

(11) Número de Publicação: **PT 1670489 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 33/00 (2007.10) **A61P 11/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2004.10.11**

(30) Prioridade(s): **2003.10.10 GB 0323861**
2004.08.19 GB 0418539

(43) Data de publicação do pedido: **2006.06.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.12.12**
042/2008

(73) Titular(es):

PROTEXEON LIMITED
ALDWYCH HOUSE, 81 ALDWICH LONDON
WC2B 4HN GB

(72) Inventor(es):

MERVYN MAZE US
NICHOLAS PETER FRANKS GB

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE XÉNON COM HIPOTERMIA PARA O TRATAMENTO DE ASFIXIA NEONATAL**

(57) Resumo:

RESUMO

**"UTILIZAÇÃO DE XÉNON COM HIPOTERMIA PARA O TRATAMENTO DE ASFIXIA
NEONATAL"**

A presente invenção refere-se à utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal num indivíduo recém-nascido, em que o referido medicamento é para utilização em combinação com hipotermia.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE XÉNON COM HIPOTERMIA PARA O TRATAMENTO DE ASFIXIA NEONATAL"

A presente invenção refere-se ao tratamento de asfixia neonatal.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A asfixia neonatal (ou perinatal), também conhecida por hipóxia-isquemia (HI) é uma patologia que surge da absorção inadequada de oxigénio por uma criança durante o trabalho de parto, nascimento ou período pós-natal imediato. A asfixia neonatal constitui a causa principal de morbidade neurológica crónica e mortalidade aguda em recém-nascidos (Balduini *et al.*, 2000; Vannucci *et al.*, 1997) e conduz, normalmente, a encefalopatia hipóxica-isquémica.

Estudos demonstraram que a asfixia neonatal (hipoxia) durante um curto período de tempo, tal como seis minutos, pode conduzir a danos neurológicos permanentes. Tem sido demonstrada a perda de tecido cerebral em primatas recém-nascidos asfixiados e correlacionada com a disfunção da memória e paralisia aspástica (Windle, WF, 1969).

Cerca de 14,6% de todas as mortes no nascimento são provocadas por asfixia neonatal. No mundo ocidental, cerca de 0,9% (i. e. 100-130000) dos recém-nascidos sofrem de asfixia neonatal. Cerca de 15-20% morrem e dos sobreviventes, 25% ficam gravemente incapacitados devido a complicações a longo termo, tais como atraso mental, paralisia cerebral, espasticidade, dificuldades de aprendizagem e/ou epilepsia (Law *et al.*, 1993; Perlman *et al.*, 1999). Além disso, é cada vez mais reconhecido que as crianças com asfixia moderada que parecem inicialmente recuperar sem complicações, apresentam problemas comportamentais na infância que podem estar relacionados com esta lesão neonatal. A asfixia neonatal preenche aos critérios de uma indicação de fármaco órfão uma vez que afecta menos de 5 doentes em 10000 habitantes e é uma doença debilitante grave com risco de vida sem uma terapia estabelecida.

Foi demonstrado em modelos animais neonatais de HI que os mecanismos de morte celular envolvidos neste tipo de lesão cerebral, envolvem uma combinação de lesão excitotóxica (ou necrose) provocada por activação excessiva de receptores do glutamato, de um modo particular, receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), uma vez que são muito sensíveis à neuxotoxicidade durante períodos de sinaptogénesis (Jevtovic-Todorovic e Olney, 2003) e por neurodegeneração apoptótica (Ikonomidou *et al.*, 1989; Pohl *et al.*, 1999). O tipo de lesão está relacionado com a gravidade da agressão hipóxica (Jevtovic-Todorovic e Olney, 2003) e, também, com a variação na vulnerabilidade das diferentes regiões cerebrais (Northington *et al.*, 2001). Actualmente não existe terapia eficaz para combater a morte neuronal aguda provocada por HI, embora estejam sob investigação experimental várias intervenções farmacológicas e não farmacológicas (Vannucci e Perlman, 1997).

A presente invenção procura proporcionar um tratamento para a asfixia neonatal.

DECLARAÇÃO DA INVENÇÃO

Um primeiro aspecto da invenção refere-se à utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal, em que o referido medicamento é para utilização em combinação com hipotermia.

Um segundo aspecto da invenção refere-se ao tratamento da asfixia neonatal num mamífero com essa necessidade por,

- (a) administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de xénon a um mamífero; e
- (b) submeter o mamífero a hipotermia.

Um terceiro aspecto da invenção refere-se ao tratamento de asfixia neonatal num mamífero com essa necessidade, por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de xénon, ao mamífero, em combinação com hipotermia.

Um quarto aspecto da invenção refere-se à utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal, em que o referido tratamento compreende administrar, a um indivíduo, simultaneamente, sequencialmente ou separadamente, xénon em combinação com hipotermia.

Um quinto aspecto da invenção refere-se à utilização de xénon, em combinação com hipotermia, para o tratamento de asfixia neonatal.

DESCRICAÇÃO DETALHADA

Fisiologia Normal do SNC Imaturo

Os aminoácidos de excitação (EAAs) glutamato e aspartato são os mediadores principais da transmissão sináptica de excitação no sistema nervoso central maduro (CNS) (Dingledine e McBain, 1999). Apresentam, também, uma função principal na ontogenia do SNC imaturo, onde estão envolvidos em vários processos fisiológicos, tais como sinaptogénese, sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e estrutura dendrítica e axónica. No entanto, a activação excessiva destes receptores de aminoácidos durante o desenvolvimento pode produzir lesão e morte neuronal. Isto é denominado “excitotoxicidade”.

O glutamato é o mais abundante dos EAA (Dingledine e McBain, 1999). É armazenado em vesículas sinápticas e provoca a despolarização membranar dependente de cálcio das membranas pós-sinápticas quando é libertado dos terminais pré-sinápticos. O glutamato exerce o seu efeito de excitação sobre vários subtipos de receptores que podem ser divididos nos tipos N-metil-D-aspartato (NMDA) e não NMDA, mas no SNC em desenvolvimento verificou-se que é o subtipo de receptor NMDA que desempenha a função principal na lesão cerebral associada com HI (Ikonomidou *et al.*, 1989; Komuro, 1993; MacDonald *et al.*, 1986).

O receptor NMDA é uma classe principal de receptor glutamato e acredita-se que seja o neurotransmissor de excitação mais importante no sistema nervoso central de mamíferos. De um modo importante, verifica-se que a activação do receptor NMDA é o principal acontecimento que conduz a excitotoxicidade e morte neuronal em muitos estados de doença, bem como é um resultado de hipoxia e isquemia seguida por trauma craniano, apoplexia e após paragem cardíaca.

O receptor NMDA é um receptor ionotrópico encontrado espalhado por todo o SNC, localizado na superfície de membranas pós-sinápticas e extra-sinápticas (Riccio e Ginty, 2002; Sattler *et al.*, 2000). Está ligado a um canal catiónico que é permeável a iões Na^+ e Ca^{2+} e, sob condições fisiológicas normais é bloqueado por Mg^{2+} num potencial de membrana em repouso negativo. Torna-se desbloqueado na despolarização da membrana celular, permitindo, assim, um influxo de Ca^{2+} através do canal e permitindo ao receptor exercer os seus efeitos intracelulares (Hardingham e Bading, 2003).

Os receptores NMDA são vitais para o funcionamento cerebral normal e a sua importância na fisiologia normal é demonstrada pela sua função principal na memória e aprendizagem (Bliss e Collingridge, 1993). Inversamente, a activação patológica dos receptores NMDA por um excesso de glutamato é a causa principal de morte celular neuronal após uma agressão isquémica ao cérebro, devido à interrupção da regulação de Ca^{2+} intracelular. Isto realça a função principal desempenhada pelos receptores NMDA em HI.

Agressão Hipóxica-Isquémica no Neonatal

De modo a que o cérebro funcione, este necessita de um fornecimento contínuo de oxigénio e glucose e está, assim dependente de um fornecimento adequado de sangue (Choi e Rothman, 1990). Caso o fornecimento de sangue seja interrompido, como no caso de asfixia neonatal, irá ocorrer, num espaço de minutos, uma lesão hipóxica-isquémica na área a jusante. Sob estas condições de falta de oxigénio, o metabolismo celular altera de aeróbico para anaeróbico (Vannucci e Perlman, 1997), que é menos eficaz na satisfação das necessidades energéticas da célula. Isto conduz a uma redução das reservas de energia, particularmente afectando as reservas de fosfato de energia elevada, tal como ATP nos compartimentos neuronais e nas células gliais (Dingledine e McBain, 1999). Existe acumulação concomitante de iões H^+ , conduzindo a acidose e libertação de radicais livres que contribuem para outros danos nas células.

Sob condições fisiológicas, a concentração extracelular do glutamato é mantida a níveis baixos pela acção dos transportadores de glutamato localizados em células neuronais, mas expressos preferencialmente em células gliais (Dingledine e McBain, 1999). Existem vários tipos diferentes de transportador de absorção de glutamato, mas essencialmente, funcionam todos do mesmo modo, transportando dois catiões Na^+ e um anião glutamato para o interior da célula, enquanto transportam um catião K^+ e um anião OH^- para fora da célula e para o espaço extracelular (Dingledine e McBain, 1999). Estas bombas iónicas actuam contra um gradiente electroquímico e, deste modo, dependem de energia, na forma de ATP, de modo a funcionarem correctamente. Deste modo, a capacidade destas bombas em manter o potencial membranar de repouso é diminuído pela redução na concentração de ATP que

resulta de HI. Consequentemente, a falha na bomba dependente de ATP conduz à despolarização da membrana e uma inversão na direcção da bombagem (Eilers e Bickler, 1996; Kauppinen *et al.*, 1988). Assim, o glutamato é transportado para fora da célula e acumula-se uma concentração de glutamato em excesso no espaço extracelular. Não só aumenta a concentração de glutamato devido a uma absorção diminuída, como também existe uma libertação aumentada de glutamato dos terminais pré-sinápticos à medida que a despolarização membranar estabelece um potencial de acção (Dingledine e McBain, 1999). Exemplos destes processos que conduzem a glutamato extracelular em excesso foram estabelecidos *in vitro* (Bosley *et al.*, 1983; Hauptman *et al.*, 1984; Pellegrino-Giampietro *et al.*, 1990) e *in vivo* (Erecinska *et al.*, 1984; Graham *et al.*, 1990; Ikeda *et al.*, 1989).

A excitotoxicidade ocorre quando o glutamato extracelular em excesso activa continuamente os receptores pós-sinápticos (de um modo particular, os receptores NMDA) e o influxo de cálcio resultante estabelece um gradiente osmótico através do qual a água se move provocando o intumescimento das células. Os sistemas enzimáticos dependentes de cálcio são, também, activados no interior da célula e estes dois processos resultam em morte celular neuronal aguda (Choi e Rothman, 1990).

Mecanismos de Morte Celular

Pensou-se sempre que a morte celular neuronal surge de um de dois mecanismos: necrose e apoptose, como colocado em hipótese por Wyllie *et al.* (Wyllie *et al.*, 1980). No entanto, recentemente, estas categorias foram questionadas à medida que surgiram mais evidências que sugeriram que a morte celular

deveria ser dividida nas categorias: morte celular excitotóxica e apoptose (Olney, 2003). A morte celular excitotóxica tem sido descrita como um processo necrótico (Gwag *et al.*, 1997; Katja e Green, 2001), um processo apoptótico e uma continuação dos dois (Leist e Nicotera, 1998; Nakajima *et al.*, 2000). A apoptose e necrose são, normalmente, distinguidas pela sua distinta aparência morfológica diferente. A apoptose necessita de ATP e síntese de novas proteínas e é identificada por redução celular, condensação da cromatina com marginação e formação de corpos apoptóticos encerrados por membrana, onde a necrose é reconhecida por redução nuclear com alterações por fícnose e cariorrexis nucleares (Hill *et al.*, 1995).

Verificou-se que a morte celular resultante de HI envolve um período inicial de necrose, seguido por uma onda retardada de morte celular apoptótica (Northington *et al.*, 2001). O tipo de lesão que sucede, parece ser dependente do tempo e dependente da localização, estando a lesão necrótica inicial confinada ao cérebro anterior ipsilateral, num modelo de HI em rato neonatal, e a lesão apoptótica retardada ocorrendo no tálamo (Northington *et al.*, 2001). Isto sugere que as diferentes regiões cerebrais podem expressar vulnerabilidade diferencial a cada tipo de morte celular a diferentes tempos, após HI.

No desenvolvimento normal, a apoptose é um acontecimento normal, através da qual os neurónios indesejados ou danificados “cometem suicídio” (Ikonomidou *et al.*, 2001). Na HI, a morte celular excitotóxica inicial é mediada por activação excessiva de receptores NMDA, resultando na libertação descontrolada de glutamato que, por sua vez, danifica os neurónios circundantes. A resposta natural aos danos durante a sinaptogénese é os neurónios iniciarem a morte celular programada (Olney, 2003), e

pensa-se que seja um mecanismos que é activado para proteger o tecido vizinho (Leist e Nicotera, 1998).

Xénon como um Neuroprotector

Conhece-se na técnica que o receptor NMDA desempenha uma função importante na plasticidade sináptica que está subjacente a muitas funções cognitivas superiores, tais como memória e aprendizagem, bem como em determinadas vias nociceptivas e na percepção de dor (Collingridge *et al.*, The NMDA Receptor, Oxford University Press, 1994). Além disso, determinadas propriedades dos receptores NMDA sugerem que estes possam estar envolvidos no processamento de informação no cérebro que está subjacente à própria consciência.

Os antagonistas do receptor NMDA são terapeuticamente valiosos por vários motivos. Primeiro, os antagonistas do receptor NMDA conferem analgesia profunda, um componente altamente desejável de anestesia geral e sedação. Segundo, os antagonistas do receptor NMDA são neuroprotectores sob muitas circunstâncias clinicamente relevantes (incluindo isquemia, trauma cerebral, estados de dor neuropáticos e certos tipos de convulsões). Terceiro, os antagonistas do receptor NMDA conferem um grau valioso de amnésia.

Dada a importância dos receptores NMDA na patogénese de HI, é normal que os antagonistas de NMDA tenham sido investigados como agentes neuroprotectores possíveis. Muitos antagonistas de NMDA, tais como MK-801 e cetamina, têm demonstrado ser neuroprotectores, em modelos *in vitro* e *in vivo* (Albers *et al.*, 1989; Arias *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 1988; Kudo *et al.*, 2001).

No entanto, apesar destes resultados encorajadores, os antagonistas do receptor NMDA têm, também, demonstrado apresentar efeitos secundários psicotomiméticos em humanos (Krystal *et al.*, 1994) e provocam danos no córtex retrosplenial (RS) e córtex posterior cingulate (PC) (Olney *et al.*, 1991). Além disso, muitos antagonistas convencionais do receptor NMDA conduzem à produção de movimentos involuntários, estimulação do sistema nervoso simpático, indução de neurotoxicidade a doses elevadas (que é pertinente uma vez que os antagonistas do receptor NMDA apresentam baixos potenciais como anestésicos gerais), depressão do miocárdio e proconvulsões em alguns paradigmas epileptogénicos, e. g., "kindling" (Wlaz P *et al.*, Eur. J. Neurosci. 1994; 6: 1710-1719). Surgiram também dificuldades consideráveis no desenvolvimento de novos antagonistas do receptor NMDA que sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica.

O xénon é um gás apolar inerte que é um potente antagonista de NMDA (Franks *et al.*, 1998). Tal como outros antagonistas de NMDA, também demonstrou ser neuroprotector contra muitas formas de lesão neuronal *in vitro* (Petzelt *et al.*, 2003) e *in vivo* (Homi *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2002). No entanto, ao contrário dos outros antagonistas do receptor de NMDA, o xénon não é neurotóxico (Ma *et al.*, 2002). Outra vantagem da utilização de xénon como um antagonista de NMDA é que a molécula é um gás inerte, volátil que pode ser rapidamente eliminado via respiração.

O xénon apresenta muitas outras propriedades favoráveis. Desde a sua primeira utilização em cirurgia (Cullen SC *et al.*, Science 1951; 113: 580-582), vários grupos de pesquisa demonstraram que apresenta um excelente perfil farmacológico, incluindo a ausência de produtos secundários do metabolismo, analgesia profunda, início e recuperação rápida e efeitos mínimos no sistema cardiovascular (Lachmann B *et al.*, Lancet 1990; 335: 1413-1415; Kennedy RR *et al.*, Anaesth. Intens. Care 1992; 20: 66-70; Luttropp HH *et al.*, Acta Anaesthesiol. Scand. 1994; 38: 121-125; Goto T *et al.*, Anesthesiology 1997; 86: 1273-1278; Marx T *et al.*, Br. J. Anaesth. 1997; 78: 326-327). Além disso, como o xénon é um átomo pequeno sem carga, pode atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, produzindo assim um início rápido de acção (Nakata *et al.*, 2001). Apresenta também um coeficiente de partição sangue:gás muito baixo, conduzindo a uma emergência rápida de anestesia por xénon (Goto *et al.*, 1997). Bem como estas vantagens, o xénon não é explosivo, não é tóxico e não é reactivo (Shichino *et al.*, 2002) e isto torna o xénon um candidato ideal para utilização como um neuroprotector no neonatal.

Como aqui utilizado, o termo “neuroprotector” significa um agente que é capaz de proporcionar neuroprotecção, *i. e.*, proteger uma entidade neural, tal como um neurónio, da lesão em curso, resultante de, por exemplo, uma lesão isquémica ou lesão traumática.

Hipotermia como um Neuroprotector

Talbot demonstrou inicialmente as propriedades neuroprotectoras da hipotermia para utilização cirúrgica em 1941 (Talbot, 1941). Actualmente a única utilização de rotina da hipotermia é durante o *bypass* cardiopulmonar de modo a proteger o cérebro de isquemia intra-operatória. No entanto, surgiram várias publicações demonstrando o efeito terapêutico da hipotermia noutros modelos de lesão cerebral. Por exemplo, existem várias publicações demonstrando o efeito benéfico da hipotermia tanto em modelos *in vitro* (Onitsuka *et al.*, 1998) como *in vivo* de asfixia neonatal (Debillon *et al.*, 2003; Treschera *et al.*, 1997). Foi demonstrado que existe uma correlação directa entre lesão tecidual e a extensão do arrefecimento do cérebro (Towfighi *et al.*, 1994), e em condições normóxicas, cada diminuição de 1 °C na temperatura corporal conduz a uma diminuição de 5% na taxa metabólica cerebral (Yager e Asselin, 1996).

O mecanismo pelo qual a hipotermia exerce o seu efeito neuroprotector foi já elucidado, mas têm sido postuladas muitas teorias. Estudos sugeriram que os mecanismos pelos quais a hipotermia é protectora são dependentes do tempo e temperatura, e podem actuar em mais de um ponto ao longo da cascata de acontecimentos que conduzem à lesão por HI (Yager e Asselin, 1996). Isto é suportado pelo facto de que uma temperatura moderada de 31 °C tem demonstrado ser neuroprotectora ao diminuir o metabolismo energético cerebral, enquanto uma hipotermia moderada de 34 °C, embora sendo também neuroprotectora, não tem efeito no metabolismo energético e deverá, deste modo, actuar via um mecanismo diferente (Yager e Asselin, 1996). Outro estudo por Taylor *et al.* (Taylor *et al.*,

2002) demonstrou que a hipotermia instituída após a agressão HI foi mais eficaz que a hipotermia intra-isquémica e sugeriu que isto pode ser devido a uma diminuição dos efeitos prejudiciais que ocorrem durante o período de recuperação. Um exemplo de tal mecanismo pode ser que a hipotermia diminui o dano excitotóxico que surge como consequência durante a reperfusão (Taylor *et al.*, 2002). Foram sugeridos muitos outros mecanismos de protecção por hipotermia, incluindo a redução de espécies reactivas do oxigénio (Taylor *et al.*, 2002), uma redução na acidose tecidual (Chopp *et al.*, 1989) e a atenuação da apoptose neuronal pós-HI (Xu *et al.*, 2002).

Xénon e Hipotermia em Combinação

Como mencionado acima, um primeiro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal num indivíduo neonatal, em que o referido medicamento é para utilização em combinação com hipotermia

Como aqui utilizado, o termo "hipotermia" refere-se a submeter um indivíduo em particular (neste caso, um indivíduo neonatal) a condições hipotérmicas, por exemplo, por diminuição da temperatura corporal, de um modo preferido, em 3-5 °C, através de técnicas activas ou passivas. Tipicamente, submetendo a condições hipotérmicas conduz a uma diminuição no metabolismo dos tecidos corporais do indivíduo, diminuindo, deste modo a necessidade de oxigénio.

Como mencionado acima, a utilização de hipotermia no tratamento de asfixia neonatal tem sido bem documentado na

técnica (ver, por exemplo, Volpe, 2001; Gunn *et al.*, 2000). No entanto, até à data não surgiu explicação ou sugestão na técnica de que a hipotermia poderá ser utilizada em combinação com a administração de xénon. Nem existe nenhuma sugestão que tal terapia de combinação conduzirá a tal surpreendente e inesperada potenciação no efeito neuroprotector resultante.

Estudos anteriores realizados pelo requerente revelaram que o xénon apresenta propriedades neuroprotectoras. Em particular, o documento WO 01/08692, cujos conteúdos da qual estão aqui incorporados por referência, refere-se à utilização de xénon como um neuroprotector e/ou como um inibidor da plasticidade sináptica. No entanto, não existe explicação ou sugestão na técnica anterior de que o xénon seria eficaz como neuroprotector no contexto da invenção presentemente reivindicada.

Numa forma de realização preferida da invenção, o xénon é misturado com um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

Exemplos de tais excipientes adequados para as várias formas diferentes de composições farmacêuticas aqui descritas podem ser encontrados no "Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2^a Edição, (1994), Editado por A Wade e PJ Weller.

Os veículos ou diluentes aceitáveis para a utilização terapêutica são bem conhecidos na técnica farmacêutica e são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edição de 1985). Exemplos de veículos adequados incluem lactose, amido, glucose, metilcelulose, estearato de magnésio, manitol, sorbitol e

semelhantes. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água.

A escolha do veículo, excipiente ou diluente farmacêutico pode ser seleccionado tendo em consideração a via de administração pretendida e prática farmacêutica convencional. As composições farmacêuticas podem compreender como, ou além do, o veículo, excipiente ou diluente, qualquer(quaisquer) ligando(s), lubrificante(s), agente(s) de suspensão, agente(s) de revestimento, agente(s) de solubilização adequado(s).

Exemplos de ligandos adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais, tais como glucose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose e polietilenoglicol.

Exemplos de lubrificantes adequados incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e semelhantes.

Na composição farmacêutica podem ser proporcionados conservantes, estabilizantes e corantes. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico. Podem também ser utilizados antioxidantes e agentes de suspensão.

A presente invenção é, também, aplicável ao tratamento de animais. Em relação a isto, a invenção refere-se também à utilização de xénon em combinação com um diluente, excipiente ou veículo veterinariamente aceitável.

Para utilização veterinária, o xénon é tipicamente administrado de acordo com a prática veterinária normal e o cirurgião veterinário irá determinar o regime de dosagem e via de administração que será a mais apropriada para um animal em particular.

O xénon pode também ser administrado em combinação com outro agente farmaceuticamente activo. O agente pode ser qualquer agente activo farmaceuticamente adequado, incluindo agentes anestésicos ou sedantes que promovem a actividade GABAérgica. Exemplos de tais agentes GABAérgicos incluem isoflurano, propofol e benzodiazapinas.

Numa forma de realização preferida, o xénon é administrado em combinação com um agente anestésico volátil, de um modo preferido, isoflurano, sevoflurano ou desflurano.

O xénon pode também ser administrado em combinação com outros ingredientes activos, tais como bloqueadores do canal de cálcio do tipo L, bloqueadores do canal de cálcio do tipo N, antagonistas da substância P, bloqueadores do canal de sódio, bloqueadores do receptor purinérgico ou as suas combinações.

O xénon pode ser administrado através de qualquer mecanismo de distribuição adequado ou dois ou mais mecanismos de distribuição adequados.

Numa forma de realização particularmente preferida, o xénon é administrado por perfusão. No contexto da presente invenção, o termo "perfusão" refere-se à introdução de uma mistura de oxigénio/xénon em, e remoção de dióxido de carbono de, um doente utilizando uma máquina coração-pulmão especializada. Em termos

gerais, a máquina coração-pulmão substitui a função do coração e pulmões e proporciona um campo cirúrgico livre de sangue e movimento para o cirurgião. O perfusionista ventila o sangue do doente de modo a controlar o nível de oxigénio e dióxido de carbono. No contexto da presente invenção, o perfusionista introduz também xénon no sangue do doente. Depois, o perfusionista impele o sangue de volta para o sistema arterial para proporcionar o fluxo sanguíneo com nutrientes a todos dos órgãos vitais e tecidos do doente durante a cirurgia.

Numa forma de realização particularmente preferida, o medicamento está na forma gasosa.

Noutra forma de realização altamente preferida, o xénon é administrado por inalação. De um modo mais preferido, o xénon é administrado por inalação de uma mistura de 70-30% v/v de xénon/oxigénio.

De um modo mais preferido, o xénon é administrado na forma de uma mistura 20-70% v/v de xénon/ar.

Ainda noutra forma de realização preferida da invenção, o medicamento está na forma de um líquido ou solução.

Ainda noutra forma de realização preferida da invenção, o medicamento está na forma de um líquido ou solução.

De um modo preferido, o líquido é administrado na forma de uma solução ou uma emulsão preparada a partir de soluções estéreis ou esterilizáveis, que podem ser injectadas intravenosamente, intra-arterialmente, intratraquealmente,

subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente ou intramuscularmente.

Numa forma de realização particularmente preferida, o xénon é administrado na forma de uma emulsão lipídica. A formulação intravenosa contém, tipicamente, uma emulsão lipídica (tal como as emulsões Intralipid®10, Intralipid®20, Intrafat®, Lipofundin®S ou Liposyn® comercialmente disponíveis ou uma especialmente formulada para maximizar a solubilidade) que aumente de um modo suficiente a solubilidade do xénon de modo a alcançar o efeito clínico desejado. Pode ser encontrada mais informação à cerca de emulsões lipídicas deste género em G. Kleinberger e H. Pamperl, *Infusionstherapie*, 108-117 (1983) 3.

A fase lipídica da presente invenção que dissolve ou dispersa o gás é, tipicamente, formada a partir de ésteres de ácido gordo de cadeia média e longa, saturados ou insaturados, contendo 8 a 30 átomos de carbono. Estes lípidos formam lipossomas em solução aquosa. Os exemplos incluem óleo de peixe e óleos de plantas, tais como óleo de semente de soja, óleo de cardo ou óleo de semente de algodão. As emulsões lipídicas da invenção são, tipicamente, emulsões óleo em água, em que a proporção de gordura na emulsão é, convencionalmente, de 5 a 30% em peso e, de um modo preferido, 10 a 20% em peso. As emulsões óleo em água deste tipo são, muitas vezes, preparadas na presença de um agente emulsionante, tal como um fosfato de soja.

Os lípidos que formam os lipossomas da presente invenção podem ser naturais ou sintéticos e incluem colesterol, glicolípidos, esfingomielina, glucolípidos, glicoesfingolípidos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidil-serina, fosfatidiglicerol, fosfatidilinositol.

As emulsões lipídicas da presente invenção podem, também, compreender componentes adicionais. Estes podem incluir antioxidantes, aditivos que formam a osmolaridade da fase aquosa que rodeia a fase lipídica isotónica com o sangue ou polímeros que modificam a superfície dos lipossomas.

Foi estabelecido que podem ser adicionadas quantidades apreciáveis de xénon a uma emulsão lipídica. Mesmo através dos meios mais simples, a 20 °C e pressão normal, o xénon pode ser dissolvido ou disperso em concentrações de 0,2 a 10 mL ou mais por mL de emulsão. A concentração do gás dissolvido está dependente de vários factores, incluindo temperatura, pressão e a concentração do lípido.

As emulsões lipídicas da presente invenção podem ser carregadas com xénon gasoso. Em geral, um dispositivo é carregado com a emulsão e anestésicos, como gases ou vapores, feitos passar através de borbulhadores de vidro sinterizado imersos na emulsão. A emulsão é deixada a equilibrar com o gás ou vapor anestésico a uma pressão parcial escolhida. Quando armazenado em recipientes de gás selados, estas emulsões lipídicas mostram estabilidade suficiente para o anestésico não ser libertado como um gás durante os períodos de armazenamento convencionais.

As emulsões lipídicas da presente invenção podem ser carregadas de modo que o xénon esteja ao nível de saturação. Alternativamente, o xénon pode estar presente em concentrações mais baixas, desde que, por exemplo, a administração da emulsão produza a actividade farmacêutica desejada.

A concentração de xénon empregue na invenção pode ser a concentração mínima necessária para atingir o efeito clínico desejado. É normal para um médico determinar a dosagem actual que será a mais adequada para um doente específicas e esta dose irá variar com a idade, peso e resposta do doente, em particular. Podem, com certeza, ocorrer situações individuais onde sejam necessárias gamas de dosagem superiores ou inferiores e essas estão dentro do âmbito desta invenção.

De um modo preferido, o medicamento está numa forma adequada para distribuição intravenosa, neuraxial ou transdérmica.

De um modo preferido, o xénon é administrado simultaneamente, em combinação, sequencialmente ou separadamente com hipotermia.

Como aqui utilizado, “simultaneamente” é utilizado para referir que o xénon é administrado ao mesmo tempo com hipotermia, enquanto o termo “em combinação” é utilizado para referir que o xénon é administrado, se não simultaneamente, então “sequencialmente” dentro de um período de tempo no qual o xénon e a hipotermia exibem ambos um efeito terapêutico, *i. e.,* estão ambos disponíveis para agir terapeuticamente dentro do mesmo período de tempo. Assim, a administração “sequencialmente” pode permitir ao xénon ser administrado no período de 5 minutos, 10 minutos ou numa questão de horas antes da hipotermia, desde que o tempo de meia vida em circulação do xénon seja tal que, esteja presente numa quantidade terapeuticamente eficaz quando o indivíduo neonatal é exposto a condições hipotérmicas.

Noutra forma de realização preferida da invenção, o neonatal é submetido a hipotermia antes do tratamento com xénon.

Em contraste com “em combinação” ou “sequencialmente”, “separadamente” é aqui utilizado para indicar que o espaço de tempo entre a administração do xénon e exposição do indivíduo neonatal a hipotermia é significativo, *i. e.*, o xénon pode já não estar presente na corrente sanguínea numa quantidade terapeuticamente eficaz quando o indivíduo neonatal é exposto a condições de hipotermia.

Numa forma de realização preferida, o xénon é administrado sequencialmente com hipotermia.

De um modo mais preferido, o xénon é administrado sequencialmente, antes da hipotermia.

Noutra forma de realização preferida, o xénon é administrado separadamente, antes da hipotermia.

Noutra forma de realização preferida, o xénon é administrado sequencialmente, após a hipotermia.

Noutra forma de realização preferida, o xénon é administrado separadamente, após a hipotermia.

De um modo mais preferido, o xénon é administrado, sequencialmente ou simultaneamente, com hipotermia, de um modo mais preferido, simultaneamente.

Numa forma de realização preferida da invenção, o xénon é administrado numa quantidade terapeuticamente eficaz.

Noutra forma de realização preferida, o xénon é administrado numa quantidade sub-terapeuticamente eficaz. Por outras palavras, o xénon é administrado numa quantidade que será insuficiente para produzir o efeito terapêutico desejado se administrado na ausência de condições de hipotermia.

De um modo ainda mais preferido, a combinação de xénon e hipotermia apresenta um efeito sinérgico, *i. e.*, a combinação é sinérgica.

Numa forma de realização particularmente preferida, o xénon é administrado antes da agressão hipóxica. Assim, numa forma de realização preferida, o xénon é administrado ao neonatal através da mãe, antes do seu nascimento, por exemplo, por administração à mãe antes ou durante o trabalho de parto. De um modo preferido, o xénon é administrado à mãe durante até cerca de 48 ou 24 horas antes do nascimento, de um modo mais preferido, até cerca de 12 horas, de um modo mais preferido, até cerca de 6 horas ou 3 horas ou 1 hora antes do nascimento. Após o nascimento, o neonatal é então submetido a condições de hipotermia.

Outro aspecto da invenção refere-se ao tratamento da asfixia neonatal num mamífero com essa necessidade por

(a) administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de xénon à mãe do mamífero antes de e/ou durante o trabalho de parto; e

(b) submeter o mamífero a hipotermia antes do nascimento.

De um modo preferido, a hipotermia é mantida durante um período de, pelo menos, 6 horas, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 12 horas, após a agressão hipóxica-isquémica (HI).

Numa forma de realização preferida, a hipotermia é mantida durante um período de cerca de 6 a cerca de 24 horas após a agressão hipóxica-isquémica (HI).

De um modo preferido, a hipotermia é mantida durante um período de, pelo menos, cerca de 6 horas, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 12 horas, após o nascimento.

Numa forma de realização preferida, a hipotermia é mantida durante um período de cerca de 6 a cerca de 24 horas após o nascimento.

De um modo preferido, o tratamento de acordo com a invenção é iniciado no período de cerca de 6 horas após a lesão hipóxica-isquémica (HI) e, de um modo mais preferido, no período de cerca de 2 horas da agressão hipóxica-isquémica.

A hipotermia pode ser produzida passivamente, ao permitir que a temperatura diminua após a lesão e não reter premeditadamente a temperatura corporal. Sendo poiquilotérmicos, os recém-nascidos assumem rapidamente a temperatura do meio que os rodeia. Alternativamente, o doente pode ser tornado hipotérmico activamente ao reduzir deliberadamente a sua temperatura ambiente.

Um segundo aspecto da invenção refere-se ao tratamento da asfixia neonatal num mamífero com essa necessidade por:

- (a) administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de xénon ao mamífero; e
- (b) submeter o mamífero a hipotermia ou condições hipotérmicas.

Numa forma de realização preferida, o mamífero é um indivíduo recém-nascido nas primeiras quatro semanas após o nascimento. De um modo mais preferido, o mamífero está nas primeiras duas semanas, de um modo ainda mais preferido, o mamífero está na primeira semana após o nascimento.

De um modo preferido, o mamífero é um humano.

De um modo preferido, o mamífero é indivíduo a condições de hipotermia moderada. Como aqui utilizado, o termo "hipotermia moderada" refere-se, tipicamente, a uma diminuição na temperatura central de 37 °C para cerca de 33 °C.

Numa forma de realização preferida, a temperatura do mamífero é mantida a uma temperatura de cerca de 31 °C a cerca de 36 °C.

De um modo mais preferido, a temperatura do mamífero é mantida a uma temperatura de cerca de 32 °C a cerca de 36 °C, de um modo mais preferido, de cerca de 32 °C a cerca de 35 °C, de um modo ainda mais preferido, de cerca de 33 °C a cerca de 35 °C.

As formas de realização preferidas para o segundo aspecto da invenção são as mesmas que as descritas acima em relação ao primeiro aspecto.

Outro aspecto da invenção refere-se a tratar a asfixia neonatal num mamífero com essa necessidade por administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de xénon, a um mamífero, em combinação com hipotermia. Ainda outro aspecto da invenção refere-se à utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal, em que o referido tratamento compreende administrar, a um indivíduo, simultaneamente, sequencialmente ou separadamente xénon em combinação com hipotermia.

Outro aspecto da invenção refere-se à utilização de xénon, em combinação com hipotermia, para o tratamento de asfixia neonatal.

Estudos In Vivo

Utilizando um modelo animal de HI, os ratos neonatais foram expostos a tratamento com xénon e hipotermia independentemente um do outro. O xénon demonstrou ser neuroprotector contra HI no recém-nascido ao reduzir a quantidade de morte celular apoptótica, enquanto a hipotermia pareceu menos eficaz. Em combinação, o xénon e hipotermia foram neuroprotectores via um mecanismo anti-apoptótico (Figura 17). Verificou-se que o seu efeito combinado era sinérgico.

O modelo de HI em rato neonatal está muito estabelecido e foi validado para utilização em vários estudos anteriores

(Levine, 1960; Rice *et al.*, 1981). A idade dos ratos utilizados neste modelo demonstrou corresponder à maturidade cerebral do recém-nascido humano de termo (Clancy *et al.*, 2001; Ikonimidou *et al.*, 1989) e, deste modo, pode ser feita uma comparação razoavelmente exacta entre os dois.

Durante as experiências de hipotermia, a temperatura das crias de rato foi monitorizada utilizando uma sonda que foi inserida no córtex de uma das crias. A sonda demorou, aproximadamente, 15 minutos a equilibrar e isto foi permitido ao atrasar o tempo de início da experiência até a sonda começar a registar a temperatura correcta. Verificaram-se flutuações na temperatura à volta do valor médio, mas estas foram controladas por monitorização contínua e ajuste manual do banho de água consoante necessário. Apenas a temperatura de um rato por grupo foi monitorizada de modo a minimizar o trauma provocado aos ratos e, também, os danos infligidos sobre o córtex pela sonda; os ratos com a sonda inserida não puderam ser utilizados para análise histológica.

O gás xénon anestésico demonstrou exibir neuroprotecção em vários modelos de lesão neuronal adulta. Actualmente, não existem dados publicados para corroborar o mesmo efeito neuroprotector do xénon em recém-nascidos. Os resultados deste estudo corroboram descobertas anteriores de que o xénon apresenta propriedades neuroprotectoras significativas e, além disso, sugerem que esta neuroprotecção estende-se aos modelos neonatais de lesão cerebral induzida por hipoxia-isquemia.

Sabe-se há muito tempo que é necessária a activação do subtípo NMDA de receptores do glutamato para suster a lesão neuronal em curso e morte em HI e está bem documentado que o

xénon exerce o seu efeito analgésico e anestésico via bloqueio destes receptores, assim, foi postulado que as propriedades neuroprotectoras do xénon são um resultado deste antagonismo. Anteriormente, muitos outros antagonistas de NMDA demonstraram neuroproteção em estudos *in vitro*, mas falharam subsequentemente quando utilizados em condições clínicas (Muir e Lees, 1995). A razão por de trás destes insucessos clínicos é desconhecida, no entanto, é possível que o bloqueio do subtípo do receptor do glutamato seja insuficiente para proteger contra lesão, o que poderá implicar que o xénon exerce o seu efeito neuroprotector através de outro mecanismo.

No presente estudo, foi demonstrado que o xénon protege significativamente, contra HI neonatal via um mecanismo *anti-apoptótico*. Quer a apoptose quer a necrose são componentes importantes de perda neuronal após lesão por HI, mas a apoptose parece ser o tipo de morte celular mais importante na determinação do recém-nascido resultante (Taylor *et al.*, 1999). A morte apoptótica é muitas vezes precedida pela activação de muitos genes, (incluindo factores de transcrição) que podem ser pro-apoptóticos ou anti-apoptóticos. Como o xénon parece interferir com a morte celular apoptótica, é possível que possa exercer o seu efeito num destes genes ou, nalgum ponto ao longo da via apoptótica. Actualmente, existem evidências de duas vias de apoptose diferentes: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca (também referida como a "via do receptor de morte") envolve a ligação de citocinas aos receptores de morte que activam a caspase-8 e esta, por sua vez, activa a "caspase executora", caspase-3 que prossegue na indução da morte celular apoptótica (Mehmet, 2000). A via intrínseca é fortemente dependente da mitocôndria e envolve um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial provocado pela proteína bax

pro-apoptótica. Isto conduz à libertação do citocromo c, a formação de um complexo de citocromo c, Apaf-1 (factor de activação da protease de apoptose 1) e caspase-9 e a subsequente activação da caspase-3. É inteiramente possível que o xénon actue em qualquer uma destas vias, mas existe uma evidência que sugere que a neurodegerenação apoptótica induzida por HI seja mediada via a via mitocondrial e a inibição de alterações mitocondriais dependentes da bax (Taylor *et al.*, 1999). Além disto, o antagonista de NMDA cetamina tem demonstrado proteger contra a isquemia cerebral incompleta e reperfusão por modulação inicial do equilíbrio entre proteínas pro- e anti-apoptóticas, nomeadamente por inibição do aumento da bax induzido por HI (Engelhard *et al.*, 2003). Assim, é possível que o xénon possa inibir a apoptose por regulação negativa da bax. A Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica que actua de modo a diminuir a permeabilidade da mitocôndria e, por sua vez, inibir a libertação do citocromo c. A sua sobre-expressão tem demonstrado diminuir os danos neuronais provocados por isquemia cerebral global transiente em gerbilos (Engelhard *et al.*, 2003). Deste modo, a regulação positiva de bcl-2 é outro alvo potencial para o xénon. Como o xénon é apolar e solúvel em gordura, é capaz de distribuir-se ele próprio por todo o corpo. Pode penetrar nas membranas e, consequentemente, pode também ter um efeito no núcleo por alteração da transcrição genética de modo a regular positivamente as vias de sobrevivência ou inibir a síntese de ARN e proteínas de moléculas pró-apoptóticas.

A anti-necrose por xénon demonstrou ser estatisticamente significativa no córtex às 48 h, mas não no girus (Figura 16). Em todos os outros grupos de tempo, o xénon não foi antinecrótico. Uma explicação possível para isto é que, de acordo com um estudo anterior (Northington *et al.*, 2001), existe

um onda secundária de morte celular necrótica às 48 h, que é apenas evidente no córtex. Isto poderia explicar o aumento na percentagem de células necróticas presentes nos controlos positivos às 48 h, comparado com 16 e 24 h. Embora não esteja completamente esclarecido como o xénon exerce um efeito antinecrótico no córtex às 48 h, pode ser que embora o xénon seja incapaz de prevenir a necrose que ocorre antes da sua administração (como nos grupos das 16 e 24 h) é, por algum motivo, capaz de combater a onda necrótica secundária que ocorre *após* a sua administração. A necrose inicial ocorre tão cedo quando 3 h após a lesão por HI (Northington *et al.*, 2001) e neste ponto o xénon, ainda, não foi administrado. É, por isso, improvável que seja capaz de interromper ou inverter um processo que já ocorreu. No entanto, a onda necrótica secundária ocorre a um tempo no qual o xénon está presente no cérebro durante 48 h e isto sugere que a presença de xénon no acontecimento de necrose pode ser capaz de diminuir este tipo de morte celular. Devem ser completados outros trabalhos de modo a esclarecer o mecanismo exacto desta interacção.

Estudos anteriores demonstraram que a hipotermia moderada de 33 °C é neuroprotectora contra lesão neuronal isquémica (Busto *et al.*, 1987). Outros estudos sugeriram que esta neuroprotecção é alcançada via um mecanismo anti-apoptótico (Xu *et al.*, 2002). Experiências demonstraram que não se verificou neuroprotecção às 16 ou 24 h (Figuras 13 e 15, respectivamente).

No entanto, às 48 h, foi alcançada uma neuroprotecção significativa tanto no córtex como no girus, mas através de mecanismos diferentes. No córtex, a hipotermia é antinecrótica e no girus é anti-apoptótica (Figura 16). Os dados nestes estudo não explicam este efeito, mas uma justificação possível pode ser

que diferentes regiões cerebrais expressam vulnerabilidade diferencial (Northington *et al.*, 2001). No córtex, a onda necrótica secundária (discutida acima) ocorre num tempo ao qual a hipotermia já foi administrada e isto pode torná-la mais eficaz. No entanto, no girus, não se verificou necrose retardada e, assim, não foi observado efeito anti-necrótico. A anti-apoptose parece ser o mecanismo neuroprotector nesta região e é possível que o efeito neuroprotector anti-apoptótico esperado da hipotermia, que não é evidente nos intervalos de tempo iniciais, possa estar exposto após períodos mais longos.

Os resultados demonstraram que quando utilizado em combinação, 20% de xénon e 35 °C de hipotermia proporcionam um nível impressionante de neuroprotecção. Como estes valores não proporcionaram neuroprotecção quando cada agente foi utilizado individualmente, o resultado não poderá ser explicado por um mecanismo aditivo mas, em vez disso, tem de ser devido à interacção sinérgica entre os dois agentes.

Em resumo, o presente estudo demonstrou a utilização de um modelo em rato *in vivo* para mostrar que o xénon é neuroprotector no recém-nascido e protege, significativamente, contra a apoptose induzida por lesão hipóxica-isquémica. Os dados neste estudo sugerem também que o xénon e a hipotermia quando são utilizados em combinação no mesmo modelo, interagem sinergisticamente de modo a diminuir dramaticamente a morte celular por apoptose. Consequentemente, esta combinação pode representar um tratamento eficaz para proteger contra as consequências neurológicas devastadoras da asfixia neonatal.

A presente invenção é, também, descrita através de exemplo e com referência às seguintes figuras, em que:

A Figura 1 mostra a relação entre dano, como determinado pela perda de peso do cérebro (razão do hemisfério direito/esquerdo) e a duração do período hipóxico (em minutos) em ratos Sprague-Dawley.

A Figura 2 mostra secções de cérebro de ratos Sprague-Dawley que sofreram 90 minutos de agressão por hipóxia-isquemia.

A Figura 3 mostra o principal dano celular que é evidente nos ratos Sprague-Dawley 24 horas após 90 minutos de hipóxia-isquemia.

A Figura 4 mostra a neuroproteção dependente da concentração de xénon (razão do peso do hemisfério direito/esquerdo em relação à concentração de xénon).

A Figura 5 mostra o efeito de xénon a 70% nas funções neurológicas analisadas algum tempo após agressão hipóxica-isquémica (HI).

A Figura 6 compara o efeito neuroprotector (razão do hemisfério direito/esquerdo) observado com N_2 e xénon respectivamente, quando é administrado xénon 2 horas após agressão por HI.

A Figura 7 mostra o efeito da hipotermia moderada no efeito neuroprotector do xénon (libertaçāo de LDH em relação à concentração de xénon, atm em %).

A Figura 8 mostra um gráfico de van't Hoff do logaritmo natural da libertação de LDH representado graficamente em relação à temperatura absoluta recíproca.

A Figura 9 mostra uma fotografia das câmaras hermética fechadas construídas para esse objectivo, utilizadas para distribuição do gás. São também representados o banho de água e o sistema de distribuição de xénon em circuito fechado.

A Figura 10 mostra uma linha temporal esquemática do método utilizado. 60 minutos é o tempo que durou a cirurgia de n=12 crias de rato. Os períodos de recuperação foram passados com a progenitora. As intervenções utilizadas foram: animais simulados, controlos positivos, xénon a 75% (oxigénio de equilíbrio), hipotermia a 33 °C, xénon a 20% (oxigénio a 25%, azoto a 55%), hipotermia a 35 °C e uma combinação de hipotermia a 35 °C e xénon a 20%. A não ser que seja indicado o contrário, os animais foram mantidos a 37 °C e respiraram uma mistura gasosa de oxigénio a 25% equilibrado com azoto. Os animais simulados foram submetidos a uma incisão, mas sem ligação ou HI e os controlos positivos sofreram cirurgia e HI. Os animais de cada grupo foram divididos de modo igual entre períodos de recuperação variáveis (16, 24 e 48 h) antes de serem sacrificados. Abreviaturas: HI, hipoxia-isquemia.

A Figura 11 mostra (A) Secção Sagital de um cérebro de rato modificado a partir da página da Internet: faculty.virginia.edu/.../Rat-BrainLabels.jpg. A linha a tracejado representa a área do cérebro a partir da qual foram retiradas as secções coronais (B), aproximadamente, -3,6 mm do bregma. (B) representa uma secção coronal corada com violeta de cresilo. As caixas indicam as áreas nas quais foram colocadas as

grelhas de contagem e as células foram analisadas - as caixas superiores indicam o córtex e a inferior o girus. O X cobre um buraco que foi criado intencionalmente com um alfinete de segurança, de modo a demonstrar o hemisfério não ligado (contralateral).

A Figura 12 mostra uma fotomicrografia do córtex (corado de violeta de cresilo), tirada com lentes de imersão em óleo de 100x e uma câmara digital Axiocam, demonstrando a diferença no aspecto morfológico entre uma célula viável, necrótica e apoptótica. As células viáveis coram com menor intensidade que qualquer um dos tipos de morte celular e, por isso, apresentam um citoplasma mais pálido, enquanto as células mortas estão coradas com maior intensidade. As células que sofreram necrose e apoptose são diferenciadas com base nos seus aspectos nucleares diferentes - os núcleos necróticos são maiores e de forma irregular, enquanto os núcleos apoptóticos são mais pequenos, mirrados e de forma esférica.

A Figura 13 mostra que o xénon é neuroprotector às 16 h via um mecanismo anti-apoptótico. Mais especificamente, a Figura 13 mostra gráficos da morte neuronal necrótica e apoptótica induzida por hipóxia-isquemia e os efeitos de 75% de xénon e 33 °C de hipotermia em tal morte celular às 16 h no (A) córtex e (B) no girus. Em ambas as áreas cerebrais, o xénon aumenta significativamente a percentagem de células viáveis e diminui a percentagem de células apoptóticas quando comparado com animais de controlo positivo. No córtex, a hipotermia diminui a percentagem de células apoptóticas, embora não aumente a contagem de células viáveis e, por isso, não pode ser considerado neuroprotectora. Os resultados são média ± SD (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. controlos positivos.

A Figura 14 mostra uma fotomicrografia demonstrando o córtex e o girus nos animais simulados, controlo positivo e com xénon a 75% às 16 horas. O grupo dos 75% é mais parecido no aspecto ao grupo simulado que ao grupo do controlo positivo. Isto confirma o efeito neuroprotector do xénon às 16 horas. O girus do grupo controlo é de forma distorcida devido à quantidade superior de morte celular e vacuolação.

A Figura 15 mostra que o xénon é neuroprotector às 24 h via um mecanismo anti-apoptótico. Mais especificamente, a Figura 15 mostra gráficos para morte neuronal apoptótica e necrótica induzida por hipóxia-isquemia e os efeitos de 75% de xénon e hipotermia a 33 °C em tal morte celular às 24 h no (A) córtex e (B) no girus. Em ambas as áreas cerebrais, o xénon provoca um aumento significativo na percentagem de células viáveis devido a uma diminuição na contagem de células necróticas. Os resultados são media ± SD (n=3). *p < 0,05 vs. controlos positivos.

A Figura 16 mostra que o xénon é neuroprotector às 48 h via um mecanismo anti-apoptótico. Mais especificamente, a Figura 16 mostra gráficos para a morte neuronal necrótica e apoptótica induzida por hipóxia-isquemia e os efeitos de xénon a 75% e hipotermia a 33 °C em tal morte celular às 48 h no (A) córtex e (B) no girus. O xénon é neuroprotector via um mecanismo anti-apoptótico no córtex e girus. Além disso, o xénon tem um efeito anti-necrótico no córtex. A hipotermia a 33 °C parece ser neuroprotectora em ambas as áreas do cérebro, mas através de um mecanismo diferente - é anti-necrótico no córtex e anti-apoptótico no girus. Os resultados são média ± SD (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. controlos positivos.

A Figura 17 mostra que uma combinação de xénon e hipotermia interagem sinergisticamente de modo a produzirem neuroprotecção anti-apoptótica. Mais especificamente, a Figura 17 mostra gráficos para a morte neuronal necrótica e apoptótica induzida por hipóxia-isquemia e o efeito de uma combinação de 20% de xénon e hipotermia a 35 °C em tal morte celular às 16, 24 e 48 h no (A) córtex e (B) no girus. Não foram observadas diferenças quando comparados os grupos de 20% de xénon e hipotermia a 35 °C com os controlos positivos, assim, a estes valores, não existe neuroprotecção. No entanto, quando estes valores são utilizados em combinação, observa-se um aumento dramático na percentagem de células viáveis devido a uma diminuição significativa na contagem de células apoptóticas quando comparado com os animais do controlo positivo. No girus, a combinação proporciona um efeito anti-necrótico adicional às 24 h. Os resultados são média \pm SD (n=3). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 vs. controlos positivos.

Pode ser encontrada uma discussão mais detalhada destas figuras na secção de Exemplos que se segue.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Modelo de Asfixia Neonatal

Os ratos Sprague-Dawley recém-nascidos com sete dias de idade foram submetidos a ligação da artéria carótida comum direita sob anestesia cirúrgica (isoflurano a 1%-1,5% em oxigénio puro). Após ligação, os animais foram devolvidos às

suas progenitoras e colocados numa área especialmente concebida com temperatura ambiente (23 °C) e humidade (48%) constantes. Uma hora após cirurgia, os ratos neonatais foram colocados numa câmara especialmente concebida com oxigénio a 8% combinado com Xénon a 0, 20, 40, 60 ou 70% (com azoto para perfazer o equilíbrio) durante 90 min a 37 °C (a temperatura foi mantida pelo banho de água a correr por fora das câmaras). No dia 7 pós-experiência, os ratos (com 14 dias de idade) foram sacrificados e os seus cérebros removidos. Foi calculada a razão do peso do hemisfério direito em relação ao esquerdo (razão D/E). Foi permitido às crias de rato de alguns grupos viver até 30 dias após o nascimento, tempo após o qual a sua função neuromotora e de coordenação foram avaliadas através de protocolos estabelecidos (Teste neuromotor e Teste da barra giratória).

Os resultados indicam que, com tempos crescentes de hipoxia, o dano (quando determinados pela perda de peso do cérebro) é apenas evidente quando a hipoxia excede os 90 minutos (Figura 1). Deste modo, o período convencional de lesão hipoxica foi programado para os 90 minutos.

As secções cerebrais dos animais que sofreram 90 minutos de agressão por hipoxia-isquemia, são apresentadas na Figura 2. Em maior detalhe, a Figura 2 (centro) mostra a deterioração anatómica grosseira (no lado do cérebro que sofrem a lesão - lado esquerdo desta vista) comparado com os animais de controlo (esquerda). As secções do cérebro da direita são de animais que sofreram a mesma hipoxia-isquemia mas que estiveram a respirar xénon a 70% durante o período hipóxico. Estes cérebros parecem semelhantes aos normais, mostrando a neuroproteção excepcional proporcionada pelo xénon.

São apresentados na Figura 3 os principais danos celulares evidentes 24 horas após 90 minutos de hipóxia-isquemia.

É apresentada na Figura 4 a neuroprotecção dependente da concentração de xénon (razão peso do hemisfério direito/esquerdo em relação à concentração de xénon). Em maior detalhe, a Figura 4 mostra as razões de peso hemisférico ipsilateral/contralateral de cérebro de rato com 14 dias após hipóxia/isquemia com ou sem várias concentrações de xénon aos 7 dias de idade. A neuroprotecção é evidente mesmo a concentrações sub-anestésicas. Os animais de controlo foram submetidos a ligação da carótida mas não foi efectuada hipóxia. Os resultados são média ± SEM ($n = 5-8$). * $P < 0,01$ vs O_2 a 8%.

É apresentado na Figura 5 o efeito do xénon a 70% nas funções neurológicas avaliadas vagamente após agressão hipóxica-isquémica (HI). No dia 7 pós-nascimento, a artéria carótica direita foi ligada e as crias de rato foram expostos a ambiente hipóxico (oxigénio a 8% + xénon a 70% e equilibrado com azoto) durante 90 min. Trinta dias após a lesão, os ratos foram avaliados para a função neuromotora (A) utilizando um conjunto que inclui ensaios de tracção preênsil, força e desempenho na barra de equilíbrio (classificado numa escala de 0-9) e (B) equilíbrio numa barra giratória, um teste convencional de equilíbrio e função neuromotora. O ponto de dados de um rato individual é a soma dos três testes. As barras horizontais indicam a média de cada grupo.

É apresentado na Figura 6 o efeito neuroprotector (razão do hemisfério direito/esquerdo) observado com N_2 e xénon respectivamente, quando o xénon é administrado 2 horas após a

agressão por HI. Em maior detalhe, os dados mostram que o xénon é eficaz ao proporcionar neuroprotecção mesmo sendo administrado 2 horas após o final do período hipóxico. As razões do peso hemisférico ipsilateral/contralateral de cérebro de rato com 14 dias 90 min de agressão hipóxica-isquémica e, depois, 2 h de recuperação após exposição com N₂ a 70% ou Xe a 70% + O₂ a 30% durante 90 min aos 7 dias de idade. Os resultados são média ± SEM (n = 6).

É apresentado na Figura 7 o efeito da hipotermia moderada no efeito neuroprotector do xénon (libertação de LDH em relação à concentração de xénon, % em atm). A hipotermia modesta produz um aumento muito grande e inesperado na neuroprotecção por xénon. O arrefecimento em 4 °C aumenta em muito a potência do xénon no bloqueio da libertação de LDH. Em maior detalhe, esta figura apresenta o efeito de uma combinação de xénon e hipotermia na libertação de lactato desidrogenase (LDH) induzida por privação de oxigenoglucone. A Figura 7 mostra os resultados da exposição de culturas neuronais a 75 minutos de OGD na presença de concentrações crescentes de xénon, quer a 37 °C (vermelho) ou a 33 °C (azul). Os valores de ED₅₀ de xénon a 37 °C vs. xénon a 33 °C foram 35,9 +/- 2,15% e 11,5 +/- 2,0% (médias +/- SEM), respectivamente. A lesão neuronal é expressa como uma percentagem da libertação de LDH máxima após 75 minutos de OGD e 6 horas de recuperação na ausência de xénon ou hipotermia. Os pontos representam valores médios, com barras de erro indicando os desvios padrão.

É apresentada na Figura 8 a extensão da dependência da temperatura do processo, que mostra uma curva de van't Hoff do logaritmo natural da libertação de LDH representada graficamente em relação à temperatura absoluta recíproca. Do declive desta

curva pode ser calculada a variação da entalpia do processo, sendo o seu tamanho uma medida da dependência da temperatura. Os dados a vermelho mostram o efeito da temperatura na libertação de LDH na ausência de xénon. É esperada uma redução, embora modesta, na libertação à mediada que a temperatura é reduzida. Quando estão presentes 12,5% de xénon, a dependência da temperatura é muito grande e inesperada. Por isso, parece que a hipotermia aumenta em muito os efeitos neuroprotectores do xénon. Consequentemente, os resultados sugerem que a hipotermia e o xénon actuam sinergisticamente como neuroprotectores.

São esquematizados estudos mais detalhados no Exemplo 2 abaixo.

EXEMPLO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo está de acordo com United Kingdom Animals (Processos Científicos) Act de 1986 e foi aprovado por Home Office (R.U.).

Modelo Animal de Hipóxia-Isquemia

Este estudo utilizou um modelo de HI focal em rato com 7 dias (p7), no qual o padrão de lesão cerebral assemelha-se com a lesão hipóxica-isquémica no recém-nascido humano terminal (Johnston, 1983).

As crias de rato p7 Sprague-Dawley (com pesos entre 10 e 14 g) da Harlan, R.U. foram submetidos a um modelo previamente descrito de lesão por HI (Levine, 1960; Rice *et al.*, 1981). Resumidamente, as crias de rato foram anestesiadas com isoflurano a 2% antes de serem submetidas a ligação unilateral permanente da artéria carótida comum direita, utilizando uma incisão na linha média do pescoço e fio de sutura de seda 5,0. Após conclusão da cirurgia, as crias recuperaram da anestesia e foram recolocadas junto das progenitoras até chegar a altura da experiência.

1 h após a cirurgia, as crias foram expostas a hipóxia por colocação destas em câmaras hermeticamente fechadas construídas para este objectivo que foram, parcialmente, submersas num banho de água a 37 °C (Figura 9). Foi escolhido um período hipóxico de 90 minutos, uma vez que experiências preliminares indicaram que a lesão hipóxica-isquémica, como determinado pelo peso hemisférico, é máxima após esse tempo. A hipóxia foi induzida por um fluxo contínuo de oxigénio a 8% húmido, equilibrado com azoto, e esta mistura foi monitorizada de 15 em 15 minutos através de um Datex Ohmeda (Bradford, R.U.). (Todos os gases foram fornecidos por BOC.)

Tratamentos Experimentais

Após HI, as crias foram recolocadas junto das progenitoras durante 4 h para recuperação, tempos após o quais foram submetidas a 90 minutos de uma das intervenções experimentais abaixo. Os dados das experiências preliminares demonstraram que o tempo óptimo para aplicar a intervenção era quer simultaneamente com HI ou 4 h após essa. Não existiu diferença

significativa entre os dois períodos de tempo e, assim, foi escolhido o tempo de 4 h após a agressão como o tempo para aplicar a intervenção, uma vez que se pensou ser o mais relevante clinicamente.

As crias foram recolocados junto das suas progenitoras até ao sacrifício às 16, 24 e 48 h após o tratamento (Northington *et al.*, 2001) (Figura 10).

Controlos

Os grupos de controlo consistiram de (a) animais da mesma ninhada não tratados que foram submetidos a incisão mas não a ligação (*i. e.*, animais simulados), utilizados como controlos negativos e (b) animais da mesma ninhada expostos a HI, mas não a intervenção experimental, para servirem de controlos positivos. Estes animais foram submetidos a 90 minutos a 37 °C e a uma mistura gasosa composta por oxigénio a 25% e equilibrada com azoto.

Ratos Experimentais

Após HI e recuperação, os ratos experimentais foram tratados com 90 minutos de uma das cinco intervenções experimentais abaixo. Cada um dos cinco tratamentos foi efectuado em grupos de ratos separados.

Tratamento com Hipotermia

As crias de rato foram submetidas a tratamento de 90 minutos com hipotermia moderada (33 °C). Foi seleccionada uma cria aleatoriamente e, sob isoflurano e anestesia local, foi inserida uma sonda de temperatura (Mini-Mitter Co. Inc., Bend, OR, E.U.A.) no córtex e mantida no sítio com supercola. Todos as crias foram, então, colocados nas câmaras hermeticamente fechadas (como anteriormente) e foi bombeada uma mistura de oxigénio a 25% e equilibrada com azoto. As câmaras foram parcialmente, submersas num banho de água que foi mantido de modo a manter a temperatura cortical das crias a exactamente 33 °C, como determinado pela sonda de temperatura e software de computador Vital View. Esta temperatura foi escolhida porque representa a hipotermia "moderada" e, assim, pensou-se ser relevante clinicamente, proporcionando um bom equilíbrio entre os efeitos secundários e benefícios. Após 90 minutos de tratamento, as crias recuperaram com as suas mães até ao tempo do sacrifício. A cria com a sonda de temperatura no local foi retirada imediatamente após a experiência e o seu cérebro não foi utilizado para análise.

Tratamento com Xénon

Foi seguido o mesmo paradigma experimental para o tratamento com xénon, mas em vez de hipotermia, o banho de água foi mantido a 37 °C e a mistura gasosa foi alterada para oxigénio a 25% e xénon a 75% durante 90 minutos. O gás foi administrando por um sistema fechado construído para esse objectivo de modo a minimizar a perda de xénon (Figura 9). Mais

uma vez, as crias foram recolocados junto das suas progenitoras até ao sacrificio.

Protocolo de Combinação

No paradigma de combinação, os ratos foram submetidos a hipotermia e a xénon em simultâneo, durante 90 minutos. Mais uma vez, as crias foram colocadas em câmaras hermeticamente fechadas, mas desta vez as suas temperaturas foram mantidas nos 35 °C e a mistura gasosa consistiu em oxigénio a 25%, xénon apenas a 20% e equilibrada com azoto. Esta temperatura e a concentração de xénon foi apresentada em experiências preliminares como conferindo o benefício neuroprotector ao cérebro em desenvolvimento, quando utilizado independentemente. Assim, ao utilizar estes valores, qualquer benefício neuroprotector é indicador de sinergia entre os dois agentes. Após o tratamento, as crias foram recolocadas junto das suas progenitoras até ao sacrificio.

De modo a demonstrar que os valores utilizados no grupo de combinação conferiram neuroprotecção quando utilizados independentemente, foram utilizados mais dois grupos experimentais de ratos: um grupo foi submetido a hipotermia (como anteriormente) a 35 °C e o outro grupo foi exposto a xénon a uma concentração de 20%.

Preparação do Tecido

Recolha dos Cérebros

Os cérebros foram retirados às 16, 24 e 48 h após o final do protocolo experimental.

Os animais foram sacrificados com uma overdose de pentobarbital (100 mg/kg) intraperitoneal e, depois, recolhido o sangue com 2,5 µ/mL de heparina em PBS via perfusão transcardíaca através do ventrículo esquerdo. A isto seguiu-se a perfusão com 20 mL de paraformaldeído a 4% em PBS e subsequente remoção do cérebro. Os cérebros foram depois pós-fixados de um dia para o outro no mesmo fixador. Para cada grupo de tempo, o número de cérebros, controlo ou experimental, foi dividido igualmente e cada um seccionado como secções congeladas para immuno-histoquímica ou embebidos em parafina para análise histológica. De modo a distinguir entre os hemisférios contralateral e ipsilateral, foi utilizado um clip para fazer um buraco no hemisfério contralateral não afectado (esquerdo) antes do seccionamento.

Integração em Parafina

Após pós-fixação, os cérebros para histologia foram desidratados utilizando um processador de integração de tecidos Histokinette 2000 (Leica R.U. Ltd., Milton Keynes, R.U.) e, depois, integrados em blocos de cera de parafina. Os cérebros integrados em parafina foram cortados em secções coronais a uma espessura de 5 µm utilizando um micrótomo (Leica, Alemanha). A Figura 10.3 ilustra a área do cérebro a partir da qual foram

retiradas as secções. Foram retiradas, aproximadamente, 20 secções de cada cérebro da região do hipocampo, (uma vez que esta é a área mais vulnerável a lesão por HI a cerca de -3,6 mm da bregma).

Secções Congeladas

Depois dos cérebros terem sido pós-fixados de um dia para o outro, foram crioprotegidos em sacarose a 30% em PBS (este também continha 2 mg/mL de azida de sódio) e armazenados no frigorífico durante 48 h ou até ficarem submersos no fundo do tubo. Os cérebros foram depois congelados em composto O.C.T (BDH, Poole, Inglaterra) a -22 °C e foram cortadas secções coronais de 30 µm num sliding cryostat (Bright Instrument Company Ltd., Huntingdon, R.U.). Os cérebros em secções foram armazenados no frigorífico em poços contendo PBS 0,1 M PBS e 1 mg/mL de azida de sódio, antes de serem corados para imuno-histoquímica (ver abaixo).

Processos de Coloração

Histologia

As secções embebidas em parafina foram montadas em lâminas e coradas com violeta de cresilo para a histologia, como descrito anteriormente (Wilhelm *et al.*, 2002).

Análise Neuropatológica de Necrose e Apoptose

Microscopia Histológica

A lesão neuronal foi avaliada por análise histológica de secções de cérebro em parafina coradas com violeta de cresilo. O violeta de cresilo é um corante básico que se liga aos componentes acídicos do citoplasma neuronal, tal como ribossomas ricos em ARN e também ao núcleo e nucléolo de células nervosas. Esta técnica foi utilizada para avaliar a viabilidade celular e determinar se as células não viáveis exibiam apoptose ou necrose com base em critérios morfológicos validados (Nakajima *et al.*, 2000).

Cada um dos grupos experimentais consistiu em três grupos de tempo (16, 24, 48 h) e cada grupo de tempo continha três animais (assim, existem nove animais no total para cada grupo experimental). Foram escolhidas três lâminas por animal da área do cérebro que foi - 3,6 mm da bregma (Figura 11). As secções foram depois divididas nos grupos de tempo e o examinador foi cego á intervenção.

Foram analisadas duas áreas do lado ipsilateral de cada cérebro utilizando um microscópio de luz BX60 (Olympus, Southall, R.U.) - uma no córtex e uma no girus do hipocampo (Figura 11). Foram utilizadas lentes com objectiva de 40x com uma grelha para contar o número total de células que aparecem na grelha. As células foram classificadas como viáveis, apoptóticas ou necróticas com base na sua aparência morfológica e a percentagem de cada tipo de célula foi registado para cada uma das áreas do cérebro. Juntamente com o microscópio foi utilizada

uma câmara digital Axiocam (Zeiss, Göttingen, Alemanha) para tirar fotomicrografias das secções de cérebro.

Os critérios para distribuir as células em cada uma das categorias foram como abaixo (Figura 12):

1. As células que sofreram qualquer tipo de morte celular (apoptose ou necrose) absorveram o corante violeta de cresilo mais intensamente do que as células viáveis, que apresentavam uma forma mais regular com o citoplasma pálido e um núcleo mais escuro e claramente visível.
2. As células classificadas como apoptóticas apresentaram núcleos encolhidos e corados muito escuros que apresentavam uma forma esférica e uma membrana celular intacta, muitas vezes, com uma área circundante de vacuolação.
3. As células necróticas, por outro lado, embora também coradas muito intensamente, apresentavam núcleos aumentados e de forma muito irregular. O número de células apoptóticas, necróticas e viáveis foi expresso como uma percentagem do número total de células e anotado para cada lâmina. Foi depois calculada uma percentagem média para cada um dos animais a partir das três lâminas, de modo a que cada um dos três animais num grupo de tempo tenha apenas um valor. Foi determinada outra média destes três animais de modo a obter apenas um valor para cada grupo de tempo e foi registado o desvio padrão.

Análise Estatística

A análise dos dados foi efectuada utilizando ANOVA unilateral seguida por Student-Newman-Keuls quando apropriado. Um $p < 0,05$ foi considerado como sendo estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Xénon e Hipotermia como Agentes Independentes

O xénon é neuroprotector no recém-nascido através de um mecanismo anti-apoptótico

A análise microscópica da região cortical e hipocampal do cérebro demonstrou as propriedades neuroprotectoras do xénon através da aparência morfológica semelhante de cérebros tratados com xénon, em comparação com cérebros simulados e a diferença na aparência quando comparados com cérebros de ratos que não foram tratados com xénon (Figura 14). Foi obtida neuroprotecção acentuada contra agressão hipóxica-isquémica no rato neonatal pela utilização de xénon à sua concentração máxima (75%) e tal foi quantificada por análise histológica de secções de cérebro coradas com violeta de cresilo. A utilização independente desta concentração de xénon diminuiu, significativamente, a morte celular apoptótica e aumentou a contagem de células viáveis. Às 16 h, a apoptose no córtex diminui de $36,5\% \pm 2,5\%$ nos controlos positivos para $8,5\% \pm 1,6\%$ ($p < 0,001$) e a contagem de células viáveis aumentou de $52,9\% \pm 2,3\%$ nos controlos positivos para $80,6\% \pm 0,2\%$ ($p < 0,001$) (Figura 13A). No girus, a apoptose diminuiu de $33,6\% \pm 1,8\%$ nos controlos positivos para

13,9% \pm 2,4% ($p < 0,01$) e a contagem de célula viáveis aumentou de 56,5% \pm 2,6% nos controlos positivos para 77,1% \pm 3,3% ($p < 0,01$) (Figura 13B). Os grupos de 24 e 48 h (Figuras 15 e 16, respectivamente) apresentaram resultados semelhantes ao grupo de 16 h, com o xénon a exibir anti-apoptose estatisticamente significativa, quando comparado com os animais de controlo positivo, no córtex e girus. A anti-necrose pelo xénon não foi estatisticamente significativa no córtex a 48 h, onde diminui a necrose de 16,6% \pm 0,2% nos controlos positivos para 10,7% \pm 0,4% ($p < 0,01$) (Figura 16A).

No entanto, o xénon não foi anti-necrótico no girus às 48 h (Figura 16B). Em todos os outros grupos de tempo (16 e 24 h), o xénon não foi anti-necrótico.

90 minutos de hipotermia a 33 °C depois de HI moderada é ineficaz

Não foi observada neuroprotecção com 33 °C de hipotermia às 16 ou 24 h (Figuras 13 e 15, respectivamente). Às 16 h, a hipotermia pareceu ter um efeito anti-apoptótico significativo no córtex, mas como a contagem de células viáveis não foi estatisticamente diferente dos animais do controlo positivo, pode-se concluir que esta intervenção não proporcionou neuroprotecção.

No entanto, às 48 h a hipotermia foi neuroprotectora via um mecanismo anti-necrótico no córtex, reduzindo a contagem de células necróticas de 16,6% \pm 0,2% nos controlos positivos para 12% \pm 2,3% e aumentando a contagem de células viáveis de 43% \pm 3,4% para 52,3% \pm 3,1% (Figura 16A). No girus às 48 h, a

hipotermia proporcionou neuroprotecção de um modo anti-apoptótico (Figura 16B).

Xénon e Hipotermia em Combinação

Tratamento com xénon a 20% isoçadamente não demonstra neuroprotecção

Ao contrário dos resultados obtidos com xénon a 75%, xénon a 20% não exerce efeito neuroprotector. Ao observar a Figura 17, pode ser observado que a percentagem de apoptose observada no córtex do grupo de xénon a 20% às 16 h é de $36\% \pm 5,7\%$ em comparação com $37\% \pm 2,5\%$ nos animais do controlo positivo ($p > 0,05$) e a percentagem de viabilidade é de $51\% \pm 7,8\%$ em comparação com $53\% \pm 2,3\%$, respectivamente ($p > 0,05$), (i. e., não existe diferença estatística entre os grupos de 20% e controlo positivo). Os dados do girus produziram resultados muito semelhantes.

Tratamento com hipotermia a 35 °C isoladamente não proporciona neuroprotecção

A hipotermia a 35 °C utilizada isoladamente é ineficaz contra HI e não mostra diferença estatística em qualquer área do cérebro quando comparada com os controlos positivos. A percentagem de apoptose é de $48\% \pm 10,1\%$ versus $37\% \pm 2,5\%$ nos controlos positivos e a percentagem de viabilidade celular é de $44\% \pm 10,3\%$ versus $53\% \pm 2,3\%$.

O tratamento com uma combinação de xénon a 20% + hipotermia a 35 °C demonstra neuroprotecção sinérgica via um mecanismo anti-apoptótico. Ao utilizar intervenções que provaram ineficácia de xénon (20%) ou hipotermia (35 °C) em combinação, foi demonstrada uma profunda neuroprotecção sinérgica em ambas as áreas do cérebro e em todos os três grupos de tempo (16, 24 e 48 h) via um mecanismo anti-apoptótico. A aplicação após isquemia do tratamento de combinação reduziu, significativamente, o nível de morte celular apoptótica e aumentou a proporção de células viáveis (ver Figura 17). Às 16 h no córtex, verificou-se que a redução da apoptose, devido à terapia de combinação, foi de $35,8\% \pm 5,7\%$ e $47,6\% \pm 10,1\%$ nos grupos de xénon a 20% e hipotermia a 35 °C, respectivamente, para apenas $7,2\% \pm 2\%$ no grupo de combinação ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), enquanto as células viáveis aumentaram de $51\% \pm 7,8\%$ e $43,7\% \pm 10,3\%$ para $82,3\% \pm 4,9\%$ ($p < 0,01$ em ambos os grupos). Os dados do girus produziram resultados semelhantes (Figura 17B) excepto o grupo das 24 h, que pareceu proporcionar uma protecção anti-necrótica bem como anti-apoptótica.

Considerando o facto de que não foi proporcionada neuroprotecção pelos agentes individuais, os resultados da combinação são surpreendentes e, certamente, muito superiores aos que foram previstos. O nível de neuroprotecção proporcionado pela combinação de duas intervenções ineficazes individualmente demonstra que existe sinergia *in vivo* entre o xénon e hipotermia.

REFERÊNCIAS

- Albers, G., Goldberg, M.P., Choi, D.W., 1989. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann Neurol* 25: 398-403.
- Ankarcrona, M., 1995. Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973.
- Arias, R.L., Tasse, J.R.P., Bowlby, M.R., 1999. Neuroprotective interaction effects of NMDA and AMPA receptor antagonists in an *in vitro* model of cerebral ischemia. *Brain Research* 816: 299-308.
- Balduini, W., De Angelis, V., Mazzoni, E., Cimino, M., 2000. Long-lasting behavioural alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research* 859: 318-325.
- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-38.
- Bosley, T.M., Woodhams, P.L., Gordon, R.D., Belazs, R., 1983. Effects of anoxia on the stimulated release of amino acid neurotransmitters in the cerebellum *in vitro*. *J. Neurochem* 40: 189-201.
- Busto, R., Dietrich, W.D., Globus, M.Y.T., 1987. Small differences in intraischemic brain temperature critically

determine the extent of ischemic neuronal injury. *Blood Flow Metab* 7: 729-738.

Choi, D.W., Koh, J-Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J. Neurosci* 8: 185-196.

Choi, D.W., Rothman, S.M., 1990. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-182.

Chopp, M., Knight, R., Tidwell, C.D., Helpern, J.A., Brown, E., Welch, K.M., 1989. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hypothermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 141-148.

Chow, A., Ma, D., Hossain, M., Franks, N.P., Maze, M., 2003. Combined neuroprotection by xenon and hypothermia. *Society Neuroscience Abstract* 293 (1).

Clancy, B., Darlington, R.B., Finlay, B.L., 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neurosci* 105(1): 7-17.

Cullen, S.C., Gross, E.G., 1951. The anaesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science* 113: 580-581.

Debillon, T., Daoud, P., Durand, P., Cantagrel, S., Jouvet, P., Saizou, C., Zupan, V., 2003. Whole-body cooling after

perinatal asphyxia: a pilot study in term neonates. Developmental Medicine and Child Neurology 45: 17-23.

Dingledine, R., McBain, C.J., 1999. Glutamate and aspartate in: Siegel, S.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D., (Eds), Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects, 6^a edição, Lippincott-Raven, pp 316-333.

Eilers, H., Bickler, P.E., 1996. Hypothermia and Isoflurane similarly inhibit glutamate release evoked by chemical anoxia in rat cortical brain slices. Anesthesiology 85: 600-607.

Engelhard, K., Werner, C., Eberspächer, E., Bachl, M., Blobner, M., Eberhard, H., Hutzler, P., Eberhard, K., 2003. The effect of the α 2-agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. Anesth Analg 96: 524-531.

Erecinska, M., Nelson, D., Wilson, F., Silver, I.A., 1984. Neurotransmitter amino acid levels in rat brain during ischemia and reperfusion. Brain Research 304: 9-22.

Franks, N.P., Dickinson, R., de Sousa, S.L.M., Hall, A.C., Lieb, W.R., 1998. How does xenon produce anaesthesia? Nature 396(6709): 324.

Goto, T., Nakata, Y., Morita, S., 2003. Will xenon be a stranger or a friend? Anesthesiology 98: 1-2.

Goto, T., Saito, H., Nakata, Y., Uezono, S., Ichinose, F., Morita, S., 1997. Emergence times from xenon anaesthesia are independent of the duration of anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 79: 595-599.

Graham, S.H., Shiraishi, K., Panter, S.S., Simon, E.P., Faden, A.I., 1990. Changes in extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 110: 124-130.

Gunn *et al.*, 2000. *Curr Opin Pediatr.* Apr; 12(2): 111-5.

Gwag, B.J., Koh, J.Y., Demaro, J.A., Ying, H.S., Jacquin, M., Choi, D.W., 1997. Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77: 393-401.

Hardingham, G.E., Bading, H., 2003. The yin and yang of NMDA receptor signalling. *Trends in Neuroscience* 26(2): 81-89.

Hauptman, M., Nelson, D., Wilson, D.F., Erecinska, M., 1984. Some changes in amino acid levels in rat brain synaptosomes during and after in vitro anoxia and simulated ischemia. *Brain Research* 304: 23-35.

Hill, I.E., MacManus, J.P., Rasquinha, I., Tuor, U.I., 1995. DNA fragmentation indicative of apoptosis following unilateral cerebral hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res* 676: 398-403.

Homi, H.M., Yokoo, N., Ma, D., Warner, D.S., Franks, N.P., Maze, M., Grocott, H.P., 2003. The neuroprotective effect

of xenon administration during transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Anesthesiology* 99: 876-881.

Ikeda, M., Nakazawa, T., Abe, K., Kaneko, T., Yamatsu, K., 1989. Extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus induced by ischemia is not calcium dependent in vitro and in vivo evidence. *Neurosci Lett* 96: 202-206.

Ikonomidou, C., Bittigau, P., Koch, C., Genz, K., Hoerster, F., Felderhoff-Mueser, U., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W., 2001. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical Pharmacology* 62: 401-405.

Ikonomidou, C., Mosinger, J.L., Olney, J.W., 1989. Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. *Brain Research* 487: 184-187.

Ikonomidou, C., Mosinger, J.L., Salles, K.S., 1989. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *J Neurosci* 9: 2809.

Ikonomidou, C., Price, M.T., Mosinger, J.L., 1989. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate like cytopathology in infant rat brain. *J Neurosci* 9: 1693.

Jevtovic-Todorovic, V., Olney, J.W., 2003. Neuroprotective agents in: Evers, A.S., Maze, M., (Eds), *Anesthetic Pharmacology: Physiological principles and clinical practice*, Churchill Livingstone, pp 557-572.

Johnston, M.V., 1983. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. Ann Neurol 13: 511-518.

Katja, C.Z., Green, D.R., 2001. How cells die: Apoptosis pathways. J Allergy Clin Immunol 108(4): S99-S103.

Kauppinen, R.A., McMahon, H., Nicholls, D.G., 1988. Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca²⁺-concentration in isolated nerve terminals following *in vitro* hypoglycaemia and anoxia. Neuroscience 27: 175-182.

Komuro, R.P., 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. Science 260: 95.

Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, R., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers, M.B., Charney, D.S., 1994. Subanaesthetic effects of the non-competitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive and neuroendocrine responses. Arch Gen Psychiatry 51: 199-214.

Kudo, M., Aono, M., Lee, Y., Massey, G., Pearlstein, R.D., Warner, D.S., 2001. Effects of volatile anesthetics on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronalglial cultures. Anesthesiology 95: 756-765.

Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. Experimental Cell Research 239: 183-201.

Levine, S., 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. Am J Pathol 36: 1-17.

Low, J.A., 1993. The relationship of asphyxia in the mature fetus to long-term neurologic function. Clinical Obstetrics and Gynaecology 36(1): 82-90.

Ma, D., Wilhelm, S., Maze, M., Franks, N.P., 2002. Neuroprotective and neurotoxic properties of the "inert" gas, xenon. British Journal of Anaesthesia 89: 739-746.

MacDonald, J.F., Schneiderman, J.H., Miljkovic, Z., 1986. Excitatory amino acids and regenerative activity in cultured neurons. Adv Exp Med Biol 203: 425.

Mehmet, H., 2000. Caspases find a new place to hide. Nature 403: 29-30.

Muir, K.W., Lees, K.R., 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. Stroke 26: 503-513.

Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., Gabrielson, K.L., Wilson, M.A., Martin, L.J., Blue, M.E., Johnston, M.V., 2000. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. J Neurosci 20(2): 7994-8004.

Nakata, Y., Goto, T., Morito, S., 2001. Clinical pharmacology of xenon. Int Anesthiol Clin 39: 63-75.

Nicholls, D.G., Budd, S.L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. Physiol Rev 80: 315-360.

Northington, F.J., Ferriero, D.M., Graham, E.M., Traystman, R.J., Martin, L.J., 2001. Early neurodegeneration after hipoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiology of Disease* 8: 207-219.

Olney, J.W., 2003. Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology* 3: 101-109.

Olney, J.W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T., Sesma, M.A., 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254: 1515-1518.

Onitsuka, M., Satoshi, M., Inokuchi, H., Shigemori, M., Higashi, H., 1998. Mild hypothermia protects rat hippocampal CA1 neurons from irreversible membrane dysfunction induced by experimental ischemia. *Neuroscience Research* 30: 1-6.

Pellegrino-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiana, M., Carla, V., Moroni, F., 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced damage. *J. Neurosci* 10: 1035-1041.

Perlman, J.M., 1999. Markers of asphyxia and neonatal brain injury. *NEJM* 341(5): 364-365.

Petzelt, C., Blom, P., Schmehl, W., Müller, J., Kox, W.J., 2003. Prevention of neurotoxicity in hypoxic cortical

neurons by the noble gas xenon. *Life Sciences* 72: 1909-1918.

Pohl, D., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., 1999. N-methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 96: 2508.

Reinelt, H., Marx, T., Schirmer, U., Schmidt, M., 2001. Xenon expenditure and nitrogen accumulation in closed-circuit anaesthesia. *Anaesthesia* 56(4): 309-311.

Riccio, A., Ginty, D.D., 2002. *Nature Neurosci* 5(5): 389-390.

Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131-141.

Rothman, S.M., Olney, J.W., 1986. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111.

Sanders, R.D., Franks, N.P., Maze, M., 2003. Xenon: no stranger to anaesthesia. *BJA* 91(5): 709-717.

Sattler, R., Xiong, Z., Lu, W., MacDonald, J.F., Tymianski, M., 2000. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 20(1): 22-33.

Shichino, T., Murakawa, M., Adachi, T., Miyazaki, Y., Segawa, H., Fukuda, K., Mori, K., 2002. Effects of xenon on

acetylcholine release in the rat cerebral cortex *in vivo*.
British Journal of Anaesthesia 88(6): 866-868.

Talbot, J.H., 1941. The physiologic and therapeutic effects of hypothermia. N Eng J Med 224: 281.

Taylor, D.L., Mehmet, H., Cady, E.B., Edwards, A.D., 2002. Improved neuroprotection with hypothermia delayed by 6 hours following cerebral hypoxia-ischemia in the 14-day-old rat. Ped Res 51(1): 13-19.

Towfighi, J., Housman, C., Heitjan, D.F., Vannucci, R.C., Yager, J.Y., 1994. The effect of focal cerebral cooling on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Acta Neuropathol (Berl.) 87: 598-604.

Treschera, W.H., Ishiwac, S., Johnston, M.V., 1997. Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. Brain and Development 19: 326-338.

Vannucci, R.C., 1997. Hypoxia-ischemia: Clinical Aspects in: Fanaroff, A.A., Martin, R.J., (Eds), Neonatal-perinatal medicine IV, Mosby-Yearbook Inc, Philadelphia, pp 877-891.
Vannucci, R.C., Connor, J.R., Mauger, D.T., Palmer, C., Smith, M.B., Towfighi, J., Vannucci, S.J., 1999. Mini-Revisão: Rat model of perinatal hypoxicischemic brain damage. J Neuro Res 55: 158-163.

Vannucci, R.C., Perlman, J.M., 1997. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatrics 100(6): 1004-1014.

Volpe, 2001. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 7: 56-64.

Wilhelm, S., Ma, D., Maze, M., Franks, N.P., 2002. Effects of xenon on *in vitro* and *in vivo* models of neuronal injury. Anesthesiology 96: 1485-1491.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68: 251-306.

Windle, WF, 1969. Brain Damage by Asphyxia at Birth. Scientific American Oct; 221(4): 76-84.

Xu, L., Yenari, M.A., Steinberg, G.K., Giffard, R.G., 2002. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons *in vitro* early in the cascade. J Cereb Blood Flow Metab 22: 21-28.

Yager, J.Y., Asselin, J., 1996. Effect of mild hypothermia on cerebral energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. Stroke 27: 919-926.

Lisboa, 15 de Fevereiro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal num indivíduo neonatal, em que o referido medicamento é para utilização em combinação com hipotermia.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o xénon é misturado com um diluente, excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável.
3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o medicamento está na forma gasosa.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o medicamento é para ser administrado por inalação.
5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o xénon é para ser administrado na forma de uma mistura 20 a 70% v/v de xénon/ar.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o xénon é para ser administrado por perfusão.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o medicamento está na forma de um líquido ou solução.
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o medicamento está na forma de uma emulsão lipídica.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, em que o medicamento está numa forma adequada para distribuição intravenosa, neuraxial ou transdérmica.
10. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o xénon é para ser administrado simultaneamente, sequencialmente ou separadamente com hipotermia.
11. Utilização de acordo com a reivindicação 10, em que o xénon é para ser administrado simultaneamente com hipotermia.
12. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o xénon é para ser administrado à mãe do indivíduo neonatal antes do nascimento.
13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o xénon é para ser administrado à mãe do indivíduo neonatal antes de, ou durante, o trabalho de parto.
14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o xénon é para ser administrado à mãe do indivíduo neonatal até cerca de 24 horas antes do nascimento.
15. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a hipotermia é para ser mantida durante um período de, pelo menos, 6 horas após a agressão hipóxica-isquémica (HI).
16. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que a hipotermia é para ser mantida durante um período

de cerca de 6 a cerca de 24 horas após a agressão hipóxica-isquémica (HI).

17. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o xénon é para ser administrado numa quantidade terapeuticamente eficaz.
18. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que o xénon é para ser administrado numa quantidade sub-terapeuticamente eficaz.
19. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o xénon é para ser administrado em combinação com um anestésico seleccionado de isoflurano, sevoflurano e desflurano.
20. Utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o indivíduo recém-nascido é um mamífero e a temperatura do mamífero é para ser mantida a uma temperatura de cerca de 32 °C a cerca de 36 °C.
21. Utilização de acordo com a reivindicação 20, em que a temperatura do mamífero é para ser mantida a uma temperatura de cerca de 33 °C a cerca de 35 °C.
22. Utilização de xénon na preparação de um medicamento para o tratamento de asfixia neonatal, em que o referido tratamento comprehende administrar a um indivíduo, simultaneamente, sequencialmente ou separadamente xénon em combinação com hipotermia.

Lisboa, 15 de Fevereiro de 2008

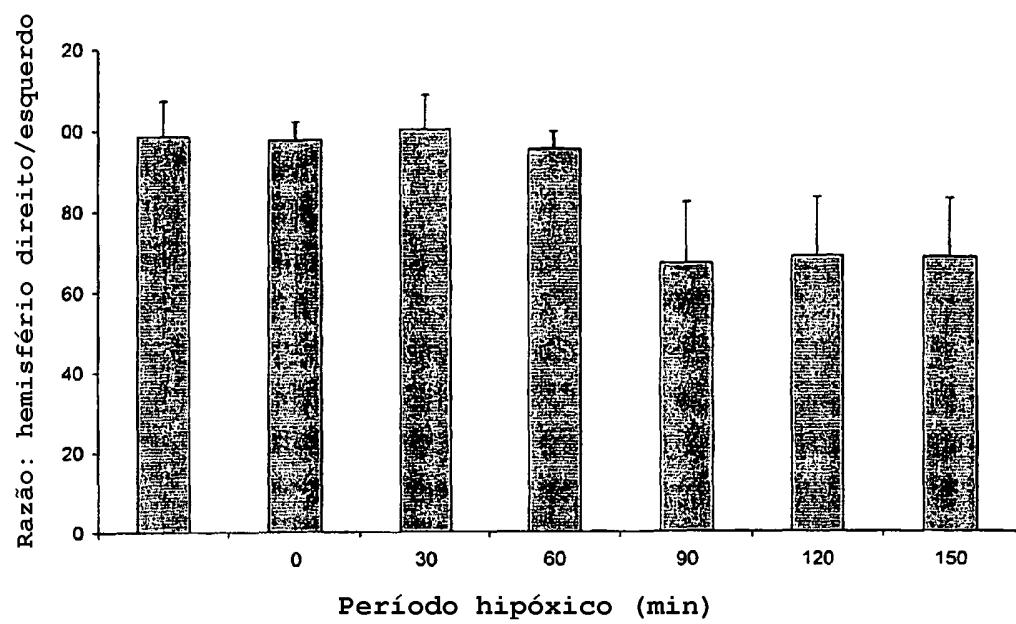


FIGURA 1

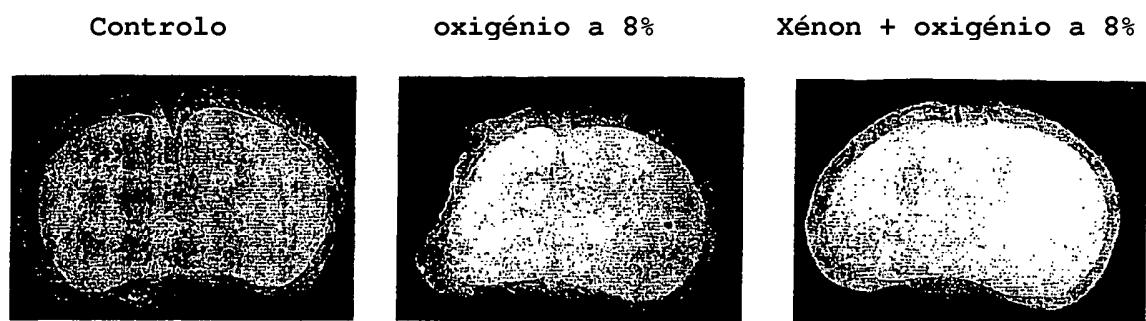


FIGURA 2

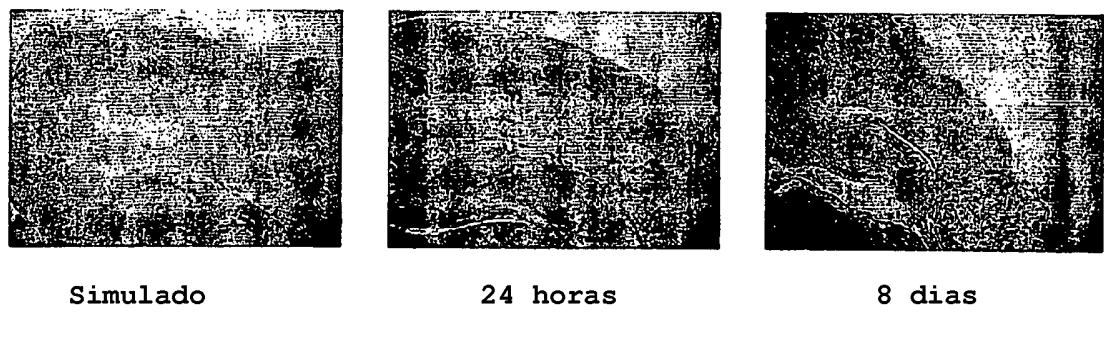


FIGURA 3

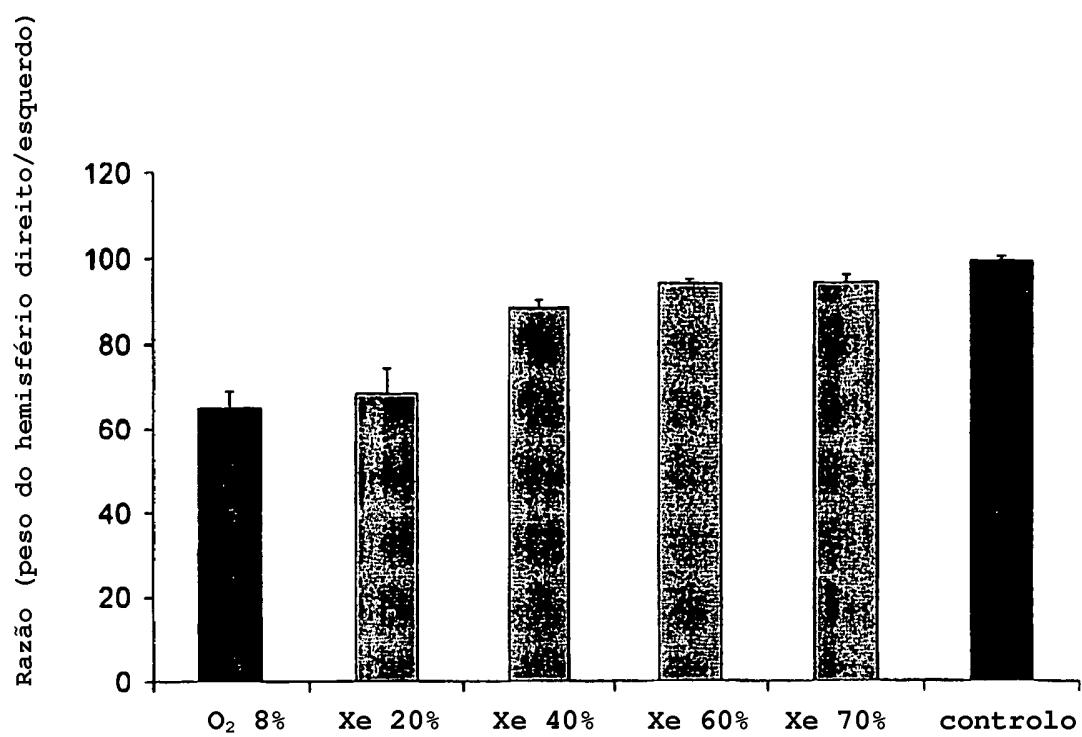


FIGURA 4

Tempo dispendido na Barra Biratória (seg)

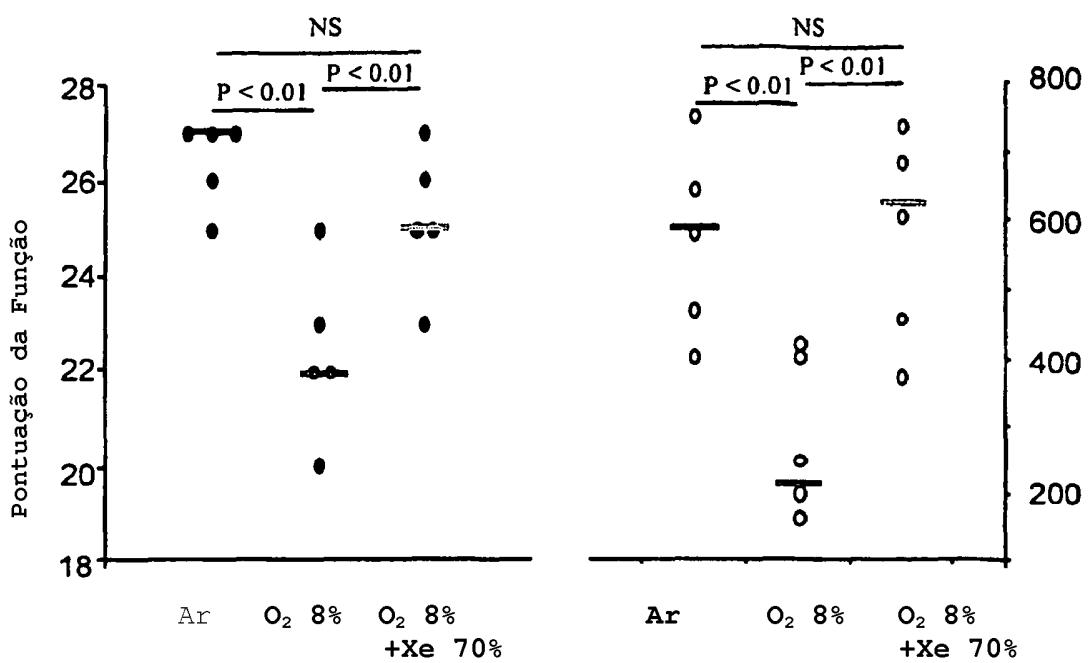


FIGURA 5

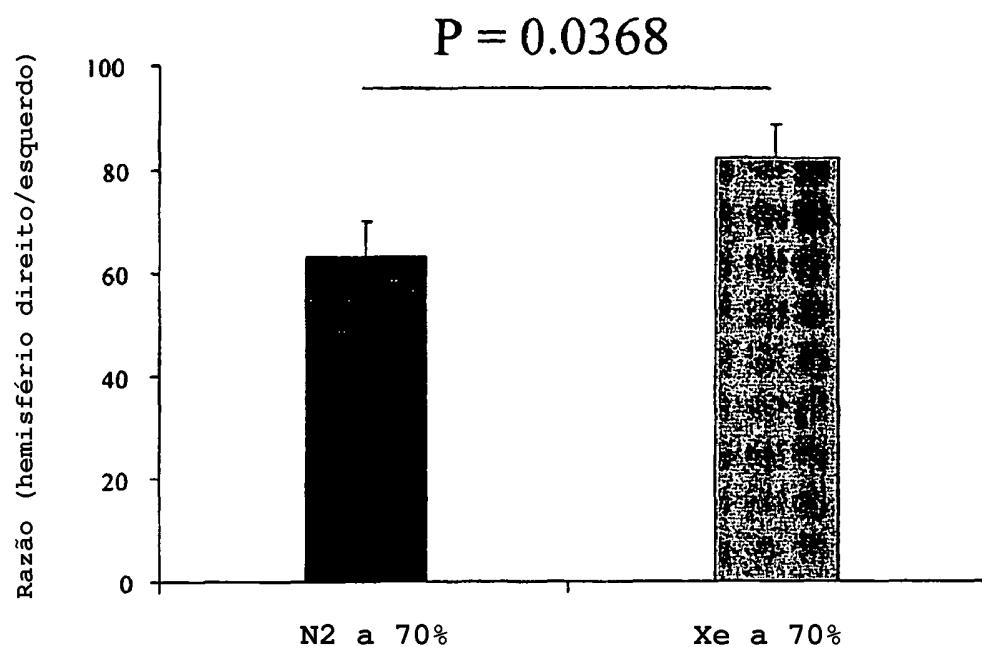


FIGURA 6

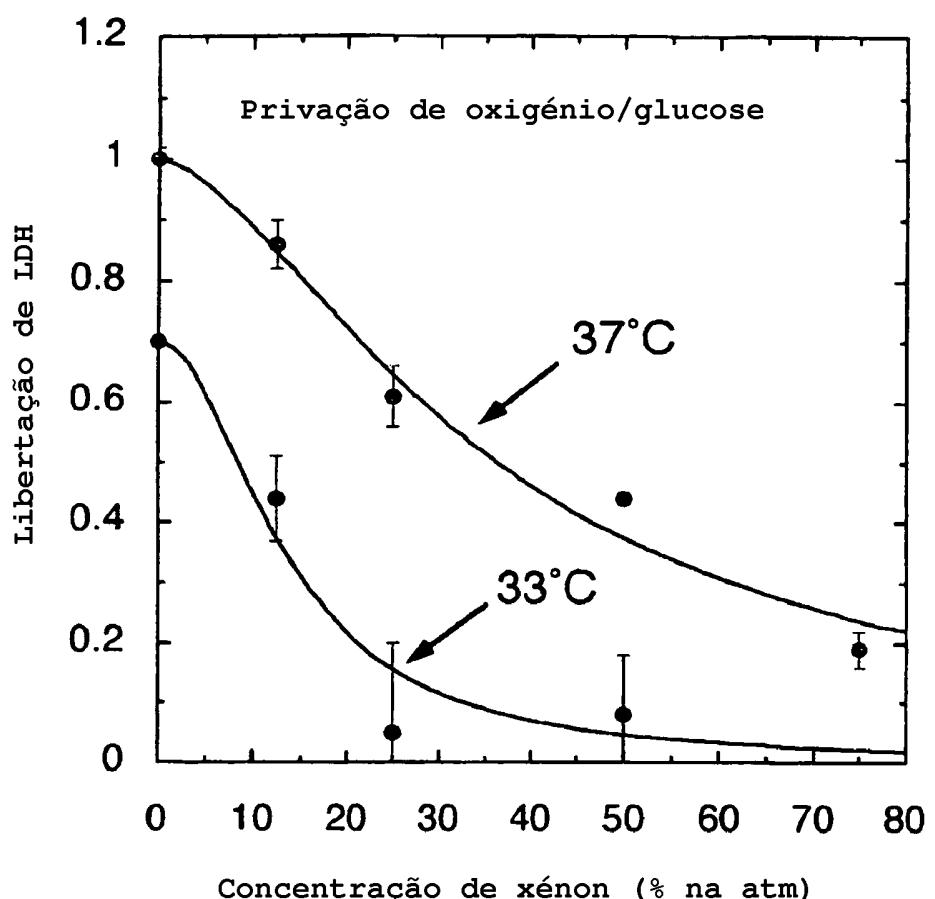


FIGURA 7

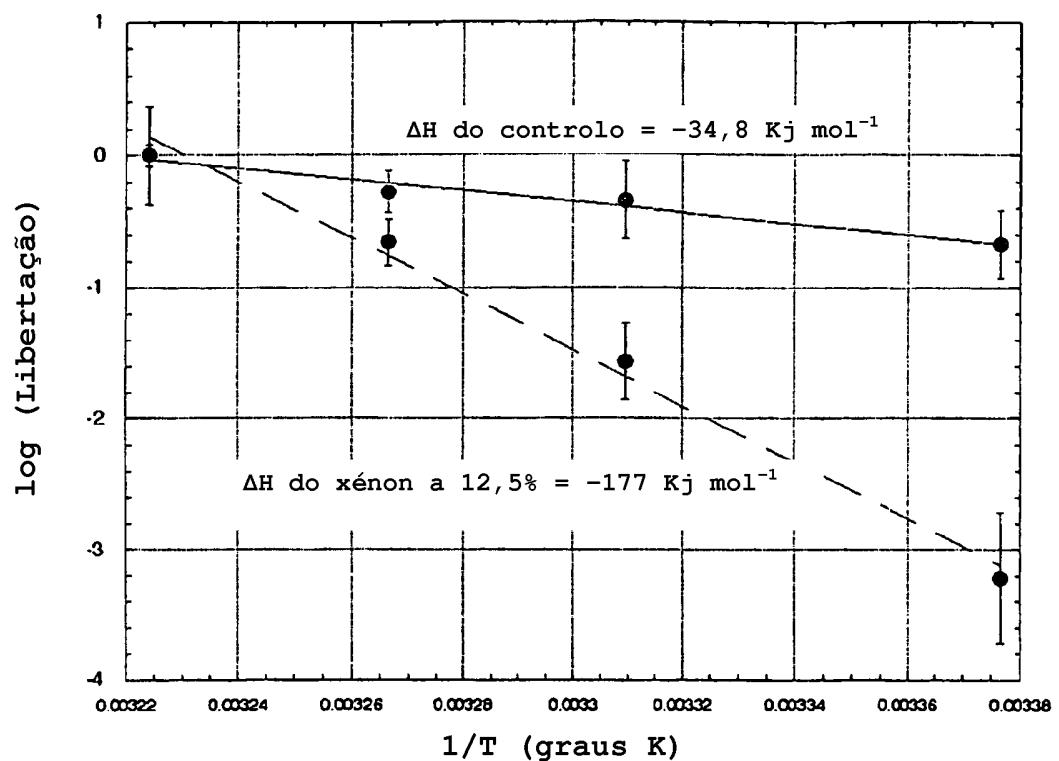


FIGURA 8

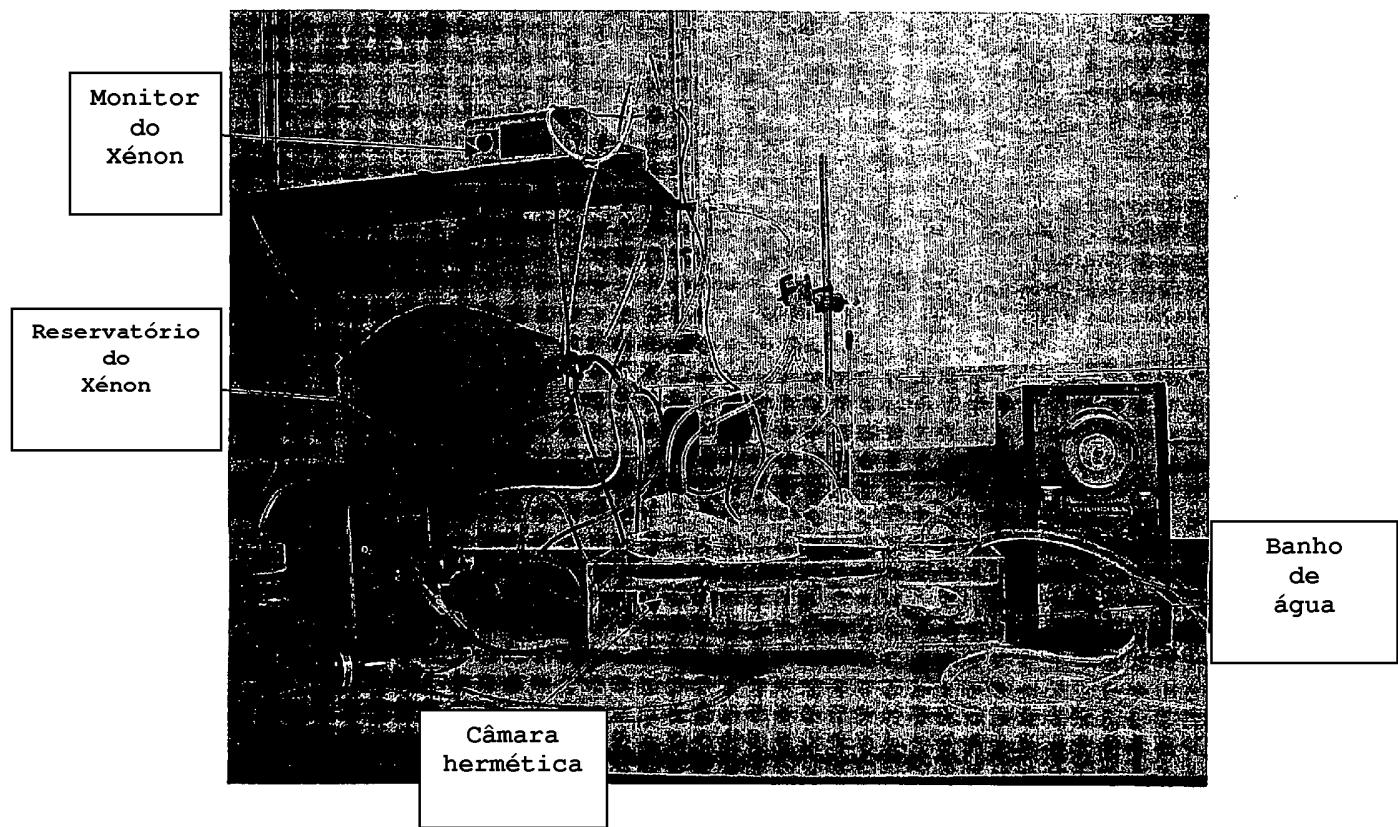


FIGURA 9

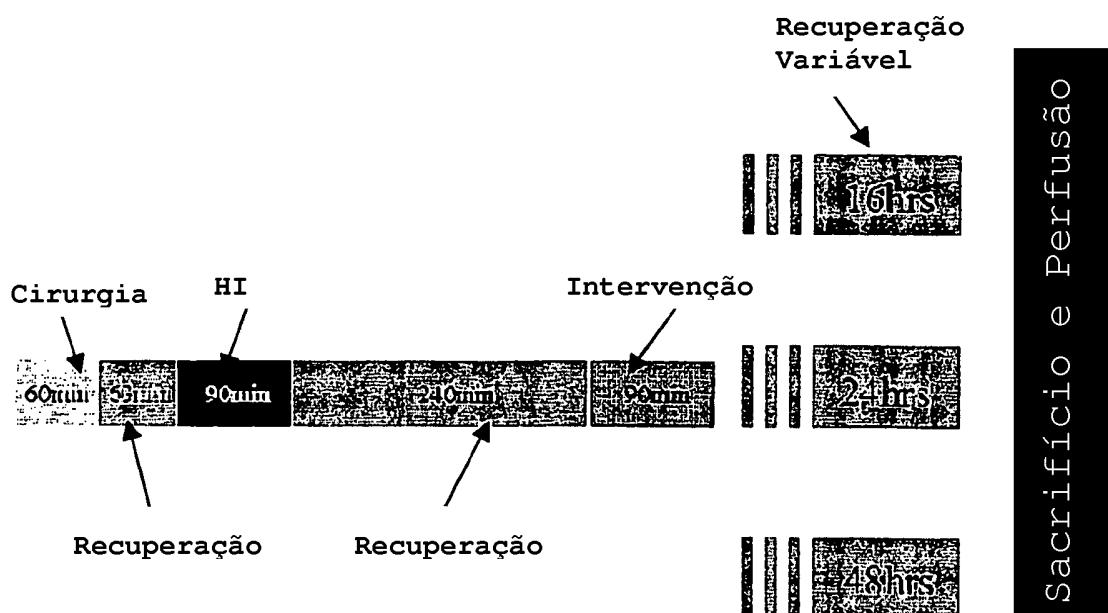


FIGURA 10

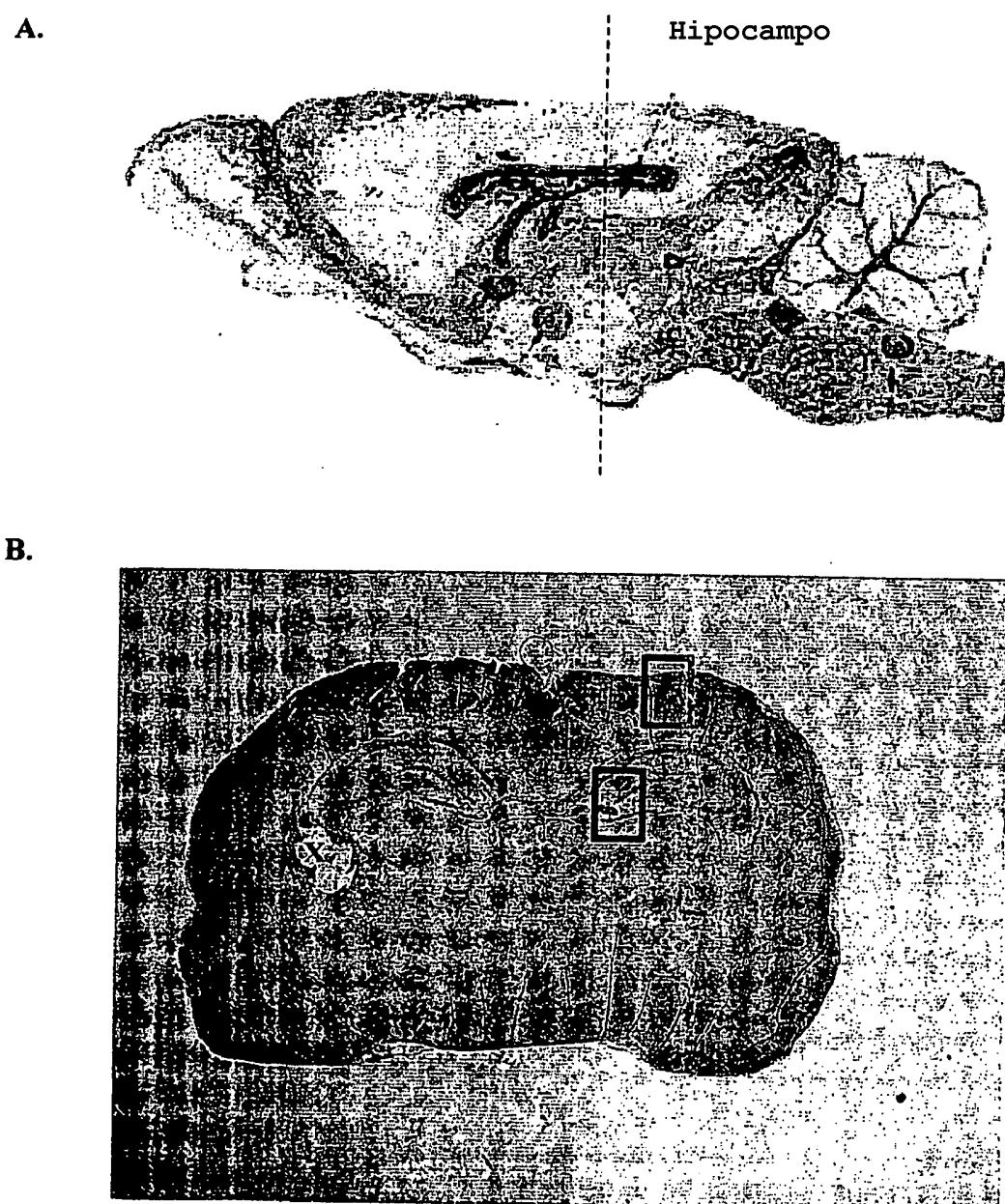


FIGURA 11

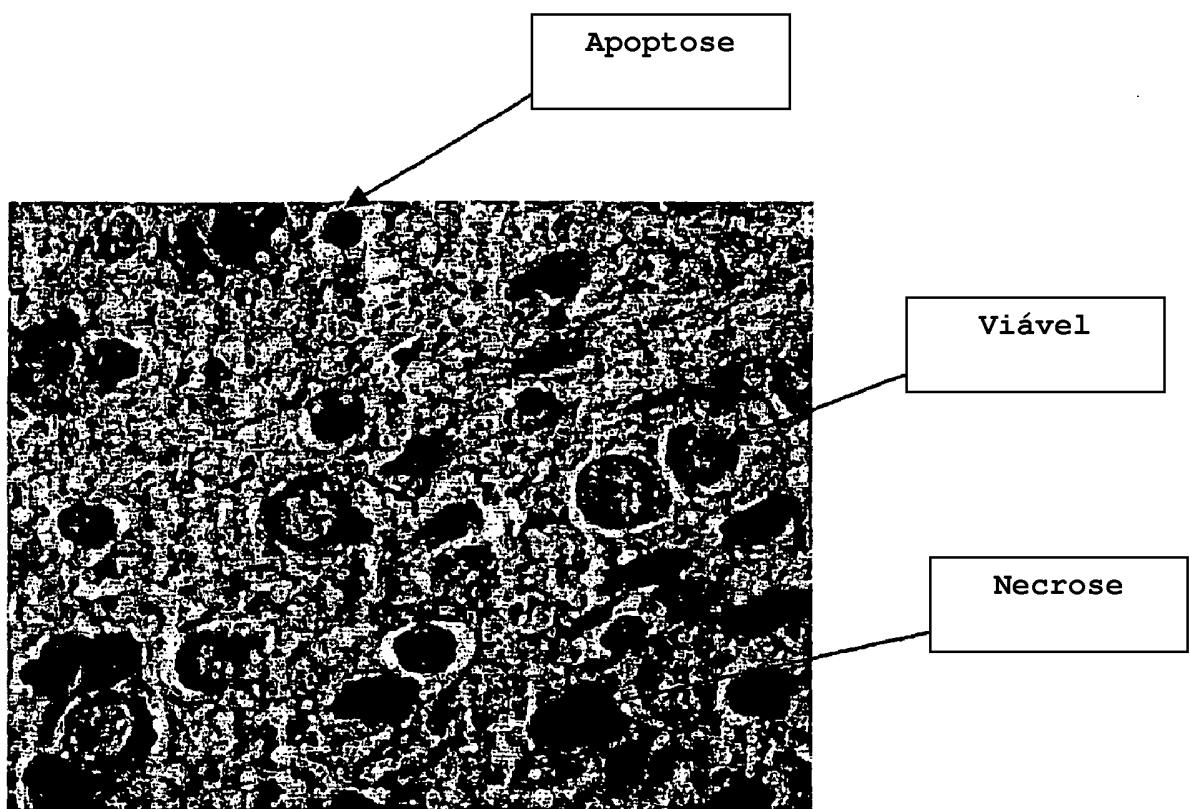
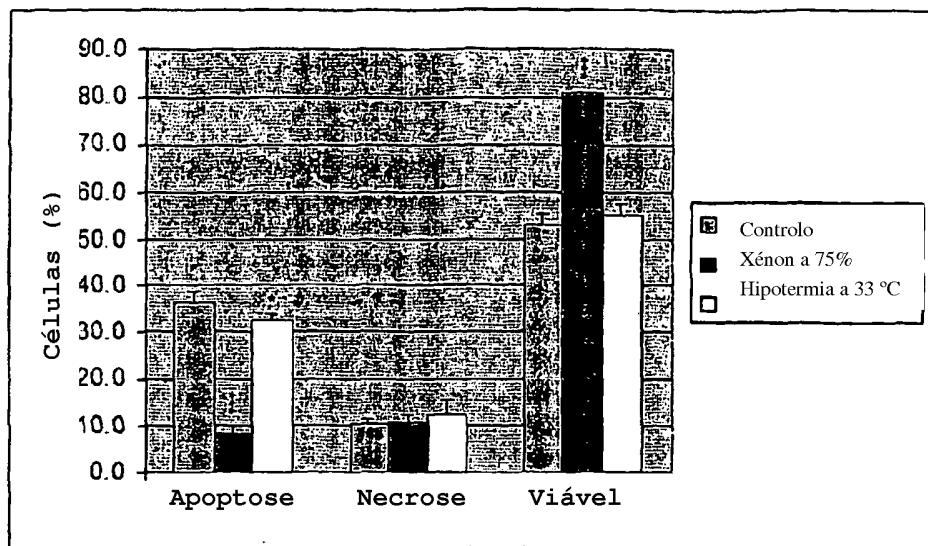


FIGURA 12

A.



B.

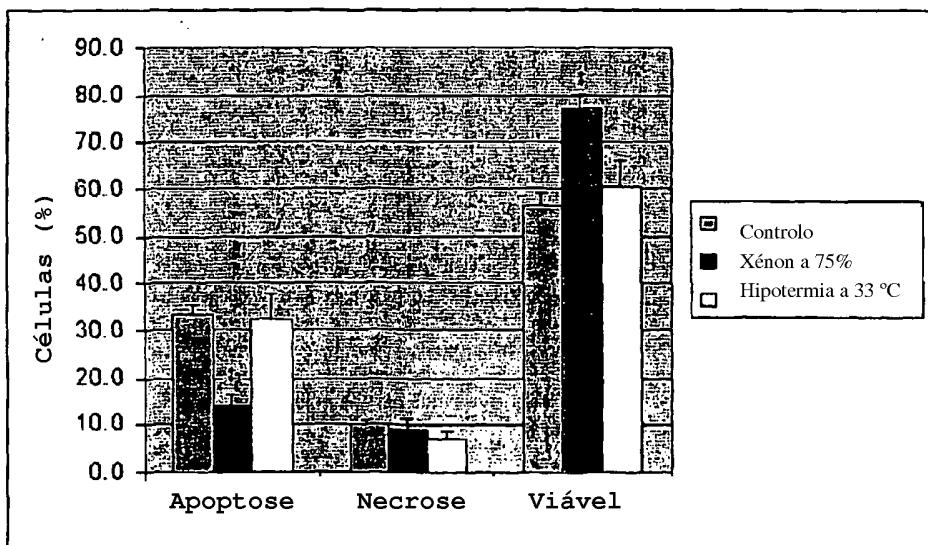


FIGURA 13

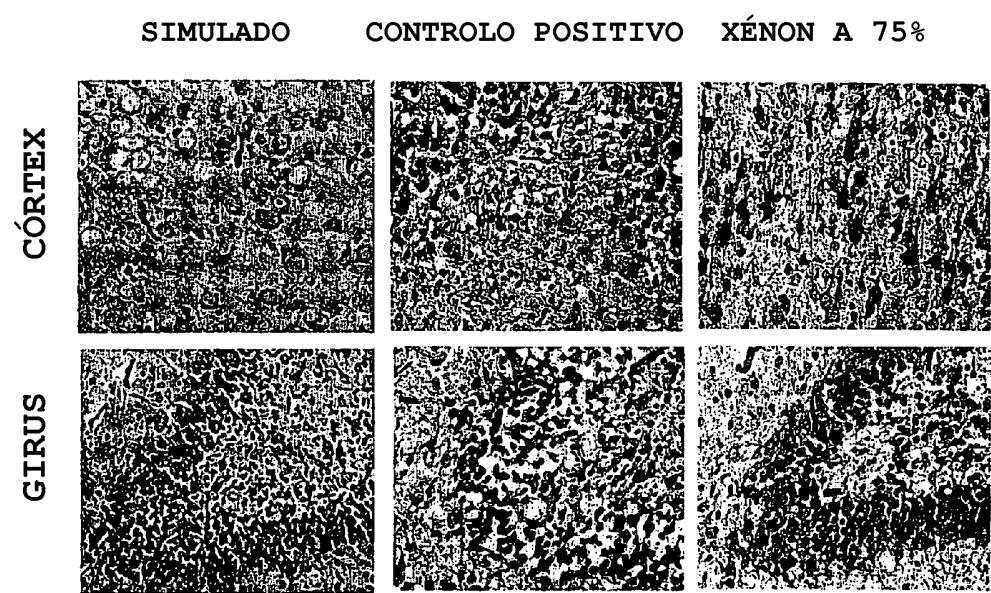
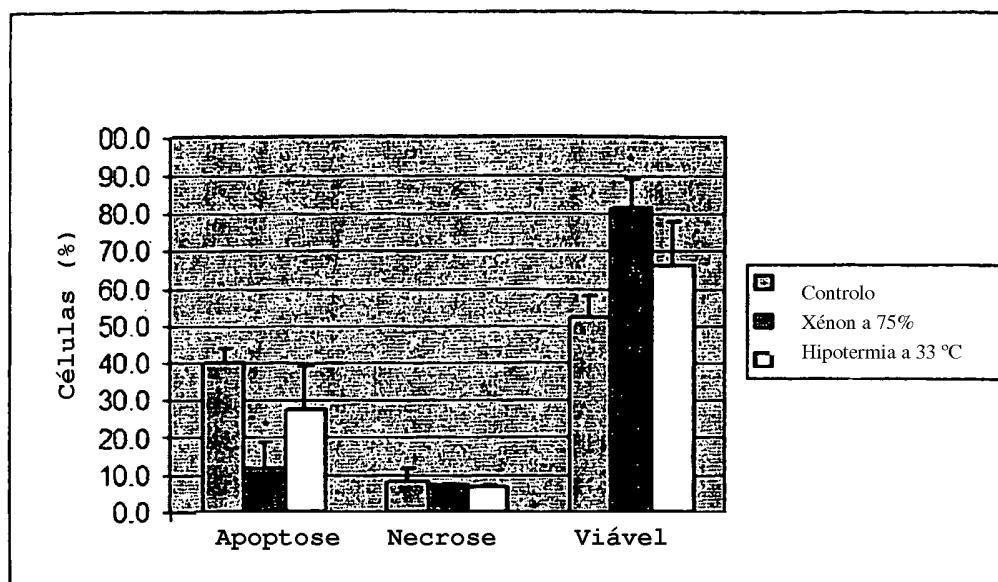
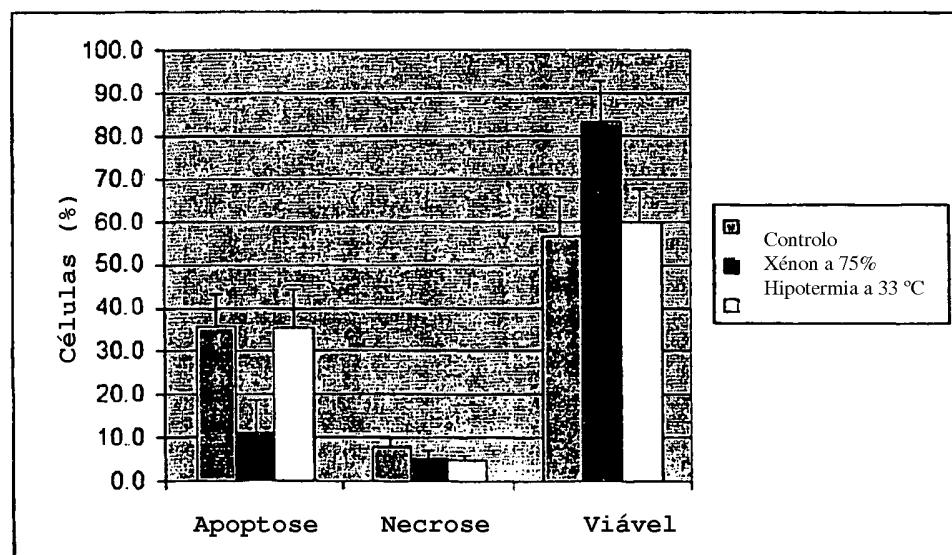
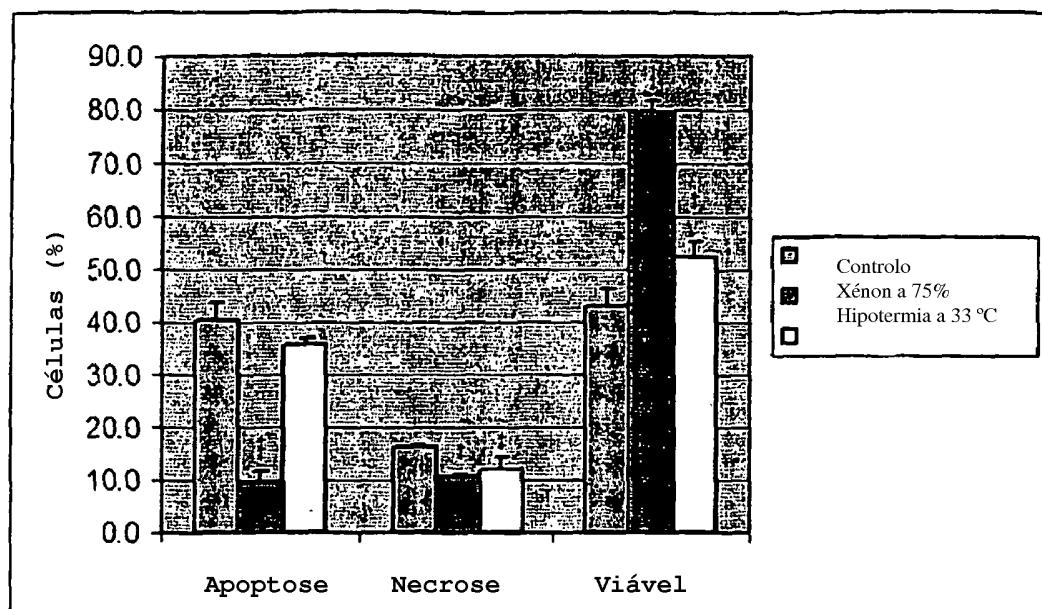


FIGURA 14

A.**B.****FIGURA 15**

A.



B.

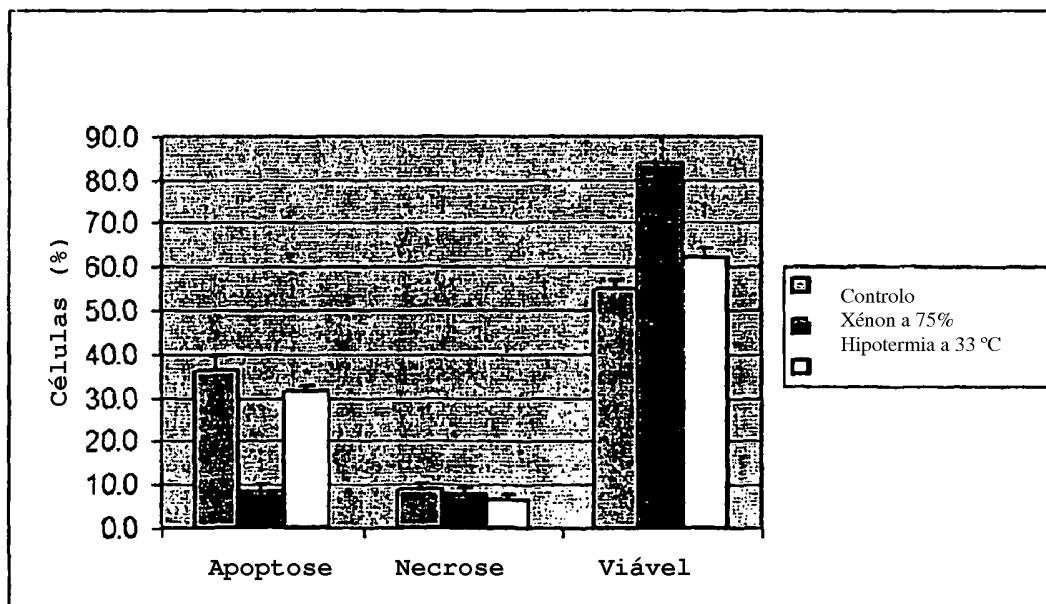
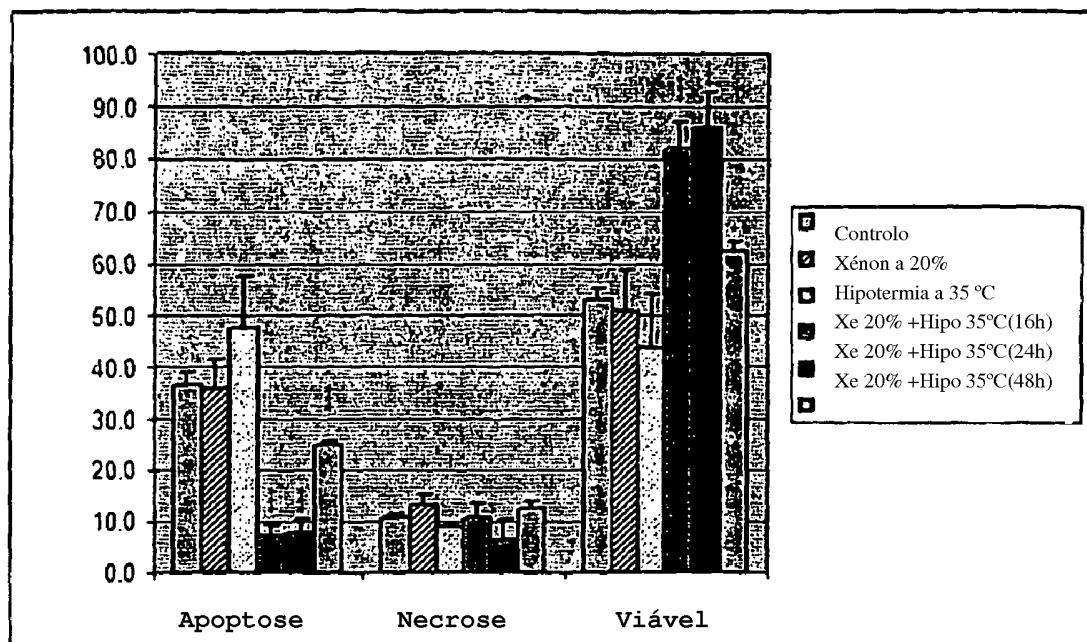


FIGURA 16

A.



B.

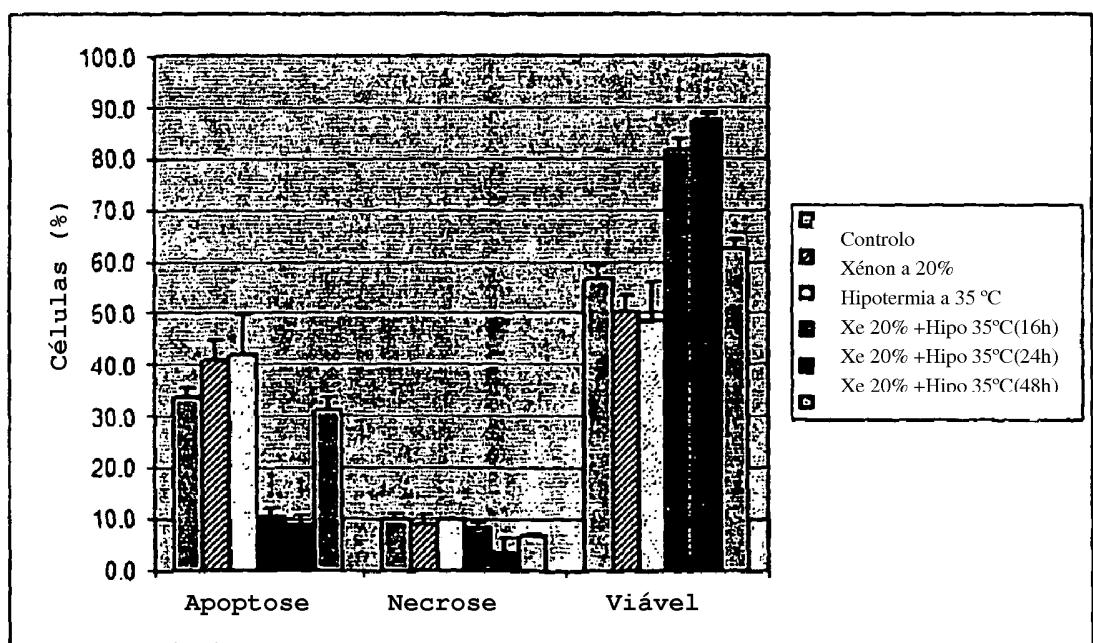


FIGURA 17