de algum reflexo, que no caso foi a resposta à colocação pelas vibrissas (Gráfico 4E).

Alguns estudos já haviam evidenciado que a aplicação de Alda-1 tem o potencial de proteger o sistema nervoso, particularmente o cérebro, contra a isquemia cerebral (Fu et al., 2014), a encefalomielite autoimune induzida (Islam et al., 2021), a doença de Alzheimer (Yang et al., 2021), a doença de Parkinson, a obesidade e o envelhecimento (Chen; Joshi; Mochly-Rosen, 2016). Também já foi demonstrado que a Alda estimula a expressão do fator de crescimento vascular endotelial no hipocampo (Liu et al., 2018) e protege a medula espinal de injúria (Khan et al., 2022). Porém, este é o primeiro estudo a demonstrar que a Alda acelera e protege o desenvolvimento do sistema nervoso durante a lactação.

3.5 Testes de memória

Nas sessões de familiarização do TRON e do TDO (Gráfico 5A e 5C) não houve efeito da mutação, da anóxia ou da Alda, nem diferença entre os grupos. Isso significa que não houve preferência do sujeito por qualquer um dos dois objetos idênticos posicionados no mesmo lugar.

No índice de discriminação do TRON (Gráfico 5B) houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 21,12$; $p < 0,0001$) e da anóxia ($F_{(1,61)} = 5,373$; $p = 0,02$) em diminuir o índice; condizendo com o fato de que o grupo SC apresentou maiores índices que os grupos SAN e MC. Também houve interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 20,36$; $p < 0,0001$) e o grupo SAA apresentou índice maior que o MAA.

No índice de discriminação do TDO (Gráfico 5D) houve efeito da Alda ($F_{(1,61)} = 32,19$; $p < 0,0001$), interação entre anóxia e Alda ($F_{(1,61)} = 9,871$; $p = 0,002$), mutação e anóxia ($F_{(1,61)} = 5,308$; $p = 0,02$), e mutação e Alda ($F_{(1,61)} = 18,03$; $p < 0,0001$). O grupo SC apresentou índice maior que SAN e MC, e os grupos MAL e MAA apresentaram índices maiores que os dos grupos MC e MAN.

O desempenho de roedores no TRON, que avalia a memória de curta, intermediária e longa duração, é prejudicado por lesões no hipocampo, no córtex perirrinal e, principalmente, no córtex entorrinal (Antunes; Biala, 2012). Quanto ao TDO, a memória de localização de objetos está associada ao córtex parietal posterior, ao córtex parahipocampal, ao hipocampo e ao córtex perirrinal (Zimmermann; Eschen, 2017). Estudos mostraram que o hipocampo e o

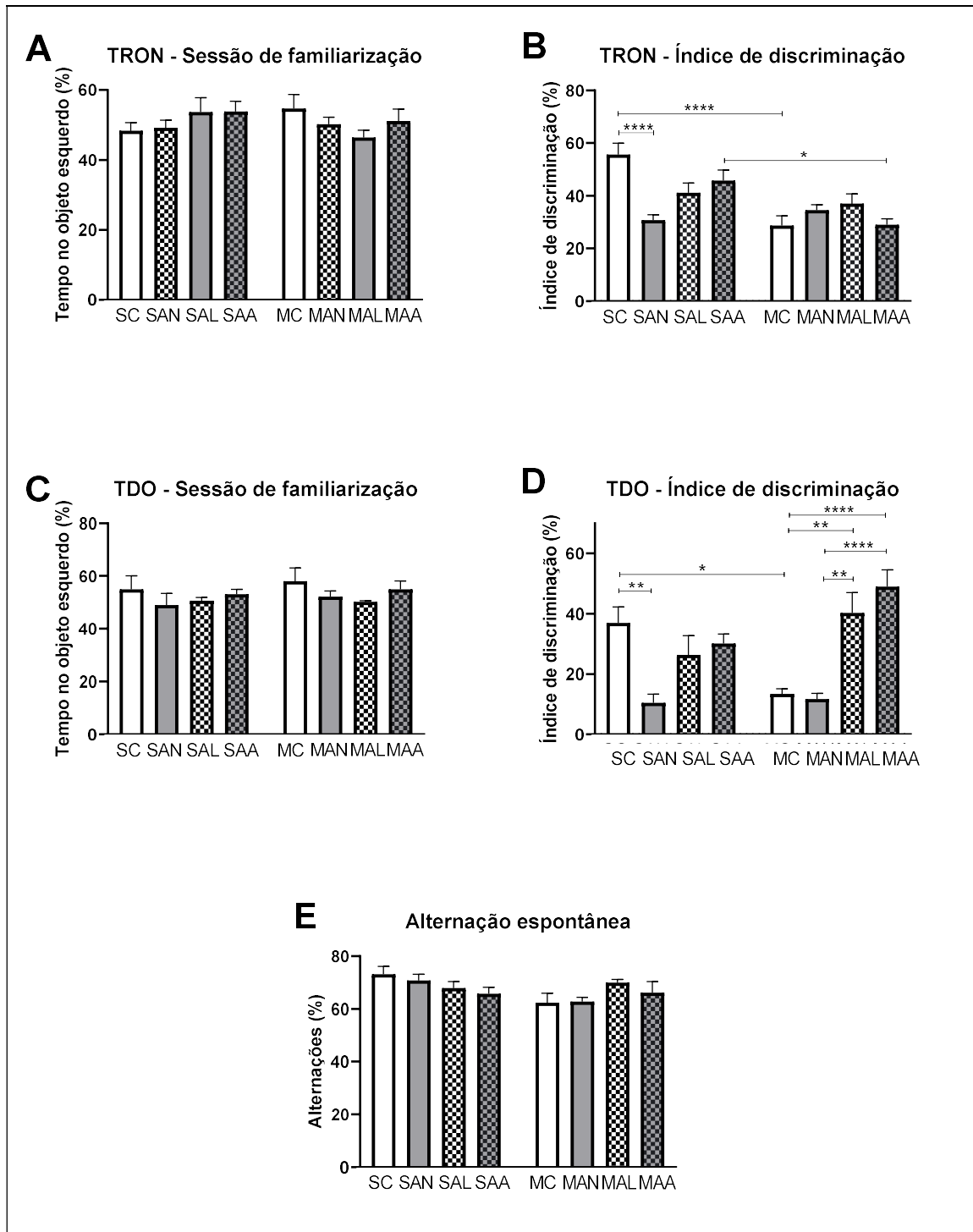
córtex pré-frontal de indivíduos com o alelo *ALDH2*2* apresentam alterações que podem comprometer a sua função, como aumento da expressão da proteína pró-apoptótica caspase 3 (Zhang et al., 2018) e aumento do dano neuronal na região dorsal do CA1 (Mehder; Bennett; Andrew, 2021). Como não foi encontrada diferença na expressão do 4-HNE entre os animais do grupo SC e MC (Gráfico 1A), a provável morte celular no hipocampo devido à mutação pode ter sido provocada pelo aumento de outras substâncias removidas pela ALDH2, como aldeídos adquiridos do meio ambiente, aldeídos alifáticos de cadeia curta, aldeídos aromáticos, aldeídos policíclicos, ésteres e o acetaldeído (Klyosov, 1996; Crabb et al., 2004; Beretta et al., 2010; Chen et al., 2014).

A anóxia neonatal também é um fator que reduziu o desempenho dos animais selvagens no TRON e no TDO (Gráfico 5B e 5D). A partir do mesmo modelo de anóxia desta tese, o nosso grupo encontrou que, em ratos *Wistar*, a anóxia neonatal aumenta a neurodegeneração no hipocampo, aumenta os déficits na memória de referência espacial e na memória operacional (observados por meio do labirinto aquático de Morris), reduz o volume hipocampal e diminui a neurogênese hipocampal (Takada et al., 2015, 2016; Kumar et al., 2019). Como o hipocampo dos animais SAN apresentou maior expressão de 4-HNE que o SC (Gráfico 1A), é provável que o aumento desta substância devido à anóxia tenha desencadeado morte celular no hipocampo e diminuído o desempenho no TRON e no TDO.

Já nos animais mutantes, a anóxia não foi um fator determinante no desempenho dos animais no TRON e no TDO (Gráfico 5B e 5D). Os animais do grupo MAN apresentaram o mesmo desempenho que os animais do grupo MC; e ambos os grupos apresentaram desempenho inferior ao dos animais SC e igual do dos animais SAN. Ou seja, os efeitos da mutação e da anóxia neonatal não foram cumulativos como no ganho de massa. No ganho de massa a mutação deve ter atingido principalmente os músculos e os ossos, enquanto a anóxia neonatal deve ter atuado principalmente sobre o hipotálamo. Já no desempenho no TRON e no TDO, tanto a anóxia neonatal quanto a mutação devem ter prejudicado principalmente as estruturas em comum com os testes, como o hipocampo, o que deve ter limitado o aparecimento de um possível efeito cumulativo destes dois estímulos no desempenho destes testes.

A aplicação da Alda sem o estímulo anóxico não foi prejudicial para o desempenho nestes testes (Gráfico 5B e 5D) como foi para o ganho de massa nos animais selvagens (Gráfico 5A e 5E), sugerindo que a Alda, sozinha, deva ter um efeito benéfico no hipocampo, mas prejudicial no hipotálamo, nos músculos e nos ossos.

Gráfico 5 – Teste de reconhecimento de objeto novo, teste de deslocamento de objeto e alternância espontânea.



(A) Sessão de familiarização do teste de reconhecimento de objeto novo (TRON). Não houve efeito da mutação, da anóxia ou da Alda. (B) Índice de discriminação do TRON. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 21,12$; $p < 0,0001$) e da anóxia ($F_{(1,61)} = 5,373$; $p = 0,02$) e interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 20,36$; $p < 0,0001$). (C) Sessão de familiarização do teste de deslocamento de objeto (TDO). Não houve efeito da mutação, da anóxia ou da Alda. (D) Índice de discriminação do TDO. Houve efeito da Alda ($F_{(1,61)} = 32,19$; $p < 0,0001$), interação entre anóxia e Alda ($F_{(1,61)} = 9,871$; $p = 0,002$), mutação e anóxia ($F_{(1,61)} = 5,308$; $p = 0,02$), e mutação e Alda ($F_{(1,61)} = 18,03$; $p < 0,0001$). (E) Alternância espontânea. Não houve efeito da mutação, da anóxia e da Alda.

Já nos animais mutantes, a aplicação da Alda, com ou sem o estímulo anóxico, não afetou o desempenho no TRON (Gráfico 5B), mas aumentou o desempenho no TDO (Gráfico 5D). Já foi discutido como a atividade da ALDH2 pode ter sido alterada, a longo prazo, pela aplicação de Alda nos animais mutantes, mas não nos animais selvagens. Talvez estes mecanismos possam estar presentes nas regiões cerebrais envolvidas apenas com o TDO, e não com o TRON, como o córtex parietal.

Nos animais selvagens que sofreram anóxia a aplicação de Alda preveniu a redução do índice de discriminação no TRON (Gráfico 5B) e no TDO (Gráfico 5D), provavelmente devido ao efeito neuroprotetor da droga no hipocampo (Liu et al., 2018). Neste caso, a Alda aumentaria a atividade da ALDH2, que reduziria a expressão de substâncias tóxicas removidas pela enzima.

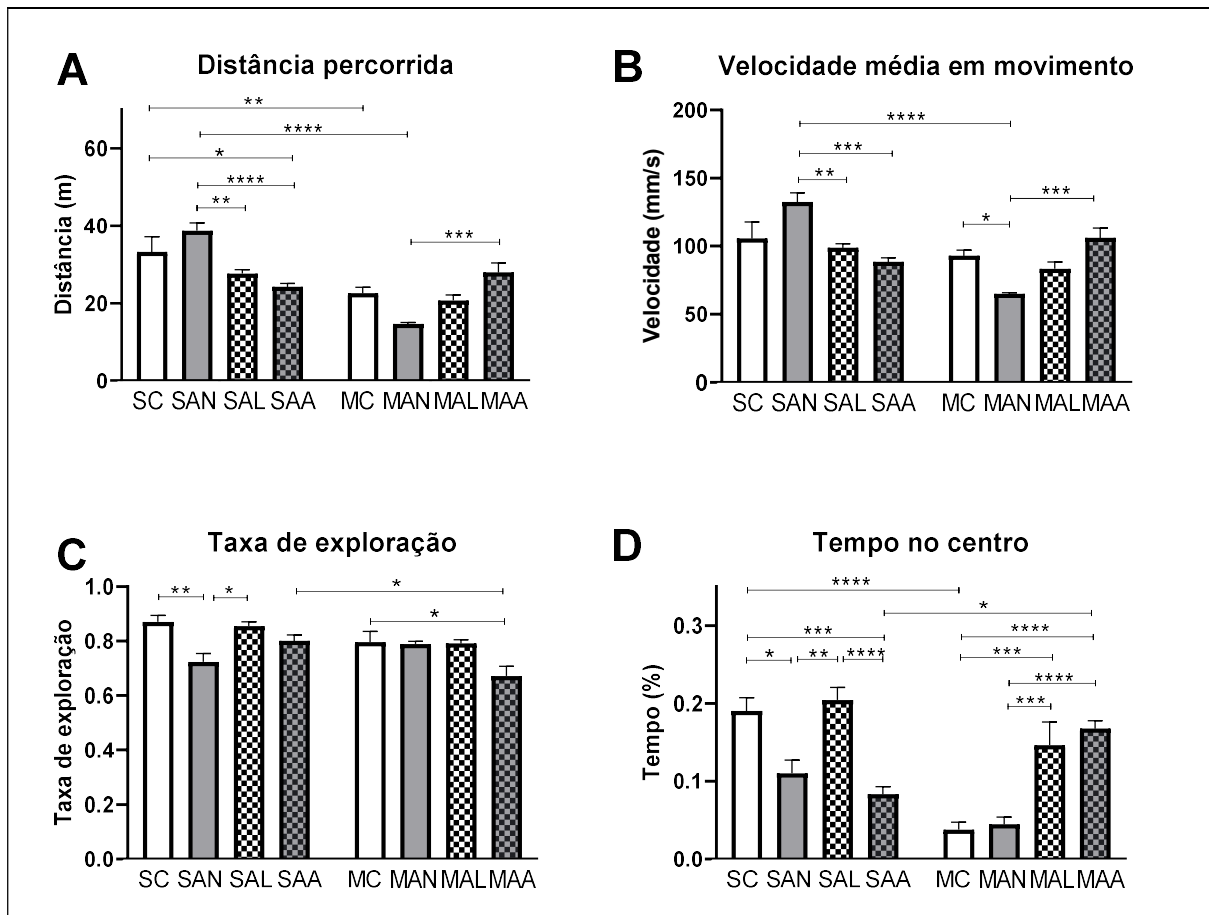
Não houve diferenças no desempenho dos grupos no teste de alternância espontânea (Gráfico 5E). Assim como o TRON e o TDO, este teste requer o uso da aprendizagem e da memória espacial. Porém, na alternância espontânea, o roedor também utiliza informações cinestésicas para se orientar no labirinto em Y (Lalonde, 2002, p. 91). Biologicamente, o teste está associado com o hipocampo e com regiões do encéfalo não associadas ao TRON e ao TDO, como o septo, o sistema vestibular e o cerebelo, que estão associados com a localização do indivíduo no espaço e a locomoção (Lalonde, 2002, p. 91). Talvez estas estruturas não tenham sido tão impactadas pela anóxia e pela mutação quanto as relacionadas à memória.

3.6 Campo aberto e labirinto em cruz elevado

Na distância percorrida no campo aberto (Gráfico 6A), houve efeito da mutação em diminuí-la ($F_{(1,61)} = 45,18$; $p < 0,0001$) e interação entre a mutação e a Alda ($F_{(1,61)} = 31,20$; $p < 0,0001$) e a mutação, a anóxia e a Alda ($F_{(1,61)} = 18,24$; $p < 0,0001$). Os animais do grupo SAN percorreram a maior distância, que foi significativamente maior que as distâncias percorridas dos grupos SAL, SAA e MAN. Em contrapartida, os animais do grupo MAN percorreram a menor distância, que foi significativamente menor que a distância percorrida pelo grupo MAA. Além disso, o grupo SC percorreu distância maior que os grupos SAA e MC. Os animais mutantes que receberam Alda percorreram distâncias maiores que os mutantes não-Alda; já os selvagens que receberam Alda percorreram distâncias menores que os selvagens não-Alda, indicando que a Alda tem um efeito diferente entre selvagens e mutantes. Além disso,

nos animais mutantes a Alda foi capaz de impedir a diminuição da distância percorrida pelos animais anoxiados, enquanto nos animais selvagens a Alda, junto com a anóxia, diminuiu ainda mais a distância percorrida, quando comparado aos animais somente anoxiados.

Gráfico 6. Campo aberto.



(A) Distância percorrida. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 45,18$; $p < 0,0001$) e interação mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 31,20$; $p < 0,0001$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 18,24$; $p < 0,0001$). (B) Velocidade média em movimento. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 19,49$; $p < 0,0001$) e interação mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 21,83$; $p < 0,0001$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 24,88$; $p < 0,0001$). (C) Taxa de exploração. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 7,450$; $p = 0,008$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 20,17$; $p < 0,0001$) e interação mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 6,427$; $p = 0,01$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 7,744$; $p = 0,007$). (D) Porcentagem de tempo no centro. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 18,20$; $p < 0,0001$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 14,84$; $p = 0,0003$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 23,79$; $p < 0,0001$), e interação mutação-anóxia ($F_{(1,61)} = 25,94$; $p < 0,0001$) e mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 29,39$; $p < 0,0001$). Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão. (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; **** = $p \leq 0,0001$). $n = 9$ nos grupos SC, SAL, SAA, MC e MAN. $n = 8$ nos grupos SAN, SAL e SAA.

Em relação à velocidade média em movimento (Gráfico 6B), assim como na distância percorrida, também houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 19,49$; $p < 0,0001$) e interação mutação-

Alda ($F_{(1,61)} = 21,83$; $p < 0,0001$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 24,88$; $p < 0,0001$). O grupo SAN apresentou velocidade maior que os grupos SAL, SAA e MAN. O grupo MAN também apresentou velocidade menor que o grupo MAA. Os efeitos de cada fator na velocidade média em movimento foram os mesmos que os na distância percorrida.

Na taxa de exploração (Gráfico 6C), a taxa foi diminuída pela mutação ($F_{(1,61)} = 7,450$; $p = 0,008$) e pela anóxia ($F_{(1,61)} = 20,17$; $p < 0,0001$). Houve efeito mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 6,427$; $p = 0,01$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 7,744$; $p = 0,007$). Os animais SAN exploraram menos o campo que os animais SC e SAL. Os animais MAA exploraram menos o campo que os animais MC e SAA.

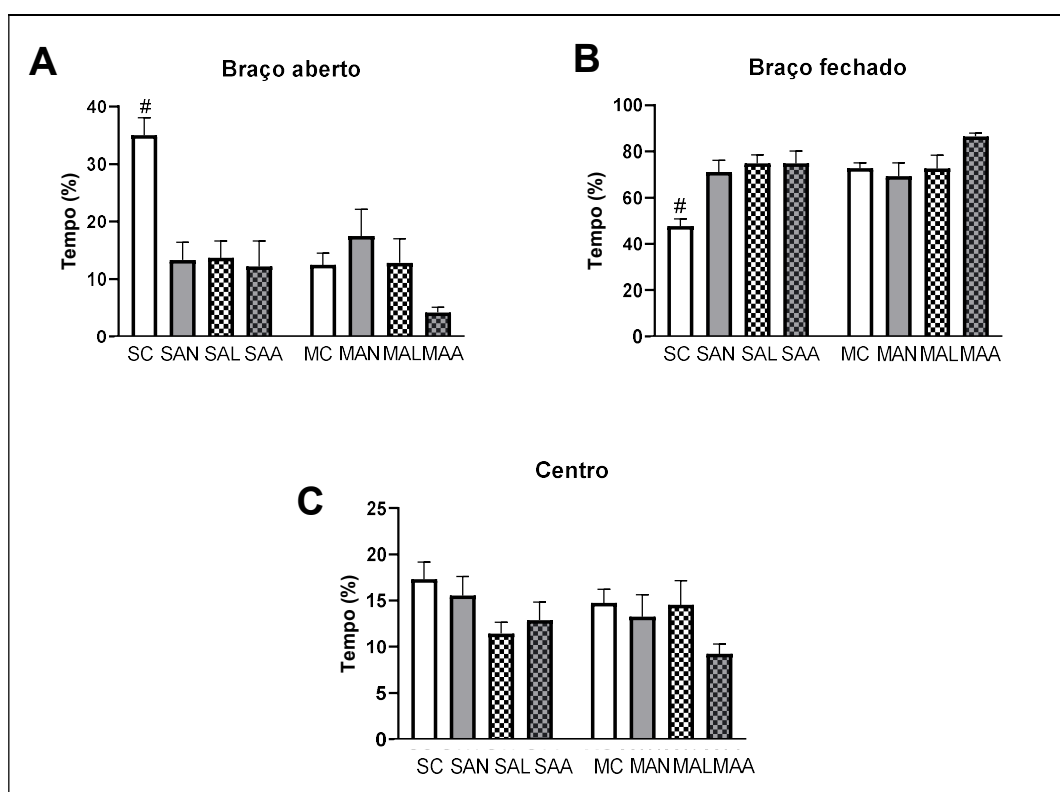
Na porcentagem de tempo nos quadrantes centrais (Gráfico 6D), houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 18,20$; $p < 0,0001$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 14,84$; $p = 0,0003$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 23,79$; $p < 0,0001$). Também houve interação mutação-anóxia ($F_{(1,61)} = 25,94$; $p < 0,0001$) e mutação-Alda ($F_{(1,61)} = 29,39$; $p < 0,0001$). Dentre os animais selvagens, os grupos que sofreram anóxia passaram menos tempo no centro do que os que não sofreram. Dentre os mutantes, os grupos que receberam Alda passaram mais tempo no centro que os que não recebem. O grupo MC ficou menos tempo no centro que o SC, e o grupo MAA passou mais tempo que o SAA.

No braço aberto do labirinto em cruz elevado (Gráfico 7A) houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 7,95$; $p = 0,006$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 7,65$; $p = 0,007$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 13,40$; $p = 0,0005$). Também houve interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 4,088$; $p = 0,04$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 12,22$; $p = 0,0009$). O grupo SC passou mais tempo no braço aberto que todos os demais grupos.

No braço fechado (Gráfico 7B) também houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 6,99$; $p = 0,01$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 7,50$; $p = 0,008$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 15,17$; $p = 0,0002$). Também houve interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 10,92$; $p = 0,0016$). O grupo SC passou menos tempo no braço fechado que todos os demais grupos.

No centro (Gráfico 7C) não houve diferença entre os grupos, mas houve efeito da interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 5,579$; $p = 0,02$).

Gráfico 7 – Labirinto em cruz elevado.



(A) Tempo relativo no braço aberto. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 7,95$; $p = 0,006$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 7,65$; $p = 0,007$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 13,40$; $p = 0,0005$). Também houve interação anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 4,088$; $p = 0,04$) e mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 12,22$; $p = 0,0009$). (B) Tempo relativo no braço fechado. Houve efeito da mutação ($F_{(1,61)} = 6,99$; $p = 0,01$), da anóxia ($F_{(1,61)} = 7,50$; $p = 0,008$) e da Alda ($F_{(1,61)} = 15,17$; $p = 0,0002$). Também houve interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 10,92$; $p = 0,0016$). (C) Tempo relativo no centro. Houve efeito da interação mutação-anóxia-Alda ($F_{(1,61)} = 5,579$; $p = 0,02$).

3.6.1 Avaliação da ansiedade

Os animais mutantes tenderam a ficar menos tempo no centro do campo aberto (Gráfico 6A) e menos tempo no braço aberto do labirinto em cruz elevado (Gráfico 7A), apresentando maior grau de ansiedade que os animais selvagens. A enzima ALDH2 selvagem remove aldeídos reativos, diminuindo os efeitos do estresse oxidativo na célula do sistema nervoso e em regiões que regulam a ansiedade, como o córtex pré-frontal e o hipocampo (Stachowicz et al., 2016).

A ALDH2 também catalisa a oxidação da dopamina, um neurotransmissor que regula comportamentos ligados à emoção, à motivação, à recompensa e ao reforço (Zarrindast; Khakpai, 2015). Em associação com polimorfismos do receptor dopaminérgico D2, e com o gene da enzima álcool desidrogenase, o alelo ALDH2*1, mas não o ALDH2*2, está

positivamente correlacionado com desordens de ansiedade, depressão e bipolaridade dependentes do alcoolismo (Wang et al., 2014).

A ALDH2 também metaboliza a serotonina e aparentemente o alelo selvagem também está associado a desordens bipolares junto com polimorfismos do gene do receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Lee et al. 2012). Porém, a exata forma como estes genes interagem entre si na presença de tais problemas ainda é alvo de estudos e de melhor compreensão.

Aparentemente o alelo selvagem está relacionado à ansiedade apenas na presença de polimorfismos de outros genes importantes na regulação da ansiedade. Já o alelo mutante parece gerar comportamentos associados à ansiedade independentemente da existência de polimorfismos de outros genes, como no caso dos animais deste estudo.

A anóxia neonatal também diminuiu a permanência dos animais selvagens nas regiões expostas do campo aberto (Gráfico 6D) e do labirinto em cruz elevado (Gráfico 7A), o que já havia sido demonstrado com ratos no labirinto com o modelo de anóxia utilizado neste projeto (Takada et al., 2015, 2016). Mas a anóxia não diminuiu o tempo de exposição nos animais mutantes, mostrando que o seu efeito não foi cumulativo com o da mutação, assim como também não foi no desempenho do TRON e do TDO (Gráfico 5B e 5D). Como o hipocampo é uma das regiões principais do sistema límbico, é provável que os resultados do TRON e do TDO, em animais mutantes e submetidos à anóxia, estejam associados com os resultados de ansiedade.

No campo aberto, a Alda não exerceu efeito nos animais selvagens, mas diminuiu a ansiedade nos animais mutantes (Gráfico 6D), o que pode estar relacionado ao efeito diferenciado da Alda a longo prazo nos animais mutantes. Porém, no labirinto em cruz elevado (Gráfico 7), a Alda aumentou a ansiedade tanto nos animais selvagens quanto nos animais mutantes. Assim como no ganho de massa, a Alda sozinha resultou em um efeito prejudicial para os animais, diferentemente do que foi encontrado no campo aberto (Gráfico 6D), no TRON (Gráfico 5B) e no TDO (Gráfico 5D). Muitas pesquisas relataram que os mesmos sujeitos experimentais que apresentaram um comportamento de ansiedade no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado não o apresentaram no outro teste (Carola et al., 2002), refletindo a multidimensionalidade das estruturas envolvidas na ansiedade e a necessidade de se entender melhor as diferenças entre esses testes comportamentais.

3.6.2 Avaliação da atividade locomotora e da exploração

No campo aberto, os animais mutantes apresentaram menor velocidade média (Gráfico 6B), taxa de exploração (Gráfico 6C) e distância percorrida (Gráfico 6A) que os animais selvagens. Como apresentado anteriormente, a mutação pode ter provocado algum tipo de debilidade nos músculos e nos ossos, prejudicando a a atividade locomotora e exploratória (Hoshi et al. 2012; Kobayashi et al., 2021). Além disso, em pacientes com doença de Parkinson foram encontradas altas concentrações de 4-HNE no encéfalo (Wey et al., 2012). Em camundongos $ALDH2^{*2/*2}$, há redução do desempenho na marcha e no rotarod, perda significativa de neurônios na substância negra e redução de dopamina no estriado (Wey et al., 2012). Ou seja, animais mutantes também apresentam problemas motores por danos nas regiões encefálicas que regulam a atividade motora.

A anóxia neonatal só reduziu a atividade locomotora (distância percorrida e velocidade média) dos animais mutantes (Gráfico 6A e 6B). Como os mutantes são mais vulneráveis à anóxia, os efeitos da anóxia podem ser crônicos nestes animais, enquanto nos animais selvagens houve recuperação ao longo do tempo. Como a diminuição do ganho de massa foi associado à diminuição da massa muscular, talvez a atividade locomotora dos animais selvagens não tenha sido impactada porque os animais selvagens apresentaram certa recuperação no ganho de massa em relação aos animais selvagens.

Os efeitos da Alda também foram diferentes na locomoção dos animais selvagens e na dos mutantes (Gráfico 6A e 6B); nos primeiros, ela aparentemente provocou um efeito deletério e persistente, talvez porque tenha aumentado a atividade de uma enzima que não apresentava problemas, alterando a regulação natural do 4-HNE na célula; no segundo, ela restaurou a atividade da enzima, permitindo a regulação do 4-HNE, como já foi observado em outros resultados desta tese.

A taxa de exploração dos animais selvagens foi diminuída pela anóxia neonatal, mas nos animais mutantes ela foi diminuída pela Alda, o que é mais notável no grupo MAA (Gráfico 6C). Tal efeito prejudicial da Alda nos animais mutantes também foi observado no labirinto em cruz elevado (Gráfico 7), em que os animais mutantes que receberam Alda permaneceram menos tempo nos braços abertos (Gráfico 7A), mais tempo nos braços fechados (Gráfico 7B) e menos tempo no centro do labirinto (Gráfico 7C). Embora estes animais tenham percorrido uma distância maior que aqueles que não receberam Alda (Gráfico 6A), houve também uma maior tendência de eles ficarem mais restritos a determinados quadrantes (Gráfico 6C). Como a

diminuição do comportamento exploratório é maior em indivíduos com maior grau de ansiedade, há um forte indicativo de que a Alda é mais ansiogênica do que ansiolítica e de que a maior permanência dos animais mutantes-Alda no centro do campo aberto pode ser devido ao maior medo de explorar novos quadrantes do que ao menor medo de ficar exposto.

4 Conclusão

A injeção de Alda no geral é protetora em animais que sofreram anóxia neonatal ou com a mutação E487K no gene *ALDH2*. Porém, a aplicação da Alda em animais que apresentam atividade normal da ALDH2, e que não estão sob estresse oxidativo, gera alguns efeitos prejudiciais, provavelmente por comprometer a regulação normal do 4-HNE. Por isso, não seria recomendável utilizá-la em indivíduos que não apresentam a mutação ou que clinicamente não precisam. A Alda também promove aumento da ansiedade e é importante que este efeito seja mais bem investigado antes de se propor tratamento em humanos contra a asfixia perinatal.

A substância possui alto potencial no tratamento da asfixia perinatal e em indivíduos com a mutação E487K no gene *ALDH2*, mas seus efeitos colaterais devem ser observados e, talvez, reduzidos com tratamentos complementares.

REFERÊNCIAS

- Altman J, Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. **Anim Behav.** 1975;23(4): 896-920. [DOI: 10.1016/0003-3472(75)90114-1].
- Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process.** 2012; 13(2): 93-110. [DOI: 10.1007/s10339-011-0430-z].
- Arakawa H, Erzurumlu RS. Role of whiskers in sensorimotor development of C57BL/6 mice. **Behav Brain Res.** 2015;287: 146-155. [DOI: 10.1016/j.bbr.2015.03.040].
- Arruda BP. **Efeito da melatonina no desenvolvimento e hipocampo de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal.** (dissertação de Mestrado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.
- Bai J, Mei Y. Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 attenuates neurotoxicity induced by 4-hydroxynonenal in cultured primary hippocampal neurons. **Neurotox Res.** 2011;19(3): 412-422. [DOI: 10.1007/s12640-010-9183-1].
- Beretta M, Gorren AC, Wenzl MV, Weis R, Russwurm M, Koesling D, Schmidt K, Mayer B. Characterization of the East Asian variant of aldehyde dehydrogenase-2: bioactivation of nitroglycerin and effects of Alda-1. **J Biol Chem.** 2010; 8;285(2): 943-952. [DOI: 10.1074/jbc.M109.014548].
- Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. **Free Radic Biol Med.** 2006; 1;40(3): 388-397. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.040].
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science.** 2004; 2;304(5667):108-110. [DOI: 10.1126/science.1095004].
- Brooks J, Day S, Shavelle R, Strauss D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. **Pediatrics.** 2011; 128(2):e299-307. [DOI: 10.1542/peds.2010-2801].
- Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. **Behav Brain Res.** 2002; 21;134(1-2):49-57. [DOI: 10.1016/s0166-4328(01)00452-1].
- Carvalho, LAJ. **Avaliação do envolvimento da leptina no desenvolvimento de camundongos leptin reporters submetidos a anóxia neonatal.** (dissertação de Mestrado em Biologia de Sistemas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.
- Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, Miller SL. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. **Front Neurosci.** 2013;7: 194. [DOI: 10.3389/fnins.2013.00194].
- Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. **Science.** 2008;321: 1493-1495. [DOI: 10.1126/science.1158554].

Chen CH, Ferreira JC, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. **Physiol Rev.** 2014; 94(1):1-34. [DOI: 10.1152/physrev.00017.2013].

Chen CH, Joshi AU, Mochly-Rosen D. The Role of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2 (ALDH2) in Neuropathology and Neurodegeneration. **Acta Neurol Taiwan.** 2016; 25(4): 111-123.

Chen CH, Ferreira JCB, Mochly-Rosen D. ALDH2 and Cardiovascular Disease. **Adv Exp Med Biol.** 2019; 1193:53-67. [DOI: 10.1007/978-981-13-6260-6_3].

Chen YC, Yang LF, Lai CL, Yin SJ. Acetaldehyde Enhances Alcohol Sensitivity and Protects against Alcoholism: Evidence from Alcohol Metabolism in Subjects with Variant ALDH2*2 Gene Allele. **Biomolecules.** 2021; 11(8):1183. [DOI: 10.3390/biom11081183].

Cheng MC, Lo WC, Chang YW, Lee SS, Chang CC. Design, synthesis and the structure-activity relationship of agonists targeting on the ALDH2 catalytic tunnel. **Bioorg Chem.** 2020; 104:104166. [DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104166].

Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biol.** 2018; 15:490-503. [DOI: 10.1016/j.redox.2018.01.008].

Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. **Exp Neurol.** 2008;210(1): 95-108. [DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.10.006].

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **Proc Nutr Soc.** 2004; 63(1):49-63. [DOI: 10.1079/pns2003327].

Cruz-Ochoa NA, Ochoa-Amaya JE, Pulecio SL, Xavier GF, Nogueira MI. Neonatal anoxia impairs long-term energy metabolism and somatic development of Wistar rats. **Int J Dev Neurosci.** 2019; 79:76-85. [DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2019.11.001].

Davidson JO, Gonzalez F, Gressens P, Gunn AJ; Newborn Brain Society Guidelines and Publications Committee. Update on mechanisms of the pathophysiology of neonatal encephalopathy. **Semin Fetal Neonatal Med.** 2021; 26(5):101267. [DOI: 10.1016/j.siny.2021.101267].

Dell'Anna ME, Calzolari S, Molinari M, Iuvone L, Calimici R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behav Brain Res.** 1991; 45(2): 125-134. [DOI: 10.1016/s0166-4328(05)80078-6].

Deiró TC, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho JE, Souza SL, Freitas-Silva SR, Ferreira LM, Guedes RC, Câmara CR, Barros KM. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Biol Res.** 2004;37(10): 1503-1509. [DOI: 10.1590/s0100-879x2004001000009].

Doorn JA, Srivastava SK, Petersen DR. Aldose reductase catalyzes reduction of the lipid peroxidation product 4-oxonon-2-enal. **Chem Res Toxicol.** 2003; 16(11):1418-1423. [DOI: 10.1021/tx0300378].

- Dubinina EE, Dadali VA. Role of 4-hydroxy-trans-2-nonenal in cell functions. **Biochemistry (Mosc)**. 2010; 75(9): 1069-1087. [DOI: 10.1134/s0006297910090014].
- Ernfors P, Van De Water T, Loring J, Jaenisch R. Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. **Neuron**. 1995;14(6): 1153-64. [DOI: 10.1016/0896-6273(95)90263-5].
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**. 1991;11(1): 81-128. [DOI: 10.1016/0891-5849(91)90192-6].
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**. 2010; 65(1): 7-19. [DOI: 10.1016/j.neuron.2009.11.031].
- Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. **Dev Neurosci**. 2001; 23(3): 198-202. [DOI: 10.1159/000046143].
- Fineschi V, Viola RV, La Russa R, Santurro A, Frati P. A Controversial Medicolegal Issue: Timing the Onset of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. **Mediators Inflamm**. 2017; 2017:6024959. [DOI: 10.1155/2017/6024959].
- Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Anim Behav**. 1965;13(2): 234-241. [DOI: 10.1016/0003-3472(65)90041-2].
- Fu SH, Zhang HF, Yang ZB, Li TB, Liu B, Lou Z, Ma QL, Luo XJ, Peng J. Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 2014; 387(1): 87-94. [DOI: 10.1007/s00210-013-0922-8].
- Fujii C, Harada S, Ohkoshi N, Hayashi A, Yoshizawa K. Study on Parkinson's disease and alcohol drinking. **Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi**. 1998; 33(6): 683-691.
- Gesell A. Behavior patterns of fetal-infant and child; with evidences of innate growth factors. **Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis**. 1954; 33:114-26.
- Gillam-Krakauer M, Gowen Jr CW. Birth Asphyxia. 2021 Aug 27. In: **StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022**.
- Gilles FH, Leviton A. Neonatal white matter damage and the fetal inflammatory response. **Semin Fetal Neonatal Med**. 2020; 25(4): 101111. [DOI: 10.1016/j.siny.2020.101111].
- Goedde HW, Agarwal DP, Fritze G, Meier-Tackmann D, Singh S, Beckmann G, Bhatia K, Chen LZ, Fang B, Lisker R, et al. Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. **Hum Genet**. 1992; 88(3): 344-346. [DOI: 10.1007/BF00197271].
- Gomes KM, Campos JC, Bechara LR, Queliconi B, Lima VM, Disatnik MH, Magno P, Chen CH, Brum PC, Kowaltowski AJ, Mochly-Rosen D, Ferreira JC6. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. **Cardiovasc Res**. 2014;103(4): 498-508. [DOI: 10.1093/cvr/cvu125].
- Gomes KM, Bechara LR, Lima VM, Ribeiro MA, Campos JC, Dourado PM, Kowaltowski AJ, Mochly-Rosen D, Ferreira JC. Aldehydic load and aldehyde dehydrogenase 2 profile during the progression of post-myocardial infarction cardiomyopathy: benefits of Alda-1. **Int J Cardiol**. 2015;179: 129-138. [DOI: 10.1016/j.ijcard.2014.10.140].

Gonzalez FF, Miller SP. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? **Arch Dis Child Fetal Neonatal** 2006; 91(6):F454-459. [DOI: 10.1136/adc.2005.092445].

Greco P, Nencini G, Piva I, Scioscia M, Volta CA, Spadaro S, Neri M, Bonaccorsi G, Greco F, Cocco I, Sorrentino F, D'Antonio F, Nappi L. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future. **Acta Neurol Belg**. 2020; 120(2): 277-288. [DOI: 10.1007/s13760-020-01308-3]

Grojean S, Schroeder H, Pourié G, Charriaut-Marlangue C, Koziel V, Desor D, Vert P, Daval J. L. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: A long term follow-up. **Neurobiol Dis**. 2003;14(2): 265-278. [DOI: 10.1016/s0969-9961(03)00082-2].

Guo JM, Liu AJ, Zang P, Dong WZ, Ying L, Wang W, Xu P, Song XR, Cai J, Zhang SQ, Duan JL, Mehta JL, Su DF. ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. **Cell Res**. 2013;23(7): 915-930. [DOI: 10.1038/cr.2013.69].

Hao PP, Chen YG, Wang JL, Wang XL, Zhang Y. Meta-analysis of aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and Alzheimer's disease in East Asians. **Can J Neurol Sci**. 2011; 38(3): 500-506. [DOI: 10.1017/s0317167100011938].

Higuchi S, Matsushita S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. **Am J Psychiatry**. 1995; 152(8): 1219-1221. [DOI: 10.1176/ajp.152.8.1219].

Himmelman K, Hagberg G, Wiklund LM, Eek MN, Uvebrant P. Dyskinetic cerebral palsy: a population-based study of children born between 1991 and 1998. **Dev Med Child Neurol**. 2007; 49(4): 246-251. [DOI: 10.1111/j.1469-8749.2007.00246.x].

Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. **J Bone Miner Res**. 2012; 27(9): 2015-2023. [DOI: 10.1002/jbmr.1634].

Hu N, Ren J, Zhang Y. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase obliterates insulin resistance-induced cardiac dysfunction through deacetylation of PGC-1 α . **Oncotarget**. 2016; 7(47): 76398-76414. [DOI: 10.18632/oncotarget.11977].

Islam SMT, Won J, Kim J, Qiao F, Singh AK, Khan M, Singh I. Detoxification of Reactive Aldehydes by Alda-1 Treatment Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. **Neuroscience**. 2021; 458: 431-442. [DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.01.021].

Jaganjac M, Cindrić M, Jakovčević A, Žarković K, Žarković N. Lipid peroxidation in brain tumors. **Neurochem Int**. 2021; 149: 105118. [DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105118].

Jin S, Chen J, Chen L, Histen G, Lin Z, Gross S, Hixon J, Chen Y, Kung C, Chen Y, Fu Y, Lu Y, Lin H, Cai X, Yang H, Cairns RA, Dorsch M, Su SM, Biller S, Mak TW, Cang Y. ALDH2(E487K) mutation increases protein turnover and promotes murine

- hepatocarcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2015; 112(29):9088-9093. [DOI: 10.1073/pnas.1510757112].
- Khan M, Qiao F, Kumar P, Touhidul Islam SM, Singh AK, Won J, Singh I. Neuroprotective effects of Alda-1 mitigate spinal cord injury in mice: involvement of Alda-1-induced ALDH2 activation-mediated suppression of reactive aldehyde mechanisms. **Neural Regen Res**. 2022; 17(1): 185-193. [DOI: 10.4103/1673-5374.314312].
- Kirk, GS, Raven, J E, Schoefield, M. Os filósofos pré-socráticos. 4. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1994.
- Klyosov AA. Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. **Biochemistry**. 1996; 35(14): 4457-4467. [DOI: 10.1021/bi9521102].
- Kobayashi H, Nakamura S, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T. ALDH2 mutation promotes skeletal muscle atrophy in mice via accumulation of oxidative stress. **Bone**. 2021; 142:115739. [DOI: 10.1016/j.bone.2020.115739].
- Kumar AJ, Takada SH, Motta-Teixeira LC, Lee VY, Xavier GF, Nogueira MI. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behav Brain Res**. 2017;333: 242-250. [DOI: 10.1016/j.bbr.2017.07.009].
- Kumar AJ, Motta-Teixeira LC, Takada SH, Yonamine-Lee V, Machado-Nils AV, Xavier GF, Nogueira MI. Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. **Int J Dev Neurosci**. 2019;73: 50-58. [DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2018.12.002].
- Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neurosci Biobehav Rev**. 2002; 26(1): 91-104. [DOI: 10.1016/s0149-7634(01)00041-0].
- Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? **Lancet**. 2005; 365(9462): 891-900. [DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71048-5].
- Lee SY, Chen SL, Chang YH, Chu CH, Huang SY, Tzeng NS, Wang CL, Lin SH, Lee IH, Yeh TL, Yang YK, Lu RB. The ALDH2 and 5-HT2A genes interacted in bipolar-I but not bipolar-II disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2012; 38(2): 247-251. [DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.04.005].
- Lee VY. **Influência do exercício materno espontâneo e da anóxia neonatal no desenvolvimento, na memória espacial e no hipocampo de ratos**. (dissertação de Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- Liu X, Jin G, Fan B, Xing Y, Wang L, Wang M, Yuan Y, Zhu Q. The impact of ALDH2 activation by Alda-1 on the expression of VEGF in the hippocampus of a rat model of post-MI depression. **Neurosci Lett**. 2018; 674: 156-161. [DOI: 10.1016/j.neulet.2018.03.048].
- Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? **J Neurosci Res**. 2013;91(4): 473-478. [DOI: 10.1002/jnr.23178].

Loh K, Zhang L, Brandon A, Wang Q, Begg D, Qi Y, Fu M, Kulkarni R, Teo J, Baldock P, Brüning JC, Cooney G, Neely GG, Herzog H. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. **Mol Metab.** 2017; 6(11): 1562. [DOI: 10.1016/j.molmet.2017.03.013].

Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvári I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behav Brain Res.** 2005; 157(1): 157-165. [DOI: 10.1016/j.bbr.2004.06.019].

Majnemer A, Mazer B. Neurologic evaluation of the newborn infant: definition and psychometric properties. **Dev Med Child Neurol.** 1998; 40(10): 708-715. [DOI: 10.1111/j.1469-8749.1998.tb12332.x].

Marcelino TB, de Lemos Rodrigues PI, Miguel PM, Netto CA, Pereira Silva LO, Matté C. Effect of maternal exercise on biochemical parameters in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. **Brain Res.** 2015; 1622: 91-101. [DOI: 10.1016/j.brainres.2015.06.024].

Martin HJ, Maser E. Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. **Chem Biol Interact.** 2009; 178(1-3): 145-150. [DOI: 10.1016/j.cbi.2008.10.021].

Martinez-Biarge M, Diez-Sebastian J, Kapellou O, Gindner D, Allsop JM, Rutherford MA, Cowan FM. Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy. **Neurology.** 2011; 76(24): 2055-2061. [DOI: 10.1212/WNL.0b013e31821f442d].

Matsuda VDV, Tejada MB, Motta-Teixeira LC, Ikebara JM, Cardoso DS, Machado-Nils AV, Lee VY, Diccini I, Arruda BP, Martins PP, Dias NMM, Tessarotto RP, Raesissadati R, Bruno M, Takase LF, Kihara AH, Nogueira MI, Xavier GF, Takada SH. Impact of neonatal anoxia and hypothermic treatment on development and memory of rats. **Exp Neurol.** 2021; 340: 113691. [DOI: 10.1016/j.expneurol.2021.113691].

Mattson MP. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. **Exp Gerontol.** 2009; 44: 625–633. [DOI: 10.1016/j.exger.2009.07.003].

mechemexpress.com [homepage on internet]. Disponível em: <https://www.medchemexpress.com/Alda-1.html>

medicalxpress.com [homepage on internet]. *What role does the hippocampus play in memory?* [citado 11 out. 2022]. Disponível em: <https://medicalxpress.com/news/2015-10-role-hippocampus-memory.html>

Mehder RH, Bennett BM, Andrew RD. Age-Related Neuronal Deterioration Specifically Within the Dorsal CA1 Region of the Hippocampus in a Mouse Model of Late Onset Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 2021; 79(4): 1547-1561. [DOI: 10.3233/JAD-201024].

Menshanov PN, Bannova AV, Dygalo NN. Anoxia ameliorates the dexamethasone-induced neurobehavioral alterations in the neonatal male rat pups. **Horm Behav.** 2017; 87:122-128. [DOI: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.013].

Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. **Front Cell Neurosci.** 2017; 11:78.

- Murata C, Taniyama M, Kuriyama S, Muramatsu T, Atsumi Y, Matsuoka K, Suzuki Y. Meta-analysis of three diabetes population studies: association of inactive ALDH2 genotype with maternal inheritance of diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** 2004; 66 Suppl 1: S145-147. [DOI: 10.1016/j.diabres.2003.11.022].
- nbtltd.com. [homepage on internet]. [citado 11 out. 2022]. Disponível em: <https://nbt ltd.com/products/elevated-plus-maze/>
- Ning S, Budas GR, Churchill EN, Chen CH, Knox SJ, Mochly-Rosen D. Mitigation of radiation-induced dermatitis by activation of aldehyde dehydrogenase 2 using topical alda-1 in mice. **Radiat Res.** 2012; 178(1): 69-74. [DOI: 10.1667/rr2861.1].
- Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG. Hypoxia and brain development. **Prog Neurobiol.** 1996; 49(1): 1-51. [DOI: 10.1016/0301-0082(96)00007-x].
- Odd D, Heep A, Luyt K, Draycott T. Hypoxic-ischemic brain injury: Planned delivery before intrapartum events. **J Neonatal Perinatal Med.** 2017; 10(4):347-353. [DOI: 10.3233/NPM-16152].
- Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, Ando F, Niino N, Shimokata H, Ohta S. Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. **J Hum Genet.** 2003; 48(8): 404-409. [DOI: 10.1007/s10038-003-0046-y].
- Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S. Age-dependent neurodegeneration accompanying memory loss in transgenic mice defective in mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity. **J Neurosci.** 2008;28(24): 6239-6249. [DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4956-07.2008].
- Oyama T, Isse T, Kagawa N, Kinaga T, Kim YD, Morita M, Sugio K, Weiner H, Yasumoto K, Kawamoto T. Tissue-distribution of aldehyde dehydrogenase 2 and effects of the ALDH2 gene-disruption on the expression of enzymes involved in alcohol metabolism. **Front Biosci.** 2005; 10:951-960. [DOI: 10.2741/1589].
- Pang R, Advic-Belltheus A, Meehan C, Fullen DJ, Golay X, Robertson NJ. Melatonin for Neonatal Encephalopathy: From Bench to Bedside. **Int J Mol Sci.** 2021; 22(11): 5481. [DOI: 10.3390/ijms22115481].
- Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism.** 2015; 64(1): 24-34. [DOI: 10.1016/j.metabol.2014.08.004].
- Piešová M, Mach M. Impact of perinatal hypoxia on the developing brain. **Physiol Res.** 2020; 69(2): 199-213. [DOI: 10.33549/physiolres.934198].
- Polley DB, Kvasnák E, Frostig RD. Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. **Nature.** 2004;429(6987): 67-71. [DOI: 10.1038/nature02469].
- Raff H, Bruder ED, Jankowski BM, Colman RJ. Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. **Horm Metab Res.** 2001; 33(3):151-155. [DOI: 10.1055/s-2001-14929].
- Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radic Biol Med.** 2011; 51(7):1302-1319. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027].

- Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect.** 2000;108 Suppl 3: 511-533. [DOI: 10.1289/ehp.00108s3511].
- Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997;21(6): 801-810. [DOI: 10.1016/s0149-7634(96)00058-9].
- Rogalska J, Danielisova V, Caputa M. Effect of neonatal body temperature on postanoxic, potentially neurotoxic iron accumulation in the rat brain. **Neurosci Lett.** 2006;393(2-3): 249-254. [DOI: 10.1016/j.neulet.2005.09.085].
- Schreier SM, Muellner MK, Steinkellner H, Hermann M, Esterbauer H, Exner M, Gmeiner BM, Kapiotis S, Laggner H. Hydrogen sulfide scavenges the cytotoxic lipid oxidation product 4-HNE. **Neurotox Res.** 2010; 17(3):249-256. [DOI: 10.1007/s12640-009-9099-9].
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. **Nature.** 2000; 404(6778): 661-671. [DOI: 10.1038/35007534].
- Stachowicz A, Głombik K, Olszanecki R, Basta-Kaim A, Suski M, Lasoń W, Korbut R. The impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) activation by Alda-1 on the behavioral and biochemical disturbances in animal model of depression. **Brain Behav Immun.** 2016;51: 144-153. [DOI: 10.1016/j.bbi.2015.08.004].
- Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. **Structure.** 1997; 5(5):701-711. [DOI: 10.1016/s0969-2126(97)00224-4].
- Stewart MJ, Malek K, Crabb DW. Distribution of messenger RNAs for aldehyde dehydrogenase 1, aldehyde dehydrogenase 2, and aldehyde dehydrogenase 5 in human tissues. **J Investig Med.** 1996; 44(2):42-46.
- Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. ALDH2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. **Sci Transl Med.** 2011;3(107): 107ra111. [DOI: 10.1126/scitranslmed.3002067].
- Suzuki Y, Taniyama M, Muramatsu T, Higuchi S, Ohta S, Atsumi Y, Matsuoka K. ALDH2/ADH2 polymorphism associated with vasculopathy and neuropathy in type 2 diabetes. **Alcohol Clin Exp Res.** 2004; 28(8 Suppl Proceedings): 111S-116S. [DOI: 10.1097/01.alc.0000133583.44581.99].
- Takada SH, Sampaio CA, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **J Neurosci Methods.** 2011;198(1): 62-69. [DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.03.009].
- Takada SH, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Sampaio CA, Polli RS, Malheiros JM, Takase LF, Kihara AH, Covolan L, Xavier GF, Nogueira MI. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behav Brain Res.** 2016;296: 331-338. [DOI: 10.1016/j.bbr.2015.08.039].
- Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe IS, Nogueira MI. Neonatal

anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**. 2015;284: 247-59. [DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.054].

Taneja I, Raju KSR, Mittal M, Dev K, Khan MF, Maurya R, Wahajuddin M. Bioavailability, plasma protein binding and metabolic stability studies of a ALDH2 activator, alda-1, using a validated LC-ESI-MS/MS method in rat plasma. **RSC Advances**. 2015; 5:54395–54402.

Tang AC, Nakazawa M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. **Behav Brain Res**. 2005;163(1): 1-9. [DOI: 10.1016/j.bbr.2005.03.025].

Ten VS, Bradley-Moore M, Gingrich JA, Stark RI, Pinsky DJ. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behav Brain Res**. 2003; 145(1-2): 209-219. [DOI: 10.1016/s0166-4328(03)00146-3].

Vasconcelos, RG. **Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento maternal e o desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar**. (tese de Doutorado em Ciências Biológicas [Fisiologia]) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Vitrikas K, Dalton H, Breish D. Cerebral Palsy: An Overview. **Am Fam Physician**. 2020; 101(4): 213-220.

Wang YS, Lee SY, Chen SL, Chang YH, Wang TY, Lin SH, Wang CL, Huang SY, Lee IH, Chen PS, Yang YK, Lu RB. Role of DRD2 and ALDH2 genes in bipolar II disorder with and without comorbid anxiety disorder. **Eur Psychiatry**. 2014; 29(3):142-148. [DOI: 10.1016/j.eurpsy.2013.05.001].

Wey MC, Fernandez E, Martinez PA, Sullivan P, Goldstein DS, Strong R. Neurodegeneration and motor dysfunction in mice lacking cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases: implications for Parkinson's disease. **PLoS One**. 2012; 7(2):e31522. [DOI: 10.1371/journal.pone.0031522].

Wilson-Costello D, Friedman H, Minich N, Siner B, Taylor G, Schluchter M, Hack M. Improved neurodevelopmental outcomes for extremely low birth weight infants in 2000-2002. **Pediatrics**. 2007; 119(1):37-45. [DOI: 10.1542/peds.2006-1416].

Xiao M, Zhong H, Xia L, Tao Y, Yin H. Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria. **Free Radic Biol Med**. 2017;111: 316-327. [DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.363].

Xiao Q, Weiner H, Crabb DW. The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. **J Clin Invest**. 1996; 98(9):2027-2032. [DOI: 10.1172/JCI119007].

Xue L, Xu F, Meng L, Wei S, Wang J, Hao P, Bian Y, Zhang Y, Chen Y. Acetylation-dependent regulation of mitochondrial ALDH2 activation by SIRT3 mediates acute ethanol-induced eNOS activation. **FEBS Lett**. 2012; 586(2):137-142. [DOI: 10.1016/j.febslet.2011.11.031].

Yamaguchi J, Hasegawa Y, Kawasaki M, Masui T, Kanoh T, Ishiguro N, Hamajima N. ALDH2 polymorphisms and bone mineral density in an elderly Japanese population. **Osteoporos Int**. 2006; 17(6):908-913. [DOI: 10.1007/s00198-006-0077-2].

Yang Y, Chen W, Wang X, Ge W. Impact of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 on cognitive impairment in the AD model mouse. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**. 2021; 53(7):837-847. [DOI: 10.1093/abbs/gmab057].

Yan F, Zhang M, Meng Y, Li H, Yu L, Fu X, Tang Y, Jiang C. Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis. **Brain Res**. 2016;1651: 104-113. [DOI: 10.1016/j.brainres.2016.09.024].

Yoshida A, Huang IY, Ikawa M. Molecular abnormality of an inactive aldehyde dehydrogenase variant commonly found in Orientals. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1984; 81(1):258-261. [DOI: 10.1073/pnas.81.1.258].

Zafeiriou DI. Primitive reflexes and postural reactions in the neurodevelopmental examination. **Pediatr Neurol**. 2004; 31(1):1-8. [DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2004.01.012].

Zarkovic K. 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. **Mol Aspects Med**. 2003; 24(4-5):293-303. [DOI: 10.1016/s0098-2997(03)00024-4].

Zarrindast MR, Khakpai F. The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior. **Arch Iran Med**. 2015; 18(9):591-603.

Zhang WY, Wang KY, Li YJ, Li YR, Lu RZ. Chronic stress causes protein kinase C epsilon-aldehyde dehydrogenase 2 signaling pathway perturbation in the rat hippocampus and prefrontal cortex, but not in the myocardium. **Neural Regen Res**. 2018; 13(7): 1225-1230. [DOI: 10.4103/1673-5374.235060].

Zhang H, Fu L. The role of ALDH2 in tumorigenesis and tumor progression: Targeting ALDH2 as a potential cancer treatment. **Acta Pharm Sin B**. 2021; 11(6):1400-1411. [DOI: 10.1016/j.apsb.2021.02.008].

Zheng R, Dragomir AC, Mishin V, Richardson JR, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Differential metabolism of 4-hydroxynonenal in liver, lung and brain of mice and rats. **Toxicol Appl Pharmacol**. 2014; 279(1):43-52. [DOI: 10.1016/j.taap.2014.04.026].

Zimatkin SM, Rout UK, Koivusalo M, Bühler R, Lindros KO. Regional distribution of low-Km mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. **Alcohol Clin Exp Res**. 1992;16(6): 1162-1167. [DOI: 10.1111/j.1530-0277.1992.tb00713.x]

Zimmermann K, Eschen A. Brain regions involved in subprocesses of small-space episodic object-location memory: a systematic review of lesion and functional neuroimaging studies. **Memory**. 2017; 25(4):487-519. [DOI: 10.1080/09658211.2016.1188965].