



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**ESCOLA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**O PAPEL DA VIA TNF- $\alpha$ /PARQUINA/NF-kB/VEGFR-1 NO REMODELAMENTO E  
NEOVASCULARIZAÇÃO DA MATRIZ GERMINATIVA DO RECÉM NATO  
DURANTE O INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO**

**ELIANE AMARAL GHIRELLI**  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lucia de Noronha

**CURITIBA, Novembro/2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**O PAPEL DA VIA TNF- $\alpha$ /PARQUINA/NF-kB/VEGF-R1 NO REMODELAMENTO E  
NEOVASCULARIZAÇÃO DA MATRIZ GERMINATIVA DO RECÉM NATO DURANTE O  
INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucia de Noronha

**CURITIBA, Novembro/2021**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 02 dias do mês de dezembro de 2021 às 19:00, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “TNF- $\alpha$ /PARQUINA/NF- $\kappa$ B/VEGFR-1 NO REMODELAMENTO E NEOVASCULARIZAÇÃO DA MATRIZ GERMINATIVA DO RECÉM NATO DURANTE O INSULTO HIPÓXICO-ISQUÊMICO” apresentado por Eliane Amaral Ghirelli para obtenção do título de Doutor, Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lucia de Noronha - Presidente	
Profa. Dra. Marina Luise Viola de Azevedo (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza (PUCPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião (UFPR)	
Profa. Dra. Ana Paula Percicote (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lucia de Noronha	Conceito: aprovada
Profa. Dra. Marina Luise Viola de Azevedo	Conceito: aprovada
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza	Conceito: aprovada
Profa. Dra. Ana Paula Martins Sebastião	Conceito: aprovada
Profa. Dra. Ana Paula Percicote	Conceito: aprovada

Parecer Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lucia de Noronha  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

## **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo a normatização estabelecida pela ABNT. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Patologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Declaramos que não há conflito de interesse na realização da presente tese.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, e a todos aqueles que em Seu nome têm me guiado estando presentes sempre em todos os passos da minha vida.

Agradeço à minha mãe Marlene quem sempre esteve ao meu lado com seu amor, força, apoio e determinação, quem me ensinou seguir em frente e sempre foi a inspiração e o maior exemplo da minha vida.

Aos meus padrinhos e aos meus tios Antônio Carlos e Neusa pelo seu amor e confiança em mim, e por sempre me incentivarem a acreditar nos meus objetivos, sendo o impulso emocional, moral e espiritual que tanto fortalece o meu caminhar.

Ao meu irmão Luiz Carlos, pelo amor, apoio e incentivo presente ao meu lado em toda esta jornada.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia de Noronha, a quem sempre admirei e respeitei pela sua capacidade profissional, mas que nesta minha trajetória mostrou-se um ser humano ímpar, com a palavra certa e estímulo adequado para seguir adiante neste desafio. Referência de mestra, doutora e pesquisadora, e uma amiga com a qual a vida acadêmica me agraciou. Gratidão por tudo.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental, em especial à Caroline Vaz de Paula e Seigo Nagashima, que demonstraram excelência profissional, dedicação no que exercem e acima de tudo por toda ajuda que prontamente me ofereceram sempre que precisei. Aos alunos da Graduação Felipe Paes Gomes da Silva e Alessandro Gonçalves Gomes Oricil pelo interesse e contribuições que tiveram neste trabalho, e que com orgulho constatei serem grandes promessas na medicina e na ciência.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta obra à Marlene, minha amada mãe, por tudo que representa, a ela devo a vida, o exemplo a ser seguido, e todas as oportunidades que com amor sempre me proporcionou.

Aos meus padrinhos que são os pilares, forças e luzes do meu caminhar.

Ao meu marido, Dr. Marlus Vinicius Costa Ferreira que partiu, mas que com amor e companheirismo muito me incentivou a iniciar esta etapa e seguir em frente, pela admiração e respeito ao profissional que foi, pelo seu legado de sabedoria e dedicação ao conhecimento que deixou neste mundo.

## RESUMO

A asfixia perinatal é uma patologia derivada do insulto hipóxico-isquêmico que poderá resultar em um importante dano cerebral, através de lesões teciduais principalmente na região da matriz germinativa do SNC. Essa região apresenta uma grande atividade proliferativa e pode ser diretamente correlacionada com a hipóxia, devido a sua rica vascularização. A falta de oxigênio nessa região pode induzir a sequelas neurológicas ou até mesmo ao óbito. A utilização de mecanismos moleculares envolvendo diferentes vias de regulação podem auxiliar no entendimento e na identificação de biomarcadores que consigam correlacionar o insulto hipóxico-isquêmico com a clínica de recém-natos prematuros. Dessa forma foram analisadas 118 amostras de SNC contendo matriz germinativa de neonatos que morreram nos primeiros 28 dias de vida. Essas amostras foram submetidas as análises histológicas e imunohistoquímicas para identificar a imunexpressão tecidual dos biomarcadores (NF-κB, AKT-3, Parquina, Trk-C e VEGFR- 1) com os parâmetros clínicos como a asfixia, prematuridade, e tempo de sobrevivência. Foram encontrados expressão significativas de NF-κB, AKT-3 e Parquina nos indivíduos prematuros. O marcador NF-κB mostrou menor expressão tecidual quando relacionado ao tempo de sobrevivência menor que 24h. Já o marcador VEGFR-1 também apresentou uma menor expressão tecidual, todavia quando relacionado com a asfixia. A associação desses diferentes biomarcadores possibilitou a construção de uma via de integração relacionando a neovascularização com fatores de proteção neural.

**PALAVRAS-CHAVE:** SNC, matriz germinativa, asfixia perinatal, insulto hipóxico-isquêmico, recém-nato prematuro

## **ABSTRACT**

Perinatal asphyxia is a pathology derived from the hypoxic-ischemic insult that may result in significant brain damage, through tissue lesions mainly in the germinal matrix region of the CNS. This region presents a high proliferative activity and is directly correlated with hypoxia, due to its rich vascularization. The lack of oxygen in this region may induce neurological sequelae or even death. Using molecular mechanisms involving different regulatory pathways may assist in understanding and identifying biomarkers that can correlate hypoxic-ischemic insult with the clinical condition of premature newborns. We analyzed 118 CNS samples containing germ matrix from neonates who died within the first 28 days of life. These samples were subjected to histological and immunohistochemical analyses to identify the tissue immunoexpression of biomarkers (NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, Trk-C, and VEGFR-1) with clinical parameters such as asphyxia, prematurity, and survival time. When analyzing the parameter prematurity we found significant expressions of NF- $\kappa$ B, AKT-3, and Parkin. The NF- $\kappa$ B marker showed lower tissue expression when related to survival time shorter than 24h. The marker VEGFR-1 also showed lower tissue expression, but when linked to asphyxia. The association of these different biomarkers allowed the construction of an integration pathway related to neovascularization with neural protection factors.

**Key words:** CNS, germinal matrix, perinatal asphyxia, hypoxic-ischemic insult, neonates

## **RESUMO POPULAR/ FACT SHEET**

A diminuição de oxigênio no tecido cerebral de recém-nascidos pode levar a perdas de funções neurológicas, lesão cerebral permanente e até mesmo a morte. Essa é uma das principais causas de morte no primeiro mês de vida e pode estar associada com outros diferentes fatores clínicos, como a prematuridade, baixo peso ao nascer, dificuldades respiratórias durante o parto, entre outros. Para a detecção de um biomarcador que auxilie na identificação precoce dessa possível lesão neurológica de origem hipóxica são investigadas vias celulares fisiopatológicas e suas proteínas envolvidas. Dessa forma, foi estudada a relação entre alguns biomarcadores (proteínas NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parquina, Trk-C e VEGFR-1) indicativos de dano cerebral e a presença de hipóxia no recém-nato. O aumento da expressão de algumas dessas proteínas resulta em uma maior proteção e possibilidade de regeneração desse tecido afetado através da formação de novos vasos sanguíneos.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Determinação do período desde a concepção até o período pós-parto.....	16
Figura 2. Fluxograma das amostras estudadas .....	25

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Dados dos anticorpos utilizados .....	26
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**MI** – Mortalidade infantil

**RN** - Recém-nascido

**AP** - Asfixia perinatal

**HI** - Hipóxia-isquêmica neonatal

**NF- $\kappa$ B** - Fator nuclear Kappa B

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral alfa

**HIF-1** - Fator induzido por hipóxia -1

**VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
<b>Insulto Hipóxico-Isquêmico Neonatal.....</b>	<b>16</b>
<b>Sistema Nervoso Central e Asfixia Perinatal.....</b>	<b>18</b>
<b>Vias de Sinalização Envolvidas na Diferenciação da Matriz Germinativa.....</b>	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>Análises Histológica .....</b>	<b>26</b>
<b>Análise Imunohistoquímica .....</b>	<b>26</b>
<b>Análise dos biomarcadores NF-kB, AKT-3, Parquina, Trk-C, VEGFR-1 .....</b>	<b>27</b>
<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>28</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>

## INTRODUÇÃO

Nas estatísticas mundiais a taxa de mortalidade infantil é uma preocupação recorrente. Em 2019 foram relatadas 2,4 milhões de mortes neonatais durante o primeiro mês de vida (UN INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY, 2020). No Brasil, desde a década de 90, a mortalidade neonatal tem sido o principal componente da mortalidade infantil (MI), e entre os anos de 2015 e 2016 esta taxa ficou em aproximadamente 9 a cada 1.000 nascidos vivos (VELOSO et al., 2019). A terapia intensiva neonatal aliada aos avanços tecnológicos foram essenciais para a redução dessa mortalidade, mas ainda é uma preocupação para a comunidade médica, uma vez que esse período neonatal é considerado o tempo mais vulnerável para uma criança (LIU et al., 2016). Até pouco tempo ainda eram escassos os recursos para análise dos fatores de risco e como principais causas para o óbito neonatal hoje destacam-se o baixo peso ao nascer, as afecções respiratórias do recém-nascido (RN), as infecções perinatais e a prematuridade (LANSKY et al., 2014; PEDROSA; SARINHO; ODD et al., 2017).

Dentre às afecções respiratórias no recém-nascido, tem-se a prevalência da asfixia perinatal, a qual se encontra como responsável por 23% dos óbitos que ocorrem no período neonatal (LANSKY et al., 2014). A asfixia perinatal (AP) ou a hipóxia-isquêmica neonatal (HI) é uma interrupção temporária da disponibilidade de oxigênio que implica em um desafio metabólico arriscado, mesmo quando o insulto não leva a um desfecho fatal (NUÑEZ et al., 2018). A AP durante o parto produz *déficits* de longo prazo no desenvolvimento do cérebro, incluindo o hipocampo, acarretando em alterações fisiopatológicas nos aspectos sistêmicos e celulares (MORALES et al., 2008). A gravidade da hipóxia é variável, podendo chegar ao desfecho da mortada criança e a recuperação dependerá da capacidade de adaptação do feto (LOCATELLI et al., 2020).

Apesar de todo esse contexto e o número de mortes e morbidades neonatais, o investimento em pesquisa poderia ser maior, e uns dos principais fatores associados a isso é o fato de ser uma condição mais prevalente em países com poucos recursos (LAROSA et al., 2017). Segundo Locci e colaboradores (2020) desde 2010 tem se destacado a necessidade da busca de uma identificação e validação de biomarcadores para o dano cerebral e também para o desfecho, visando um melhor resultado e possibilitando o alcance de um protocolo; que além de proteção do cérebro desse neonato reduziria as consequências relacionadas a essa condição (LOCCI et al., 2020).

A busca por um tratamento neuroprotetor auxiliaria na redução da taxa de mortalidade além de diminuição de sequelas neurológicas, todavia apesar dos esforços até o momento nenhum biomarcador foi validado para o diagnóstico ou predição do resultado. Apesar dessa dificuldade já existem estudos relacionados com a encefalopatia hipóxico-isquêmica apresentando que a utilização de múltiplos biomarcadores sanguíneos ao invés de um único seria mais promissor nesse campo de pesquisa

(GRAHAM et al., 2019). Dessa forma visando compreender melhor o insulto hipóxico-isquêmico, espera-se que através da correlação da clínica do recém-nascido com diferentes biomarcadores relacionados com a diferenciação da matriz germinativa, seja possível obter indicadores precoces ou determinantes prognósticos.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Insulto Hipóxico-Isquêmico Neonatal

A asfixia perinatal (AP) é uma patologia protagonista quando o assunto é a mortalidade perinatal e neonatal. Apesar dos diversos avanços na monitorização bioquímica e biofísica do feto durante o trabalho de parto, em países desenvolvidos a incidência é de dois a cada 1000 nascidos, já nos países em desenvolvimento a taxa chega a ser 10 vezes maior. Estima-se que a maioria dos casos ocorra intraparto, apesar de que 20% ocorre pré-parto e outros casos logo no período pós-natal. Nos recém-nascidos que são afetados pela asfixia, 15-20% morrem no período neonatal e aproximadamente 25% dos sobreviventes apresenta déficits neurológicos permanentes (ODD et al., 2017).

O uso do termo AP, é vinculado aos casos os quais ocorre a falta de fluxo de sangue ou troca de gases para ou do feto no período imediatamente antes, durante ou após o parto (Figura 1). Durante esse período pode ocorrer o comprometimento ou a interrupção total da troca gasosa placentária (pré-natal) ou pulmonar (pós-natal imediata). Quando a falta de oxigênio para os órgãos vitais é parcial, chama-se hipóxia, quando completa de anóxia resultando em hipoxemia progressiva e hipercarbonia. Se a hipoxemia for suficientemente grave os tecidos e órgãos vitais desenvolverão uma dívida de oxigênio, levando a uma glicólise anaeróbica e acidose láctica. (MOSHIRO; MDOE; PERLMAN, 2019; SUGIURA-OGASAWARA et al., 2019)

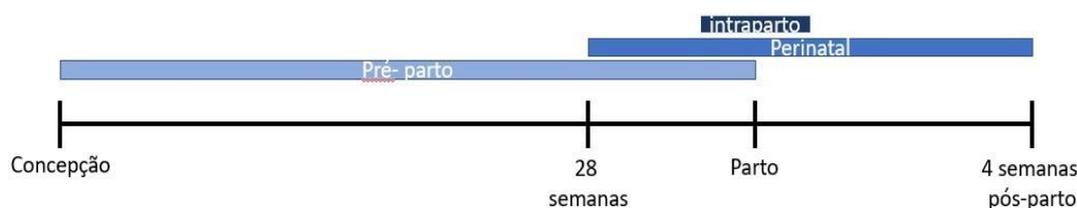


Figura 1. Determinação do período desde a concepção até o período pós-parto

Fonte: o autor (2021)

O insulto hipóxico-isquêmico é caracterizado pela lesão neuropatológica que acarreta alterações de neurodesenvolvimento em recém-nascidos asfixiados. Dessa forma, afetando seletivamente áreas vulneráveis do sistema nervoso central, que variam com a idade gestacional e que apresentam um alto grau de imaturidade cerebrovascular e bioquímico no momento do insulto. Dessa maneira, determinando dois elementos críticos para a causalidade da asfixia perinatal, a duração e a gravidade da interrupção (MOSHIRO; MDOE; PERLMAN, 2019).

A fisiopatologia da AP não corre de forma única, mas evolutiva, e é comumente descrita onde

o feto utiliza uma variedade de mecanismos adaptativos buscando aumentar o fluxo de sangue para o cérebro, coração e adrenais, desviando o fluxo dos pulmões, intestino, fígado, rins e músculo esquelético (LAROSA et al., 2017).

Primeiramente existe uma fase de falha energética primária, onde ocorre um aumento de aminoácidos excitatórios, perda de balanço iônico, aumento de cálcio intracelular, lipases e proteases e de radicais livres. É possível observar um aumento na pressão arterial, à medida que a asfixia progride evidenciando cada vez mais uma dependência metabólica anaeróbica da glicose, ocasionando uma acidose metabólica. A hipóxia e a acidose severa geram como consequência uma redução do fluxo cerebral, isquemia e necrose celular. Em sequência há a fase de falha energética secundária, que ocorre após uma fase latente, onde há a ativação da micróglia, apoptose, diminuição de fatores de crescimento, síntese de proteínas, o aparecimento da lesão oxidativa e o contínuo aumento de aminoácidos excitatórios, levando a uma lesão neurológica (apoptose e necrose celular) (INDER; VOLPE, 2000; MOSHIRO; MDOE; PERLMAN, 2019).

Para a AP ser diagnosticada, deve apresentar pelo menos uma das seguintes características em um recém-nascido: 10 min de pontuação Apgar  $\leq 5$ , necessidade de ressuscitação  $> 10$  min, acidose metabólica ( $\text{pH} \leq 7.0$  ou  $\text{BE} \leq -12$  mMol/L em artéria umbilical (UA) ou dentro de 1 h de vida). Como fatores de risco ante e intraparto associados a AP estão os eventos de nascimento asfixiantes como: ruptura uterina, abrupção placentária, ombro distócia e prolapso do cordão. O monitoramento do ritmo cardíaco fetal (FHR) também é uma ferramenta importante, todavia sua atuação no quadro da asfixia fetal ainda é controversa, e esforços são direcionados para sua interpretação e desenvolvimento de protocolos (LOCATELLI et al., 2020).

Existe uma janela terapêutica, com um intervalo de aproximadamente 6h, onde é possível tentar prevenir o dano cerebral. As sequelas tardias vistas nos sobreviventes serão mais comumente a paralisia cerebral, retardo mental, déficits visuais, epilepsias, deficiências no aprendizado e comportamento (ALBRECHT et al., 2019).

Como mencionado existem fatores de risco que podem estar associados a AP, Macdonald e colaboradores (1980) já haviam relacionado que a asfixia exibia um perfil onde ocorria mais frequentemente em recém-nascidos com menor idade gestacional e peso (LOCATELLI et al., 2020; MACDONALD et al., 1980). O nascimento pretermo é o desfecho de vários fatores determinantes, cujo processo inicia-se na gestação envolvendo condições maternas, fetais e placentárias e outros fatores não determinados que serão influenciados pela idade gestacional e peso ao nascer (ALMEIDA et al., 2017; MIRALHA et al., 2017).

A natureza imprevisível de um evento hipóxico ao nascer é um grande desafio, uma vez que na maioria das vezes é necessário que o trabalho de parto ocorra para que então os obstetras se tornam conscientes de que o feto está em risco. O que é visto é uma hipóxia isquêmica global no momento do nascimento, sendo uma das principais causas de morte para este evento e suas implicações clínicas mais comuns a curto prazo são a encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) e convulsões. Além de tratamentos como a hipotermia, que apresenta um sucesso limitado, outros estão em estudo como o uso de altas doses de eritropoetina, ou a adição de Xenon ao tratamento de hipotermia, e o uso de células-tronco (AZZOPARDI et al., 2016; BALLABH; DE VRIES, 2021; WENGER, 2002). Todavia são estudos para o tratamento principalmente da encefalopatia hipóxico-isquêmica e apesar de todos esses esforços ainda não existem tratamentos eficazes para prevenir a asfixia. Principalmente, uma vez que identificar a sequência de eventos que levam a AP durante os cuidados pré-natais e intraparto ainda é um grande desafio (LOCATELLI et al., 2020).

Um modelo ideal para um tratamento seria aquele que envolvesse um mecanismo que fosse capaz de minimizar a falha de energia que ocorre no momento do insulto, além de características antioxidantes para reduzir o estresse oxidativo que emerge logo após o nascimento. É de grande importância ressaltar que um tratamento eficaz deveria ainda ser barato e facilmente administrado para que possa estar disponível nas regiões onde a incidência da asfixia é alta (LAROSA et al., 2017).

### **Sistema Nervoso Central e Asfixia Perinatal**

A AP tem capacidade de afetar qualquer órgão do recém-nascido, e o cérebro é o órgão que acaba apresentando a maior preocupação, uma vez que apresenta menor capacidade de pronta recuperação ou até mesmo uma recuperação completa (WEBER et al., 2021). O déficit de energia hipóxico associado com o sistema nervoso central apresenta uma dependência do metabolismo aeróbico representado pela redução do suprimento de oxigênio, resultando em uma cascata de acontecimentos que entre outras vias irá ativar a ubiquitinação, apoptose ou necrose, estresse oxidativo e processos inflamatórios (HERRERA-MARSCHITZ et al., 2014; NUÑEZ et al., 2018).

O desenvolvimento estrutural e funcional do Sistema Nervoso Central (SNC) inicia a partir da 3ª semana de vida fetal, e depende da neurogênese, migração neuronal e formação de circuitos. Todo esse processo acontece de forma dinâmica e complexa envolvendo uma variedade de vias moleculares (RAHIMI-BALAEI et al., 2018).

A vascularização do cérebro começa durante essa embriogênese e continua até o período de recém-nascido, envolvendo processos de vasculogênese seguida de angiogênese. A matriz germinativa é uma região altamente vascularizada, e é a camada responsável pela produção de neurônios e células

da glia, apresentando uma fragilidade inerente, sendo vulnerável a hemorragia. Uma hemorragia na matriz germinativa-intraventricular é considerada a lesão mais devastadora que pode ocorrer no feto em desenvolvimento, e ela apresenta uma maior incidência em bebês prematuros e de baixo peso ao nascer, além de poder ser ainda mais exacerbada após a hipóxia (BABURAMANI et al., 2012; BALLABH, 2010).

Essa camada transitória de tecido cerebral localizada adjacente aos ventrículos laterais e ricamente vascularizada está presente no cérebro fetal entre a 8<sup>a</sup>. e a 36<sup>a</sup>. semana de gestação, seu pico de volume está confirmado por estudos histopatológicos na 25<sup>a</sup>. semana. Sua característica é uma camada espessa com um intenso metabolismo energético de células subependimárias do sulco tálamo-estriado (RAETS; DUDINK; GOVAERT, 2015).

As lesões que podem ocorrer nessas camadas transitórias levam o cérebro a um anormal desenvolvimento e sequelas neurológicas. A fragilidade da microvascularização desta região pode ser explicada devido a imaturidade da parede vascular, flutuações do fluxo sanguíneo cerebral e mecanismos de autorregulação (PARODI et al., 2020).

Os neonatos prematuros, que também apresentem baixo peso ao nascer são o grupo com maior risco de hemorragia na matriz germinativa. Durante o período de 24 a 32 semanas, os vasos sanguíneos da matriz germinativa são frágeis e nesse ponto da gestação a demanda de oxigênio e nutrientes é alta. Uma hipotensão ou hipoxemia pode induzir alterações hipóxico-isquêmicas focais na zona final arterial dentro da matriz germinativa (BABURAMANI et al., 2012)

### **Vias de Sinalização Envolvidas na Diferenciação da Matriz Germinativa**

Em relação a diferenciação que ocorre na MG, após o fechamento da placa neural, as células neuroepiteliais (CNE) começam a se proliferar e povoar a zona ventricular, onde ocorre a transição de CNE para progenitores gliais radiais (PGR) (JOSSIN, 2004). Nesse processo, as vias de sinalização envolvidas são intermediadas por uma família de moléculas chamadas neurotrofinas.

As neurotrofinas representam uma importante família de fatores tróficos para a sobrevivência de populações seletivas de neurônios para os diferentes períodos de desenvolvimento. Dentre elas podem ser citadas fator de crescimento nervoso (FNG), fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), NT-3 e NT-4 (PARK; POO, 2013). As ações celulares executadas através das neurotrofinas acontecem devido a dois tipos de receptores, receptores de tirosina quinase (Trk) e um receptor de baixa afinidade p75<sup>NTR</sup>. A NT-3 (neurotrofina- 3), se liga ao receptor Trk-C, uma proteína transmembranar-tirosina-quinase, que é expressa preferencialmente no cérebro. Dentro das suas funções está a mediação de efeitos na sobrevivência e na diferenciação de uma grande variedade de

populações de neurônios (HUANG; REICHARDT, 2001; SAHAY; KALE; JOSHI, 2020). A expressão de Trk-C leva à ativação constitutiva de duas principais vias efetoras, a via mitogênica Ras-MAP (MAPK) e a via triquinase fosfatidilinositol 3-quinase PI3K/AKT mediadora da sobrevivência celular. A ativação por meio das neurotrofinas, leva a auto-fosforilação de receptores tirosina-quinases (Trk), os quais ativarão vias de plasticidade ou crescimento neuronal, como por exemplo, a da fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT), que, por conseguinte, poderão ativar o complexo do alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) (JIN et al., 2008; REICHARDT, 2006).

A enzima AKT compreende uma família de proteínas quinase serina/treonina responsáveis pela fosforilação de fatores de transcrição eucarióticos necessários para a expressão de genes relacionados com a sobrevivência celular. A família de proteínas quinases chamadas AKT, proteína quinase B (PKB) ou relacionadas à A e C quinase (RAC), é muito versátil e tem sido implicada em vários processos biológicos, incluindo diferenciação de adipócitos e músculos, síntese de glicogênio, captação de glicose, apoptose, proliferação celular, transcrição e migração. Existem 3 isoformas conhecidas dessa enzima em células de mamíferos (1/alfa, 2/beta e 3/gama) (MANNING; TOKER, 2017; SONG; OUYANG; BAO, 2005). Embora a sinalização dependente de AKT, especialmente quando conduzida pela ativação de AKT-1, seja conhecida por ser importante para a angiogênese, os papéis das isoformas individuais não são bem compreendidos. Em geral, é aceito que os membros da família AKT compartilhem um certo grau de redundância funcional. No entanto, há evidências crescentes de que essas três quinases possuem metas e funções específicas de isoformas (KO et al., 2019; SOMANATH et al., 2006).

Nesse contexto, dentre as suas isoformas, a AKT-3 é a mais expressa no tecido cerebral, especialmente no cérebro fetal, e, apesar do seu papel ainda não ter sido totalmente elucidado, estudos com camundongos *knockout* para *AKT3* demonstraram uma relação de maior expressão dessa enzima em relação ao volume encefálico e melhor desenvolvimento cognitivo dos animais testados (KO et al., 2019; MANNING; TOKER, 2017). Devido ao importante papel da via de sinalização da AKT para os diversos eventos biológicos, uma desregulação nessa via pode ser associada a diversas condições patológicas.

No SNC pode ser observado que durante a neuroinflamação a ativação da AKT precede a transcrição de genes inflamatórios dependentes de NF- $\kappa$ B em micróglias ativadas. Além disso, a sobrevivência neuronal parece ser dependente da via de sinalização PI3K/AKT através da regulação do NF- $\kappa$ B de duas formas: aumento da atividade da quinase inibitória IKK e por meio da fosforilação direta da NF- $\kappa$ B, o que aumenta sua atividade (SÁNCHEZ-ALEGRÍA et al., 2018).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição, que foi identificado pela primeira vez em 1986, e é reconhecido como um regulador da expressão de genes envolvidos com os mais diversos aspectos biológicos. Sua atividade é regulada por dois fatores proteicos: um membro da família I $\kappa$ B e o complexo I $\kappa$ B quinase (IKK). Já a sua ativação pode acontecer através de duas rotas distintas, a via canônica e a não canônica, o que irá definir serão os sinais estimulantes que induzem a atividade de NF- $\kappa$ B (MULERO; HUXFORD; GHOSH, 2019). O NF- $\kappa$ B representa um complexo de proteínas pertencente à uma família de fatores de transcrição diméricos, formado por cinco principais membros: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) e NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016).

Entre as funções biológicas já descritas, o NF- $\kappa$ B é conhecido por promover a expressão de genes envolvidos com a morte celular, tanto quanto de genes necessários para a sobrevivência e plasticidade das células, como por exemplo, o fator induzido por hipóxia -1 (HIF-1) (TIRPE et al., 2019). O HIF-1 é um fator proteico heterodímero composto por duas subunidades alfa (HIF- $\alpha$ ) e beta (HIF-1 $\beta$ ) e sua atividade fisiológica está relacionada ao desenvolvimento, sobrevivência e regulação do metabolismo celular (FROST et al., 2021). Durante períodos em que ocorrem alterações na oxigenação das células, cruciais para a adaptação a condições com pouca oxigenação, a ativação do fator HIF-1 promove a expressão de receptores e neurotrofinas necessárias para a neovascularização, como o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R) (JIN et al., 2020). Em estudos realizados com camundongos *knockouts* para o gene de *HIF-1 $\alpha$* , pode-se verificar que este tem ação funcional principalmente sobre células germinativas durante o desenvolvimento encefálico no período embrionário (WENGER, 2002).

O receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-R) é um fator de crescimento com importante atividade pró-angiogênica, e apresenta diversos membros em sua família. Durante o período embrionário a formação de novos vasos ocorre pela diferenciação de células endoteliais, em um processo conhecido como vasculogênese. Em tecidos que sofrem hipóxia ocorre a liberação de HIF-1 que irá ativar a transcrição de fatores angiogênicos como VEGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , entre outros. Quando ocorre a ligação de VEGF com o domínio extracelular de VEGFR-2 resulta em uma autofosforilação, conseqüentemente ativando certas vias de sinalização com a via PI3K/AKT (MELINCOVICI et al., 2018). Segundo Schmidt e colaboradores (2007) além do HIF-1 foram identificados dentro do promotor *VEGF* locais de transcrição para AP-1, Sp1, NF- $\kappa$ B e CREB (SCHMIDT et al., 2007).

A regulação das vias de sinalizações envolvidas com a ativação do NF- $\kappa$ B é de particular

importância, uma vez que apresenta íntima relação com a Parquina (uma proteína ubiquitina ligase E3) e fatores inflamatórios liberados em um insulto hipóxico-isquêmico, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (DA COSTA et al., 2019; WANG et al., 2018). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica, que pode induzir oscilações na atividade do NF- $\kappa$ B, uma vez que a família TNF induz uma rápida transcrição de genes que podem regular inflamação, sobrevivência celular, proliferação e diferenciação através da via do NF- $\kappa$ B (HAYDEN; GHOSH, 2014).

A Parquina é uma proteína codificada pelo gene *PARK2*, que tem função de E3 ligase, sendo importante no processo de ubiquitinação e degradação proteossômica. Sua função fora do seu papel envolvido na mitofagia está relacionada com a regulação transcricional induzindo uma neuroproteção via regulação negativa de fatores pró-apoptóticos e fatores de supressão tumoral como a p53 (QUINN et al., 2020). Um pouco mais além Costa e colaboradores (2019) apresentam que a Parquina pode atuar sobre p53, NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$  e ZNF746, relacionando a ela um impacto sobre uma variedade de funções celulares (DA COSTA et al., 2019).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a relação dos sinais clínicos de risco (embasados no índice de Apgar) de insulto hipóxico-isquêmico do SNC e a imunoexpressão tecidual dos biomarcadores (NF-kB, AKT-3, Parquina, Trk-C e VEGFR-1) na Matriz Germinativa de recém-nascidos prematuros e a termo, com ou sem sinais clínicos de hipóxia/asfixia neonatal.

### **Objetivos Específicos**

- a) Avaliar a imunoexpressão das proteínas TrK-C, AKT-3, NF-kB, Parquina e VEGFR-1 em amostras de Matriz Germinativa de recém-nascidos prematuros e a termo, com ou sem sinais clínicos de hipóxia/asfixia neonatal;
- b) Correlacionar dados clínico-patológicos da amostra estudada com os achados de imunoexpressão e imunohistoquímica, buscando associações com critérios diagnósticos e prognósticos;

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, registro número 2533.140/2011-06. A metodologia foi realizada de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes. Os representantes legais dos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os fragmentos de matriz germinativa do sistema nervoso central (SN) dos pacientes que foram a óbito nos primeiros 28 dias de vida (neomortos), são provenientes do banco de amostras teciduais parafinadas de necropsias do Hospital das Clínicas (HC) de Curitiba, entre os anos de 1991 e 2007.

O fluxograma abaixo demonstra como a amostragem foi delineada (Figura 2).

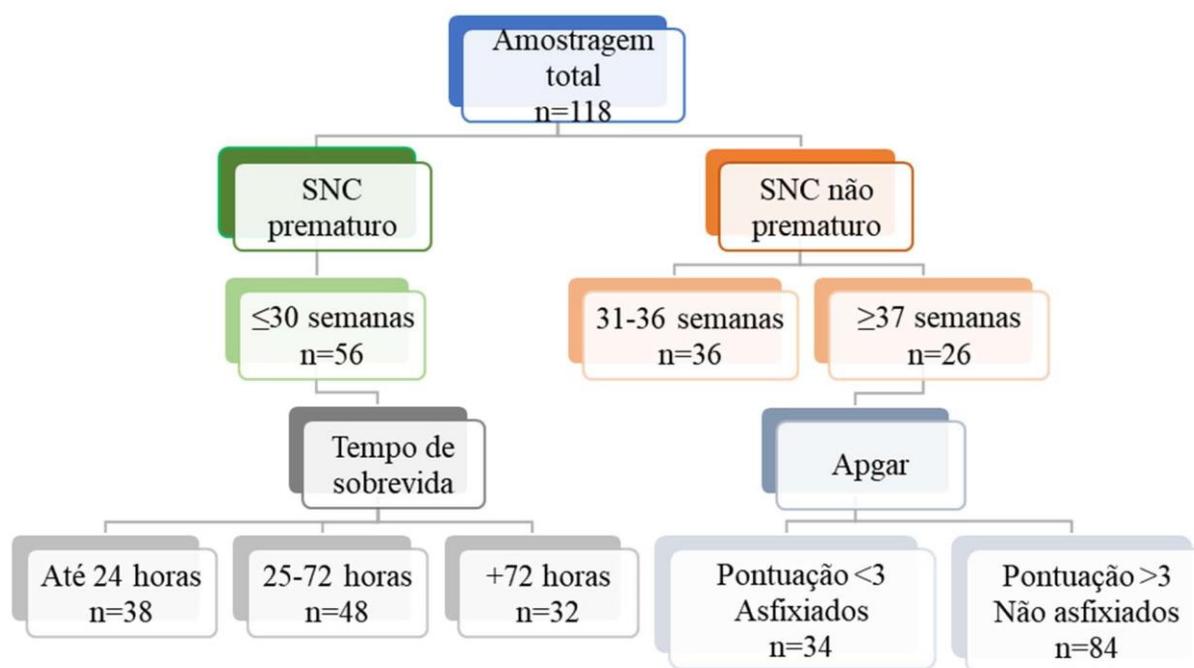


Figura 2. Fluxograma das amostras estudadas

A amostragem total contemplou 118 fragmentos de matriz germinativa do SNC de pacientes neomortos. Esta amostragem foi dividida em 2 grupos, relacionados à prematuridade do SNC (SNC prematuro e não prematuro). As amostras do SNC prematuro são aquelas em que a idade gestacional foi menor ou igual a 30 semanas, enquanto que as do não prematuro compreenderam idade gestacional de 31-36 semanas e maior ou igual a 37 semanas. Os exemplares de ambos os grupos foram avaliados em tempo de sobrevivência (até 24 horas, 25-72 horas e mais que 72 horas) em relação ao nascimento, a escala de Apgar, onde que, pacientes com pontuação menor que 3 foram

considerados asfisiados e pontuação maior que 3 foram considerados não asfisiados. Também foram considerados o peso ao nascer em gramas ( $\leq 1000g$ , entre 1000g e 1500g ou  $\geq 1500g$ ), a acidemia definida através do pH do sangue na primeira gasometria arterial no momento do nascimento ( $pH \leq 7.2$ ) e o baixo peso (<P10) ao nascer foi identificado através da correlação entre idade gestacional e peso ao nascer (pequeno para idade gestacional - PIG).

Os dados como gênero, necessidade de reanimação na sala de parto, presença de malformações associadas, e outras condições clínicas ou doenças associadas, bem como a presença ou não de fatores de risco para asfisia foram obtidos por meio de uma pesquisa direta nos laudos de necropsias do setor de Anatomia Patológica, do hospital acima citado.

### **Análises Histológica**

Os padrões anatomopatológicos encontrados nas amostras do presente estudo foram revisados em lâminas coradas em hematoxilina e eosina H&E (Harris Hematoxilina: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosina: BIOTEC Reagentes Analíticos, Cod. 4371, Paraná, BR).

### **Análise Imunohistoquímica**

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada com a finalidade de identificar a imunoexpressão de NF-kB, AKT-3, Parquina, Trk-C, VEGF-R1 (Tabela 1).

*Quadro 1. Dados dos anticorpos utilizados*

<b>Antibody</b>	<b>Type</b>	<b>Clone/Code</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>	<b>Species Reactivity</b>
Anti-NF-kB p100/52	Polyclonal/Rabbit	ab7972	1:400	Abcam	Human, Rat, Mouse
Anti-AKT-3	Monoclonal/Mouse	66C1247.1	1:400	Thermo Fisher	Human, Rat, Mouse
Anti-PARK 2	Monoclonal/Mouse	PRK8	1:100	Abcam	Human, Rat, Mouse
Anti-TRKc	Monoclonal/Mouse	75219	1:200	Leinco	Human
Anti-VEGFR	Polyclonal/Rabbit	PA1-21731	1:50	ThermoFisher	Human, Rat, Mouse

O ensaio de imunohistoquímica foi precedido pela confecção de blocos teciduais parafinados multiamostrais, TMA (do inglês *Tissue Microarray*). As áreas representativas da matriz germinativa foram previamente demarcadas e identificadas nas lâminas de H&E e após, fragmentos cilíndricos medindo aproximadamente 0,3cm de diâmetro das áreas de matriz germinativa foram extraídos dos blocos originais (blocos-doadores) e organizados em blocos de TMA (blocos receptores).

A técnica de imunohistoquímica preconiza um protocolo de incubação dos anticorpos primários em câmara úmida, com temperatura entre 2 e 8° C, *overnight*. O polímero secundário (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) foi aplicado no material testado por 20 minutos em temperatura ambiente. A revelação da técnica se deu com a adição do complexo 2, 3, diaminobenzidina + substrato peróxido de hidrogênio, por tempo de viragem da cor castanha e posteriormente realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Os resultados foram confirmados pela reatividade de um controle positivo, onde uma amostra tecidual com imunoexpressão sabidamente positiva para o anticorpo foi alocada juntamente com as amostras estudadas.

### **Análise dos biomarcadores NF-kB, AKT-3, Parquina, Trk-C, VEGFR-1**

As lâminas imunomarcadas com NF-kB, AKT-3, Parquina, Trk-C, VEGFR-1 foram escaneadas com o auxílio do scanner Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Alemanha). Os arquivos gerados pelo processo de digitalização foram utilizados para a aquisição de 20 imagens em campo de médio aumento (CMA = objetiva de 20X) pelo software ZEN Blue Edition (Zeiss, Jena, Alemanha). As análises foram realizadas de modo cego, sendo as imagens geradas, obtidas de regiões amostrais aleatórias, sem a interferência de um observador. A mensuração das áreas de imunoexpressão foi realizada com a assistência do software Image Pro-Plus versão 4.5 (Média Cybernetics, Rockville, MD). Os marcadores de neuroproliferação ou apoptose foram observados conforme sua localização preferencial na membrana, núcleo ou região perinuclear. O total de imagens adquiridas passou por um processo de seleção, onde houve a exclusão dos exemplares com imperfeições histológicas ou regiões não condizentes com a área a ser estudada.

De cada CMA, foi realizada a mensuração das áreas de imunoexpressão com o emprego de um método de segmentação semiautomatizada por cores, na qual as áreas imunopositivas dos biomarcadores em questão foram artificialmente delimitadas e quantificadas. Posteriormente, o valor, expresso em micrômetros quadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) foi dividido pelo valor da área total do CMA,

para posteriormente ser convertido em um valor percentual. Foram, então, calculados os valores de média aritmética dos vinte CMA de cada paciente e os resultados obtidos foram planilhados no Excel para posterior análise estatística.

### **Análises Estatísticas**

A comparação das variáveis qualitativas dos grupos definidos pela idade gestacional foi realizada por meio do teste do qui-quadrado. As variáveis quantitativas foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) unilateral e teste posthoc de Bonferroni ou método não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para comparações entre dois grupos em relação às variáveis quantitativas, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas que não atendiam a essa condição tiveram os dados submetidos a uma transformação logarítmica. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados no programa de computador Stata / SE v.14.1. StataCorpLP, EUA.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão do presente trabalho estão apresentados na forma de artigo científico que foi submetido a revista “*Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*”, Fator de Impacto 3,685.

**Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**  
**ROLE OF THE NF- $\kappa$ B/PARKIN/VEGFR-1 PATHWAY ASSOCIATED WITH HYPOXIC-ISCHEMIC INSULT IN GERMINATIVE MATRIX SAMPLES OF NEWBORN PATIENTS**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	ROLE OF THE NF- $\kappa$ B/PARKIN/VEGFR-1 PATHWAY ASSOCIATED WITH HYPOXIC-ISCHEMIC INSULT IN GERMINATIVE MATRIX SAMPLES OF NEWBORN PATIENTS
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Keywords:</b>	central nervous system (CNS) / Germinative Matrix (GM) / hypoxemia / premature / asphyxia
<b>Corresponding Author:</b>	Lucia NORONHA, Ph.D Pontifical Catholic University of Parana: Pontificia Universidade Catolica do Parana Curitiba, PR BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Pontifical Catholic University of Parana: Pontificia Universidade Catolica do Parana
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Eliane Amaral Ghirelli, MSc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Eliane Amaral Ghirelli, MSc Felipe Paes Gomes da Silva Alessandro Gonçalves Gomes Oricil Caroline Bussata Vaz de Paula, PhD Seigo Nagashima, MSc Carlos Frederico Oldenburg, PhD Eduardo Storti, MSc Fernando Yochiteru Rolim Sakiyama, MD Rafael Martins Kayano, MD Renata Rolim Sakiyama, MD Vinicius da Silva Moreira, MD Vanessa Santos Sotomaior, PhD LUCIA NORONHA, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Given the high proliferative activity of Germinative Matrix (GM) and its direct correlation with hypoxemia, it is necessary to investigate the possible molecular regulation pathways, to understand its existing clinical relationship between the hypoxic ischemic insult and the biomarkers NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C and VEGFR-1. For this, 118 samples of GM of the CNS of patients who died in the first 28 days of life were submitted to histological and immunohistochemistry analysis to identify the tissue immunoeexpression of those biomarkers related to asphyxia, prematurity, and death events within 24h. Significant tissue expression of NF- $\kappa$ B, AKT-3 and Parkin markers were observed in the GM of premature individuals. The VEGFR-1 and NF- $\kappa$ B markers showed low tissue expression related to asphyxia and death within 24 hours, respectively, suggesting that there was not enough time for the VEGFR-1 to be transcribed, translated, and expressed on the surface of the plasma membrane. This

temporality can be observed in the relationship of NF- $\kappa$ B expression with the lifespan of individuals who died within 24 hours, suggesting that this factor is essential to produce VEGFR-1 and, therefore, to carry out the remodeling effect necessary to neovascularize the affected region.

**ROLE OF THE NF- $\kappa$ B/PARKIN/VEGFR-1 PATHWAY ASSOCIATED WITH  
HYPOXIC-ISCHEMIC INSULT IN GERMINATIVE MATRIX SAMPLES OF  
NEWBORN PATIENTS**

Eliane Amaral Ghirelli<sup>1</sup>, Felipe Paes Gomes da Silva<sup>2</sup>, Alessandro Gonçalves Gomes Oricil<sup>2</sup>, Caroline Busatta Vaz de Paula<sup>1</sup>, Seigo Nagashima<sup>1</sup>, Carlos Frederico Oldenburg Neto<sup>1</sup>, Eduardo Storti<sup>1</sup>, Fernando Yochiteru Rolim Sakiyama<sup>3</sup>, Rafael Martins Kayano<sup>3</sup>, Renata Rolim Sakiyama<sup>3</sup>, Vinícius da Silva Moreira<sup>3</sup>, Vanessa Santos Sotomaior<sup>1</sup>, Lucia de Noronha<sup>4</sup>.

- 1- Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.
- 2- School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.
- 3- Pathology Department, Federal University of Paraná - Hospital de Clínicas, Rua General Carneiro, 181 – Centro, Curitiba, PR, Brazil
- 4- Laboratory of Experimental Pathology, Postgraduate Program of Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil.

**Leading Contact:**

Caroline Busatta Vaz de Paula, PhD  
carolbvaz@gmail.com  
School of Medicine  
Pontifical Catholic University of Paraná – PUCPR  
R. Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho, Curitiba, PR, Brazil

**Authors have no conflict of interest to declare**

**Author contributions**

Study design: L.N, E.A.G. Data collection: C.F.O.N., E. S. Data analysis: F.Y.R.S., E.A.G., R.M.K., R.R.S., V.S.M., F.P.G.S., A.G.G.O., C.B.V.P., S.N. Data interpretation: E.A.G, F.P.G.S., A.G.G.O., S.N., C.B.V.P., Manuscript writing: E.A.G., F.P.G.S., A.G.G.O., C.B.V.P., S.N., L.N.

**Funding:**

LN is a researcher from CNPq (304356/2018-2)

**ABSTRACT**

Given the high proliferative activity of Germinative Matrix (GM) and its direct correlation with hypoxemia, it is necessary to investigate the possible molecular regulation pathways, to understand its existing clinical relationship between the hypoxic ischemic insult and the biomarkers NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C and VEGFR-1. For this, 118 samples of GM of the CNS of patients who died in the first 28 days of life were submitted to histological and immunohistochemistry analysis to identify the tissue immunoexpression of those biomarkers related to asphyxia, prematurity, and death events within 24h. Significant tissue expression of NF- $\kappa$ B, AKT-3 and Parkin markers were observed in the GM of premature individuals. The VEGFR-1 and NF- $\kappa$ B markers showed low tissue expression related to asphyxia and death within 24 hours, respectively, suggesting that there was not enough time for the VEGFR-1 to be transcribed, translated, and expressed on the surface of the plasma membrane. This temporality can be observed in the relationship of NF- $\kappa$ B expression with the lifespan of individuals who died within 24 hours, suggesting that this factor is essential to produce VEGFR-1 and, therefore, to carry out the remodeling effect necessary to neovascularize the affected region.

Keywords: germinative matrix, NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C, VEGFR-1, newborns, nervous system, prematurity, hypoxic-ischemic lesion.

## INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), 2.6 million newborns die in the first 28 days of life every year – and 75% of these deaths could be avoided. In Brazil, since the 1990s, neonatal death has been the main component of infant mortality (1,2). Between 2015 and 2016, this rate decreased significantly, reaching approximately nine neonatal deaths for every 1,000 live births, compared to the 1990s, when this rate was 23 deaths for every 1,000 live births (2). The leading causes of neonatal death are congenital malformation, maternal factors, low birth weight, perinatal infections, prematurity, and respiratory injury, ranging from neonatal hypoxia to perinatal asphyxia (PA) (3-4).

Perinatal asphyxia is responsible for 23% of neonatal death (3) and can be easily diagnosed based on laboratory analysis and Apgar score. In the fifth minute of the newborn's life, the Apgar's score becomes an essential tool for neuronal assessment (1) – considering that the asphyxia during childbirth can produce long-term deficits in brain development (5).

The embryological development of the Central Nervous System (CNS) starts from the 3rd week of fetal life, which is a dynamic and complex process that involves stages of differentiation, proliferation, and neuronal migration - depending on the signaling pathway involved (6).

During this development, from the 12th week onwards, the germinal matrix (GM) formation begins - a thick layer with intense metabolism of subependymal cells of the thalamus-striatal sulcus. GM is richly vascularized, whose thin endothelial layer does not possess smooth muscles or collagen and predisposes a greater vulnerability to hemorrhagic affections until the 36th week when it regresses (7-9).

Regarding the differentiation that occurs in GM, after the closure of the neural plate, the neuroepithelial cells (NEC) begin to proliferate and populate the periventricular zone, where the transition from NEC to radial glial progenitors (PGR) can occur (10). In this process, the signaling pathways involved are mediated by a family of molecules called neurotrophins. Activation through these molecules leads to autophosphorylation of tyrosine kinases (TRK) receptors, which will activate pathways of neuronal growth, such as phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT), which, therefore, may activate the mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. The mTOR pathway, in turn, triggers numerous mitogenic signals and cellular energy and oxygen levels availability, therefore is significant in the regulation of cell growth and proliferation (11).

The AKT enzyme comprises a family of serine/threonine kinase proteins responsible for the phosphorylation of eukaryotic translation factors necessary for expressing genes related to cell survival (12). In this context, AKT-3 isoform is the most expressed in brain tissue, although its role has not been fully elucidated. Studies with AKT-3 knockout mice have shown that a higher expression of this enzyme correlates to brain volume and better cognitive development of the animals tested (13). In addition, this protein is also capable of positively regulate nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), promoting survival in response to apoptosis (12).

NF- $\kappa$ B represents a protein complex belonging to a family of dimeric transcription factors, formed by five prominent members: Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105), and NF-  $\kappa$ B2 (p52/p100). The regulation of the signaling pathways involved with the activation of NF- $\kappa$ B has a particular importance, given its close relationship with Parkin (a ubiquitin ligase E3 protein) and inflammatory factors released in a hypoxic-ischemic insult, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) (14). In addition, NF- $\kappa$ B can promote the expression of genes involved in cell death and essential genes that act in cell survival and plasticity - such as the hypoxia-induced factor-1 (HIF-1) (15,16).

HIF-1 is a heterodimer protein related to the development, survival, and regulation of cell metabolism. In studies performed with knockout mice for the HIF-1 $\alpha$  gene, it can be verified that this protein plays an essential role in hypoxic-ischemic insults, mainly on germinative cells during brain development. During events of unbalanced cell oxygenation rates, the activation of the HIF-1 factor promotes the expression of receptors and neurotrophins involved in neovascularization, such as the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) (16,17).

Considering GM's high proliferative activity and immature CNS's susceptibility for hypoxic-ischemic insults, a better investigation concerning the molecular pathways involved in the brain tissue response is required. Correlating some newborn's clinical aspects with the biomarkers mentioned above, perhaps we may understand the role of these proteins in the developing CNS responses during a hypoxic-ischemic insult. This study investigates the relationship between the clinical signs of risk of CNS hypoxic-ischemic insult and the tissue expression of NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C, and VEGFR-1 in GM of premature e term newborns with or without clinical signs of neonatal hypoxia/asphyxia.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Ethical Approvals***

The present study was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the UFPR Hospital, in Curitiba, under the registration number: 1099.138/2005. The methodology was carried out following relevant guidelines and regulations. The patient's legal representatives signed the Informed Consent Form (ICF).

### ***Samples and Clinical Data***

The formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) GM fragments of the CNS of 118 patients who died (between 1991 and 2007) in the first 28 days of life (newborn) came from the bank of necropsies of the Hospital de Clínicas (Curitiba, Brazil).

This sample was divided into two groups related to CNS immaturity (extremely immature CNS and non-immature CNS). Extremely immature CNS samples are those in which the gestational age was less than or equal to 30 weeks, while non-immature CNS samples comprised a gestational age over or equal to 31 weeks. The newborns were evaluated for survival time in hours (time elapsed between birth and death - patients who died up to 24 hours, 25-72 hours, and more than 72 hours) and the presence or absence of asphyxia (patients with the Apgar score in the fifth minute lower than or equal to 3 were considered asphyxiated and scores greater than three were considered not asphyxiated). The newborns also were divided into three groups related to gestational age in weeks (less or equal than 30 weeks, between 31- and 36-weeks e over or equal 37 weeks) and birth weight in grams (less or equal than 1000g, between 1000 and 1500g and over or equal than 1500g). Acidemia was defined by blood pH (first arterial gasometry to birth time) less or equal 7.2. Low birthweight newborns (<P<sub>10</sub>) were also identified by correlating gestational age and birth weight (small for gestational age or SGA).

Other data such as gender, need for resuscitation in the delivery room, presence of associated malformations, presence of metabolic or mixed acidosis after birth, the underlying cause of death and other clinical conditions or associated diseases, as well as the presence or absence of risk factors for asphyxia, were also obtained through a direct search in the autopsy reports.

### ***Immunohistochemical analysis***

The histopathological findings were reviewed on slides stained with Hematoxylin and Eosin H&E (Harris Hematoxylin: NewProv, Cod. PA203, Paraná, BR; Eosin: BIOTEC Analytical Reagents, Cod. 4371, Paraná, BR).

As shown in Supplemental Table, the immunohistochemistry technique was applied to identify the tissue immunoexpression of NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C, VEGFR-1.

The immunohistochemistry assay was preceded by making multi-sample paraffin tissue blocks, TMA (Tissue Microarray). The representative areas of the GM were previously demarcated and identified on the H&E slides, then cylindrical fragments measuring approximately 0.3cm in diameter from the GM areas were extracted from the original blocks (donor blocks) and compiled into new TMA blocks.

The immunohistochemistry technique recommended an overnight incubation protocol for primary antibodies in a humid chamber at a temperature between 2 and 8°C. The secondary polymer (Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) was applied to the material tested for 20 minutes at room temperature. The technique was revealed by adding the 2, 3, diamino-benzidine complex + hydrogen peroxide substrate, turning brown time, and later counterstaining with Harris Hematoxylin. The results were confirmed by the reactivity of positive control (tissue sample with known positive immunoexpression for the antibody was allocated together with the samples studied).

#### ***Analysis of NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C, VEGFR-1 biomarkers***

Immunostained slides with NF- $\kappa$ B, AKT-3, Parkin, TRK-C, VEGFR-1 were scanned by Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss, Jena, Germany). The files generated from the digitization process were used to acquire 20 images in a medium-magnification field (MMF = 20X objective) using the ZEN Blue Edition software (Zeiss, Jena, Germany). Analysis was performed blindly, so the generated images were obtained from random regions without the interference of the observer. The analysis of tissue immunoexpression areas was performed with the assistance of Image Pro-Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, Rockville, MD).

For each MMF, the tissue immunoexpression areas were obtained using a semi-automated color segmentation method, in which the immunopositive areas of the biomarkers were artificially delimited and quantified. Subsequently, the square micrometers ( $\mu\text{m}^2$ ) immunopositive values were converted into percentual values. Then, the mean values of the twenty MMF of each patient were calculated, and the results obtained were submitted to statistical analysis.

#### ***Statistical analysis***

The comparison of qualitative variables of the groups defined by gestational age was performed using the chi-square test. Quantitative variables were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's posthoc test or the non-parametric Kruskal-Wallis method. For comparisons between two groups regarding quantitative variables, Student's t-test was used for independent samples or the non-parametric Mann-Whitney test. The condition of normality of the variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Quantitative variables that did not meet this condition had the data submitted to a logarithmic transformation. Values of  $p < 0.05$  indicated statistical significance. Data were analyzed using the computer program Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

## RESULTS

The clinical characteristics of patients such as gender, birth weight (grams), presence of small gestation age ( $<P_{10}$ ), gestational age (weeks), presence of extremely CNS immaturity (gestational age  $\leq 30$ ), presence of acidemia ( $pH \leq 7.2$ ), or asphyxia ( $Apgar \leq 3$ ) and survival time (hours) are listed in Table 1. The biomarkers studied and their correlation with clinical data are listed in Table 2.

The AKT-3 tissue immunoeexpression results showed higher values in newborns with extremely CNS immaturity ( $p = 0.032$ ; Table 2; Figure 1-A). Regarding to NF- $\kappa$ B tissue immunoeexpression, the higher results were observed for newborns with extremely CNS immaturity ( $p = 0.045$ ; Table 2; Figure 1-B) and who survived more than 72 hours ( $p = 0.037$ ; Table 2; Figure 1-C). Regarding Parkin, there was a significantly increased of tissue immunoeexpression values in newborns with less than 1000g ( $p < 0.001$ ; Table 2; Figure 1-D), less than 30 weeks ( $p < 0.001$ ; Table 2), with low birthweight for gestational age ( $p = 0.014$ ; Table 2) and with extremely immaturity of CNS ( $p < 0.001$ ; Table 2; Figure 1-A). The VEGFR-1 tissue immunoeexpression showed higher values in newborns without asphyxia ( $p = 0.025$ ; Table 2; Figure 1-E).

## DISCUSSION

The mature human brain contains billions of neuronal and glial cells, in contrast to the embryonic brain, which begins with a few hundred cells designated as neural progenitors (NP) in the neural plate zone (11). It is possible to find the germinal matrix (GM) in the NP region, which will evolve through three main phases: proliferation, migration, and differentiation (10).

***Proliferation and development of germinal matrix***

During the GM proliferation phase, which lasts until the 36th week of pregnancy, there is an intense activation of tyrosine kinases receptors (TRK), which permeate the direct activation of the cascade regulated by the AKT-3 enzyme (11), necessary for the positive signaling of eukaryotic initiating factors eIF4-E and eIF4-B – which are necessary to produce proteins responsible for the formation of the cytoskeleton of mature neural cells.

The intense proliferative activity of GM associated with de higher tissue expression of AKT-3 can be observed in post-mortem tissue samples from the extremally immature CNS group ( $p = 0.034$ ), suggesting the need for high kinase levels to support the intense proliferative activity of the GM in developing brains.

Parkin is another crucial molecule present in these developing brains and showed higher tissue expression in newborns with extremal immaturity of CNS ( $p < 0.001$ ). This ubiquitin ligase E3 was also higher ( $p < 0.001$ ) in newborns with lower gestational age ( $\leq 30$  weeks), lower birth weight ( $< 1000$ g), and small for gestational age – SGA ( $< P_{10}$ ), given its role in the degradation of defective proteins produced during the most intense neural development in GM. Thus, during this phase, Parkin would be protecting this immature brain against possible injuries (14).

***Survival and remodeling phases of the germinal matrix leading to the neovascularization event***

In addition to its proliferative activity, GM has an essential role concerning cell survival and defense against metabolic and/or infectious insults, once it is already populated by glial cells, differentiated into a defense lineage, such as microglia. These cells can release pro-inflammatory molecules during insults to activate neuronal remodeling pathways necessary for survival (18-20).

The presence of microglia was confirmed in the present study, with the immunostaining of anti-CD 163, suggesting that GM has these specialized cells for defense, which can release pro-inflammatory agents such as TNF- $\alpha$ , acting as neuromodulators of the surrounding cells. Therefore, this study compared tissue expression of Parkin, NF- $\kappa$ B, and VEGFR-1 in newborns with different birth weights, gestational ages, and degrees of CNS injury, to identify the remodeling pathway activated during the hypoxic-ischemic insult.

The neovascularization event can occur during the brain's normal development or stressful events, such as O<sub>2</sub> deprivation in the hypoxic-ischemic insult (17). When this

deprivation occurs, CNS cells induce factors such as VEGF and its receptor VEGFR-1, responsible for angiogenesis, to allow the affected region to receive oxygen again (16). So, during this event, the expression of VEGFR-1 should be increased in injured newborns. Therefore, we observed lower tissue expression of VEGFR-1 in asphyxiated individuals ( $p = 0.025$ ).

Low levels of VEGFR-1 may be due to the cell time-producing or immaturity of the neuron cells. It is suggested that may have not enough time for the receptor to be transcribed, translated, and, therefore, expressed on the surface of the cell membrane. Therefore, even if produced by the AKT-3/mTOR pathways, the neurotrophin VEGF would not have a receptor for binding too. As an attempt to explain the cell time-producing of VEGFR-1 or immaturity of neuron cells, it was analyzed the tissue expression of its precursor molecule, which is the nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B).

When analyzing the expression of the NF- $\kappa$ B factor according to the time elapsed between birth and death and immaturity of CNS, there was a reduction in its tissue expression ( $p = 0.037$ ) in those newborns who died within 24 hours and those who had extremely immaturity of CNS ( $p = 0.045$ ). The lower tissue expression of NF- $\kappa$ B in these groups of newborns could trigger a lower transcription of the HIF-1 $\alpha$ , which is a precursor of VEGFR-1. Thus, the GM seems unable to perform the necessary remodeling effect to neovascularize the affected region, leading to a worsening of the hypoxic-ischemic insult.

#### ***Study limitation***

The most important limitation of our study that merit consideration is that data based on FFPE post-mortem samples only provide static information at the time of death, and they cannot reconstruct the evolving disease process.

#### **CONCLUSION:**

This study hypothesized the pathway illustrated in Figure 2. This view of the molecular signaling mechanism, demonstrated in the process of the hypoxic-ischemic insult of the germinal matrix, supports the development of future work in the therapeutic field regarding the reduction of neural damage caused by respiratory disease in neonates by inducing neural remodeling and, therefore, the neovascularization of GM.

## REFERENCES

1. Vargas NSO. Marcadores prognósticos de evolução neonatal de recém-nascidos de termo portadores de asfixia perinatal [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2012 Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5141/tde-29082012-135124/>. Accessed: February 24, 2021.
2. Veloso FCS, Kassar L de ML, Oliveira MJC, et al. Analysis of neonatal mortality risk factors in Brazil: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Jornal de Pediatria* [Internet]. 2019 Sep 1; 519–30. Available from: [www.jped.com.br](http://www.jped.com.br). Accessed: February 24, 2021.
3. Lansky S, Friche AA de L, Silva AAM da, et al. Pesquisa Nascir no Brasil: perfil da mortalidade neonatal e avaliação da assistência à gestante e ao recém-nascido. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2014 Aug ;30(suppl 1):S192–207. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-311X2014001300024&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2014001300024&lng=pt&tlng=pt). Accessed: February 25, 2021.
4. Pedrosa LDC de O, Sarinho SW, Ordonha M de AR. Óbitos neonatais: por que e como informar? *Rev Bras Saúde Matern Infant* [Internet]. 2005 Dec; 5(4):411–8. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-38292005000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292005000400004&lng=en&nrm=iso&tlng=pt). Accessed: February 25, 2021.
5. Morales P, Bustamante D, Espina-Marchant P, et al. Pathophysiology of perinatal asphyxia: Can we predict and improve individual outcomes? [Internet]. Vol. 2, *EPMA Journal*. Springer; 2011 . P. 211–30. Available from: [pmc/articles/PMC3405380/](http://pmc/articles/PMC3405380/). Accessed: February 25, 2021.
6. Higginbotham H, Yokota Y, Anton ES. Strategies for analyzing neuronal progenitor development and neuronal migration in the developing cerebral cortex [Internet]. Vol. 21, *Cerebral Cortex*. *Cereb Cortex*; 2011. p. 1465–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21078821/>. Accessed: February 26, 2021.
7. Ballabh P, de Vries LS. White matter injury in infants with intraventricular hemorrhage: mechanisms and therapies [Internet]. *Nature Reviews Neurology*. *Nature Research*; 2021. p. 1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-020-00447-8>. Accessed: February 26, 2021.
8. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. *Pediatr Res* [Internet]. 2004 Jul; 56(1):117–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15128918/>. Accessed: February 26, 2021.
9. Raets MMA, Dudink J, Govaert P. Neonatal disorders of germinal matrix. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2015 Nov 20; 28:2286–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23968365/>. Accessed: February 26, 2021.
10. Jossin Y. Neuronal migration and the role of Reelin during early development of the cerebral cortex [Internet]. Vol. 30, *Molecular Neurobiology*. Humana Press; 2004. p. 225–51. Available from:

<https://link.springer.com/article/10.1385/MN:30:3:225>. Accessed: February 28, 2021.

11. Kandel, E.R. *Princípios de Neurociências* Porto Alegre Ed. MC HILL 5a. Edição 2014.
12. Matsuo Flávia Sayuri, Faria Paulo Rogério. Estudo da via de sinalização pi3k-akt e gsk3 $\beta$  em carcinomas epidermóides metastáticos e não metastáticos de cavidade bucal. Available from: <https://repositorio.ufrb.br/handle/123456789/12413>. Accessed: February 28, 2021.
13. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* [Internet]. 2004 ; 9(6):667–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15505410/>. Accessed: February 30, 2021.
14. Wang Y, Shan B, Liang Y, et al. Parkin regulates NF- $\kappa$ B by mediating site-specific ubiquitination of RIPK1. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018 Jul 1;9(7):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0770-z>. Accessed: March 13, 2021.
15. Franco DG. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. *Rev da Biol* [Internet]. 2010 Jun; 4:35–9. Available from: [www.ib.usp.br/revista](http://www.ib.usp.br/revista). Accessed: February 28, 2021.
16. Van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by NF- $\kappa$ B. *Biochem J*. 2008;412(3):477–84.
17. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub> - sensing protein hydroxylases, hypoxia- inducible transcription factors, and O<sub>2</sub> - regulated gene expression. *FASEB J*. 2002;16(10):1151–62.
18. Kaur C, Hao AJ, Wu CH, et al. Origin of microglia. *Microsc Res Tech*. 2001;54(1):2–9.
19. SANTOS NK dos. SANTOS, Nathalia Kersting dos. Avaliação da inflamação por mensuração de IL-1 $\beta$  em modelo animal de hemorragia da matriz germinativa/intraventricular perinatal. 2013. [Internet]. Vol. 10, Acta Botanica Brasílica. 1996. Available from: <http://hdl.handle.net/10183/194491>. Accessed: February 28, 2021.
20. Supramaniam V, Vontell R, Srinivasan L, et al. Microglia activation in the extremely preterm human brain. *Pediatr Res*. 2013;73(3):301–9.
21. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines [Internet]. Vol. 26, *Seminars in Immunology*. Academic Press; 2014. p. 253–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958609/>. Accessed: March 31, 2021.
22. Mulero MC, Huxford T, Ghosh G. NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, and IKK: Integral components of immune system signaling. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2019. p. 207–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31628658/>. Accessed: March 31, 2021.

23. Minet E, Ernest I, Michel G, et al. HIF1A gene transcription is dependent on a core promoter sequence encompassing activating and inhibiting sequences located upstream from the transcription initiation site and cis elements located within the 5'UTR. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Aug 2; 261(2):534–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10425220/>. Accessed: March 30, 2021.
24. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factors in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Feb 15; 97(4):1749–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10677529/>. Accessed: March 30, 2021.
25. Chen EY, Mazure NM, Cooper JA, et al. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res*. 2001;61(6):2429–33.

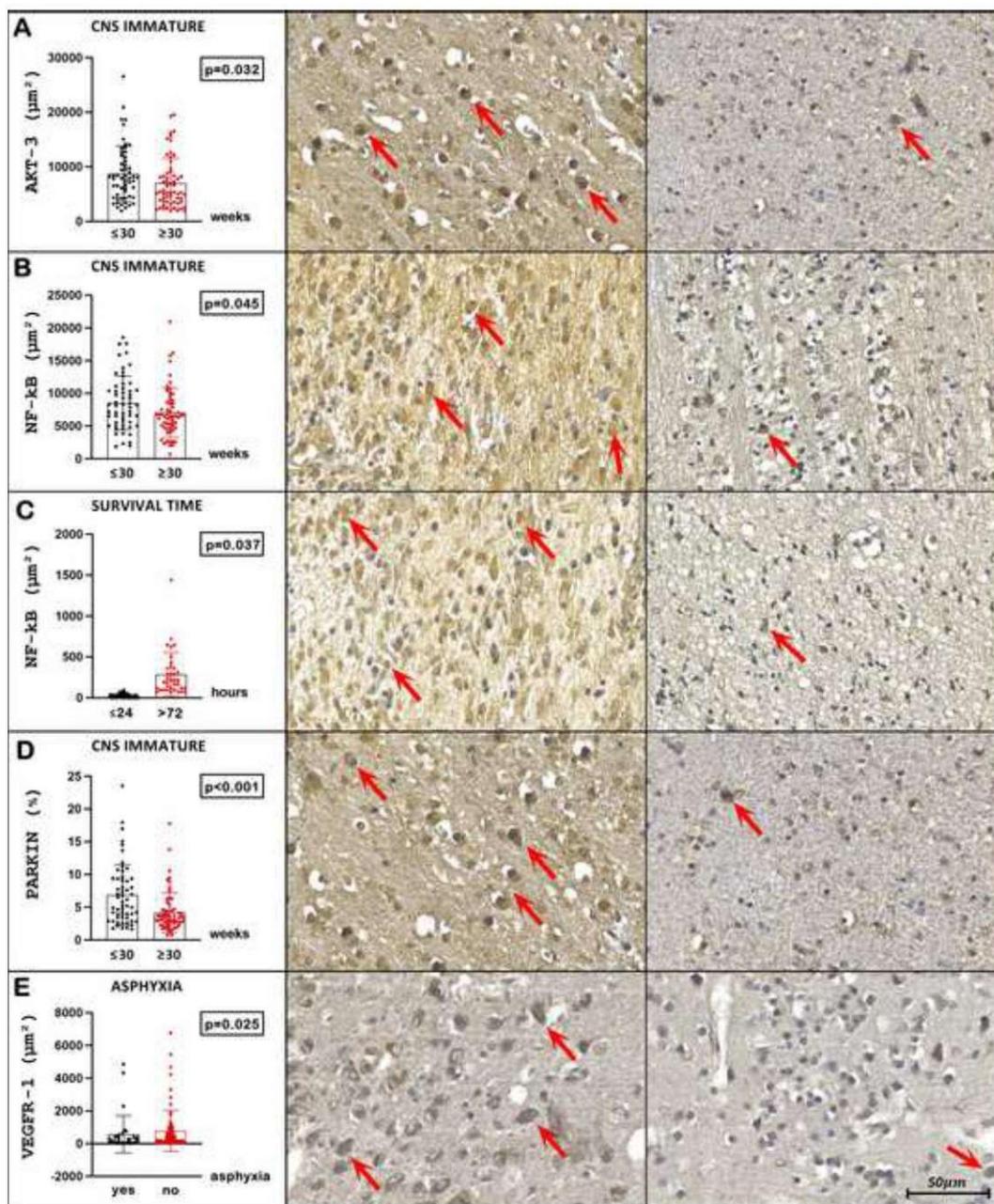
## LEGENDS OF FIGURES

**Figure 1.** Graphics show tissue expression of Parkin, AKT-3, VEGFR-1, and NF- $\kappa$ B in columns plot mean $\pm$ SD. Photomicrography is showing germinative matrix expressing the respective biomarker – higher expression on the left column and lower expression on the right column (200X magnification)

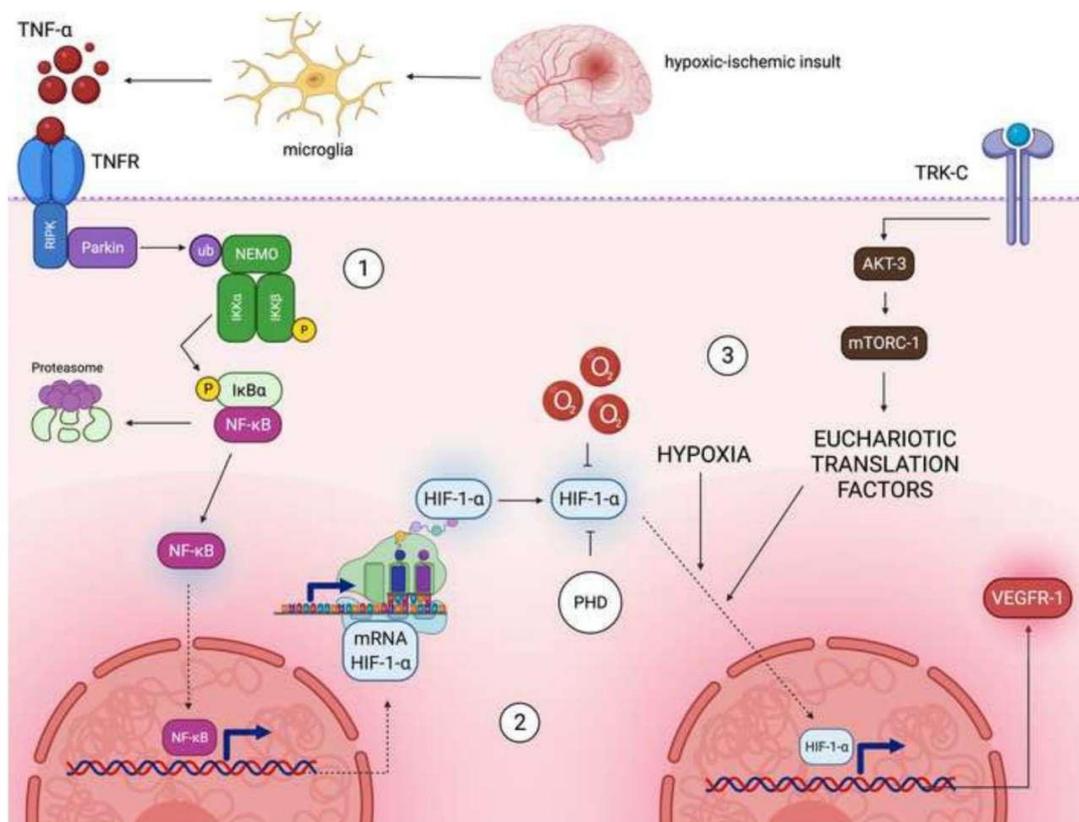
**Figure 2:** 1) Recruitment of Parkin by inflammatory agents in the activation process of Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B): In the course of the hypoxic-ischemic insult, inflammatory factors are released by glial cells, such as TNF- $\alpha$ , activating a pathway of neural remodeling 18,20. In the presence of high levels of TNF- $\alpha$ , it binds to its receptor, TNFR, which recruits the protein kinase interaction receptor (RIPK), which serves as a binding site for Parkin to act. This molecule promotes the activation of nuclear factor-kappa (NF- $\kappa$ B) by promoting the ubiquitination of the gamma (NEMO) subunit of the I $\kappa$ B enzyme complex (IKK) 14. Thus, Parkin promotes NEMO labeling and indirectly phosphorylation of the Beta subunit (IKK $\beta$ ) of the IKK complex by an upstream kinase, activating it 21,22. With this activation, IKK $\beta$  manages to phosphorylate the inhibitory protein linked to NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , which is polyubiquitinated and degraded by proteosomes, thus allowing NF- $\kappa$ B, originating from the canonical pathway, to enter the nucleus of neuronal cells in its active form. 2) Role of NF- $\kappa$ B in HIF-1- $\alpha$  mRNA transcription: The NF- $\kappa$ B activated binds to the initiation site of the Hypoxia Inducible Factor (HIF-1- $\alpha$ ) precursor DNA molecule, which induces the transcription of the mRNA HIF-1- $\alpha$  23. This binding allows translation of the HIF factor promoter gene to occur, giving rise to the HIF-1- $\alpha$  molecule. This molecule, inside the cell cytoplasm and in the presence of oxygen, is induced to degradation by PHD (prolyl hydroxylase) enzymes and, under hypoxic conditions, allows the HIF molecule to be activated and enter the cell nucleus 16. 3) Role of cell growth pathways in HIF activation and production of neural protective factors in MG such as VEGFR-1: Once the HIF molecule is produced, it needs to be stabilized and activated in order to be able to promote the production of neural protective factors such as VEGFR-1. The HIF-1- $\alpha$  molecule in the cell cytoplasm is in an inactive form and stabilized by normoxic conditions. For its activation to occur, several factors are related, among them, eukaryotic translation factors/growth factors, which have been shown to contribute to HIF-1- $\alpha$  activation by phosphorylating the molecule and allowing it to enter the nucleus 24,25. In this process, neurotrophins are released and bind to the Tyrosine Kinase C (TRK-C) receptor, which is responsible for activating the AKT-3/mTORC-1 pathway and producing eukaryotic translation factors. Inside the nucleus, HIF can produce molecules associated with cellular vascularization – VEGFR-1 - and, therefore, revitalize the tissue by guaranteeing the supply of O<sub>2</sub>.

Figure

[Click here to access/download;Figure;figure 1 Geminative Matrix ± Newborn.tif](#)



Figure

[Click here to access/download;Figure;figure 2 Geminative Matrix Newborn.tif](#)


Table

**Table 1:** Demographic characteristics and clinical findings.

Data	Category	(Number of patients) %	Mean $\pm$ Standard deviation
Gender	Male	(66) 55,9%	--
	Female	(52) 44,1%	
Birth weight (g)	$\leq 1000$	(34) 28,8%	171 $\pm$ 975
	>1000 <1500	(29) 24,6%	
	$\geq 1500$	(55) 46,6%	
Gestational age (weeks)	$\leq 30$	(56) 47,5%	--
	31 a 36	(36) 30,5%	
	$\geq 37$	(26) 22,0%	
Small for gestational age (SGA)	No	(101) 85,6%	--
	Yes	(17) 14,4%	
Acidemia	No	(39) 33,1%	--
	Yes	(79) 66,9%	
Asphyxia (Apgar score in the fifth minute $\leq 3$ )	No	(84) 28,8%	5.6 $\pm$ 2,8
	Yes	(34) 71,2%	
Survival time (hours)	Until 24h	(38) 32,2%	4.4 $\pm$ 8
	25 to 72h	(48) 40,7%	
	More than 72	(32) 27,1%	

Table

**Table 2:** Tissue expression of *AKT3*, *NF- $\kappa$ B*, *Parkin*, *TRK-C* and *VEGFR-1* correlated with gender, birth weight, gestational age, presence of low birthweight for gestational age (SGA), presence of immaturity of CNS, acidemia or asphyxia and survival time.

	Gender	p value	Birth weight (g)	p value	Gestational age (weeks)	p value	SGA	p value	Immature CNS	p value	Acidemia	p value	Asphyxia (Appar $\leq 3$ )	p value	Survival time (hours)	p value
AKT-3	Male 8727±5578	0.094*	≤ 1000 7483±3067	0.089*	≤ 30 8713±5119	0.089*	No 7956±4978	0.451*	No 7001±4550	0.032*	No 8612±6162	0.662*	No 7538±4864	0.300*	Until 24h 7202±4515	0.666*
	Female 6641±3503		>1000 <1500 9778±6714		31 to 36 7302±4811		Yes 6967±4280		Yes 8713±5119		Yes 7446±4122		Yes 8526±4948		25 to 72h 8116±5228	
			≥1500 7033 ±4504		≥ 37 6609±4245		≥ 37 6609±4245		Yes 8713±5119		Yes 7446±4122		Yes 8526±4948		More than 72h 8157±4889	
NF-kβ	Male 7401±3974	0.342*	≤ 1000 8536±4356	0.054*	≤ 30 8521±4112	0.092*	No 8000±4154	0.194*	No 7023±3787	0.045*	No 7707±4588	0.735*	No 7970±4126	0.402*	Until 24h 6374±3200	0.037***
	Female 8195±4034		>1000 <1500 8329±3313		31 to 36 7381±3858		Yes 6103±2243		Yes 8521±4112		Yes 7775±3725		Yes 7235±3698		25 to 72h 8064±3958	
			≥1500 6920±4025		≥ 37 6572±3720		Yes 6103±2243		Yes 8521±4112		Yes 7775±3725		Yes 7235±3698		More than 72h 8899 ± 4529	
Parkin (%)	Male 5.7±4.4	0.726*	≤ 1000 7.5±4.2	<0.001**	≤ 30 6.9±4.6	<0.001**	No 5.1±4.0	0.014*	No 4.2±3.0	<0.001*	No 6.3±4.3	0.355*	No 5.2±3.8	0.179*	Until 24h 5.5±4.2	0.988*
	Female 5.1±3.6		>1000 <1500 6.0±4.5		31 to 36 4.9±3.5		Yes 7.3±4.1		Yes 6.9±4.6		Yes 5.1±3.9		Yes 6.1±4.6		25 to 72h 5.1±3.4	
			≥1500 3.9±3.1		≥ 37 3.10±1.9		Yes 7.3±4.1		Yes 6.9±4.6		Yes 5.1±3.9		Yes 6.1±4.6		More than 72h 5.9±4.9	
TRK-C (%)	Male 8.7±5.6	0.179	≤ 1000 10.9±6.8	0.073*	≤ 30 10.4±6.8	0.137*	No 9.1±6.0	0.266*	No 8.5±5.1	0.098*	No 10.5±7.2	0.197*	No 9.6±6.0	0.481*	Until 24h 8.7±5.7	0.545*
	Yes 10.2±6.5		>1000 <1500 10.0±6.6		31 to 36 9.2±5.2		Yes 10.9±5.7		Yes 10.4±6.8		Yes 8.8±5.3		Yes 8.7±6.1		25 to 72h 10.1±6.3	
			≥1500 8.0±4.9		≥ 37 7.4±4.7		Yes 10.9±5.7		Yes 10.4±6.8		Yes 8.8±5.3		Yes 8.7±6.1		More than 72h 9.0±5.9	
VEGFR-1	Male 629±1021	0.221*	≤ 1000 881±1427	0.668*	≤ 30 908±1397	0.528*	No 648±1014	0.637*	No 551±1010	0.286*	No 899±1625	0.928*	No 778±1247	0.025*	Until 24h 697±1343	0.180*
	Yes 823±1412		>1000 <1500 894±1312		31 to 36 575±1252		Yes 1125±2026		Yes 908±1397		Yes 632±963		Yes 574±1137		25 to 72h 941±1418	
			≥1500 526±996		≥ 37 521±576		Yes 1125±2026		Yes 908±1397		Yes 632±963		Yes 574±1137		More than 72h 387±293	

Legend: \* p obtained by Student's t-test;

\*\*p obtained by Bonferroni's test.

a p obtained by comparison between 24 hours x 72 hours of survival time = 0.013;

b p obtained by comparison between <1000g and ≥1500g of birth weight < 0.001 and between 1000g to < 1500g x ≥ 1500g = 0.007;

c p obtained by comparison between <30 x ≥ 37 weeks of gestational age <0,001 and between 31 to 36 x ≥ 37 weeks = 0,027.

Table

*Supplemental Table. Data of antibodies.*

Antibody	Type	Clone/Code	Dilution	Source	Species Reactivity
Anti-AKT-3 <sup>a</sup>	Monoclonal/Mouse	66C1247.1	1:400	Thermo Fisher	Human, Rat, Mouse
Anti-NF- $\kappa$ B p100/52 <sup>b</sup>	Polyclonal/Rabbit	ab7972	1:400	Abcam	Human, Rat, Mouse
Anti-PARK 2 <sup>c</sup>	Monoclonal/Mouse	PRK8	1:100	Abcam	Human, Rat, Mouse
Anti-TRK-C <sup>d</sup>	Monoclonal/Mouse	75219	1:200	Leinco	Human
Anti-VEGFR-1 <sup>e</sup>	Polyclonal/Rabbit	PA1-21731	1:50	ThermoFisher	Human, Rat, Mouse

<sup>a</sup> <https://www.thermofisher.com/antibody/product/AKT3-Antibody-clone-66C1247-1-Monoclonal/MA1-41201>

<sup>b</sup> <https://www.citeab.com/antibodies/769393-ab7972-anti-nfkb-p100-p52-antibody-chip-grade>

<sup>c</sup> <https://www.abcam.com/parkin-antibody-prk8-ab77924.html>

<sup>d</sup> <https://www.leinco.com/p/anti-human-trkc/>

<sup>e</sup> <https://www.thermofisher.com/antibody/product/VEGF-Receptor-1-Antibody-Polyclonal/PA1-21731>

## CONCLUSÃO

Através da avaliação dos sinais clínicos foi possível observar que mais de uma via estava relacionada com o processo hipóxico-isquêmico. A correlação dos biomarcadores analisados, ressaltaram uma relação da expressão do VEGFR-1, o NF- $\kappa$ B, AKT-3 e a Parquina, sugerindo a falta da indução de um processo de neovascularização na matriz germinativa dos recém-natos avaliados. Essa relação apenas foi vista a partir da via construída sinalizando a relação entre esses diferentes marcadores e seus sinais moleculares. A utilização desse modelo permitiu uma análise *post-mortem* de informações estáticas do momento da morte, apresentando como limitação a incapacidade de reconstrução do processo de evolução da lesão estudada.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo apresenta uma via de possível correlação entre diferentes biomarcadores que podem estar atuando concomitantemente ou de forma individual durante o processo de lesão induzido pelo insulto hipóxico-isquêmico. Estes achados permitem que novos caminhos sejam elucidados na busca por marcadores periféricos e que dessa forma possam oportunizar a utilização dos mesmos para um possível diagnóstico visando a intervenção no prognóstico e tratamento precoce da doença.

## REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, M. et al. Neuroprotective strategies following perinatal hypoxia-ischemia: Taking aim at NOS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 142, n. November 2018, p. 123–131, 2019.
- ALMEIDA, M. F. B. DE et al. Óbitos neonatais precoces associados à asfixia perinatal em neonatos  $\geq 2.500$  g no Brasil. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 576–584, 2017.
- AZZOPARDI, D. et al. Moderate hypothermia within 6 h of birth plus inhaled xenon versus moderate hypothermia alone after birth asphyxia (TOBY-Xe): A proof-of-concept, open-label, randomised controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 2, p. 145–153, 2016.
- BABURAMANI, A. A. et al. Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: Contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? **Frontiers in Physiology**, v. 3 NOV, n. November, p. 1–21, 2012.
- BALLABH, P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: Mechanism of disease. **Pediatric Research**, v. 67, n. 1, p. 1–8, 2010.
- BALLABH, P.; DE VRIES, L. S. **White matter injury in infants with intraventricular haemorrhage: mechanisms and therapies** *Nature Reviews Neurology* Nature Research, 27 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41582-020-00447-8>>. Acesso em: 26 fev. 2021
- DA COSTA, C. A. et al. The transcription factor function of Parkin: Breaking the dogma. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, p. 1–8, 2019.
- FROST, J. et al. **Roles of hif and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases in controlling gene expression in hypoxia**. [s.l: s.n.]. v. 13
- GRAHAM, E. M. et al. Encephalopathy- State of the Art. v. 30, n. 2, p. 199–203, 2019.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. **Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines** *Seminars in Immunology* Academic Press,, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958609/>>. Acesso em: 30 mar. 2021
- HERRERA-MARSCHITZ, M. et al. Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. MAR, p. 1–11, 2014.
- HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.
- INDER, T. E.; VOLPE, J. J. Mechanisms of perinatal brain injury. **Seminars in Neonatology**, v. 5, n. 1, p. 3–16, 2000.
- JIN, M. L. et al. Effect of the recombinant adenovirus-mediated HIF-1 alpha on the expression of VEGF in the hypoxic brain microvascular endothelial cells of rats. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 16, p. 397–406, 2020.
- JIN, W. et al. c-Src is required for tropomyosin receptor kinase C (TrkC)-induced activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 3, p. 1391–1400, 2008.

JOSSIN, Y. **Neuronal migration and the role of Reelin during early development of the cerebral cortex** *Molecular Neurobiology* Humana Press, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1385/MN:30:3:225>>. Acesso em: 28 fev. 2021

KO, H. R. et al. SIAH1 ubiquitin ligase mediates ubiquitination and degradation of Akt3 in neural development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 42, p. 15435–15445, 2019.

LANSKY, S. et al. Pesquisa Nascido no Brasil: perfil da mortalidade neonatal e avaliação da assistência à gestante e ao recém-nascido. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. suppl 1, p. S192–S207, ago. 2014.

LAROSA, D. A. et al. Understanding the Full Spectrum of organ injury following intrapartum asphyxia. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, n. February, p. 1–11, 2017.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3027–3035, 2016.

LOCATELLI, A. et al. Is perinatal asphyxia predictable? **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 20, n. 1, p. 1–8, 2020.

LOCCI, E. et al. Exploring perinatal asphyxia by metabolomics. **Metabolites**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2020.

MACDONALD, H. M. et al. Neonatal asphyxia. I. Relationship of obstetric and neonatal complications to neonatal mortality in 38,405 consecutive deliveries. **The Journal of Pediatrics**, v. 96, n. 5, p. 898–902, 1980.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

MELINCOVICI, C. S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 59, n. 2, p. 455–467, 2018.

MIRALHA, AL. L. et al. Prevenção da prematuridade – uma intervenção da gestão e da assistência. **Sociedade Brasileira de Pediatria**, p. 1–6, 2017.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system Simon. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.**, v. 8, n. 3, p. 227–241, 2016.

MORALES, P. et al. Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 12, p. 2650–2662, 2008.

MOSHIRO, R.; MDOE, P.; PERLMAN, J. M. A Global View of Neonatal Asphyxia and Resuscitation. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, n. November, p. 1–6, 2019.

MULERO, M. C.; HUXFORD, T.; GHOSH, G. NF-κB, IκB, and IKK: Integral components of immune system signaling. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2019. v. 1172p. 207–226.

NUÑEZ, A. et al. Oxidative stress in perinatal asphyxia and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Anales de Pediatria**, v. 88, n. 4, p. 228.e1-228.e9, 2018.

- ODD, D. et al. Hypoxic-ischemic brain injury: Planned delivery before intrapartum events. **Journal of Neonatal-Perinatal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 347–353, 2017.
- PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 7–23, 2013.
- PARODI, A. et al. Cranial ultrasound findings in preterm germinal matrix haemorrhage, sequelae and outcome. **Pediatric Research**, v. 87, p. 13–24, 2020.
- PEDROSA, L. D. C. DE O.; SARINHO, S. W.; ORDONHA, M. DE A. R. Óbitos neonatais: por que e como informar? **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, n. 4, p. 411–418, dez. 2005.
- QUINN, P. M. J. et al. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. **Acta neuropathologica communications**, v. 8, n. 1, p. 189, 2020.
- RAETS, M. M. A.; DUDINK, J.; GOVAERT, P. Neonatal disorders of germinal matrix. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 28, p. 2286–2290, 2015.
- RAHIMI-BALAEI, M. et al. Neuronal migration during development of the cerebellum. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. December, p. 1–16, 2018.
- REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545–1564, 2006.
- SAHAY, A.; KALE, A.; JOSHI, S. Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain development. **Neuropeptides**, v. 83, n. June, p. 102075, 2020.
- SÁNCHEZ-ALEGRÍA, K. et al. PI3K signaling in neurons: A central node for the control of multiple functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.
- SCHMIDT, D. et al. Critical role for NF- $\kappa$ B-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. **EMBO Journal**, v. 26, n. 3, p. 710–719, 2007.
- SOMANATH, P. R. et al. Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. **Cell Cycle**, v. 5, n. 5, p. 512–518, 2006.
- SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 9, n. 1, p. 59–71, 2005.
- SUGIURA-OGASAWARA, M. et al. Adverse pregnancy and perinatal outcome in patients with recurrent pregnancy loss: Multiple imputation analyses with propensity score adjustment applied to a large-scale birth cohort of the Japan Environment and Children's Study. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 81, n. 1, p. 1–14, 2019.
- TIRPE, A. A. et al. Hypoxia: Overview on hypoxia-mediated mechanisms with a focus on the role of hif genes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 1–20, 2019.
- UN INTER-AGENCY GROUP FOR CHILD MORTALITY. **Levels & Trends in childhood mortality**. [s.l.: s.n.].
- VELOSO, F. C. S. et al. Analysis of neonatal mortality risk factors in Brazil: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Jornal de Pediatria**, v. 95, n. 5, p. 519–530, 1 set. 2019.

WANG, Y. et al. Parkin regulates NF- $\kappa$ B by mediating site-specific ubiquitination of RIPK1. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 1 jul. 2018.

WEBER, A. M. et al. Quantitative susceptibility mapping of venous vessels in neonates with perinatal asphyxia. **American Journal of Neuroradiology**, v. 42, n. 7, p. 1327–1333, 2021.

WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 10, p. 1151–1162, 2002.