



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Tiago Savignon Cardoso Machado

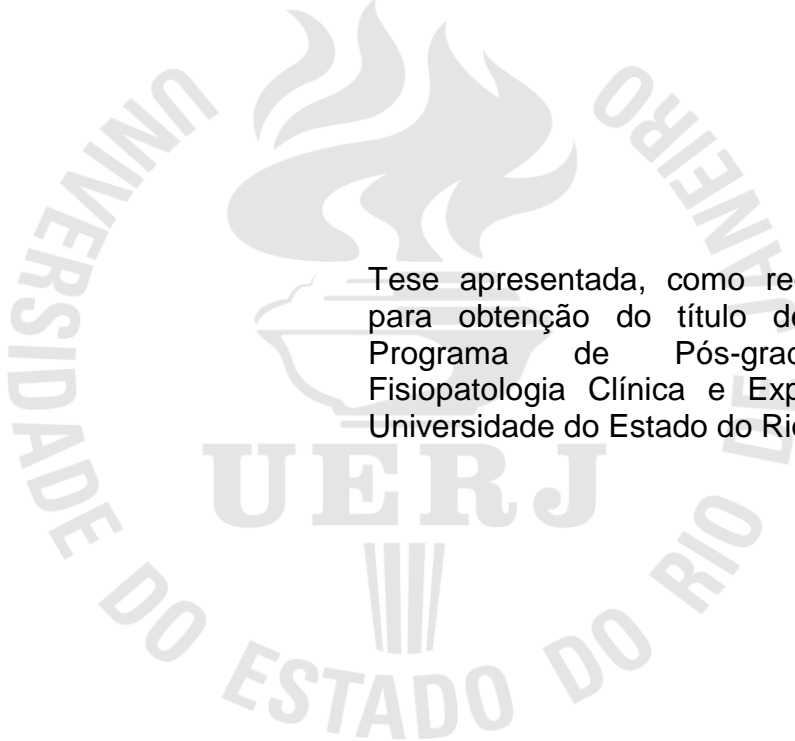
Inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA em um modelo de hipóxia-isquemia prenatal: avaliação morfofuncional do cerebelo

Rio de Janeiro

2013

Tiago Savignon Cardoso Machado

**Inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA em um modelo de hipóxia-
isquemia prenatal: avaliação morfofuncional do cerebelo**



Tese apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos

Coorientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M149 Machado, Tiago Savignon Cardoso.
Inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA em um modelo de hipóxia-isquemia prenatal: avaliação morfofuncional do cerebelo / Tiago Savignon Cardoso Machado – 2013.
87 f.

Orientadora: Penha Cristina Barradas Daltro Santos.
Coorientador: Alex Christian Manhães.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Hipóxia Fetal. 2. Cerebelo - Teses. 3. Receptores de N-Metil-D-Aspartato. 4. Células de Purkinje – Teses. 5. Oligodendroglia – Teses. 6. Bainha de mielina - Teses. I. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. II. Manhães, Alex Christian. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.831:599.323.4

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Tiago Savignon Cardoso Machado

**Inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA em um modelo de hipóxia-
isquemia prenatal: avaliação morfofuncional do cerebelo**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de março de 2013.

Coorientador: Alex Christian Manhães
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Cláudio Carneiro Filgueiras
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cecilia Hedin Pereira
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Prof.^a Dra. Adriana da Cunha Faria Melibeu
Instituto de Biologia - UFF

Prof. Dr. Anderson Ribeiro Carvalho
Faculdade de Formação de Professores - UERJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio incondicional.
Minha esposa amada, meu filho amado.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, por minha vida. A Ele dou meu louvor e minha adoração.

Aos meus pais, por terem me ensinado tanto, e por se orgulharem de mim.

À minha esposa amada, sem ela não haveria tempo nem condições de realizar esta obra.

Ao meu filhote, que nos momentos finais, sempre pedia pra eu ir pra casa, por estar com “sudade” de mim. Era e é sempre uma alegria chegar em casa pra brincar com você, definitivamente um momento de refrigério. Papai te ama!

À professora Penha, pela amizade, orientação, por tantas conversas, científicas ou não, pelo apoio em todos os momentos. Definitivamente faz parte de minha história.

Ao professor Frank, por tantos cafés, conversas, por sempre lembrar de minha família nas suas viagens, e nos trazer sempre um presente. Não nos esqueceremos disso.

Ao professor Alex, que fugia para o nosso laboratório, e sempre conversávamos sobre as coisas mais diversas possíveis. Obrigado por toda orientação que me foi passada.

Ao pessoal do laboratório, que diretamente ou não me ajudaram nessa caminhada.

Ao Serginho, que mesmo tendo partido do lab, sempre esteve presente.

Ao Michael, por tantas conversas científicas, e ajuda mútua. Finalmente me ouviu e saiu de casa.

Ao Lo, por tantas notícias do Omelete. Como me manteria informado se não fosse por você?

Ao Paulinho, que veio na junção dos laboratórios, e nos tornamos bons amigos.

Ao Alan, que tem me ajudado de tantas maneiras, muito obrigado.

À Marta, por toda ajuda nos WBs, muito obrigado.

Ao Nelcir, por toda ajuda no biotério, e também à Mariana. Ao ‘diretor’ Jorge, por toda assistência no criostato. Muito obrigado.

À todos do laboratório, que me ajudaram nesta caminhada, mesmo que não tenha citado aqui, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

MACHADO, Tiago Savignon Cardoso. **Inibição do receptor de glutamato do tipo NMDA em um modelo de hipóxia-isquemia prenatal: avaliação morfofuncional do cerebelo.** 2013. 87f. Tese de Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Lesões sistêmicas peri e pré-natais alteram o desenvolvimento do SNC, levando a problemas cognitivos e motores em crianças que podem perdurar por toda a vida. Um tipo particular de lesão é a hipóxia-isquemia (HI), caracterizada pela interrupção momentânea ou permanente do fluxo sanguíneo. Um dos mecanismos propostos para as lesões decorrentes da HI é a excitotoxicidade glutamatérgica. O uso de inibidores da neurotransmissão glutamatérgica tem sido estudados em diversos modelos de HI. Neste trabalho, avaliamos os efeitos morfofuncionais da administração de um antagonista não-competitivo do receptor de glutamato NMDA sobre o desenvolvimento do cerebelo. Ratas no 18º dia de gestação foram anestesiadas, os cornos uterinos expostos e as 4 artérias uterinas obstruídas por 45 minutos (Grupo H). Animais controle tiveram os úteros expostos, sem a obstrução (Grupo S). Após a cirurgia a gestação prosseguiu. Somente animais nascidos a termo foram utilizados. Um dia após o nascimento, metade de cada ninhada foi designada para receber MK801, 0,3mg/kg/dia, (grupos SM e HM) e a outra metade recebeu solução salina (grupos SS e HS), por 5 dias. Após anestesia e perfusão-fixação com paraformaldeído 4% aos 9, 23, 30 e 60 dias pós-natais, cortes parassagitais do cerebelo foram obtidos em criótomo e submetidos à imunohistoquímica para calbindina, GFAP, GLAST, PDGFR α e MBP. A partir de 45 dias de vida, os animais foram testados em vários de testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), campo vazado (CV), ROTAROD, teste de caminhada sobre barras (*ladder test*) e teste do comprimento da passada (*stride length*). Aos 9 dias, a espessura da árvore dendrítica era menor nos animais SM, HS/HM, demonstrando efeitos deletérios tanto do MK801 quanto da HI. Menor número de células PDGFR α + foi observado nos animais HS/HM, sem efeitos da administração de MK801. Aos 23 dias, maior número de células PDGFR α + foi observado nos animais HM comparado aos outros 3 grupos, indicando efeito neuroprotetor do MK801. Nessa idade, menor número de fibras mielinizadas (MBP+) foi observada nos animais HS, e a administração de MK801 parece reverter estes efeitos. Aos 9 dias a distribuição de GLAST estava alterada nos animais HS, com os efeitos da HI parcialmente revertidos pelo MK801. Não foram observados efeitos da HI ou do MK801 sobre comportamentos relacionados a ansiedade pelo LCE, assim como na latência de queda no ROTAROD. HI piora a performance motora no *ladder test*. No teste do CV, não observamos efeitos da HI sobre a busca por novidade assim como sobre a atividade locomotora espontânea. No entanto, MK801 diminui comportamentos de autolimpeza e a atividade locomotora espontânea. Menor variação das passadas foi observada em decorrência da administração de MK801 no *stride length*, com nenhum efeito da HI. Nossos resultados demonstram que a inibição do receptor NMDA tem um efeito neuroprotetor sobre os progenitores de oligodendrócitos e mielinização, provavelmente pela manutenção da capacidade proliferativa por um período maior. A atividade do receptor NMDA exerce importante papel na diferenciação das células de Purkinje, assim como na distribuição do transportador GLAST, corroborando a importância deste receptor na gênese das lesões causadas pela HI.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia prenatal. Cerebelo. Receptor NMDA. Células de Purkinje. Oligodendrócitos. Mielina.

ABSTRACT

MACHADO, Tiago Savignon Cardoso. **Inhibition of glutamate NMDA receptor in a prenatal hypoxia-ischemia model**: morphofunctional analyses of cerebellum. 2013. 87f. Tese de Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental – Faculdade de Ciências Médicas. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Peri and prenatal systemic lesions alter CNS development leading to motor and cognitive problems in children that might persist throughout life. A particular kind of injury, the hypoxic ischemic (HI), is characterized by a permanent or temporary blockage of blood flow. One of the proposed mechanisms downstream from a HI event is called glutamatergic excitotoxicity. The administration of glutamate inhibitors has been studied in HI models for several years. In this work, we evaluated the effects of administration of a non-competitive antagonist of glutamate receptor, NMDA, on cerebellar development and behavioral tests of HI animals. Pregnant rats in the 18th gestational day were anesthetized, the uterine horns were exposed and the four uterine arteries were clamped for 45 minutes (group H). Sham controls had the uterine horns exposed, but no arteries were clamped (group S). Gestation proceeded after surgery. Only full term animals were used. One day after birth half the animals was assigned to receive either SALINE (groups SS and HS) or MK801 (groups SM and HM). Animals were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde at 9, 23, 30 and 60 days of age. Parasagittal cerebellar sections were submitted to Calbindin, GFAP, GLAST, PDGFR α and MBP immunohistochemistry. Beginning at P45 animals were subjected to a battery of behavioral tests: elevated plus maze (EPM), hole board (HB), ROTAROD, ladder test and stride length. At P9 the dendritic tree of Purkinje cells were thinner in SM, HS/HM animals, indicating that both HI and MK801 are deleterious regarding this Purkinje cell differentiation. A lower number of PDGFR α + cells was observed in HS/HM animals, with no effects of MK801 administration. At P23 a greater number of PDGFR α + cells was found in HM animals when compared to the other 3 groups, demonstrating a neuroprotector effect of MK801. A lower number of myelinated fibers (MBP+) was observed in HS animals at P9, and MK801 administration reverse this effect. At P9, GLAST distribution was altered in HS animals, and MK801 partially reverse this altered distribution. No effects of HI and MK801 were observed in the EPM and ROTAROD tests. HI decreased motor performance of hind limbs in the ladder test, though no effect of MK801 was noted. In the HB test, we do not observe HI effects regarding the novelty seeking behavior and locomotor activity, otherwise the administration of MK801 decreased the number of grooming and locomotor activity. In the stride length test, we do not observed effects of HI although MK801 augmented the length variation of the fore limbs. Our results show that inhibition of NMDA receptors exerts a neuroprotector effect on oligodendrocyte progenitor cells and myelination, probably by temporarily inhibiting differentiation of those, providing more time to proliferate. NMDA activity exerts a crucial role in Purkinje cell differentiation as well as in GLAST distribution. Taken together our results lead us to conclude that NMDA receptor activity has an important role in the genesis of lesions caused by HI events.

Keywords: Prenatal hipóxia-ischemia. Cerebellum. NMDA receptor. Purkinje cells. Oligodendrocytes. Myelin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura do córtex cerebelar.....	23
Figura 2 –	Desenvolvimento do cerebelo.....	26
Figura 3 –	Figuras esquemáticas demonstrando etapas na diferenciação das células de Purkinje.....	27
Figura 4 –	Esquema representativo da classificação morfológica e antigênica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica.....	29
Figura 5 –	Representação esquemática do desenvolvimento oligodendroglial no cerebelo do rato do nascimento até P10.....	30
Figura 6 –	Fotografia ilustrando a cirurgia realizada em ratas no décimo oitavo dia de gestação com a obstrução das artérias uterinas...	35
Figura 7 –	Delineamento experimental.....	36
Quadro 1 –	Anticorpos primários e secundários que foram utilizados neste estudo.....	37
Figura 8 –	Sequência dos testes comportamentais utilizados neste estudo.....	39
Figura 9 –	Fotografia do aparelho para o teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado neste estudo.....	40
Figura 10 –	Fotografia do equipamento para o teste do Campo Vazado utilizado neste estudo.....	41
Figura 11 –	Fotografia do aparelho para o teste do Rota Rod utilizado neste estudo.....	42
Figura 12 –	Desenho esquemático do equipamento para o teste de caminha sobre barras utilizado neste estudo.....	44
Figura 13 –	Fotografia de dois testes do comprimento da passada.....	44
Figura 14 –	Imunomarcção para calbindina no cerebelo de ratos aos 9 dias.....	48
Figura 15 –	Imunomarcção para calbindina no cerebelo de ratos aos 60 dias.....	49

Figura 16 –	Imunomarcaco para GFAP (vermelho) e GLAST (verde) no cerebelo de ratos aos 9 dias de vida.....	51
Figura 17 –	Imunomarcaco para PDGFR α na substância branca cerebelar de ratos aos 9 dias de vida.....	53
Figura 18 –	Imunomarcaco para PDGFR α na substância branca cerebelar de ratos aos 23 dias de vida.....	55
Figura 19 –	Imunomarcaco para MBP no cerebelo de ratos aos 23 dias de vida.....	56
Figura 20 –	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	57
Figura 21 –	Variáveis etológicas estudadas no teste do LCE.....	58
Figura 22 –	Número de orifícios explorados no teste do campo vazado.....	59
Figura 23 –	Variáveis etológicas no teste do campo vazado.....	60
Figura 24 –	Total de deambulações no teste do campo vazado.....	61
Figura 25 –	Latência de queda média no ROTAROD em três dias consecutivos.....	62
Figura 26 –	Teste de caminhada sobre barras.....	63
Figura 27 –	Teste do comprimento da passada.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A2B5	Anticorpo monoclonal que reconhece gangliosídeos em progenitores O2-A
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4isoxazol propiônico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Área tegmental ventral
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BA	Braços abertos
BF	Braços fechados
BrdU	Bromo deoxi-uridina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CGE	Camada germinativa externa
CGI	Camada germinativa interna
CN	Centro
CNPase	2',3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase
CV	Campo vazado
DAG	Diacil glicerol
EAAC1	Carregador de aminoácidos excitatórios tipo 1
EAAT4	Transportador de aminoácidos excitatórios tipo 4
EAAT5	Transportador de aminoácidos excitatórios tipo 5
E	Embrionário
ED1	Anticorpo monoclonal para macrófago/microglia
EGL	Camada granular externa
FPLSD	Teste de Fisher
GalC	Galactocerebrósídeo C
GD3	Gangliosídeo presente em células neuroepiteliais
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato/aspartato
GLT1	Transportador de glutamato 1
GluR	Receptor de glutamato

HI	Hipóxia isquemia
HS	HIPÓXIA+SALINA
HM	HIPÓXIA+MK801
IGL	Camada granular interna
IO	Oligodendrócitos imaturo
IP3	Inositol tri-fosfato
KA	Ácido kaínico, do inglês kainic acid
LCE	Labirinto em cruz elevado
MAG	Glicoproteína associada à mielina
MBP	Proteína básica de mielina
MK801	Maleato de dizocilpina
MOG	Glicoproteína associada a oligodendrócitos e mielina
NADPH- diaforase	Reação para nicotinamida adenina dinucleotódeo fosfato reduzida
NG2	Proteoglicanos sulfatados de ratos
NMDA	Receptor de glutamato n-metil,d-aspartato
NOS+	Óxido nítrico sintase positiva
OPC	Progenitor de oligodendrócitos
O4	Anticorpo que reconhece oligodendrócitos imaturos
PBS	Tampão fosfato salinizado
PC	Células de Purkinje
PDGFR α	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PF	Fibra paralela
PLP	Proteína proteolipídica
PO	Precursor de oligodendrócito
P	Pósnatal
PSA-NCAM	Forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular
SHAM	Falso cirúrgico
SM	SHAM+MK801
SNC	Sistema nervoso central
SN	Substância negra
SS	SHAM-SALINA
TH	Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS GERAIS	33
1.1	Objetivos específicos	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Obtenção das ratas grávidas	34
2.2	Tratamento com antagonista não-competitivo do receptor NMDA - MK801	35
2.3	Processamento histológico	36
2.4	Imunohistoquímica	37
2.5	Análise morfológica e quantitativa	38
2.6	Análise comportamental	38
2.6.1	<u>Avaliação da ansiedade</u>	39
2.6.1.1	Labirinto em cruz elevado (LCE).....	39
2.6.2	<u>Avaliação da atividade locomotora espontânea e busca por novidade</u>	40
2.6.2.1	Teste do campo vazado (CV).....	40
2.6.3	<u>Avaliação motora</u>	41
2.6.3.1	Rota rod ou cilindro giratório.....	42
2.6.3.2	Teste de caminhada sobre barras.....	42
2.6.3.3	Teste do comprimento das passadas.....	44
2.7	Análise estatística	45
3	RESULTADOS	47
3.1	Imunohistoquímica da Calbindina	47
3.2	Imunohistoquímica da GFAP e GLAST	50
3.3	Imunomarcção da Oligodendroglia	52
3.4	Avaliação comportamental	57
3.4.1	<u>Labirinto em cruz elevado</u>	57
3.4.2	<u>Teste do campo vazado</u>	59
3.5	Avaliação motora	61
3.5.1	<u>Teste do cilindro giratório (ROTA ROD)</u>	61

3.5.2	<u>Teste de caminhada sobre barras</u>	62
3.5.3	<u>Teste do comprimento da passada (stride length)</u>	63
4	DISCUSSÃO	65
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

INTRODUÇÃO

Considerações iniciais

Insultos sistêmicos pré e perinatais podem alterar o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), tendo como consequências de longo prazo problemas motores, cognitivos e comportamentais (Tyson, Saigal, 2005). Alguns fatores são particularmente importantes, como o tipo de lesão, o período do desenvolvimento em que ocorrem, a intensidade e a área afetada. Nas últimas décadas, com os avanços na medicina neonatal, a proporção de crianças com déficits neurológicos após sofrerem insultos perinatais permanece estável (Nelson et al., 2003). A interrupção momentânea ou permanente do fluxo sanguíneo e aporte nutricional caracteriza uma dessas lesões, a hipóxia isquemia (HI). Eventos de HI podem levar ao atraso e/ou comprometimento cognitivo, problemas no desenvolvimento motor, hiperatividade, dificuldade de concentração (du Plessis, Johnston, 1997; Filloux et al., 1996), e em casos mais graves a epilepsia e paralisia cerebral em crianças (Nelson et al., 2003). Esta é uma desordem debilitante, não progressiva, afetando principalmente o sistema motor e sendo fortemente relacionada com injúrias cerebrais perinatais (Kuban, Leviton, 1994; Volpe, 2001, 2003). Apesar dos avanços na medicina, a taxa de paralisia cerebral não caiu nos últimos trinta anos, mesmo com um aumento de cinco vezes no número de partos por cesariana, pelo menos nos Estados Unidos (Clark, Hankins, 2003).

Quando crianças nascidas com baixo peso são comparadas com crianças nascidas com peso normal, em relação a diversos aspectos do desenvolvimento que afetam os dois grupos, as crianças nascidas com baixo peso os apresentam mais comumente. Baixo QI, problemas respiratórios como asma, adaptação social e funcional, limitações sociais, dependência de medicamentos, dietas ou equipamentos e assistência médica (Tyson, Saigal, 2005). Inflamação e HI são ocorrências comuns em crianças prematuras, sendo talvez os eventos mais utilizados para explicar os danos e sequelas observados (Haynes et al., 2003; Kadhim et al., 2001; Volpe, 2008). Desde 1980 a incidência de baixo peso ao

nascimento aumentou 21% assim como o nascimento com menos de 37 semanas, desde 1990 (Hamilton et al., 2006; Martin et al., 2008)

Estudo da organização mundial de saúde estima que o número de mortes de neonatos por eventos intraparto, com dados de 48 países, é de aproximadamente 900 mil/ano, de um total de quatro milhões de mortes de crianças até cinco anos de vida (Lawn et al., 2005). A asfixia sistêmica pré-natal pode ocorrer tanto por um processo mecânico, insuficiência placentária, trabalho de parto prolongado, dobras no cordão umbilical, ou mesmo incapacidade de o neonato começar a respirar (de Haan et al., 2006), assim como outros fatores de risco, entre eles o tabagismo materno, anemia, hipotensão, nascimentos múltiplos e uso de drogas (Pundik et al., 2006).

Estudos *post mortem*, em crianças que passaram por eventos de HI, demonstraram a perda de oligodendrócitos, hipomielinização e astrogliose (Marin-Padilla, 1997). Técnicas de imageamento por ressonância magnética têm mostrado um grande número de alterações no sistema nervoso de crianças nascidas com baixo peso, que sofreram hipóxia, apresentando ou não sequelas severas.

Modelos para o estudo dos efeitos de HI no encéfalo em desenvolvimento

Na tentativa de mimetizar os diferentes tipos de lesão que ocorrem em humanos, particularmente a HI, diversos modelos *in vitro* e *in vivo* foram propostos. Ao longo das últimas décadas, várias intervenções farmacológicas tem sido abordadas na tentativa de amenizar as neuropatologias ocorridas após uma injúria no desenvolvimento, incluindo o uso de glicocorticóides, antagonistas de receptores glutamatérgicos (GluR), inibidores de radicais livres, bloqueadores de canais de cálcio, entre outros (Altman et al., 1984; Barks et al., 1991; Hagberg et al., 1994; Gunn et al., 1989; Palmer et al., 1993).

Em 1960, Levine criou o primeiro modelo de HI, que era baseado na oclusão unilateral das artérias carótidas, momentânea ou permanentemente, no rato adulto. Em 1981, Rice o modificou, realizando a oclusão em ratos com sete dias de vida. Neste modelo os danos ocorrem no hemisfério ipsilateral, com o hemisfério contralateral normalmente servindo como controle do experimento. Os danos

observados foram no córtex cerebral, substância branca periventricular, estriado e hipocampo (Rice et al., 1981). Diversos pesquisadores passaram a utilizar este modelo para verificar as consequências das lesões na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (Silverstein, Johnston, 1984; Romijin et al., 1992), da neurotoxicidade glutamatérgica (Silverstein et al., 1991; Gordon et al., 1991), da neurotoxicidade do óxido nítrico (Ferriero et al., 1988; Ferriero et al., 1995) e nos sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI (Burke et al., 1991; Romijin et al., 1992). Apesar dos inúmeros achados observados neste modelo a partir de então, a principal crítica feita a este modelo é o fato de ele não mimetizar uma lesão sistêmica, com as intercorrências entre mãe-feto, o que é, frequentemente, o que ocorre em humanos.

Em outro modelo de HI pré-natal criado por Bjelke et al. (1991), os cornos uterinos da fêmea são retirados e imersos em água a 37° C por 15 a 21 minutos, no vigésimo segundo dia de gestação (E22). Depois da asfixia os filhotes são retirados do útero e ressuscitados. O filhote controle é retirado do útero por cesariana antes do procedimento de asfixia. Através desse modelo é verificado um aumento no número de corpos celulares imunorreativos para a tirosina hidroxilase (TH) na zona compacta da substância negra (SN). O aumento do número de neurônios dopaminérgicos marcados é associado ao aumento da expressão do gene do fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) tanto na SN quanto na área tegmental ventral (ATV) (Andersson et al., 1995).

Modelos que tentam mimetizar os eventos que podem ocorrer em humanos tem sido utilizados há algum tempo. Trabalhos do grupo de Baud (2005) o fazem pela ligadura das artérias de um dos cornos uterinos cinco dias antes do nascimento e utilizam o grau de retardo no crescimento (peso ao nascer) como índice relacionado à isquemia e provavelmente hipóxia a que estes animais foram submetidos. Lesões na substância branca subcortical foram encontradas, com maior número de células apoptóticas. Microgliose e astrogliose (microglia e astrócitos reativos) também foram observadas em diversas regiões, como cíngulo e cápsula externa. Déficits na mielinização também foram observados durante o desenvolvimento até a vida adulta (P60) no corpo caloso e córtex motor. Nesse mesmo ano, Robinson estabeleceu um modelo de HI pré-natal transitório, onde o fluxo das artérias uterinas da rata grávida era obstruído por 15, 30 ou 45 minutos no décimo oitavo (E18) dia de gestação (nascimento, aproximadamente, em E22).

Neste modelo foram observados resultados semelhantes aos do grupo de Baud; astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos, e lesão em axônios tanto na substância branca como no córtex cerebral, principalmente nos animais submetidos à HI por 45 minutos (Robinson et al., 2005), alterações estas que são similares às observadas em cérebros humanos que passaram por hipóxia perinatal (Marin-Padilla, 1997, 1999). Morfologicamente, 87% dos ratos jovens que foram submetidos à isquemia têm lesão na substância branca detectável em secções coronais. Mas, dentre estes animais, nem todos possuem a mesma severidade de lesão: 27% possuem lesões leves, 33% moderadas e 27% lesões críticas severas. Algumas hipóteses para as lesões celulares ocorridas após HI são: a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (Kinney e Back, 1998), o aumento do nível de radicais livres (Volpe, 2001 e 2003), o aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Baud et al., 1999; Dammann e Leviton, 1997; Nelson et al., 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (Kavanaugh et al., 2000, Itoh et al., 2002; Tekkok e Golberg, 2001).

Utilizando o modelo de Robinson et al. (2005), demonstramos um aumento de células óxido nítrico sintase positivas (NOS+) aos 23 dias de vida na substância branca cerebelar dos animais HI comparados ao SHAM, através da técnica da NADPH-diaforase, e que essas células eram tanto astrócitos e microglia, pela imunoidentificação com GFAP (proteína ácida fibrilar glial) e ED1 (anticorpo monoclonal para macrófago/microglia), respectivamente (Savignon et al., 2012). Isso nos mostrou que as alterações celulares e teciduais permanecem por um período considerável de tempo, durante o qual importantes fenômenos ocorrem no cerebelo, estrutura em que o desenvolvimento é majoritariamente pós-natal. Também mostramos que as células de Purkinje têm a expressão/distribuição da NOS no corpo celular e árvore dendrítica alterada aos nove dias de vida nos animais HI, sugerindo que estas alterações podem afetar importantes etapas como a migração celular da camada granular externa (Savignon et al., 2012).

Embora existam outros modelos de injúria cerebral e de HI que estudam os mecanismos das lesões nos sistemas de neurotransmissores e da plasticidade cerebral no desenvolvimento, esses não mimetizam integralmente insultos sistêmicos ocorridos no final do segundo terço/início do último trimestre de gestação humano (Back et al., 2001), e que provavelmente são uma causa importante de nascimentos prematuros e de baixo peso (Pundik et al., 2006). As intercorrências

maternas, a importância da atividade placentária, das trocas entre mãe-filho, deixam de ser abordadas nos modelos de hipóxia neonatal. Este modelo, portanto, pode mimetizar os efeitos estruturais e funcionais de uma lesão ocorrida neste período, e ser utilizado para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações celulares como também na citoarquitetura de diversas estruturas cerebrais importantes, relacionados com o controle motor, com o aprendizado e a memória.

Glutamato

Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e está envolvido em muitos aspectos da função neural, como cognição, memória e aprendizado, além de ser importante também durante o desenvolvimento. Durante a transmissão sináptica normal, o glutamato é liberado na fenda sináptica, se liga aos seus receptores e é recaptado por transportadores localizados principalmente em neurônios e astrócitos, mantendo os níveis de glutamato extracelular regulados.

Os GluR mediam os efeitos excitatórios do glutamato e são subdivididos em duas grandes categorias, os ionotrópicos e os metabotrópicos:

- a) receptores ionotrópicos do tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4isoxazol propiônico) e kainato (KA) – são canais iônicos que permitem a passagem de Na^+ e K^+ ;
- b) receptores ionotrópicos do tipo NMDA (receptor de glutamato n-metil,d-aspartato) – são canais iônicos altamente permeáveis a Na^+ e Ca^{++} ; são regulados de maneira complexa por íons Mg^{++} que fecham o canal, e somente se desligam quando o potencial de membrana atinge certo limiar, pela ativação de receptores AMPA/KA. Outras moléculas se ligam neste receptor, funcionando como co-ativadores, como é o caso da glicina;
- c) receptores metabotrópicos – são acoplados à proteína G, e geram cascatas de segundos mensageiros, como IP3/DAG (inositol trifosfato/diacil glicerol), quando ligados a fosfolipase C ou cAMP, quando ligados a adenilatociclase.

O uso de ferramentas farmacológicas tem sido utilizado para avaliar o papel da sinalização glutamatérgica em diversos modelos de hipóxia-isquemia e desenvolvimento do SNC (Yuan et al., 1998; Baig, Joseph, 2006; Fukamachi et al., 2001). Agonistas e antagonistas para os diversos tipos de GluRs tem sido utilizados, e tanto neuroproteção quanto neurotoxicidade tem sido observados (Kavanaugh et al., 2000, Itoh et al., 2002; Tekkok, Golberg, 2001, Józwiak et al., 2008, Tekkok et al., 2005). Uma das ferramentas farmacológicas utilizadas no estudo da excitotoxicidade (discutida posteriormente) é o uso do antagonista não-competitivo do receptor de glutamato do tipo NMDA, conhecido como dizocilpina ou MK801 (maleato de dizocilpina) (Alix et al., 2012; Li et al., 2013; Ford et al., 1989; LeBlanc et al., 1991). Os resultados da administração deste fármaco são controversos, com alguns trabalhos descrevendo neuroproteção e outros neurotoxicidade.

Transportadores de Glutamato

Transportadores de glutamato regulam a transmissão nas sinapses excitatórias, pela rápida remoção do glutamato liberado. Cinco subtipos de transportadores já foram clonados: 1 - GLAST (transportador de glutamato/aspartato) (Storck et al., 1992; Tanaka, 1994); 2 - GLT1 (transportador de glutamato 1) (Pines et al., 1992); 3 - carregadores de aminoácidos excitatórios tipo 1 (EAAC1 – do inglês excitatory amino acid carrier 1) (Kanai, Hediger, 1992); 4 - transportadores de aminoácidos excitatórios tipo 4 (EAAT4) (Fairman et al., 1995); 5 - EAAT5 (Arriza et al., 1997). A expressão desses transportadores ocorre em tipos celulares específicos. GLAST e GLT-1 são expressos em células gliais (Rothstein et al., 1994; Lehre et al., 1995), enquanto EAAC1 e EAAT4 são expressos em neurônios (Furuta et al., 1997; Dehnes et al., 1998). EAAT5 está presente em glia e neurônios na retina (Eliasof et al., 1998). No córtex cerebelar são encontrados GLAST e EAAT4 abundantemente expressos por células gliais e neuronais, respectivamente (Danbolt, 2001).

No córtex cerebelar as células da glia de Bergmann expressam GLAST. Seus prolongamentos envolvem as sinapses excitatórias das células de Purkinje com as fibras paralelas, sendo responsáveis por removerem a maior parte do glutamato

liberado nestas sinapses (Rothstein et al., 1994; Chaudhry et al., 1995; Otis et al., 1997; Wadiche, Jahr, 2001). Já foi mostrado que a captação de glutamato por este transportador é retardada quando há retração dos prolongamentos astrocitários (Lino et al., 2001).

HI e glutamato

Dentre os tipos celulares que formam o tecido nervoso, neurônios e oligodendrócitos, especialmente os progenitores, são os mais afetados pela HI, tanto na substância cinzenta quanto na substância branca (Back et al., 2002a; Deng et al., 2003). Progenitores de oligodendrócitos (OPC) são desprovidos de sistemas enzimáticos maduros o suficiente para lidar com a grande quantidade de radicais livres produzidos principalmente pela microglia reativa (Le Mellédo et al., 2004), o componente do sistema imune no SNC. Além disso, precursores de oligodendrócitos (PO) expressam receptores de glutamato do tipo AMPA e NMDA (Gallo et al., 1994; Karadottir et al., 2005; Salter, Fern, 2005; Micu et al., 2006), o que ajuda a tornar esta subpopulação a mais vulnerável em eventos de isquemia e lesão excitotóxica (Follett et al., 2000; Back et al., 2002a; Deng et al., 2003; Rosenberg et al., 2003). Tanto *in vivo* quanto *in vitro* OPCs são lesados pela ativação excessiva de receptores AMPA/KA (Yoshioka et al., 2000; McDonald et al., 1998; Fern, Moller, 2000). Já foi demonstrado que antagonistas de receptores AMPA/kainato reduzem morte de OPCs na isquemia (Tekkok, Goldberg, 2001). O pico de vulnerabilidade em humanos correlaciona com a presença dessa subpopulação, no terceiro trimestre de gestação (Back et al., 2002b; Riddle et al., 2006), que no rato corresponderia à primeira semana de vida pós-natal, pelo menos nos hemisférios cerebrais (Craig et al., 2003). Neurônios também são sensíveis à HI e provavelmente morrem devido ao fato de expressarem a maquinaria bioquímica envolvida na excitotoxicidade (para revisão ver Zipfel et al., 2000; Arundine, Tymianski, 2004).

Durante a HI, os níveis de glutamato extracelular aumentam por diversos mecanismos. Já foi demonstrado que tanto axônios quanto oligodendrócitos liberam grande quantidade de glutamato para o meio extracelular (Back et al., 2007). Astrócitos liberam glutamato principalmente pelo funcionamento reverso dos

transportadores, onde estes tem sua função fisiológica alterada, retirando glutamato do citoplasma e liberando para o meio extracelular (Rossi et al., 2000), ao mesmo tempo em que sua função normal é inibida (Boycott et al., 2007, Dallas et al., 2007), contribuindo ainda mais para que as concentrações extracelulares de glutamato permaneçam elevadas no meio extracelular .

Excitotoxicidade glutamatérgica

A excitotoxicidade glutamatérgica tem como causa primordial o aumento de glutamato extracelular com consequente super ativação de GluR ionotrópicos, AMPA/KA e NMDA, levando a aumento intracelular de íons Na^+ e Ca^{++} (para revisão ver Arundine, Tymianski, 2003). A administração de NMDA em culturas de progenitores de oligodendrócitos leva a um aumento na diferenciação pela maior expressão da proteína básica de mielina (MBP) e células MBP+. Os efeitos da administração de NMDA são dose-dependentes, tendo sido observados efeitos deletérios nas doses mais altas, provavelmente pela excessiva entrada de íons Ca^{++} decorrente da ativação do receptor NMDA (Li et al., 2013). O aumento de Ca^{++} intracelular está envolvido com diversas vias de morte celular, seja por necrose ou apoptose (para revisão ver Bano, Nicotera, 2007), além de vias relacionadas a diferenciação e maturação celular. Participam deste processo diversos tipos celulares, liberando ou retirando glutamato do meio extracelular e da fenda sináptica. Entre os tipos celulares que captam glutamato estão principalmente os astrócitos, que expressam o transportador GLAST. Neurônios e oligodendrócitos também expressam transportadores de glutamato. Durante um evento de HI, que pode estar ou não associada com isquemia, o funcionamento dos transportadores de glutamato torna-se prejudicado pela despolarização dos terminais nervosos, pela falta de ATP (adenosina trifosfato), tendo com principal efeito a inversão dos transportadores, que liberam glutamato da célula ao invés de o retirarem da fenda sináptica (Rossi et al., 2000; Dallas et al., 2007).

Cerebelo

O cerebelo é uma grande parte do encéfalo em todos os vertebrados. Em humanos constitui cerca de 10% do peso encefálico, mas suas células granulares, pequenas e densamente empacotadas fazem com que haja nesta pequena estrutura aproximadamente 50 bilhões de neurônios (Zagon, 1977). Esta imensa quantidade de neurônios permite uma enorme capacidade de processamento de informações, oriundas principalmente do córtex cerebral, relacionada tradicionalmente, desde a década de 60, ao sistema motor (Albus, 1971; Blomfield, Marr, 1970; Marr, 1969). Métodos de imageamento funcional têm mostrado atividade cerebelar evocadas comumente em condições muito distintas daquelas de domínio do controle motor, sugerindo outras funções que não as tradicionais (Fiez et al., 1996; Allen et al., 1997; Ivry, Baldo, 1992; Kim et al., 1994). Corroborando com estas descobertas, alguns estudos também sugerem associações entre patologias cerebelares e desordens de funções superiores, relacionadas à cognição, memória e aprendizado, que não podem ser explicadas apenas por lesões no controle motor (Schmahmann, 2004; Desmond et al., 1998, Chen, Desmond, 2005).

O córtex cerebelar maduro contém três camadas celulares que de fora para dentro são: a camada molecular, camada de Purkinje e camada granular, estando esta última em contato com a substância branca. No córtex cerebelar estão presentes cinco tipos de neurônios com distribuição diferente pelas camadas corticais (Figura 1). Na camada molecular estão presentes as células estreladas, e no limite entre esta camada e a camada de células de Purkinje se localizam as células em cesto. Na camada granular estão localizadas as células de Golgi e as células granulares.

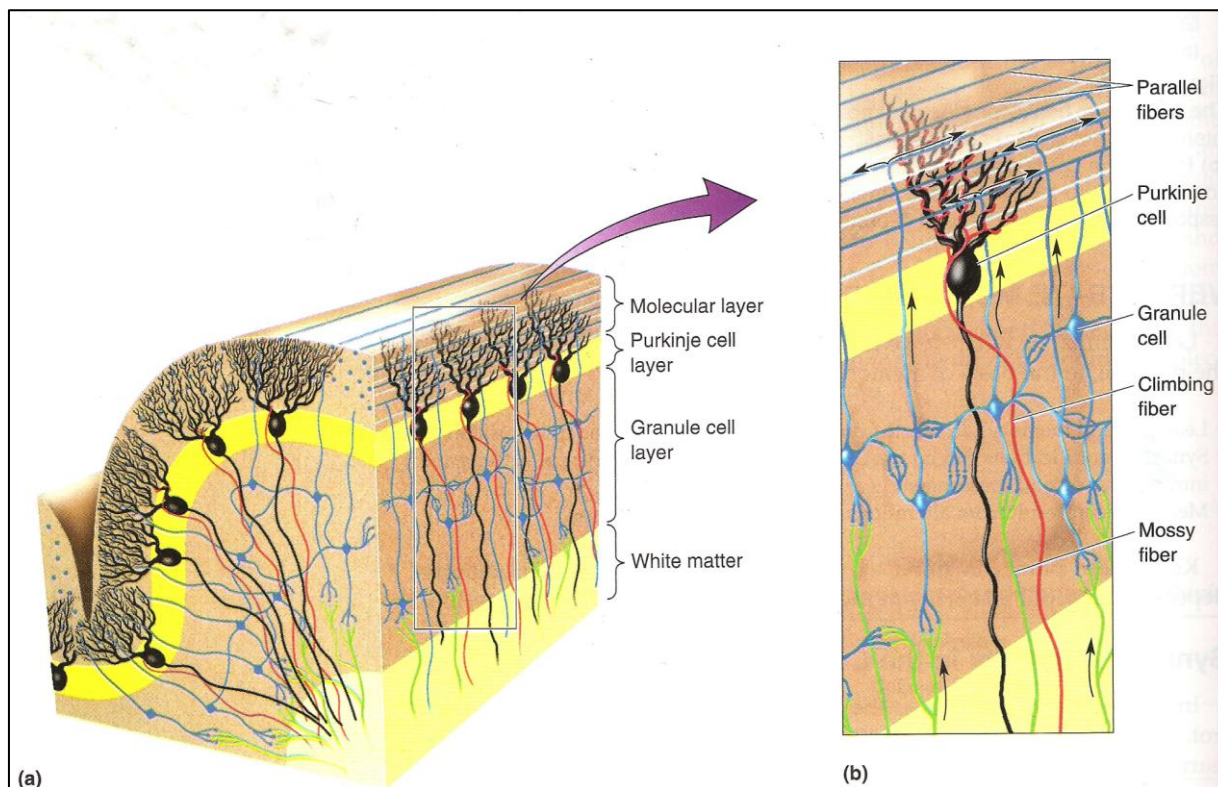


Figura 1 – Estrutura do córtex cerebelar

Legenda: (a) Representação esquemática do córtex cerebelar maduro mostrando a organização das camadas molecular, de células de Purkinje e de células granulares; (b) As aferências mais importantes das células de Purkinje são as fibras paralelas, originárias das células granulares e as fibras trepadeiras originárias da oliva inferior.

Nota: As aferências mais importantes das células granulares são as fibras musgosas, originárias de neurônios do núcleo pontino.

Fonte: adaptado de Bear et al., 1995.

A principal unidade processadora de informação no cerebelo é a célula de Purkinje. Estas estão organizadas em monocamadas entre a camada molecular e a granular, integrando informações de dois outros importantes pontos de retransmissão pré-cerebelares: núcleo olivar inferior e núcleo pontino. Cada célula de Purkinje recebe até 200.000 sinapses provenientes das fibras paralelas, as quais recebem as informações do núcleo pontino. Já outra classe de fibras, as chamadas fibras trepadeiras, recebe informações do núcleo olivar inferior. Cada uma dessas fibras forma poucas sinapses com cada célula de Purkinje, porém como o número de fibras é muito grande, o total de sinapses tem estimativa tão elevada.

Devido às características singulares da organização cerebelar, como sua regularidade, provavelmente há também uma uniformidade quanto ao modo como o

cerebelo processa as informações que chegam, e como transmite informações aos seus alvos (Bloedel, 1992).

O cerebelo pode ser dividido regionalmente de acordo com suas aferências principais, que são tradicionalmente descritas como três divisões funcionais (Kandel et al., 2000):

- a) O cerebelo vestibular, ou vestibulocerebelo, que recebe aferências do labirinto vestibular, participa da manutenção do equilíbrio e do controle da cabeça e do movimento ocular;
- b) O cerebelo espinhal, ou espinocerebelo, que recebe aferências sensoriais somáticas altamente organizadas oriundas da medula espinhal, e é importante no controle da postura e do movimento do tronco e dos membros;
- c) O cerebelo telencefálico ou cortical, ou cerebrocerebelo, que recebe aferências do córtex cerebral e participa do planejamento dos movimentos. Esta região é a mais recente na escala filogenética.

Em roedores, grande parte do desenvolvimento do cerebelo ocorre ao final da gestação e nos primeiros dias da vida pós-natal. Ainda na vida embrionária o primórdio cerebelar se origina por espessamento dos lábios rômnicos em torno do décimo quarto dia embrionário (E14). A população celular dos núcleos cerebelares e do córtex cerebelar tem origens distintas. Como acontece em outras porções do tubo neural, o neuroepitélio da região do lábio rômnico sofre uma intensa proliferação para produzir as chamadas zona ventricular, zona do manto e zona marginal (Figura 2). Entretanto, em um período posterior do desenvolvimento uma nova camada de células proliferativas aparece na região mais superficial da zona marginal. A zona ventricular proliferativa é então chamada de camada germinativa interna (CGI) e a nova camada é chamada de camada germinativa externa (CGE). A CGI dá origem aos neuroblastos primitivos nucleares, que migram para formar os núcleos cerebelares, a partir do décimo sexto dia embrionário (E16). Além disto, esta camada produz outros dois tipos de neuroblastos que migram para o córtex cerebelar, os neuroblastos primitivos de Purkinje, que se diferenciam para formar as células de Purkinje, e os neuroblastos de Golgi, que se diferenciam para formar as células de Golgi.

A CGE sofre três ondas de proliferação para produzir, em sucessão, as três

populações de neuroblastos cerebelares restantes no córtex cerebelar: os neuroblastos em cesto, os granulares e os estelares. Estas células migram tangencialmente pela superfície externa do cerebelo em desenvolvimento e posteriormente migram radialmente para seus locais definitivos nas camadas do córtex cerebelar descritas previamente, a partir de E18 e nos primeiros dias da vida pós-natal. A Figura 2 mostra esquemas do surgimento da zona marginal, as camadas germinativas interna e externa e a direção da migração dos neuroblastos. A glia de Bergmann tem papel fundamental neste processo. São astrócitos especializados, com morfologia radial. Os corpos celulares se localizam junto aos corpos celulares das células de Purkinje (PC), e seus prolongamentos, ligados à superfície pial, servem como trilhos por onde os neuroblastos podem ancorar, fazendo contato membrana-membrana (Rakic, 1971). O papel da glia de Bergmann, no entanto, não se restringe ao eventos migratórios. São importantes durante a sinaptogênese entre as fibras paralelas (PF) e as PCs, exercendo controle sobre a neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que expressam o transportador de glutamato GLAST (Danbolt, 2001; Martínez-Lozada et al., 2011).

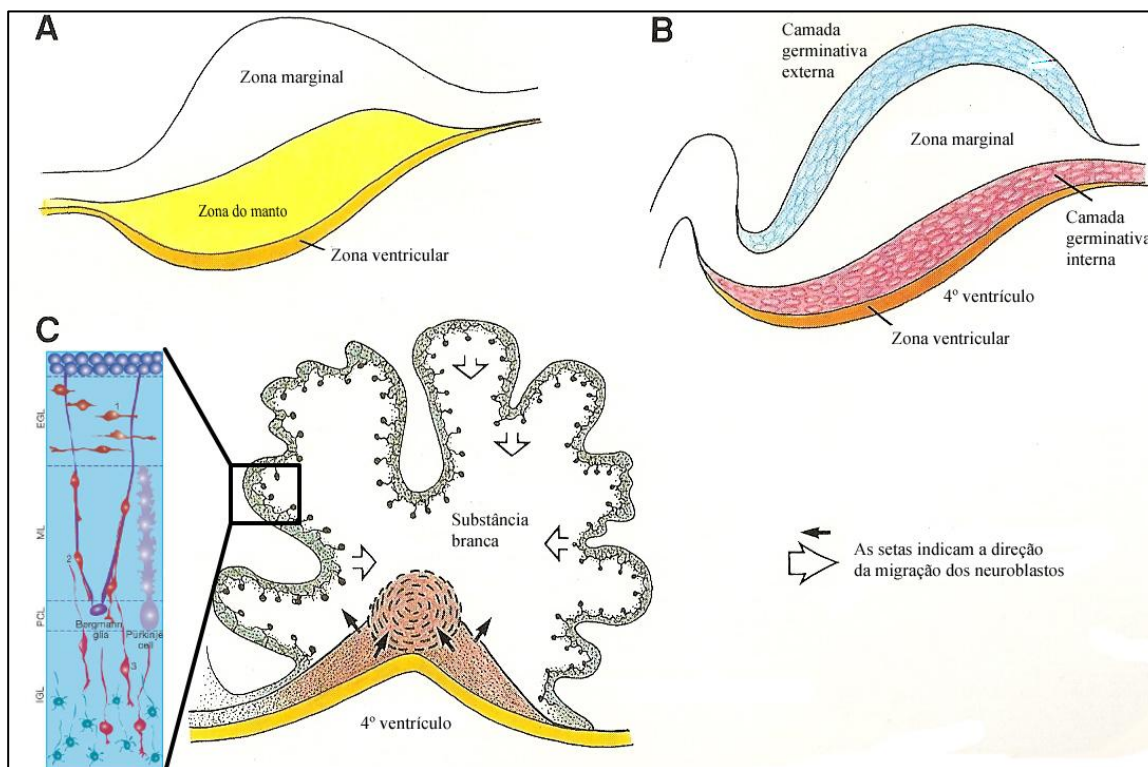


Figura 2 – Desenvolvimento do cerebelo

Legenda: A – Formação das zonas marginal, do manto e ventricular a partir de intensa proliferação das margens do lábio rômico; B – Neuroblastos são produzidos pela proliferação celular na CGI, adjacente à zona ventricular, e na região mais periférica da zona marginal que constitui a CGE; C – Neuroblastos produzidos na CGE migram tangencialmente e radialmente constituindo a camada molecular e granular. A caixa inserida em C detalha os processos de migração radial, da camada granular externa (EGL) para a camada granular interna (IGL).

Nota: Os neuroblastos migram utilizando a glia de Bergmann como trilho. Neuroblastos produzidos na CGI incluem os neuroblastos de Purkinje, que migram para fora e se localizam entre as camadas granular e molecular (camada de células de Purkinje (ver Figura 1) e os neuroblastos que constituem os núcleos profundos do cerebelo.

Fonte: adaptado de Larsen, 1993 e Yacubova, Komuro, 2002.

Apesar de os neuroblastos de Purkinje serem gerados e migrarem para seus locais de destino muito precocemente durante o desenvolvimento, a fase inicial de diferenciação se restringe à emissão do axônio, que se conecta aos núcleos profundos cerebelares ou aos núcleos vestibulares (Eisenman et al., 1991). A Figura 3 apresenta de maneira esquemática as principais etapas da diferenciação dos neurônios de Purkinje. Logo após o nascimento as células de Purkinje assumem morfologia bipolar, com os dendritos emanando do lado oposto ao do axônio, porém

ainda não subdivididos. Nesta fase, em torno de P3, os dendritos imaturos são emitidos tanto paralelamente à superfície pial quanto perpendiculares a esta. A polarização torna-se menos evidente, e outros dendritos podem emergir a partir do corpo celular. Ramon y Cajal, em 1911, chamou esta fase de “estrelada com dendritos desorientados”. Durante a primeira semana, as células de Purkinje se alinham em monocamada, e já formam sinapses com fibras trepadeiras. A partir do fim da primeira semana de vida, tem início a segunda fase do desenvolvimento da árvore dendrítica. O lado apical começa a crescer e forma um cone (Altman, 1972), a partir do qual os dendritos primários emergem. Este dendrito cresce rapidamente e se ramifica. Com a continuidade do crescimento e ramificação, a árvore dendrítica é formada em aproximadamente três semanas. Múltiplas sinapses com as fibras paralelas já ocorrem nesta fase. Uma característica importante é a retração de vários dendritos, com a permanência dos dendritos apenas no plano de orientação, quase em duas dimensões. Este processo dura até o fim do primeiro mês, quando a EGL já não existe, e todas as células granulares já atingiram seu destino (Ver Kapfhammer, 2004 para revisão).

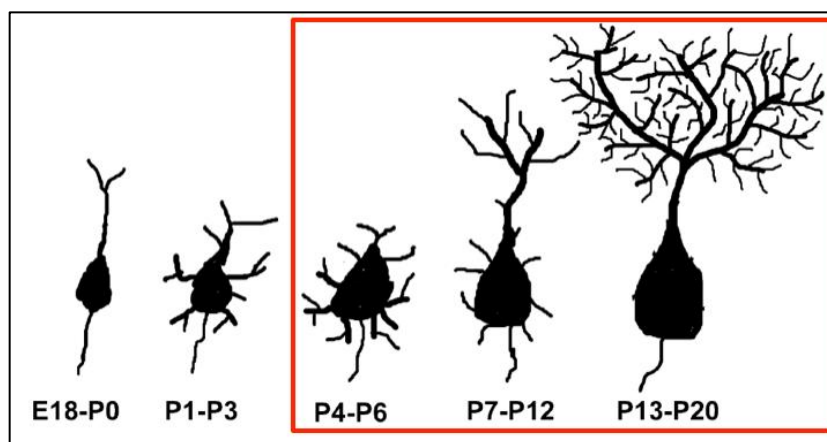


Figura 3 – Figuras esquemáticas demonstrando etapas na diferenciação das células de Purkinje.

Legenda: Após atingir seu local de destino, as células de Purkinje tem morfologia bipolar (E18-P0). Em um primeiro momento, elas emitem prolongamentos para todas as direções atingindo o padrão maduro de arborização entre P20 e P30. O quadrado em vermelho indica estágios de diferenciação onde as células expressam receptores de NMDA (Dupont et al., 1987)

Fonte: adaptado de Kapfhammer, 2004.

Desenvolvimento da oligodendroglia

Oligodendrócitos se originam de precursores migratórios e mitóticos, passam a progenitores, e com a progressiva maturação atingem o estágio de células pós-mitóticas produtoras de mielina (Miller, 2002). A expressão sequencial de marcadores do desenvolvimento, identificados por um painel de anticorpos específicos da oligodendroglia divide a linhagem em diferentes estágios fenotípicos, caracterizados pela capacidade proliferativa, capacidade de migração e mudanças morfológicas dramáticas, desde células com morfologia unipolar e bipolar (precursores e progenitores) até células com múltiplos prolongamentos e expansões de membrana (oligodendrócitos maduros mielinizastes), como mostra a Figura 4. A diferenciação envolve a perda de alguns antígenos de superfície ou intracelulares e a aquisição de outros novos. Caracterizam os estágios com maior capacidade proliferativa (precursores e progenitores) os gangliosídeos de superfície, ainda não totalmente caracterizados, identificados pelo anticorpo A2B5 (anticorpo monoclonal que reconhece gangliosídeos em progenitores O2-A) (Raff, 1989); o receptor alfa do fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR α) (Hart et al., 1989; Decker, french-Constant, 2004); os proteoglicanos sulfatados de ratos (NG2) (Nishiyama et al., 1996), que aparecem logo depois do PDGFR α e se co-localizam com este tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Nishiyama et al., 1996); a forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural (PSA-NCAM), (Ben-Hur et al., 1998); nestina, uma proteína que distingue linhagens de células neuroepiteliais (Lendahl et al., 1990); e o RNAm para 2',3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase), que é o primeiro marcador protéico específico de oligodendrócito a surgir (de Vries et al., 1997). O aparecimento sequencial de MBP e também de outra proteína minoritária, a glicoproteína associada à mielina (MAG), assim como de proteína proteolipídica (PLP) e da glicoproteína de oligodendrócito e mielina (MOG), que também é correlacionada com estágios tardios de maturação de oligodendrócitos (Solly et al., 1996), tanto *in vivo* quanto *in vitro*, caracteriza um oligodendrócito maduro (Pfeiffer et al., 1993) (Figura 4). Em cerebelos de ratos, a CNPase aparece ao mesmo tempo do Galactocerebrósídeo (GalC), e a proteína básica de mielina (MBP) é expressa 2-3 dias depois, juntamente com a PLP (Baumann, Pham-Dinh, 2001) e imediatamente antes da formação de mielina.

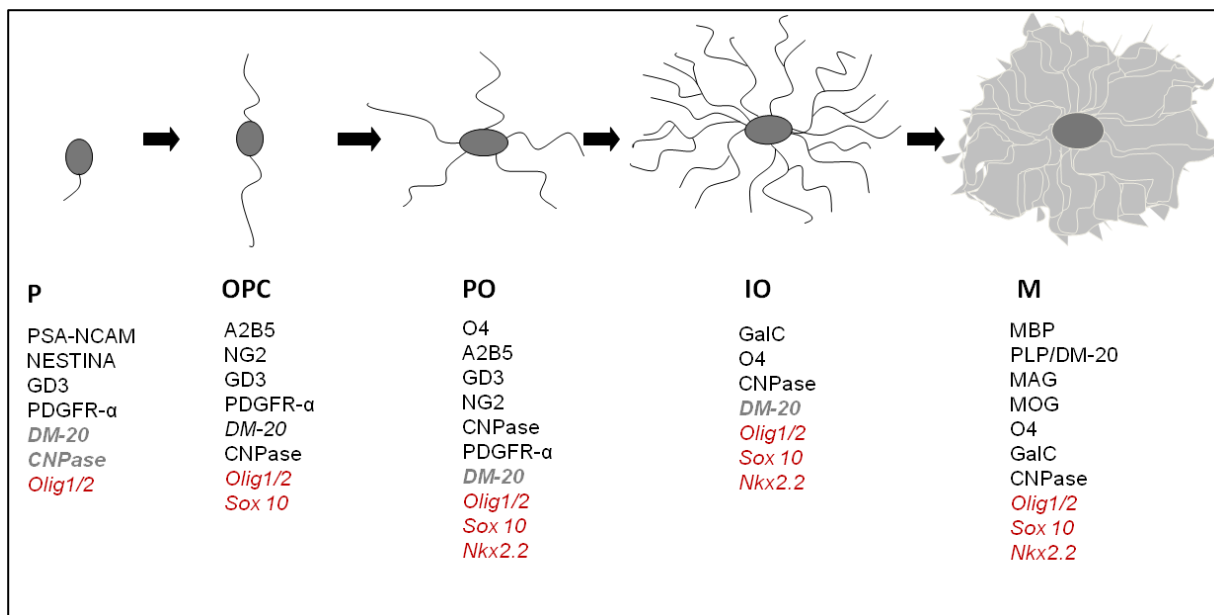


Figura 4 – Esquema representativo da classificação morfológica e antigênica nas diferentes fases de maturação oligodendrocítica

Legenda: P (precursor), OPC (célula progenitora de oligodendrócitos), PO (pré-oligodendrócito), IO (oligodendrócito imaturo), M (oligodendrócito maduro com véus de membrana). Seguem listadas as proteínas expressas em cada estágio específico (em preto), os RNA mensageiros (em cinza) e os fatores de transcrição (em vermelho).

Nota: Alguns autores, inclusive o nosso grupo, já identificaram a proteína CNPase já expressa nesta fase de progenitor.

Fonte: adaptado de Younes-Rapozo et al., 2009.

No fim da década de 1980, trabalhos do grupo de Goldman, utilizando uma série de marcadores celulares como: o gangliosídeo GD3, presente em células neuroepiteliais; o gangliosídeo GQ1 (reconhecido pelo A2B5); anidrase carbônica II, GalC e MBP, marcadores da oligodendroglia; e marcadores precoces (vimentina) e tardios (GFAP) da astroglia; demonstrou divergência precoce de células astrogliais e oligodendrogliais no cerebelo, com o último tipo se originando de precursores da zona sub-ventricular do IV ventrículo (LeVine, Goldman, 1988). A diferenciação da oligodendroglia do cerebelo do rato também foi estudada nesta mesma época utilizando, além dos marcadores já citados, a CNPase. Neste trabalho é demonstrada a origem dos oligodendrócitos do cerebelo a partir de precursores do véu supra-medular e da região adjacente ao IV ventrículo (Reynolds, Wilkin, 1988). Ao nascimento, oligodendroglia que expressa CNPase (CNPase+) é encontrada na base do cerebelo (Figura 5A – setas). Após um dia (Figura 5B) está presente na

folha 1, e com o avanço do desenvolvimento já é encontrada em todas as folhas cerebelares (Figura 5C e D).

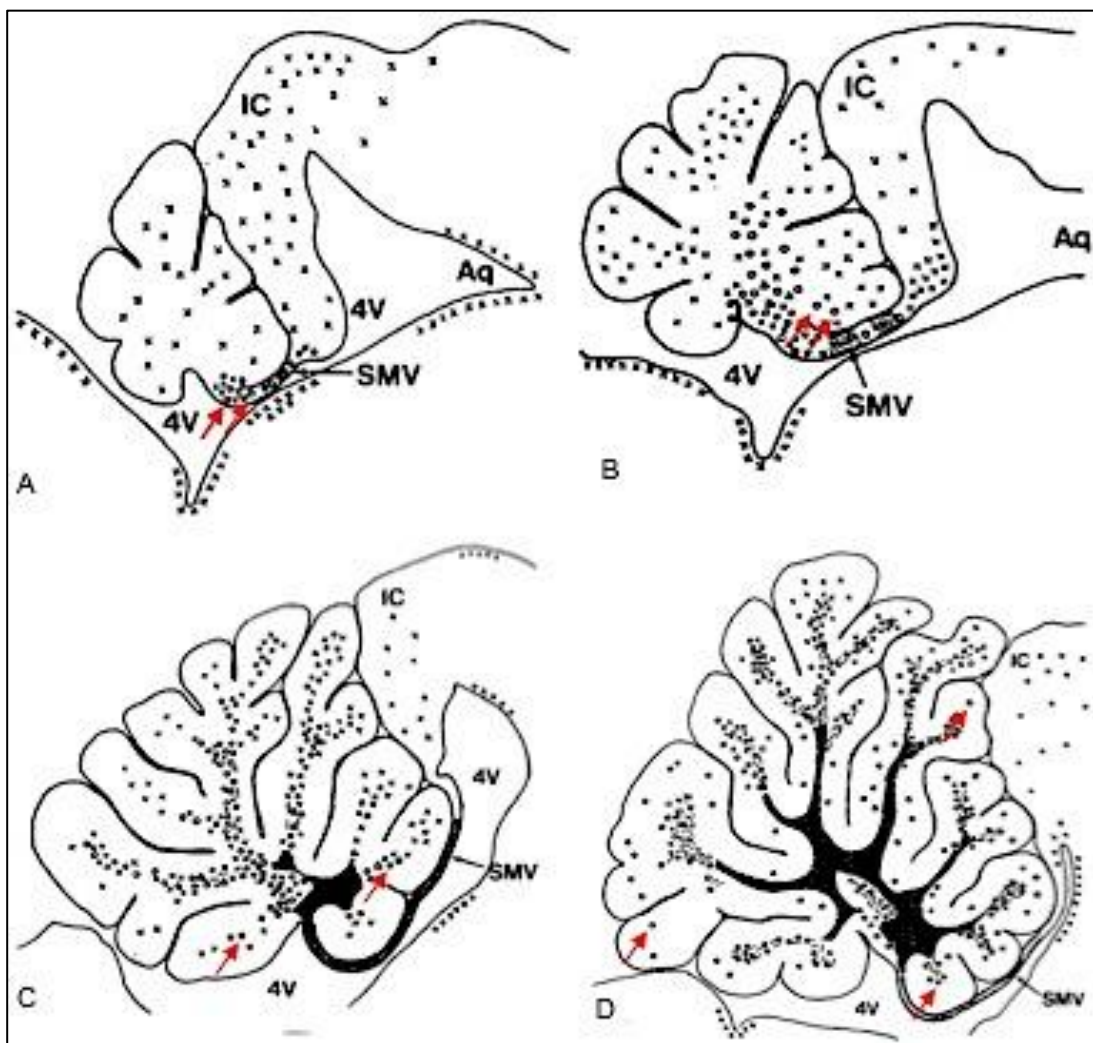


Figura 5 – Representação esquemática do desenvolvimento oligodendroglial no cerebelo do rato do nascimento até P10

Legenda: (A) Nascimento, (B) 24 h, (C) 5 dias, (D) 10 dias. 4V, quarto ventrículo; Aq, aqueduto cerebral; IC, colículo inferior; SMV, véu supra-medular..

Nota: Os diagramas foram desenhados a partir de fotografias de seções parasagitais coradas com azul de toluidina após a imunohistoquímica, de acordo com os símbolos: x, células GD3+; O, células GalC+/CNPase+; Δ, corpos de células GalC+/CNPase+/MBP+; =, pequenos segmentos de mielina MBP+; em negro, áreas densamente mielinizadas. A presença de células GD3+ nas zonas sub-ventriculares e no colículo inferior é adicionada para dar uma indicação de uma possível origem de precursores gliais entrando no cerebelo. As setas vermelhas realçam a localização das células GalC+/CNPase+. Nas áreas densamente mielinizadas não foram desenhados os corpos celulares para maior clarificação

Fonte: Adaptado de Reynolds, Wilkin, 1988.

O cerebelo apresenta aspectos próprios que o torna distinto de toda e qualquer outra estrutura encefálica. Primeiramente, o córtex cerebelar com suas células organizadas de maneira regular e simples, repetidas de maneira muito semelhante ao longo de toda a estrutura. Além disso, a natureza de suas conexões com outras áreas, em particular com o córtex cerebral. Essas características fazem com que qualquer alteração na estrutura regular possa alterar o processamento de informações, acarretando possíveis danos ao indivíduo.

Avaliação funcional em modelos de HI

Nos vários modelos de HI que existem atualmente, diversos aspectos comportamentais tem sido estudados. No estudo inicial em que Robinson et al. propuseram o modelo utilizado nessa tese (Robinson et al., 2005), foram observados déficits motores persistentes quando comparados ao grupo SHAM no teste do campo aberto (*open field*) e no teste *Stride length*. Segundo os autores, estes achados seriam consistentes com o modo de andar espástico de crianças que desenvolveram paralisia cerebral. Em outro trabalho (Mazur et al., 2010) verificaram que a administração de eritropoietina, uma citocina que atua no sistema nervoso central ativando proteínas cinases específicas, melhorava a performance motora em animais jovens (P23) e adultos (3 meses) em testes de equilíbrio (*bar hold test*), caminhada sobre barras (*Ladder test*) e avaliação do comprimento das passadas (*Stride length*).

Em modelos de hipóxia neonatal, como o de ligadura unilateral da artéria carótida, não foram observados efeitos da HI na atividade locomotora de camundongos (Józwiak et al., 2006). Neste modelo, a administração de MK801 aumentou a atividade locomotora em ambos os grupos, SHAM e hipóxia. Girard et al. encontraram danos motores através do teste do cilindro giratório (RotaRod) em animais entre 35 e 45 dias de vida.

No modelo de Bjelke, onde a hipóxia é feita submergindo os cornos uterinos contendo os fetos em solução salina por período variável de tempo, não foram observadas alterações no teste de busca e discriminação de novos objetos (*novelty seeking behaviour*) em ratos adolescentes (Spandou et al., 2005), enquanto animais

adultos apresentaram diminuição de atividade locomotora e menor comportamento estereotipado (Venerosi et al., 2004). Em outro estudo foram observadas alterações comportamentais tanto nos animais que sofreram apenas a cesariana quanto em animais que passaram por hipóxia (Venerosi et al., 2006). Nesse modelo, não foram observados efeitos da hipóxia sobre aspectos relacionados à ansiedade, no teste do labirinto em cruz elevado (Galeano et al., 2011).

Dada a importância do cerebelo em diversos aspectos do comportamento, da variedade de lesões causadas por eventos de HI e pela crescente evidência do papel da neurotransmissão glutamatérgica neste tipo de lesão, decidimos avaliar os efeitos da inibição da atividade glutamatérgica sobre um dos tipos de GluRs, o NMDA. A busca por agentes terapêuticos adequados na prevenção de lesões encefálicas no feto é difícil, não apenas devido à maioria dos compostos terem baixa penetrância pela barreira hematoencefálica. A janela temporal para agentes terapêuticos é outro desafio. Quanto mais precoce for a administração destes, tanto maiores serão as chances de se obter algum sucesso, já que a maior parte das lesões devem decorrer nas primeiras horas e dias.

1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos celulares e sobre o comportamento motor da administração de MK801, um antagonista de receptor de glutamato do tipo NMDA, no mesmo modelo de lesão.

1.1 Objetivos específicos

Avaliar a diferenciação de oligodendrócitos/mielina no cerebelo através da imunohistoquímica para o PDRGR α e MBP durante o desenvolvimento.

Avaliar o desenvolvimento das células de Purkinje através da imunohistoquímica para calbindina.

Avaliar a distribuição do transportador de glutamato GLAST no cerebelo, assim como a morfologia da glia de Bergmann.

Avaliar o padrão de ansiedade e atividade locomotora através dos testes do labirinto em cruz elevado e do teste do campo aberto.

Avaliar diferentes aspectos da motricidade através de testes sensório-motores, como RotaRod, teste de caminhada sobre barras (Ladder test) e teste do comprimento da passada (Stride length).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das ratas grávidas

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o número UERJ/CEA/019/2010. Todos os animais utilizados neste estudo foram obtidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia. O regime de iluminação seguiu um ciclo de claro-escuro, com as luzes acendendo às 6h e apagando às 18h.

Ratas Wistar, a partir de 90 dias de vida, foram postas para acasalar sempre no período final da tarde e permaneciam com os machos por três dias. Em todas as manhãs foi feita análise do esfregaço vaginal para procura de espermatozóides e células queratinizadas típicas do estro, ou a presença do plugue vaginal. Estes parâmetros definiram o dia 1 de gravidez (Marcondes et al., 2002). Aos 18 dias de gestação as ratas foram anestesiadas com Avertin® (35mg/100g de peso corporal) preparado no dia da administração (0,5 g de tribromoetanol + 0,31 ml de 2-metil-2-butanol + 39,5 ml de água destilada) aplicado em doses fracionadas durante a cirurgia. Após a laparotomia os cornos uterinos foram expostos. As quatro artérias uterinas foram obstruídas com grampos de aneurisma por 45 minutos (Grupo HI), como pode ser observado na Figura 6. A interrupção do fluxo sanguíneo foi verificada visualmente pela alteração na coloração da vascularização na parede uterina (os cornos uterinos tornam-se mais claros). Nos animais SHAM (Grupo SH) os úteros foram expostos, mas nenhuma oclusão das artérias uterinas foi realizada. Após o período de oclusão, os grampos foram removidos, e a reperfusão foi confirmada por inspeção visual, tanto nas artérias quanto nos vasos mais externos da parede uterina. Os cornos uterinos foram então reposicionados na cavidade peritoneal, e foi feita sutura por planos anatômicos. Ao acordarem da cirurgia, foi administrada por via oral, com auxílio de uma agulha de gavagem, dipirona infantil (10mg/100g de peso corporal) para analgesia. Os animais nasceram a termo (E22) sem nenhuma intervenção por parte do experimentador. O número médio de animais por ninhada variou de seis a oito. Ninhadas com mais de oito animais foram ajustadas para oito ainda nas primeiras 24h de vida pós-natal. Toda a ninhada foi

aproveitada, tanto animais machos quanto fêmeas. Nas idades iniciais de P9, P23 e P30 foram utilizados somente filhotes do sexo feminino para as análises histológicas e para os testes comportamentais e histologia posterior, apenas machos.

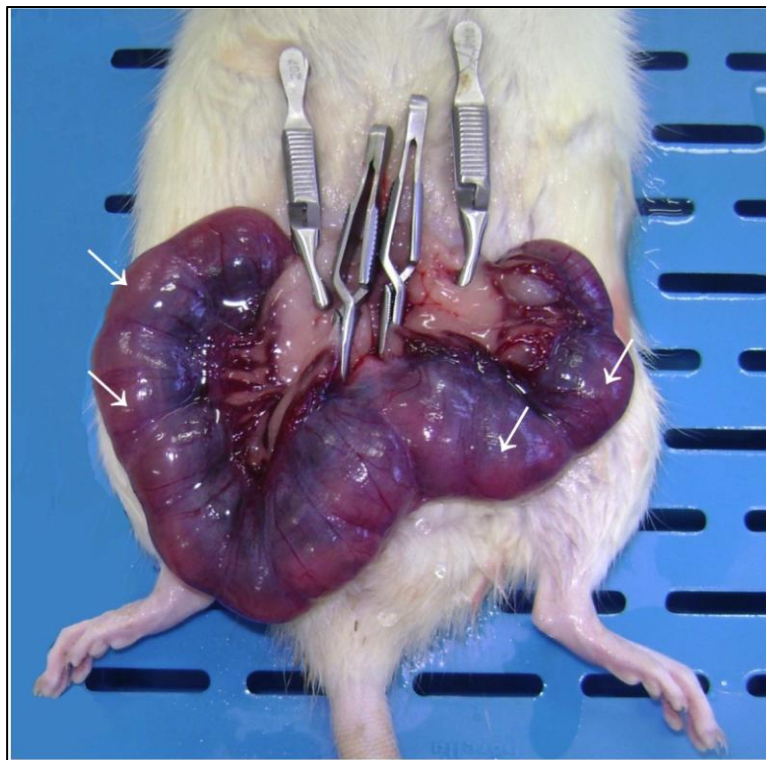


Figura 6 – Fotografia ilustrando a cirurgia realizada em ratas no décimo oitavo dia de gestação com a obstrução das artérias uterinas

Legenda: Modelo de hipóxia-isquemia desenvolvido por Robinson et al. (2005).

Nota: Observar a coloração clara (esbranquiçada) da parede uterina (setas).

2.2 Tratamento com antagonista não-competitivo do receptor NMDA - MK801

Um dia após o nascimento, metade da ninhada foi aleatoriamente designada para receber solução salina (NaCl 0,9%) ou MK801 (0,3mg/kg de peso corporal i.p.), uma vez ao dia, durante cinco dias. Em algumas ninhadas os animais SALINA foram pintados diariamente com violeta de genciana no dorso, e em outras foram os animais que receberam MK801. Assim, temos quatro grupos: SS – SH+SALINA; SM – SH+MK801; HS – HI+SALINA; HM – HI+MK801.

A Figura 7 mostra as etapas, desde o procedimento cirúrgico até os testes comportamentais e posterior estudo histológico.

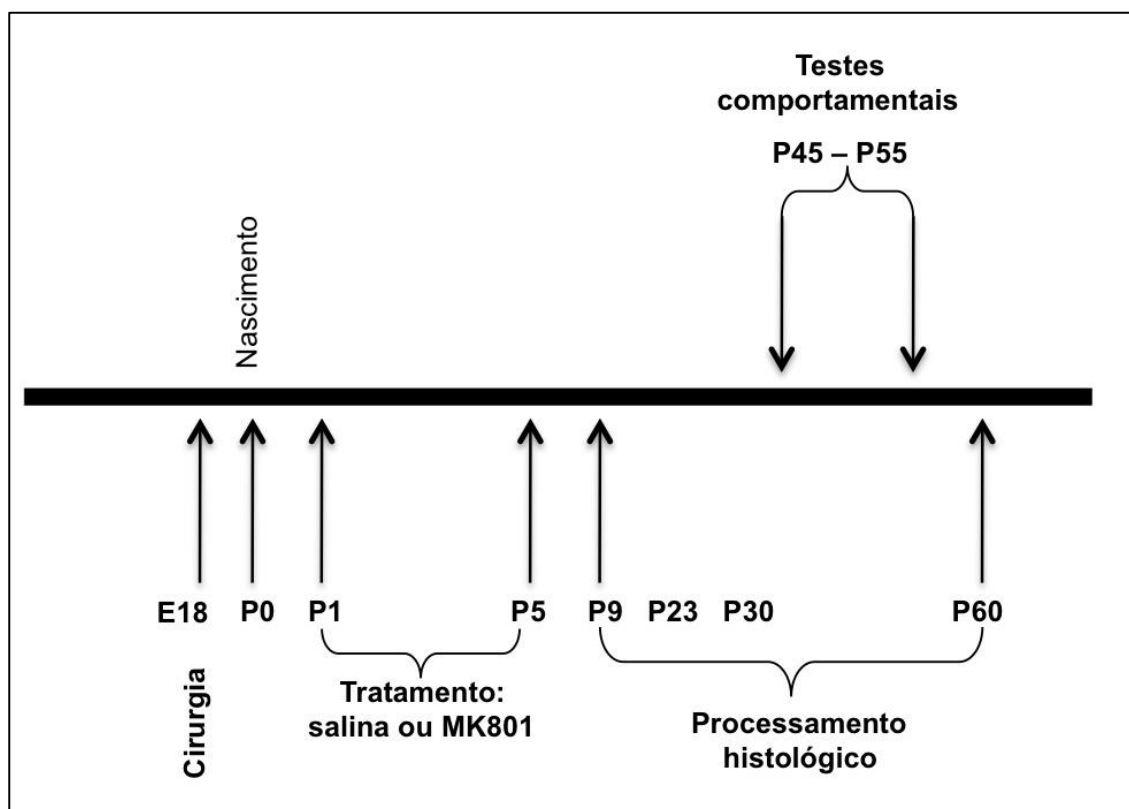


Figura 7 – Delineamento experimental

Nota: A Figura mostra as etapas experimentais, desde o procedimento cirúrgico até o estudo histológico após os testes comportamentais.

2.3 Processamento histológico

Animais com idades variando de 9 a 60 dias pós-natal (P9, P23, P30 e P60) foram anestesiados com tiopental e perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9%, paraformaldeído 4% e paraformaldeído com sacarose a 10%, nessa ordem. Após serem retirados da caixa craniana os encéfalos permanecem em paraformaldeído com sacarose a 10% entre 1 e 2 horas e, posteriormente foram armazenados em solução de tampão fosfato com sacarose a 20%, durante a noite a 4°C. Processada a crioproteção, foi feita a inclusão em OCT para a criotomia: o congelamento rápido do bloco foi obtido por imersão em nitrogênio líquido. Os cortes, com espessura de 25µm, em plano parasagital foram obtidos em criótomo e montados em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%. As regiões de interesse foram coletadas segundo as coordenadas obtidas do Atlas estereotáxico

(Paxinos, Watson, 1998). Cortes parassagitais na região do vermis, de Lateral - 0,9mm a Lateral 0,9mm (Figuras 79, 80 e 81 do atlas estereotáxico) foram recolhidos de maneira seriada em lâminas gelatinizadas, mantidas a -20°C , enquanto aguardavam o processamento imunohistoquímico.

2.4 Imunohistoquímica

Foram utilizados os seguintes anticorpos, conforme o Quadro 1:

Quadro 1 – anticorpos primários e secundários que foram utilizados neste estudo

Anticorpos Primários				
Anticorpo anti-	Marca	Isotipo	Origem	Diluição
GLAST	ABCAM	IgG	Coelho	1:100
MBP	Serotec	IgG	Camundongo	1:100
PDGFR α	Santa Cruz	IgG	Coelho	1:100
GFAP	Sigma	IgG	Camundongo	1:400
Calbindina	ABCAM	IgG	Coelho	1:1000
Anticorpos Secundários				
Anticorpo anti-	Conjugado a	Marca	Origem	Diluição
IgG camundongo	Alexa 555	Invitrogen	Cabra	1:500
IgG coelho	Alexa 488	M. Probes	Cabra	1:400
IgG coelho	Alexa 488	M. Probes	Burro	1:400

As lâminas foram lavadas seis vezes em PBS+triton 0,3% (salina tamponada com fosfato: KCl 2,7mM; KH_2PO_4 1,47mM; NaCl 136mM e Na_2HPO_4 8mM; pH 7,4). Em cada lavagem os cortes ficaram submersos por 5 minutos. Após as lavagens esses foram incubados com soro normal de cabra a 10% em PBS+triton 0,3% por duas horas, ou leite em pó Molicco® 1% em PBS+triton 0,3% por 1 hora, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário durante a noite a 4°C . Após este período, prosseguiu-se com seis lavagens de 5 minutos cada com PBS incubação com o anticorpo secundário apropriado, por 1 a 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens de 5 minutos cada com PBS, as lâminas foram montadas com ProLong antifade (Invitrogen nº catálogo P36930) ou em n-propil galato e foram observadas ao microscópio de fluorescência.

As análises foram feitas com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX-40, acoplado a uma câmera de vídeo digital (Olympus DP71).

2.5 Análise morfológica e quantitativa

Fotomicrografias da substância branca profunda no cerebelo em P9 e P23 foram obtidas utilizando uma lente objetiva de 40x. Este aumento foi escolhido por permitir uma boa visualização e definição dos corpos celulares. Com o auxílio do software Image Pro Plus (versão 7.0), foi desenhado um quadrado com 100 μm quadrados. Este foi aleatoriamente inserido em cada imagem, e o número de células positivamente identificadas foi contado.

Fotomicrografias das folhas 1 e 3 do cerebelo foram obtidas utilizando uma lente objetiva de 20x. Utilizando uma régua micrométrica calibrada e o software Image Pro Plus (versão 7.0), a espessura da camada de Purkinje foi medida, somando-se o corpo celular com a árvore dendrítica.

2.6 Análise comportamental

A análise comportamental foi realizada a partir das imagens gravadas (Samsung Camcorder SMX-C10GN/XAA) e com o auxílio de programas de computador desenvolvidos pelo Laboratório de Neurofisiologia/IBRAG/UERJ (ACC Behav, ACC OpF HB Rat e ACC Plus M), a fim de gerar dados para a análise quantitativa.

Para a avaliação comportamental, foram utilizados animais machos a partir de 45 dias de vida. Todos os testes foram feitos no mesmo ambiente, sempre a partir das 18h, e tinham duração de uma semana e meia. A Figura 8 mostra o protocolo de testes utilizado. Cerca de trinta minutos antes do início de cada teste, os animais eram levados para a sala de teste para habituação.

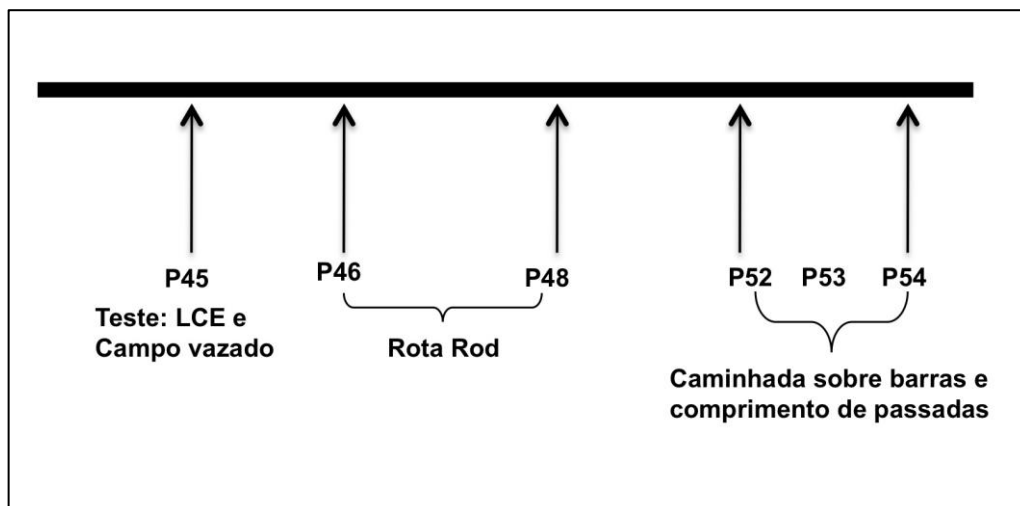


Figura 8 – Sequência dos testes comportamentais utilizados neste estudo

2.6.1 Avaliação da ansiedade

Para avaliação da ansiedade utilizamos o teste do Labirinto em cruz elevada. Esta avaliação é importante uma vez que este parâmetro é um fator de confusão nas análises sensório-motoras posteriores.

2.6.1.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O equipamento tem formato em cruz e consiste em 2 braços abertos (sem paredes, medindo 28.5 x 7 cm) e dois braços fechados (com paredes medindo 28.5 x 7 x 14 cm) perpendiculares entre si e elevados 50 cm acima do chão, como pode ser observado na Figura 9. Os animais iniciavam o teste sempre postos no centro, com a cabeça voltada para um dos braços abertos. O teste tinha duração de 5 minutos. Os tempos de permanência e os números de entradas em cada uma das áreas do labirinto (braços abertos, braços fechados e região central) foram medidos. O tempo de permanência nos braços abertos e o seu percentual (Tempo BA e %Tempo BA: Tempo BA dividido pela soma do Tempo BA com o tempo de permanência nos braços fechados – Tempo BF) e o número de entradas nos braços

abertos e o seu percentual (Entradas BA e %Entradas BA: Entradas BA dividido pela soma das Entradas BA com o número de entradas nos braços fechados – Entradas BF) foram utilizados como medidas de ansiedade (Fraga-Marques et al., 2009; Fraga-Marques et al., 2010). O número de entradas no braço fechado (Entradas BF) foi utilizado como medida de atividade. Uma entrada é contada sempre que o animal cruza com as duas patas dianteiras em direção a uma das áreas do labirinto. Adicionalmente, o percentual de tempo de permanência no centro do labirinto (%Tempo CN: tempo de permanência no centro dividido pelo tempo total do teste) foi utilizado como uma medida independente de tomada de decisão (Manhães et al., 2008; Rodgers, Dalvi, 1997). Também foram avaliados parâmetros etológicos (Rodgers, Dalvi, 1997) como: rearing (movimentos verticais sobre as patas traseiras, tratados aqui como verticalizações), stretched attend posture (SAP: o animal estica-se para fazer exploração sem dar passos, tratados aqui como alongamentos) e grooming (comportamento de autolimpeza).

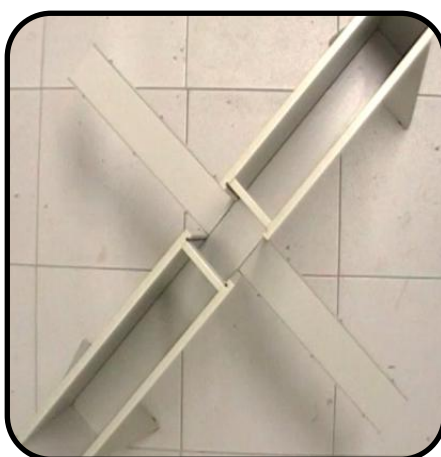


Figura 9 – Fotografia do aparelho para o teste do Labirinto em Cruz Elevado utilizado neste estudo

2.6.2 Avaliação da atividade locomotora espontânea e busca por novidade

2.6.2.1 Teste de campo vazado (CV)

Consiste numa arena de madeira, suspensa 10 cm do chão, medindo 80 cm x 60cm, com orifícios no piso em espaçamentos regulares, totalizando 20 orifícios,

como pode ser observado na Figura 10. O teste tinha início com o animal sempre numa mesma borda, e tinha duração de 5 minutos. Cada animal passava por apenas uma sessão de teste. A atividade locomotora foi avaliada utilizando-se o número de orifícios explorados, tanto no centro como no total (Fraga-Marques et al., 2009; Fraga-Marques et al., 2010). Dados etológicos também foram avaliados, como *rearing* (movimentos verticais sobre as patas traseiras - tratados aqui como verticalizações), *stretched attend posture* (SAP: o animal estica-se para fazer exploração sem dar passos - tratados aqui como alongamentos) e *grooming* (comportamento de autolimpeza), os quais têm sido utilizados como medidas de atividade vertical, avaliação de risco e exploração (Rodgers et al., 1997). Neste teste, a deambulação também foi avaliada. O campo foi dividido em 30 quadrados, e sempre que o animal pisava com as duas pernas dianteiras, este era contado. Foram avaliados o total de quadrados no centro e o total de quadrados somando-se a borda e o centro.

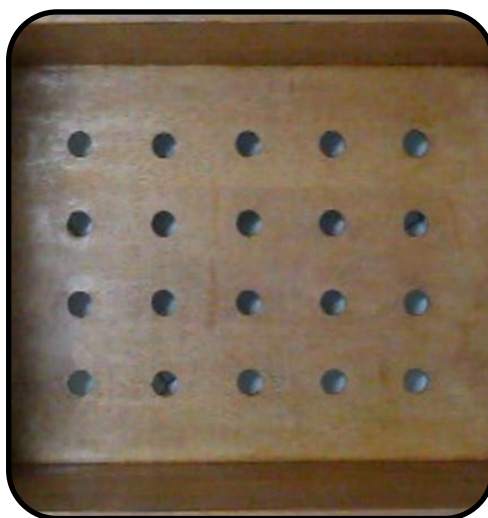


Figura 10 – Fotografia do equipamento para o teste do Campo Vazado utilizado neste estudo

2.6.3 Avaliação motora

Para avaliação do comportamento motor, foram utilizados três testes.

2.6.3.1 Rota rod ou cilindro giratório

Consiste em um cilindro giratório com aceleração de 4 a 40 rpm em 5 minutos (Figura 11). Este teste foi realizado por 3 dias seguidos, com 5 testes em cada dia por animal, com 1 minuto entre cada teste. O parâmetro avaliado foi a latência de queda do aparelho (Dunham, Miya, 1957).



Figura 11 – Fotografia do aparelho para o teste do Rota Rod utilizado neste estudo

2.6.3.2 Teste de caminhada sobre barras

O equipamento consiste em duas placas de acrílico transparente, medindo 1 metro de comprimento por 30 cm de altura, com 3 mm de espessura, e em uma das laterais, na parte inferior, furos de 3 mm são feitos com espaçamentos regulares, de 1 cm, ao longo de todo o comprimento, como mostra a Figura 12. Barras de aço inoxidável com 3 mm de diâmetro ligam as duas placas, permitindo o ajuste da largura. Os animais foram habituados ao equipamento por dois dias, com duas sessões de aproximadamente 10 minutos, onde eram postos para caminhar sobre o aparelho, e tinham livre acesso ao mesmo. O intuito desta habituação é o de diminuir ao máximo o efeito estressante do teste, que poderia refletir no comportamento motor. Nestes dias, as barras eram postas de maneira regular, com

2 cm de espaçamento entre elas. No terceiro dia, os animais eram testados três vezes, com configurações diferentes e irregulares, sendo que as distâncias entre as barras variaram entre 1 e 5 cm.

Para cada tipo de pisada, de cada pata, foi dada uma pontuação, segundo o sistema de pontuação proposto por Metz e Whishaw em 2009. O número total de passos também foi contabilizado. Não foram contabilizados erros com escores 0, 1 e 2 em sequência.

(0) Total miss - Zero ponto: quando o animal erra a barra completamente, não tocando a barra e chocando o ventre nas barras, alterando a postura e o equilíbrio.

(1) Deep slip - Um ponto: a pata inicialmente toca a barra mas quando o peso seria sustentado, há o escorrego, e a queda.

(2) Slight slip - Dois pontos: a pata inicialmente toca a barra mas quando o peso seria sustentado, há o escorrego, mas sem queda. Esse tipo de erro não altera o equilíbrio e o animal é capaz de manter a marcha.

(3) Replacement - Três pontos: a pata é posta numa barra, mas antes de sustentar o corpo, era rapidamente deslocada para outra barra.

(4) Correction - Quatro pontos: o animal objetiva pisar uma determinada barra, mas durante o movimento troca e pisa em outra.

(5) Partial placement - Cinco pontos: essa pontuação é dada quando o animal pisa ou com o punho ou dígitos com as patas dianteiras, ou com dígitos e calcanhar para as patas traseiras.

(6) Correct placement - Seis pontos: a pisada é feita com a porção medial da palma ou planta das patas, capaz de sustentar o peso completamente.

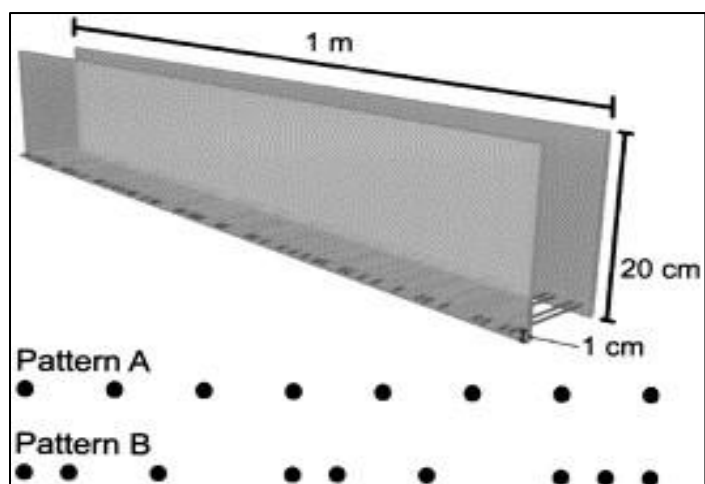


Figura 12 – Desenho esquemático do equipamento para o teste de caminhada sobre barras utilizado neste estudo

2.6.3.3 Teste do comprimento das passadas

Neste teste, os animais tinham as patas pintadas com tinta não tóxica, utilizando-se uma cor para cada pata, como pode ser observado na Figura 13. O comprimento de cada passada foi medido (em cm). A partir de cada conjunto de dados, foi feita a média das passadas, com cada passada sendo subtraída da média, para avaliar a variação de cada passada.

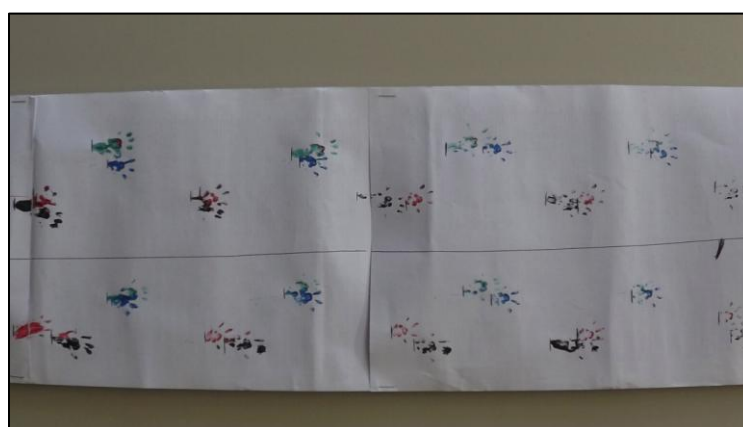


Figura 13 – Fotografia de dois testes do comprimento da passada
Nota: Os animais caminharam da esquerda para a direita, sob um túnel feito com o aparelho do teste de caminhada sobre barras

2.7 Análise estatística

Todas as distribuições de dados foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para uma amostra. Para valores de $P < 0,05$ (bicaudal), as distribuições foram consideradas não-paramétricas e as análises posteriores realizadas considerando-se esta característica. Para valores de $P \geq 0,05$, as distribuições foram consideradas paramétricas.

Para o teste do LCE, uma ANOVA multivariada (mANOVA) foi utilizada para a análise dos seguintes dados: Tempo BA, %Tempo BA, %Tempo CN, Entradas BA, %Entradas BA e Atividade Total (Entradas BA + BF). Os fatores utilizados foram o PROCEDIMENTO (hipóxia ou SHAM) e TRATAMENTO (MK801 ou salina). Os dados etológicos (verticalização, autolimpeza, alongamento) foram também analisados com uma ANOVA multivariada (mANOVA) usando como fatores o PROCEDIMENTO (hipóxia ou SHAM) e TRATAMENTO (MK801 ou salina).

Para o teste do CV, inicialmente, foi utilizada uma ANOVA univariada (uANOVA) para a análise do número de orifícios explorados. Os fatores utilizados foram o PROCEDIMENTO (hipóxia ou SHAM) e TRATAMENTO (MK801 ou salina). Os dados etológicos (verticalização, autolimpeza e alongamento) foram analisados com uma mANOVA usando como fatores o PROCEDIMENTO (hipóxia ou SHAM) e TRATAMENTO (MK801 ou salina).

Para os dados obtidos com o teste do ROTAROD, foi utilizada uma ANOVA de medidas repetidas (rANOVA) tendo como variável o tempo de permanência no cilindro e como fatores o PROCEDIMENTO e o TRATAMENTO. DIA (1, 2 e 3) e a TENTATIVA (1 a 5) foram utilizados como fatores de repetição.

Em relação aos dados do teste de caminhada sobre barras (Ladder test) foi utilizada uma ANOVA em que as variáveis foram o somatório dos escores, somatório dos passos para realizar o teste, somatório dos escores dividido pelo somatório dos passos, somatório dos erros (escores 0, 1 e 2) e somatório dos erros dividido pelo número de passos. Os fatores considerados foram o PROCEDIMENTO e o TRATAMENTO. Os fatores de repetição foram a TRIAGEM (1 a 3), a posição Antero-posterior das patas (frontais ou traseiras) e a posição látero-lateral das patas (esquerdas ou direitas).

No caso do teste do comprimento da passada, foi utilizada uma ANOVA em que a variável é a média das variações de cada pata e como fatores o PROCEDIMENTO e o TRATAMENTO. Os fatores de repetição são a posição Antero-posterior das patas (frontais ou traseiras) e a posição látero-lateral das patas (esquerdas ou direitas).

Sempre que houve interações entre os fatores, nos casos em que $P < 0,10$ (bi-caudal), os fatores interativos (PROCEDIMENTO e TRATAMENTO) foram separados e as ANOVAs repetidas para verificar se os efeitos eram mantidos. Teste de Fisher (Fisher *protected least square difference test* do original em inglês - FPLSD) foi utilizado para comparações par a par.

Os dados foram apresentados na forma de médias e erros padrão da média. Os efeitos de fatores individuais foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (bi-caudal).

3 RESULTADOS

Ao nascimento, os animais foram observados e nenhuma alteração perceptível foi encontrada em qualquer ninhada. Os marcos de desenvolvimento, como abertura dos olhos, crescimento de pelos, e desdobramento das orelhas não diferiu entre os grupos.

Nas idades de 9, 23, 30 e 60 dias, a avaliação da citoarquitetura por meio da coloração com cresil-violeta não mostrou alterações importantes no padrão de foliação e na estrutura cortical cerebelar.

3.1 Imunohistoquímica da Calbindina

Aos 9 dias de vida, avaliamos o padrão de desenvolvimento da camada de Purkinje através da imunomarcagem para calbindina. A espessura da camada de Purkinje em duas folhas, 1 e 3 foi avaliada. Estas folhas foram escolhidas pelo fato de a folha 1 ser uma das últimas a se desenvolver, enquanto a folha 3 se desenvolve juntamente com a maioria das outras folhas, sendo representativa do padrão de desenvolvimento da maioria das folhas. Utilizando o software Image Pro Plus (Media Cybernetics, versão 7.0) a espessura média da camada de Purkinje foi medida (corpo celular + árvore dendrítica). Os resultados para as duas estruturas foram muito semelhantes, e para simplificação, serão mostrados apenas os dados da folha 3. Observamos uma interação significativa entre o procedimento cirúrgico (HI e SHAM) e o tratamento (SALINA e MK801) (uANOVA – $F = 6,185$; $gl = 1$; $p = 0,027$). As comparações par-a-par pelo teste FPLSD mostraram que não havia diferenças entre os grupos SM, HS e HM, e que a árvore dendrítica era menor quando comparados aos animais SS, como pode ser observado na Figura 14 (SSxSM $p = 0,012$; SSxHS $p = 0,002$; SSxHM $p = 0,009$; número de animais SS=5, SM=4, HS=4, HM=4).

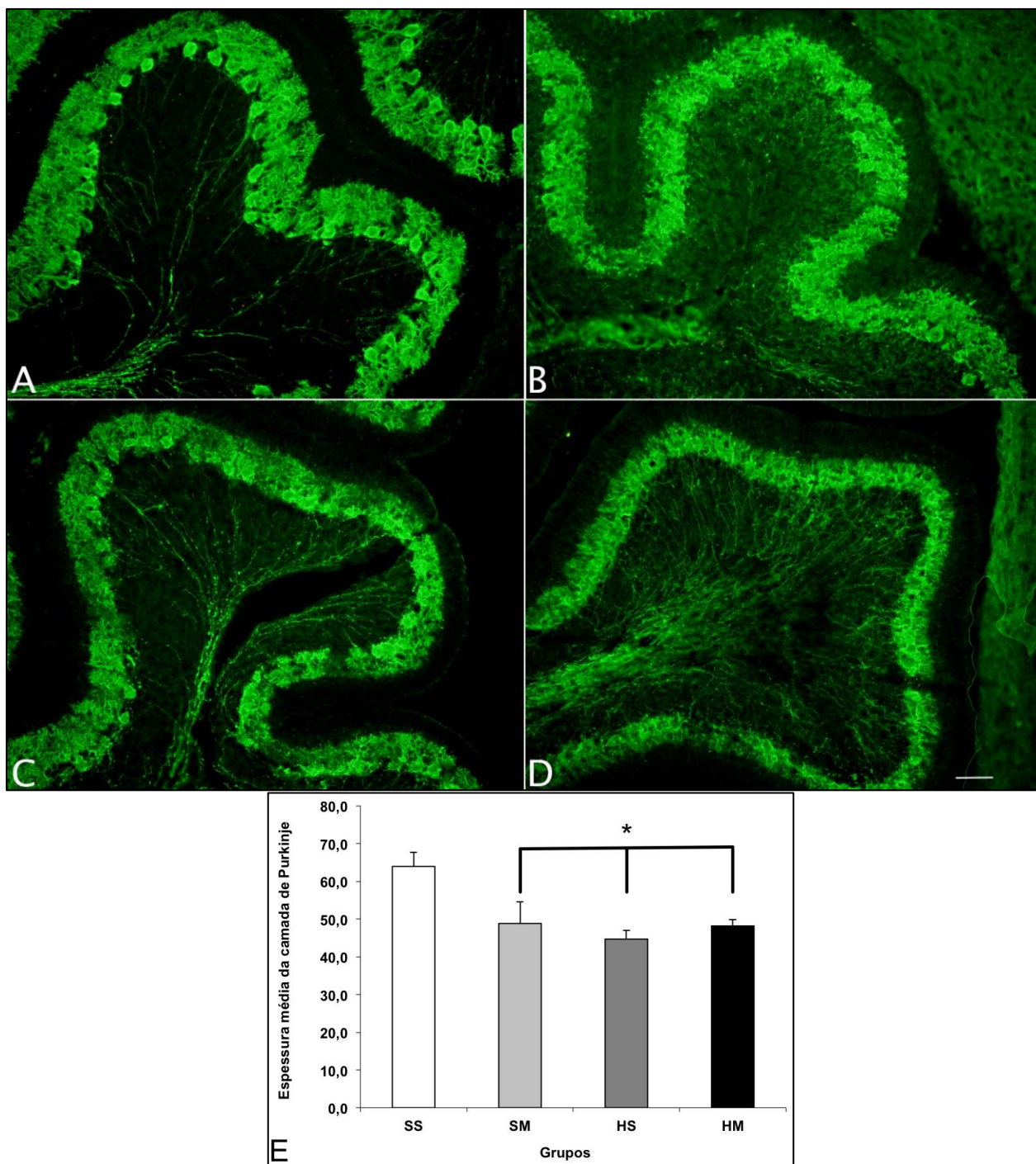


Figura 14 – Imunomarcção para calbindina no cerebelo de ratos aos 9 dias
 Legenda: A – grupo SS; B – grupo SM; C – grupo HS; D – grupo HM.

Nota: Observar que no grupo SS (A) o padrão de desenvolvimento da camada de Purkinje é maior do que nos outros três grupos (B-D). Em E, o gráfico mostra as comparações par a par, e os resultados significativos. Barra de calibração 50 μm.

Aos sessenta dias de vida, observamos que em todos os grupos a imunomarcção para calbindina evidencia uma monocamada de células de Purkinje, que não é completamente contínua, como mostra a Figura 15. Nos grupos SS/SM, assim como no HM, não observamos células ectópicas em nenhuma folha. No grupo HS, todavia, foram observadas células ectópicas em diversas folhas, especialmente na folha 15 (setas na Figura 15D).

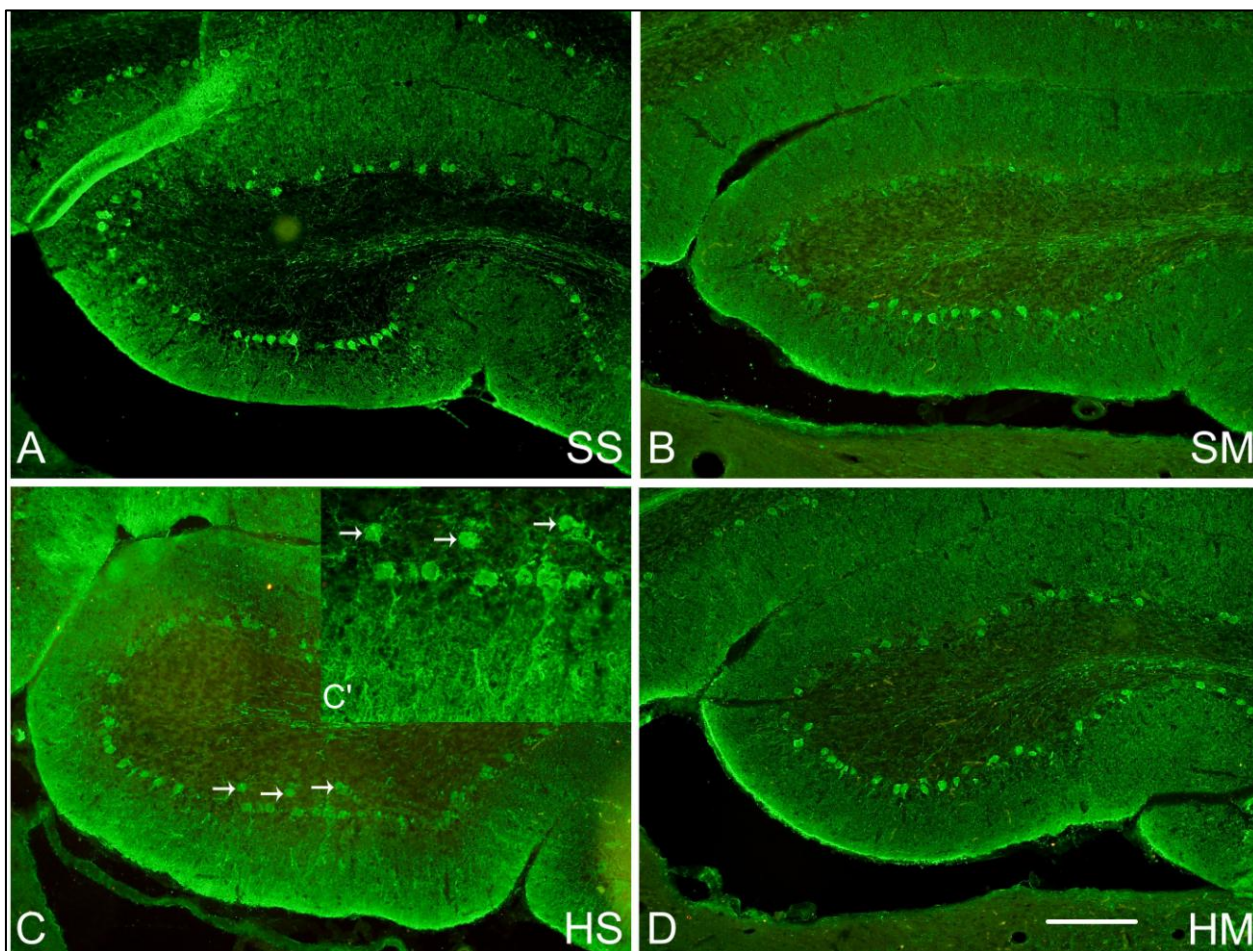


Figura 15 – Imunomarcção para calbindina no cerebelo de ratos aos 60 dias

Nota: Em todos os grupos as células de Purkinje estão dispostas em monocamada, embora esta camada apresente regiões sem marcação para calbindina. Nos animais HS, células ectópicas foram detectada em várias folhas, como mostrado em C. Não foram detectadas células de Purkinje ectópicas nos outros grupos. Barra de calibração 100 μ m.

3.2 Imunohistoquímica da GFAP e GLAST

Avaliamos a morfologia da glia de Bergmann através da imunomarcação para GFAP em P9. Não observamos diferenças óbvias entre os grupos com relação à morfologia da glia de Bergmann. Esta se apresentava bem organizada, com o padrão radial característico e forte imunomarcação, os prolongamentos bem delineados em toda sua extensão. Avaliamos em conjunto a distribuição do transportador de glutamato - GLAST. Nos animais SS a marcação era encontrada ao longo de todo o prolongamento, acompanhando a marcação para GFAP, como pode ser observado na Figura 16B. Nos animais SM a marcação não parece ser tão regular. Varias porções dos prolongamentos não apresentaram superposição (F), indicando uma alteração na distribuição desse transportador. No grupo HS, foi observado a maior irregularidade na marcação para GLAST entre todos os grupos (H). No grupo HM (L), grande parte dos prolongamentos apresentava sobreposição de GFAP e GLAST, porém ainda diferente dos grupos SHAM (conferir com C e F). Em todos os animais observamos células $GLAST^+/GFAP^-$, especialmente na camada granular.

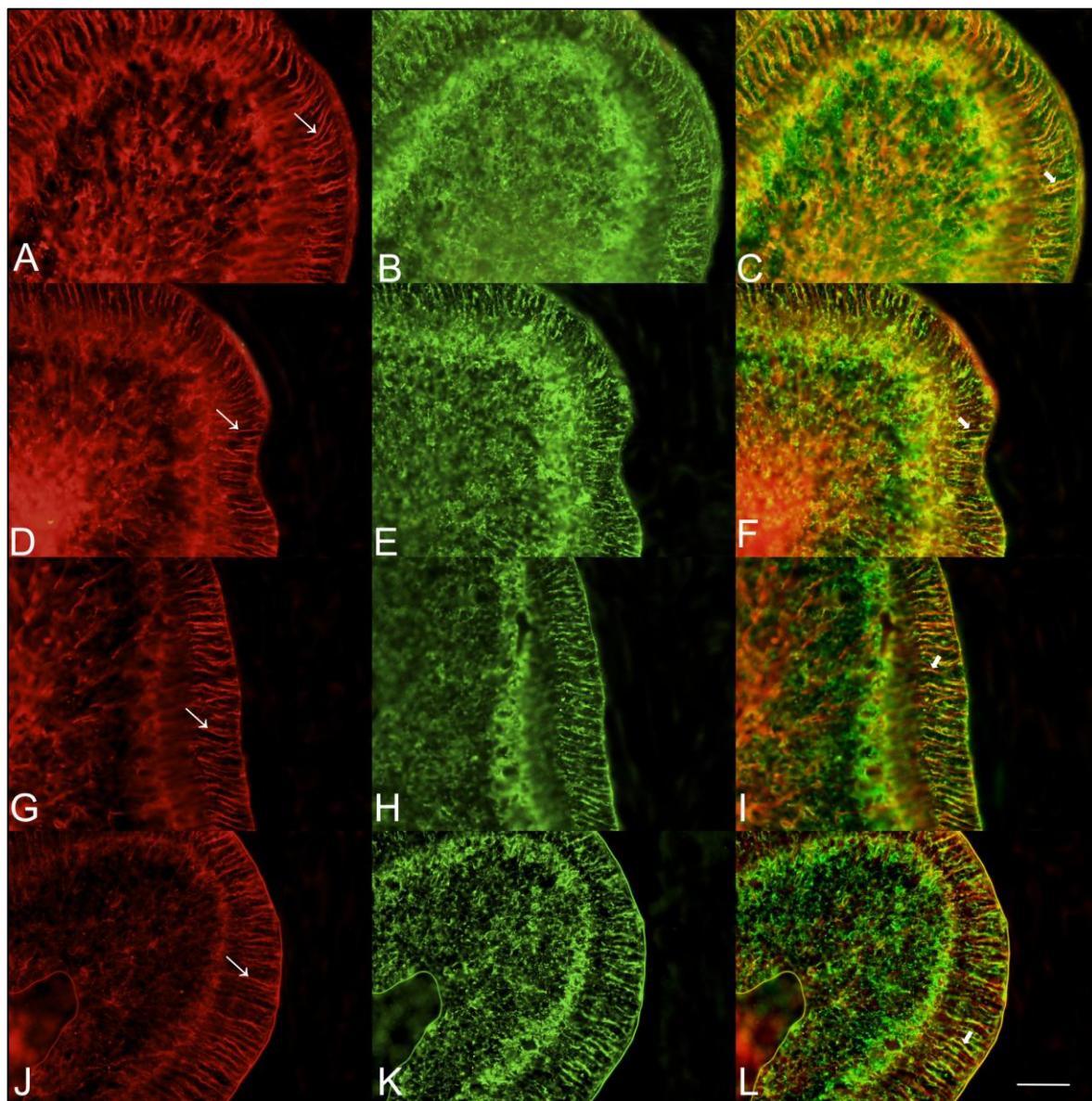


Figura 16 – Imunomarcção para GFAP (vermelho) e GLAST (verde) no cerebelo de ratos aos 9 dias de vida

Legenda: A,B e C (SS); D, E e F (SM); G, H e I (HS); J, K e L (HM); A, D G e J – GFAP; B, E, H e K – GLAST; C, F, I e L – sobreposição.

Nota: Em todos os grupos, a glia de Bergmann está bem organizada, com o seu padrão radial característico (setas). O padrão de distribuição do transportador GLAST também foi avaliado. No grupo SS (B), podemos observar que a glia de Bergmann apresenta imunomarcção ao longo de toda sua extensão (setas cheias), como mostra a sobreposição (C). A distribuição da imunomarcção do transportador GLAST não apresenta a mesma regularidade nos animais SM (setas cheias em E) da do grupo SS. No grupo HS (H), o transportador GLAST apresenta um padrão irregular de distribuição, não se distribuindo ao longo de toda a extensão dos prolongamentos. O transportador GLAST no grupo HM (K) apresenta-se distribuído ao longo dos prolongamentos em um padrão diferente ao do grupo HS, como pode ser observado na sobreposição, com grandes porções em amarelo. Barra de calibração: 50 μ m.

3.3 Imunomarcção da Oligodendroglia

Um dos subtipos celulares mais afetados em eventos de HI são as células da linhagem oligodendrocítica. Para avaliar o perfil de células progenitoras utilizamos o anticorpo contra o PDGFR α , que é um marcador estágio-específico dessa subpopulação (expresso em progenitores). O número de células PDGFR α ⁺ foi menor em ambos os animais que passaram pela hipóxia-isquemia (média de 42 células/campo) quando comparados aos animais SHAM (média de 52 células/campo), indicando um efeito predominante da hipóxia sobre esta subpopulação, nesta idade (efeito do procedimento cirúrgico - $F = 13,290$; $gl = 1$; $p = 0,003$), como mostra a Figura 17E. Nesta idade, não observamos efeito significativo do tratamento com MK801 sobre o número de células PDGFR α ⁺, tanto nos animais do grupo hipóxia quanto nos animais SHAM. Aos 23 dias, em todos os grupos foi observada uma queda acentuada no número de células PDGFR α ⁺, o que já era esperado durante o processo de desenvolvimento (efeito da idade - $F = 273,516$; $gl = 1$; $p < 0,001$).

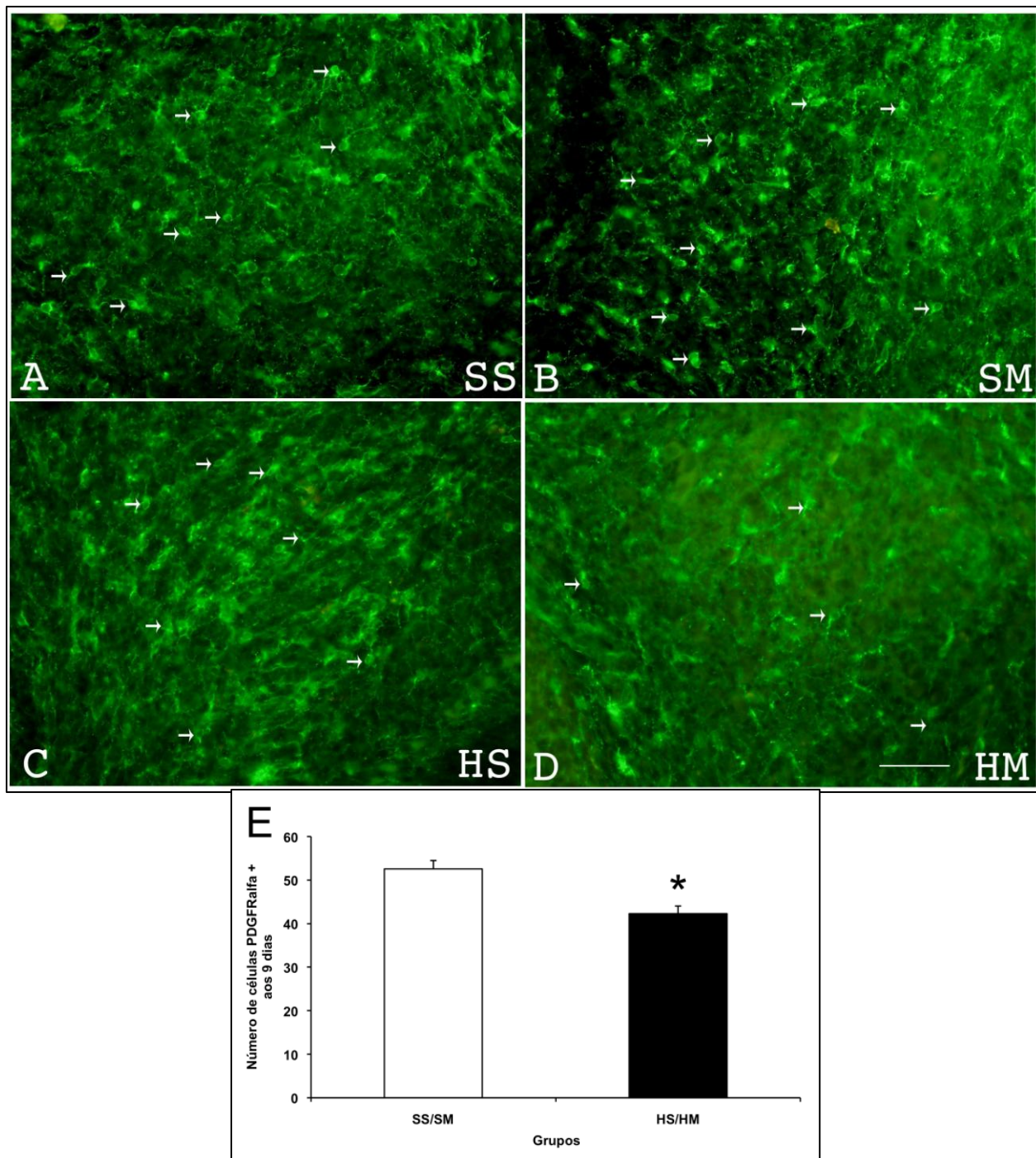


Figura 17 – Imunomarcção para PDGFR α na substância branca cerebelar de ratos aos 9 dias de vida

Nota: O número de células PDGFR α + (setas) é menor nos grupos HS/HM quando comparados com os grupos SS/SM. O gráfico mostra o número médio de células nos animais que sofreram HI comparados com os animais SHAM. Barra de calibração = 50 μ m.

Observamos uma interação significativa entre o tipo de procedimento cirúrgico (HI ou SHAM) com o tratamento (SALINA ou MK801) [$F = 5,058$; $gl = 1$; $p = 0,013$]. As comparações par-a-par mostraram que os animais do grupo HM apresentaram maior número de células PDGFR α + que os outros três grupos, conforme a relação SS/SM = HS < HM (SSxHM $p = 0,008$; SMxHM $p = 0,005$; HSxHM $p = 0,007$; número de animais SS=5 , SM=4 , HS=5 , HM=4), indicando que o tratamento com MK801 exerce um papel importante na manutenção de progenitores de oligodendrócitos nos animais HI (Figura 18E). Aos trinta dias, o número de células PDGFR α + é muito pequeno em todos os grupos examinados (1 a 3 por campo), sem diferenças aparentes.

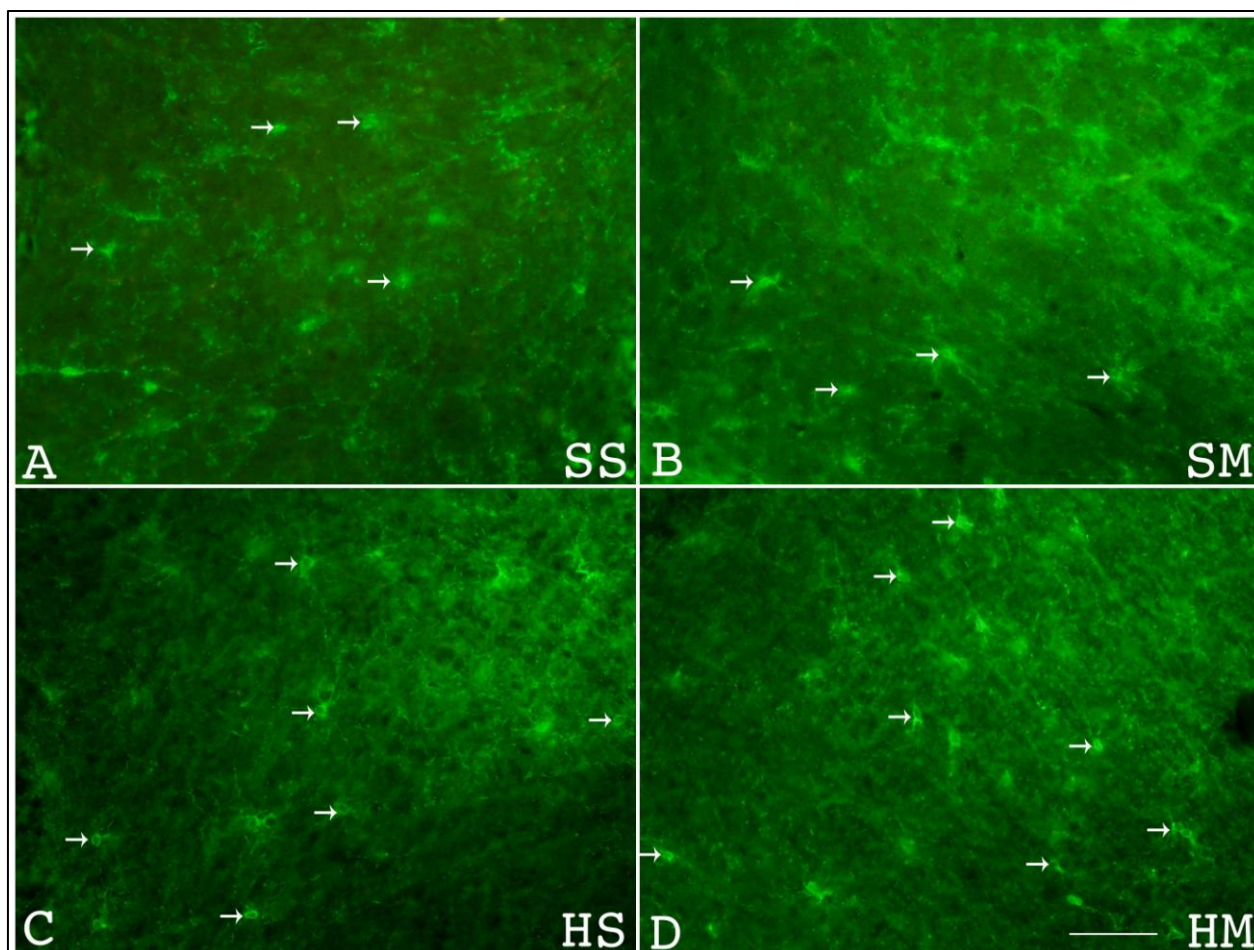


Figura 18 – Imunomarcação para PDGFR α na substância branca cerebelar de ratos aos 23 dias de vida

Nota: O número de células PDGFR α + (setas) é maior no grupo HM, quando comparados ao grupo HS e SS/SM, que não apresentam diferenças entre si. O gráfico mostra o número médio de células em cada grupo. Barra de calibração = 50 μ m.

Aos 23 dias, a imunomarcação para MBP revelou uma intensa imunorreatividade em todos os grupos. Abundante número de fibras mielinizadas (MBP+) foi encontrado nos animais SS, como mostra a Figura 19A. As fibras se estendiam por toda a camada granular, atingindo o limite com a camada de Purkinje. Os perfis de mielina eram bastante extensos. Nos animais SM, observamos uma diminuição das fibras marcadas, como mostra a Figura 19B. Nestes animais, houve uma diminuição das fibras marcadas, principalmente no limite com a camada de Purkinje, assim como ao longo da camada granular. Nos animais HS, foi observada intensa diminuição das fibras imunomarcadas (Figura 19C). Além do menor número de fibras, os perfis de mielina também parecem ser menores. Nos animais HM

(Figura 19D) podemos observar que os perfis de mielina são bastante extensos, e atingem a camada de Purkinje, de maneira semelhante ao observado nos animais SS.

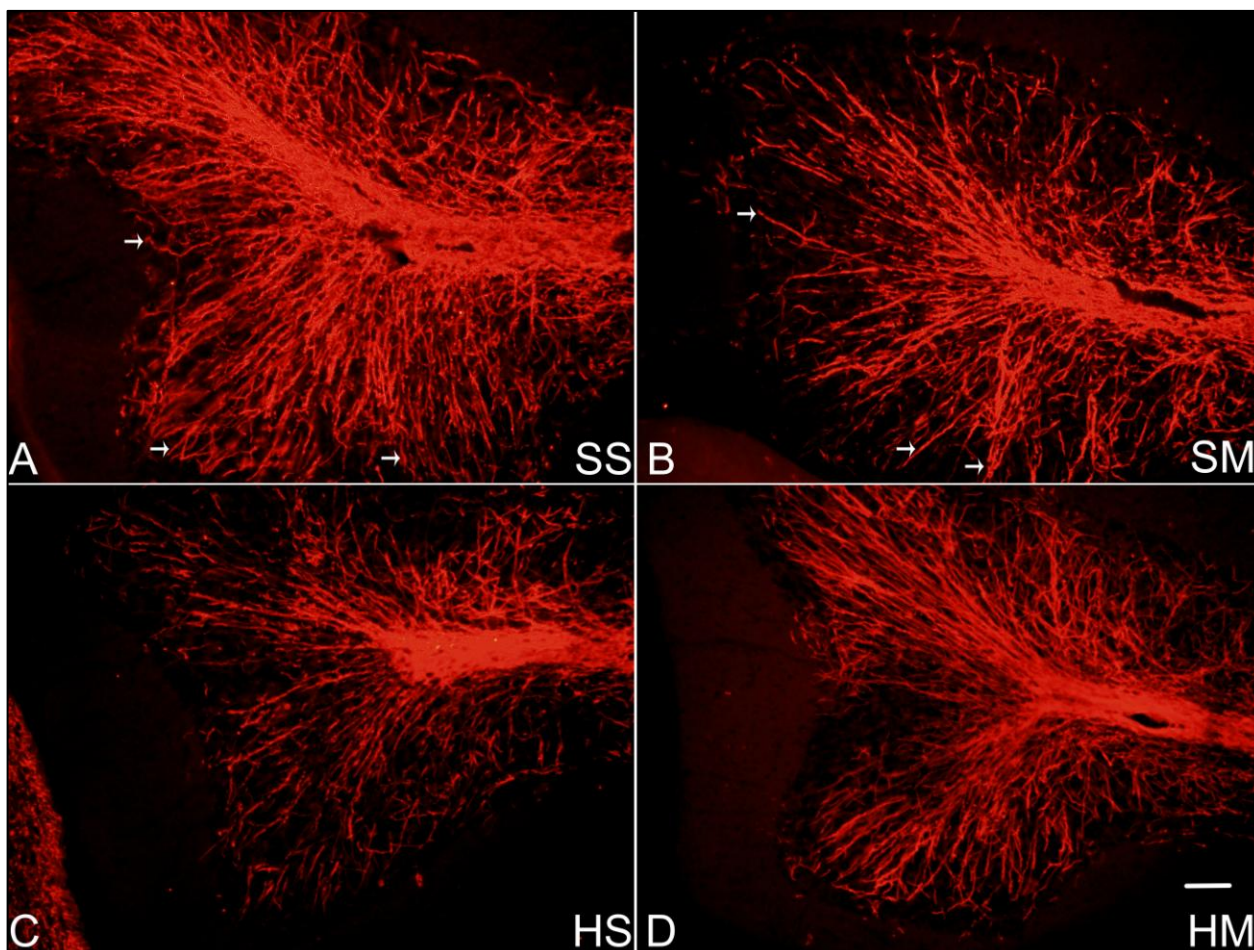


Figura 19 – Imunomarcção para MBP no cerebelo de ratos aos 23 dias de vida
 Legenda: A (SS); B (SM); C (HS) e D (HM). Em A podemos observar que as fibras imunomarcadas se estendem por toda a camada granular, atingindo o limite com a camada de Purkinje, o que não é observado em B. Em ambos os grupos, os perfis de mielina são bastante extensos (setas). Nos animais HS, as fibras não atingem a camada de Purkinje como nos animais SHAM, e os perfis de mielina parecem ter menor tamanho. Nos animais HM, podemos observar que as fibras estão melhor distribuídas ao longo da camada granular, com extensos perfis de mielina. Barra de calibração = 50 μ m.

3.4 Avaliação comportamental

3.4.1 Labirinto em cruz elevado

Não observamos efeitos ou interações significativas envolvendo o tipo de procedimento cirúrgico (SHAM ou HI) e o tratamento (SALINA ou MK801) nas variáveis relacionadas à ansiedade e à atividade locomotora no teste do LCE (SS n=21; SM n=17; HS n=12; HM n=16), como mostra a Figura 20.

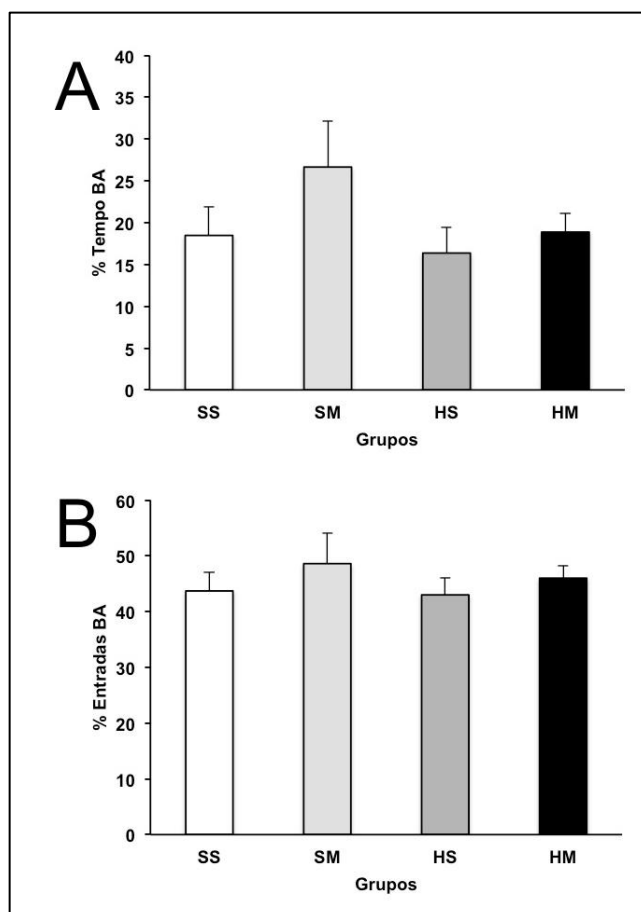


Figura 20 – Teste do Labirinto em cruz elevado (LCE)

Legenda: A – Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos; B – Porcentagem de entradas nos braços abertos. SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801.

Nota: Não foram observados efeitos ou interações significativas.

Em relação às variáveis etológicas, também não observamos efeitos ou interações envolvendo os grupos estudados, como mostra a Figura 21 (SS n=21; SM n=17; HS n=12; HM n=16).

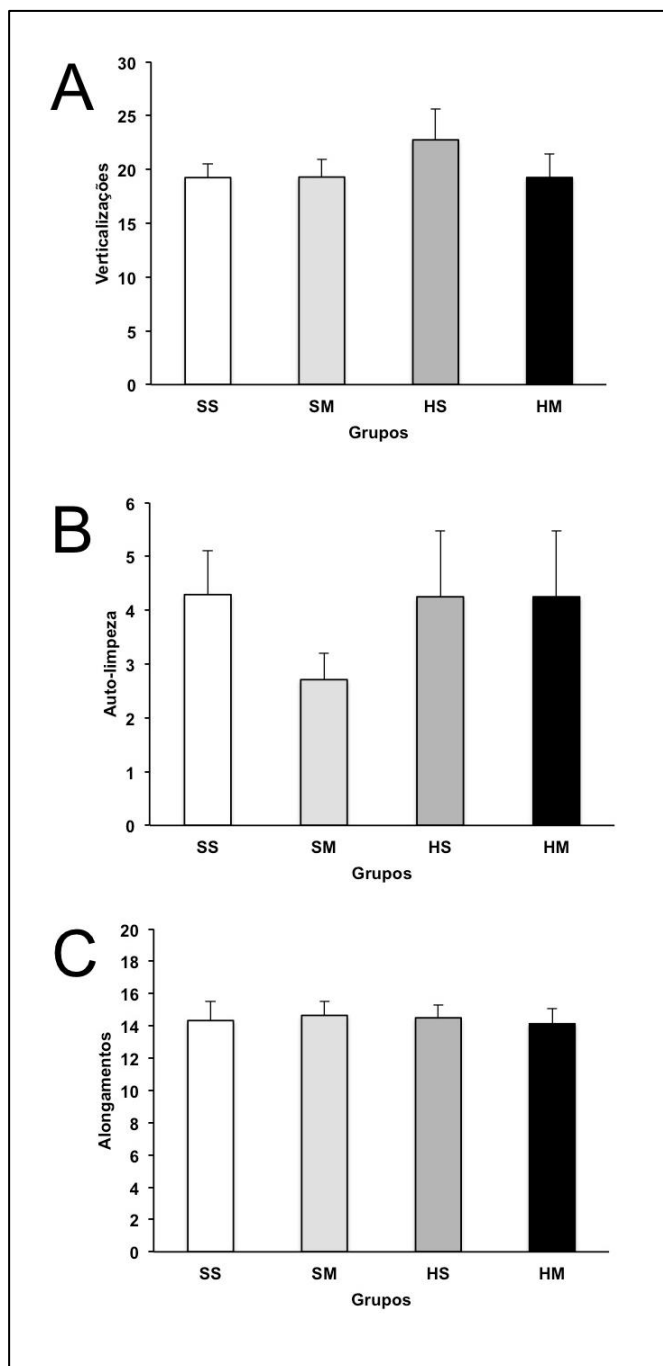


Figura 21 – Variáveis etológicas estudadas no teste do LCE

Legenda: A – verticalizações; B – auto-limpeza; C – alongamentos. SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801.

Nota: Não foram observados efeitos ou interações significativas.

3.4.2 Teste do campo vazado.

Não observamos efeitos ou interações entre os fatores procedimento e tratamento quanto ao número de orifícios explorados em qualquer das regiões do campo (centro ou total), como mostra a Figura 22, o que demonstra que os animais não apresentam diferenças na busca por novidades (SS n=21; SM n=17; HS n=12; HM n=16).

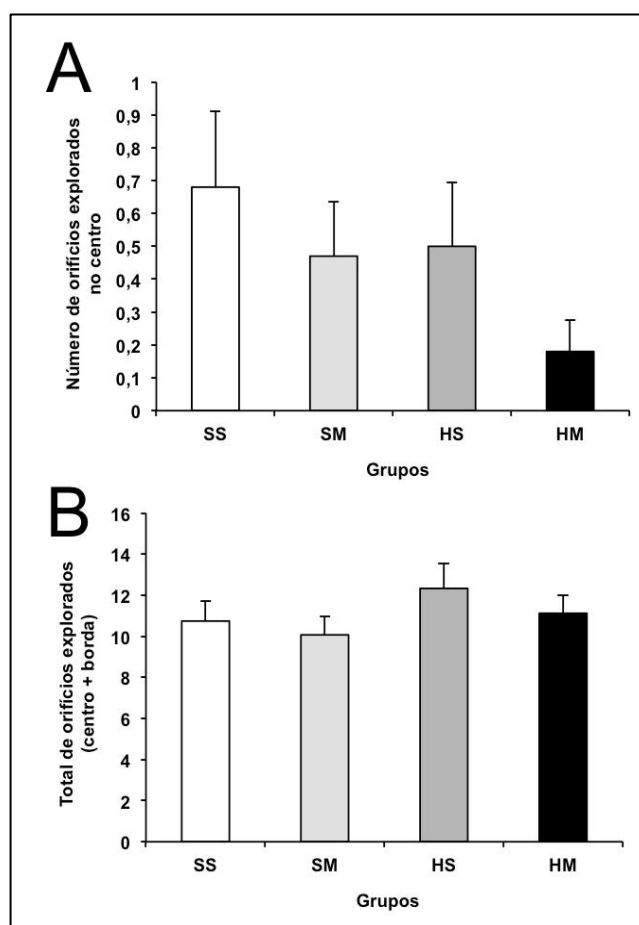


Figura 22 – Número de orifícios explorados no teste do campo vazado

Legenda: A – orifícios explorados no centro; B – total de orifícios explorados (centro + borda). SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801.

Nota: Não foram observados efeitos ou interações significativas.

Em relação às variáveis etológicas analisadas no teste do campo vazado, não observamos efeitos ou interações significativas entre os fatores quanto ao número de alongamentos e verticalizações (Figura 23A e B). Houve, no entanto, efeito da

administração de MK801 sobre o comportamento de auto-limpeza ($F = 8,563$; $gl = 1$; $p = 0,005$), como mostra a Figura 23C (SS $n=21$; SM $n=17$; HS $n=12$; HM $n=16$).

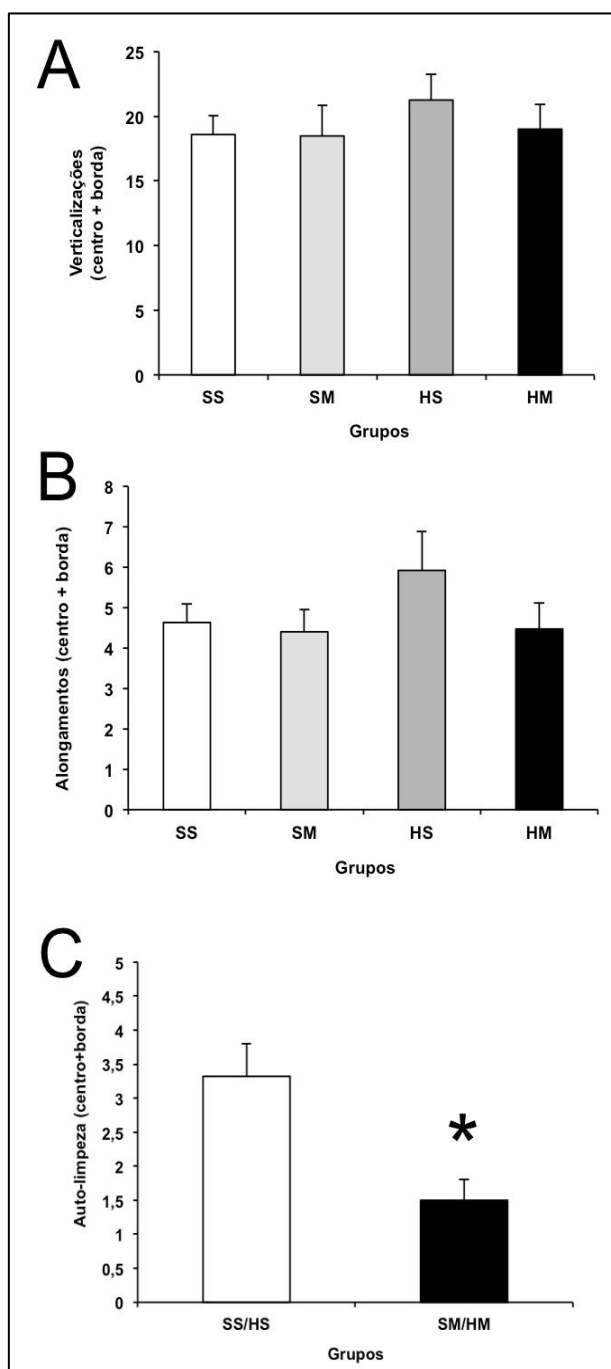


Figura 23 – Variáveis etológicas no teste do campo vazado

Legenda: A – Número de alongamentos; B – Número de verticalizações; C – Número de comportamentos de auto-limpeza. SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801.

Nota: Em A e B, não observamos efeitos ou interações significativas entre os fatores nos comportamentos de alongamento e verticalizações no teste do campo vazado. Observamos, no entanto, um efeito da administração de MK801 sobre o comportamento de auto-limpeza, que independe do procedimento cirúrgico.

A deambulação também foi avaliada no teste do campo vazado, como uma medida de atividade locomotora espontânea. Foi observado um efeito do da administração de MK801 no total de deambulações (centro + borda) feito pelos animais ($F = 4,631$; $gl = 1$; $p = 0,035$), indicando que a administração de MK801 diminui o padrão de atividade locomotora espontânea dos animais, como mostra a Figura 24 (SS n=21; SM n=17; HS n=12; HM n=16).

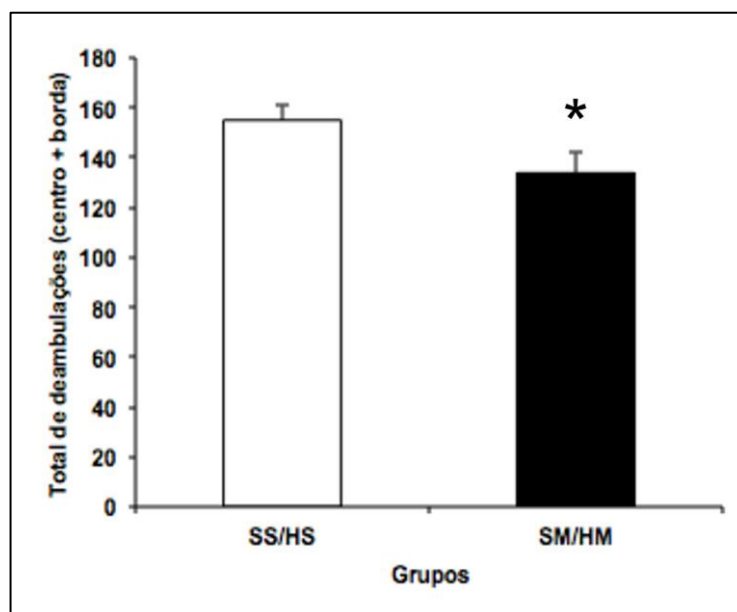


Figura 24 – Total de deambulações no teste do campo vazado

Legenda: SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801

Nota: Observamos um efeito da administração de MK801 sobre o total de deambulações (deambulações na borda + centro)

3.5 Avaliação motora

3.5.1 Teste do cilindro giratório (ROTA ROD)

Os animais aumentaram a latência de queda (efeito do DIA, $F = 21,367$; $gl = 1,443$; $p < 0,001$) indicando que os animais melhoram ao longo dos três dias de teste. Entretanto, não houve interação significativa do tipo de procedimento cirúrgico com o tipo de tratamento. Não foram observadas diferenças significativas quanto à

latência de queda entre os grupos em cada dia separadamente, ou na média dos três dias de teste (SS n=8; SM n=7; HS n=10; HM n=13), como mostra a Figura 25.

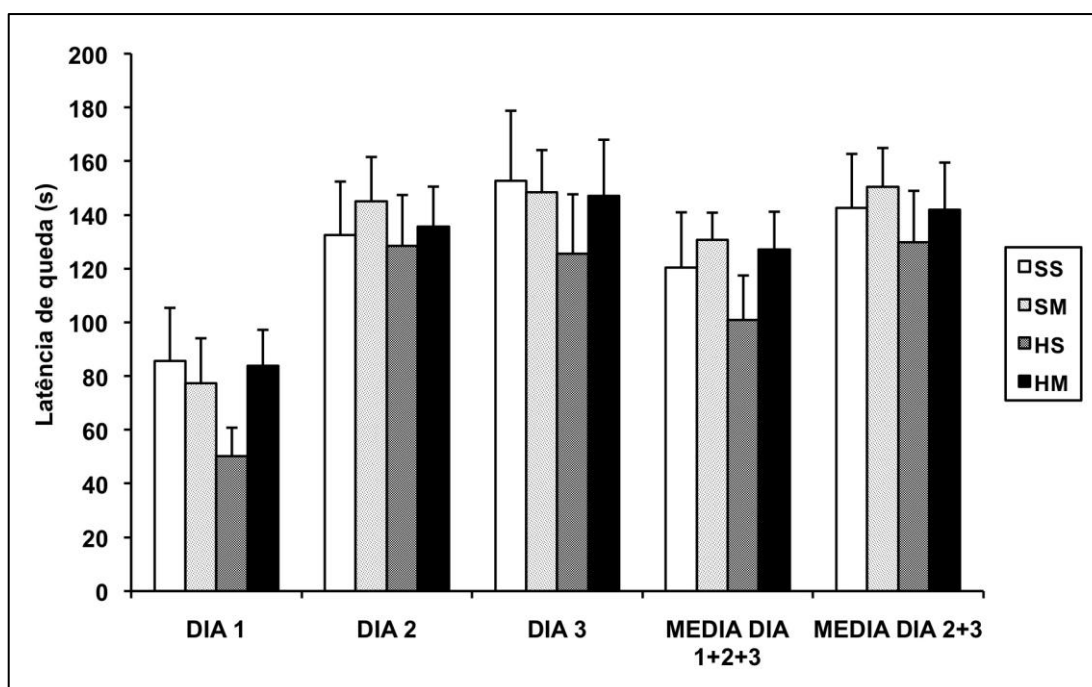


Figura 25 – Latência de queda média no ROTAROD em três dias consecutivos

Legenda: SS – SHAM+SALINA; SM – SHAM+MK801; HS – HIPOXIA+SALINA; HM – HIPOXIA+MK801

Nota: Observe que a latência de queda no dia de teste entre os animais HM e HS é de mais de 30 segundos, e no terceiro dia esta é de mais de 20 segundos. Estes resultados mostram que a administração de MK801 pode ser importante na melhora de desempenho motor neste teste de motricidade.

3.5.2 Teste de caminhada sobre barras

Observamos um efeito significativo do procedimento cirúrgico (HI x SHAM) sobre os escores das patas traseiras (pata traseira direita – $F = 4,612$; $gl = 1$; $p = 0,036$; pata traseira esquerda – $F = 6,031$; $gl = 1$; $p = 0,017$), e que não houve efeito da administração de MK801, como mostra a Figura 26. Os animais do grupo HI apresentaram pior performance (quanto < o escore pior o desempenho motor). Um efeito do procedimento cirúrgico também foi observado em relação ao total de passos nas 3 testagens ($F = 4,094$; $gl = 1$; $p = 0,047$). Não observamos efeitos ou interações significativas em relação às patas dianteiras, ao total de erros, ao escore

global (somatório dos escores das patas traseiras + dianteiras) e total de escore corrigido pelo número de passos. (SS n=17; SM n=13; HS n=13; HM n=21)

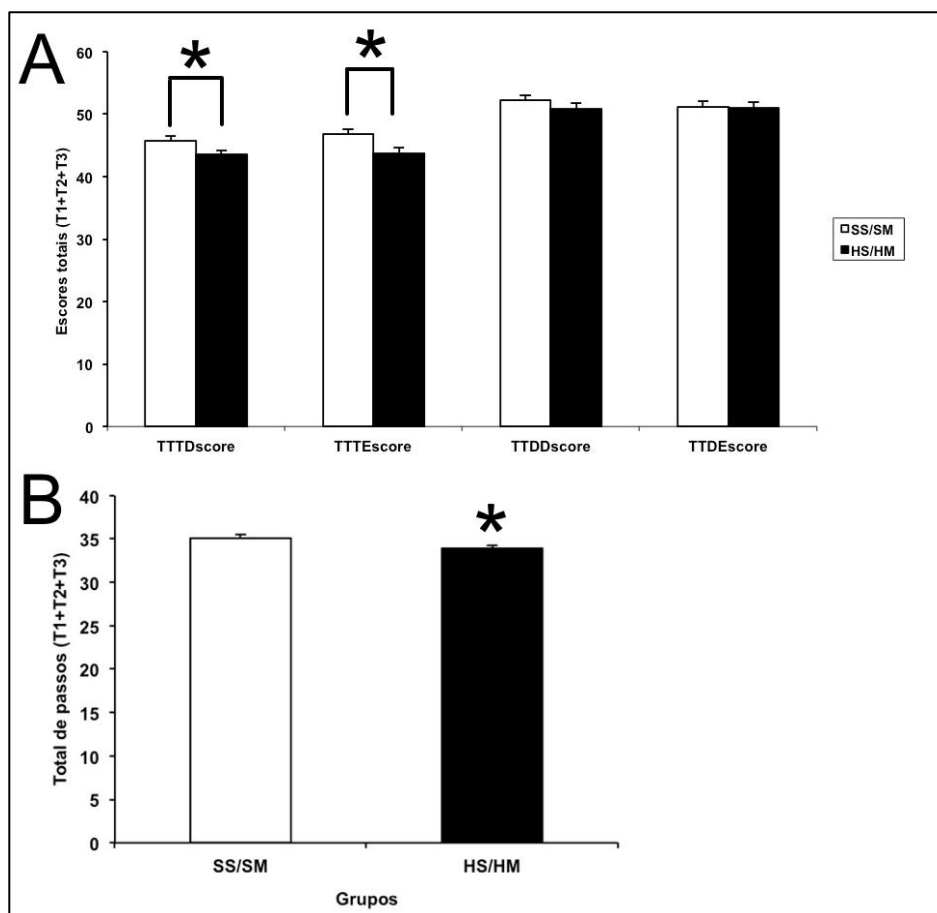


Figura 26 – Teste de caminhada sobre barras

Legenda: Como mostrado em A, foram observados efeitos significativos do procedimento cirúrgico (HI x SHAM) sobre os escores das patas traseiras. Não observamos diferenças quanto aos escores das patas dianteiras. Também foi observado (B) um efeito significativo do MK801 na média de passos para completar o percurso ($F = 4,094$; $gl = 1$; $p = 0,047$).

3.5.3 Teste do comprimento da passada (stride length)

No teste do comprimento da passada, não foram observados efeitos ou interações envolvendo o procedimento cirúrgico (HI ou SHAM), em relação à variação média tanto das patas traseiras quanto dianteiras. No entanto, um efeito significativo da administração de MK801 foi observado em relação à variação média das dianteiras ($F = 6,683$; $gl = 1$; $p = 0,014$). Os animais que receberam MK801

apresentaram maior variação das passadas do que os que receberam solução salina (Figura 27). (SS n=14; SM n=10; HS n=7; HM n=10)

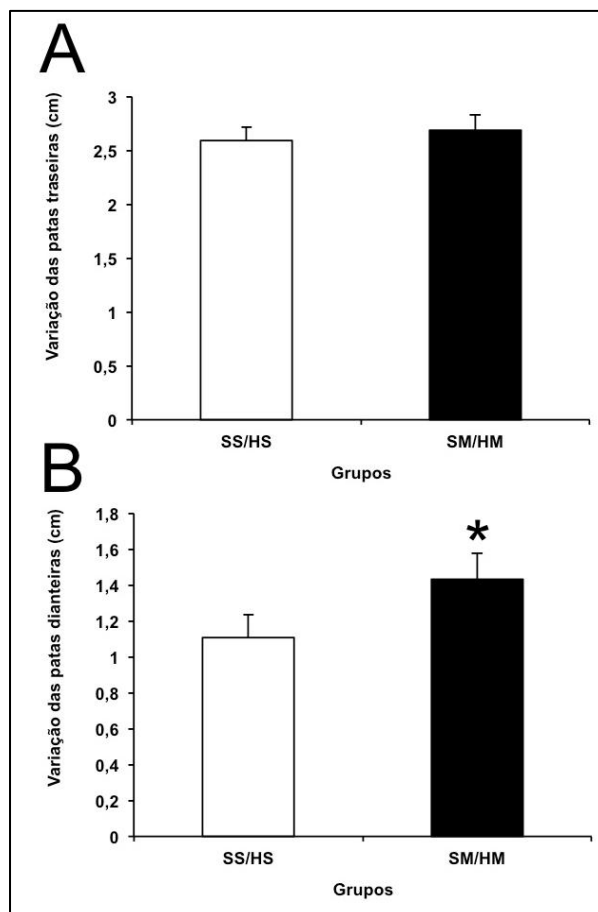


Figura 27 – Teste do comprimento da passada

Legenda: (A) patas traseiras e (B) patas dianteiras. SS - SHAM+SALINA; SM - SHAM+MK801; HS - HIPOXIA+SALINA; HM - HIPOXIA+MK801.

Nota: Observamos um efeito significativo da administração de MK801 ($F = 6,683$; $gl = 1$; $p = 0,014$). Os animais que receberam MK801 apresentaram maior variação das passadas em relação à média do que os que receberam solução salina.

4 DISCUSSÃO

A partir de estudos clínicos e experimentação animal (Johnston et al., 2000) sabemos que as cascatas de eventos nocivos ao SNC podem durar de dias a semanas (Johnston et al., 2000; Savignon et al., 2012), sugerindo que a janela temporal para intervenções terapêuticas é mais extensa do que se imaginava. Diversas intervenções tem sido testadas em modelos animais de HI, a saber: inibidores da NOS, inibidores de caspases, bloqueadores de radicais livres, uso de antioxidantes (Nakayama et al., 2011) inibidores de receptores de glutamato, tanto AMPA/KA quanto NMDA.

Na última década, muitos estudos tem chamado a atenção para o fato de os modelos animais mais utilizados (ligadura unilateral das artérias carótidas principalmente) não replicarem os possíveis cenários da lesão ao sistema nervoso, como as intercorrências maternas, inflamação, reperfusão do fluxo sanguíneo após a isquemia, eventos estes que somente acontecem *in útero* (Northington, 2006; Back et al., 2006; Derrick et al., 2007). Os efeitos da administração de MK801 tem sido estudados, majoritariamente, em modelos de HI neonatal (HI feita em P7). Nesses estudos, tem sido observados tanto neuroproteção quanto neurotoxicidade. Um fato interessante é que as dosagens estudadas são muito variadas, desde 0,05mg/kg até 10mg/kg, além do regime de administração (Hagberg et al., 1994; Hattori et al., 1989, Olsson et al. 2003).

Neste estudo observamos menor número de progenitores de oligodendrócitos na substância branca cerebelar profunda aos nove dias de vida nos animais que passaram pela HI. OPCs são especialmente vulneráveis a eventos de HI (Back et al., 2002a,b; Jelinski et al., 1999; Liu et al., 2002; Skoff et al., 2001) e diversas hipóteses tem sido levantadas para explicar esta vulnerabilidade. Além dos danos diretos causados pela privação de oxigênio e nutrientes, a maioria das hipóteses converge para mudanças teciduais e no microambiente, como aumento de citocinas pró-inflamatórias (Robinson 2005), radicais livres (para revisão ver Volpe, 2009), microgliose (Olivier et al., 2005), glutamato (Back et al., 2006). A sensibilidade dos OPCs está associada com a limitada capacidade de resistir ao estresse oxidativo (Back et al., 1998), à expressão de receptores de glutamato AMPA permeáveis a Ca^{++} (Fern, Moller, 2000) e à expressão de receptores NMDA nos prolongamentos

de oligodendrócitos imaturos (Salter, Fern, 2005). Tem sido sugerido que glutamato liberado durante um evento de HI por precursores de oligodendrócitos, oligodendrócitos imaturos e axônios podem ativar GluRs em oligodendrócitos adjacentes levando à lesão (Back et al., 2007).

Interessante notar que a administração de MK801 nos animais SHAM não levou a déficits perceptíveis quanto ao número de células PDGFR α + (Figura 12B). Diversos estudos tem mostrado efeitos deletérios da administração desta droga (Jacobs et al., 2000; Pohl et al., 1999; Wosniak et al., 1990). Portanto, aos nove dias, os efeitos da hipóxia isquemia são preponderantes sobre a administração de MK801, em relação à sobrevivência de progenitores de oligodendrócitos.

Aos vinte e três dias, todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa no número de células PDGFR α +. Esse resultado já era esperado, tendo em vista a redução de progenitores durante o desenvolvimento, e ocorreu de maneira semelhante em todos os grupos. Os animais do grupo HM (hipóxia+MK801) apresentaram um número significativamente maior de células PDGFR α + em comparação aos outros 3 grupos. Nossa hipótese é que a administração de MK801 protegeu uma parcela da população de progenitores, provavelmente em relação à retenção ou aumento da capacidade proliferativa, pois não observamos maior número de células nesse grupo aos 9 dias. Em cultura de OPCs, agonistas do receptor NMDA inibem a proliferação celular (Gallo et al., 1996) e aumentam a taxa de diferenciação e expressão de proteínas de mielina (Li et al., 2013). Em culturas de fatias de cerebelo, a administração de um antagonista de receptor NMDA (NBQX) aumentou a porcentagem de células LB1+ (GD3+), NG2+ e O4+ (anticorpo que reconhece oligodendrócitos imaturos) marcadas com BrdU+ (bromo deoxi-uridina) (Yuan et al., 1998). Oligodendrócitos se diferenciam mais tardiamente do que todos os outros tipos de células neurais. O desenvolvimento dos OPCs provavelmente é influenciado pela sinalização de outros tipos de células, incluindo neurônios (Hardy, Reynolds, 1993b; Dutly, Schwab, 1991). Em OPCs, sinais extracelulares podem ser decodificados por uma variedade de canais iônicos ligante/voltagem dependentes, os quais são expressos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Sontheimer et al., 1989; Barres et al., 1990; von Blankenfeld et al., 1991; Wyllie et al., 1991).

Aos vinte e três dias, observamos uma intensa imunomarcagem para MBP nos animais SS (SHAM+SALINA). A queda no número de progenitores observada de 9 a 23 dias se correlaciona com o desenvolvimento normal da linhagem oligodendroglial.

Nos animais SM (SHAM+MK801), observamos que o número de fibras é menor quando comparamos com o grupo SS. A administração de MK801 em animais que não apresentam alterações teciduais tão intensas pode afetar a sinalização glutamatérgica necessária para a diferenciação da oligodendroglia. O grupo HS (HIPOXIA+SALINA) também apresentou um número reduzido de fibras MBP+, enquanto um aumento destas foi observado nos animais HM (HIPOXIA COM MK801). Recentemente, foi demonstrado que a ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA em culturas de OPCs (100 μ M de NMDA) promove o aumento tanto no número de células MBP+ quanto da expressão desta proteína, mostrando um efeito importante da ativação do receptor NMDA na diferenciação de oligodendrócitos. Nesse estudo, também foi demonstrado que esta resposta é dose-dependente. A administração de 1000 μ M de NMDA apresentou efeitos deletérios (menor número de células e menor expressão da proteína), enquanto com 500 μ M não foram observadas diferenças com o grupo controle (Li et al., 2013). Danos na oligodendroglia tem sido reportados em vários modelos de hipóxia isquemia, e a excitotoxicidade glutamatérgica relacionada em muitos deles (Back et al., 2007; Matute 2002, 2010; Johnston, 2005).

Nossos resultados demonstram uma diminuição da arborização dendrítica nos animais SM, HS e HM. Ao nascimento, as células de Purkinje em desenvolvimento não respondem quando NMDA é administrado, contudo passam a ser sensíveis 3-4 dias depois (Dupont et al., 1987), sendo todas as células de Purkinje excitadas por NMDA ao fim da primeira semana de vida, mesmo que em potências mais baixas que outros agonistas (Dupont et al. 1987; Garthwaite et al. 1987; krepa, Crepel, 1990). O período em que as células de Purkinje são responsivas ao NMDA termina com o fim da terceira semana de vida pós-natal. A diminuição da atividade deste receptor, pela administração de MK801 nos animais SHAM, pode explicar a menor extensão da arborização dendrítica observada em nosso estudo, devido à importância deste receptor neste processo. O desenvolvimento da arborização dendrítica está intimamente relacionado à formação das sinapses entre células de Purkinje e fibras paralelas (PC-PF). Mutantes em que as fibras paralelas não se estabelecem tem células de Purkinje responsivas a NMDA até a vida adulta (Dupont et al., 1984). Nos animais HS/HM, acreditamos que os efeitos predominantes sejam da hipóxia-isquemia pré-natal. A administração de MK801 não teve efeito significativo em reverter a menor arborização causada pela hipóxia, sugerindo que o

desenvolvimento da arborização dendrítica depende de outros fatores além da sinalização glutamatérgica via receptor NMDA.

O transportador GLAST é um dos principais agentes na finalização da sinalização glutamatérgica no cerebelo, especialmente na camada molecular, onde se encontram as sinapses entre PC-PF e é expresso majoritariamente pela glia de Bergmann. Nos animais SS, observamos imunomarcção para o transportador GLAST nos prolongamentos da glia de Bergmann, com longos perfis sobrepostos com GFAP. A administração de MK801 nos animais SHAM alterou a distribuição do transportador GLAST. Os efeitos da HI parecem ser mais severos ainda. Nos animais HS observamos maior irregularidade na sobreposição entre GFAP e GLAST, com longos trechos imunomarcados para GFAP mas não para GLAST. Observamos que a distribuição de GLAST sobrepunha melhor com a imunomarcção para GFAP nos animais HM, sugerindo que a administração de MK801 recupera até certo ponto a irregularidade observada nos animais HS. Importante notar que o padrão observado nos animais SS não é observado em nenhum dos outros grupos.

Diversos estudos tem mostrado intensa intercomunicação entre a glia de Bergmann e as células de Purkinje. É possível que as sinapses glutamatérgicas entre PF-PC regulem a expressão/distribuição do transportador GLAST. Em culturas de embriões de pinto, foi sugerido que glutamato regula a translocação de GLAST na glia de Bergmann (González, Ortega, 2000). Astrócitos corticais tem a captação de glutamato diminuída pela hipóxia (Dallas et al., 2007). Mesmo que os efeitos desta diminuição sejam atribuídos ao transportador GLT1, não deixa de ser importante o fato de a resposta astrocitária ser a diminuição da captação de glutamato durante a hipóxia.

Observamos também, em todos os grupos, corpos celulares GLAST+/GFAP- , especialmente na IGL. A identidade destas células não foi confirmada nesse estudo. Oligodendrócitos corticais, obtidos de ratos neonatos, em cultura expressam GLAST desde progenitores até oligodendrócitos maduros mielinizantes (DeSilva et al., 2010) o que sugere que pelo menos parte dessas células GLAST+/GFAP- possa corresponder a oligodendroglia. Além disso, em um estudo de lesão de nervo ciático, foi observado que a microglia reativa expressava GLAST por até 14 dias (Xin et al., 2009). Apesar da diferente localização e modelo de lesão, o fato de que a microglia pode expressar o transportador GLAST em decorrência de lesões pode sugerir que

algumas células GFAP⁻/GLAST⁺ observadas neste estudo, correspondem a microglia, visto que em P9 já foi descrito a presença de microglia reativa em nosso modelo de lesão (Savignon et al., 2012). Novas análises serão feitas na tentativa da identificação dessas células.

Não observamos diferenças entre os grupos quanto a comportamentos relacionados à ansiedade e atividade locomotora no teste do LCE. O teste do LCE é um dos testes mais utilizados *in vivo* para avaliar aspectos relacionados à ansiedade (Carobrez, Bertoglio, 2005), por ser econômico, rápido, extremamente funcional e de não requerer procedimentos invasivos ou o uso de choques elétricos (Pellow et al., 1985). Os roedores em geral evitam as áreas abertas do labirinto, as quais provavelmente são as mais aversivas, e mostram preferência pelas partes protegidas pelas paredes do aparelho. Os padrões comportamentais observados no teste do labirinto em cruz elevado representam a combinação de comportamentos exploratórios e de esquiva, que são influenciados por fatores genéticos e ambientais. Dados anteriores obtidos em nosso laboratório (Ferraz, M., 2010) mostraram que os animais que passaram por HI não apresentavam comportamentos relacionados à ansiedade. Este dado é importante uma vez que um estado de ansiedade poderia confundir a avaliação motora subsequente.

Galeano et al. (2011), utilizando o modelo de Bjelke (cornos uterinos mergulhados em água em E22) também não observaram diferenças significativas no teste do LCE em animais adultos. Em camundongos tratados entre P5 e P10 com MK801, foram observados diversos comportamentos relacionados à ansiedade, como menor número de entradas nos braços abertos, menor tempo nos braços abertos e maior tempo nos braços fechados. As diferenças observadas entre este estudo (Akillioglu et al., 2012) e o nosso podem ser devidos à diferenças entre as espécies (camundongos x ratos), idade (P90 x P45) e regime de administração (2 doses diárias x 1 dose diária), respectivamente.

No teste do campo vazado, não observamos diferenças em relação ao comportamento de busca por novos estímulos. Entre as variáveis etológicas, um efeito da administração de MK801 foi observado sobre o comportamento de autolimpeza. Várias regiões cerebrais são relacionadas com este comportamento como hipotálamo e núcleos da base (Aldridge et al., 2004; Lalonde et al., 2010; Roeling et al., 1993). As primeiras evidências de que o cerebelo participava da gênese deste tipo de comportamento veio com a estimulação elétrica do vermis

cerebelar de ratos e gatos (Bernstson, Torello, 1982; Berntson et al., 1988; Berntson et al., 1973). Em camundongos mutantes Lurcher, os quais praticamente não apresentam células de Purkinje, foi observado menor comportamento de autolimpeza do que em animais selvagens. Nesses animais, outros tipos celulares também estão ausentes, pela perda da aferência das PCs. Contudo, maior importância tem sido dada às PCs pois são as únicas células eferentes do cerebelo. Nossos resultados demonstram que a administração de MK801 altera padrões de comportamento relacionados à função cerebelar. Entretanto, como a administração do fármaco é sistêmica, não podemos descartar alterações em outros circuitos neurais, como o hipotálamo e núcleos da base, cuja função também influencia a gênese do comportamento de autolimpeza. Observamos também uma diminuição da atividade locomotora associada à administração de MK801 neste teste, mas não no LCE. Em camundongos que foram tratados com MK801 por 5 dias (P5-P10) também foi observada diminuição da atividade locomotora e aumento da atividade exploratória quando testados na vida adulta no teste do campo aberto (Akillioglu et al., 2012).

Não observamos diferenças na latência de queda entre os diferentes grupos. A latência para queda no ROTAROD é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a coordenação motora, postura e equilíbrio em roedores (Bearzatto et al., 2005; Fujimoto et al., 2004; Hunter et al., 2000; Lalonde, Strazielle 2007). A validade desta medida está relacionada ao fato de que o medo da queda faz com que o animal tente permanecer sobre o aparelho o máximo de tempo possível. Está bem estabelecido na literatura que quanto maior for a capacidade de coordenação motora do animal, mais tempo ele permanecerá sobre o cilindro. No entanto, a latência de queda e, conseqüentemente, o tempo de permanência dos animais no cilindro, podem ser influenciadas por pelo menos dois outros fatores: cansaço físico e ansiedade. Portanto, a análise do desempenho motor pode ser mascarada se os animais saltarem do cilindro na tentativa de fugir da situação aversiva do teste, tiverem sua resistência física debilitada (Lalonde, Strazielle 2007), simplesmente não caminharem, exibindo um comportamento de congelamento. Observamos em nossos testes que muitos aprendiam a descer do aparelho. Portanto, algumas considerações devem ser feitas sobre este teste. No primeiro dia, um número muito grande de animais caiu por razões não associadas à dificuldade de permanecer no cilindro giratório. Vários animais se viravam e caminhavam para trás, ou

acompanhavam a separação das baias e caíam. Estes dados foram excluídos das análises. Portanto, foram analisadas as médias dos três dias de teste, e também somente a média dos 2 últimos dias. A diferença média no tempo de queda entre os animais HM x HS é de mais de 30 segundos para o primeiro dia de teste, e de mais de 20 segundos para o terceiro dia, sugerindo que uma diferença significativa poderá ser observada com o aumento da amostra, o que poderia confirmar dados anteriores de nosso laboratório que demonstram que HI diminui a motricidade (comparação entre os grupos SS x HS) e sugerir efeitos neuroprotetores da administração de MK801 (comparação entre os grupos HS x HM).

Observamos um efeito significativo do procedimento cirúrgico (HI x SHAM) sobre o desempenho motor das patas traseiras, tanto esquerda quanto direita no teste de caminhada sobre barras, enquanto a administração de MK801 não afetou o desempenho em nenhum dos grupos. Os escores das patas traseiras foram menores no grupo HIPÓXIA do que no grupo SHAM, demonstrando pior performance. Para a realização deste teste, os animais lançam mão de pistas visuais, propriocepção, equilíbrio, funções neurais que não são propriamente motoras. Mazur et al., em 2010 (mesmo grupo de Robinson, que descreveu o modelo utilizado neste estudo) observaram que animais HI adultos, apresentam desempenho inferior quando comparados aos animais SHAM e aqueles que receberam altas doses de eritropoetina entre P1-P5 apresentaram melhores resultados neste teste, em comparação aos animais que receberam solução salina. Os autores reportaram apenas os dados do número de erros, mas não os escores. Em nosso estudo, não observamos as mesmas diferenças entre os grupos em relação ao número de erros, porém as diferenças nas idades dos animais testados, na espessura e na montagem das barras podem ter grande influência sobre os resultados. Observamos também que os animais do grupo HI dão menos passos do que os do grupo SHAM para atravessar o aparelho. Os efeitos da HI parecem estar mais relacionados a alterações no padrão de caminhada. Roedores apresentam diferenças no caminhar, explorando o ambiente com a parte anterior do corpo e andando aos saltos com as pernas traseiras. Este tipo de caminhada parece estar alterado nos animais HI, a julgar pelo menor número de passos para cruzar o aparelho.

Observamos que os animais que receberam MK801 apresentam maior variação das passadas do que os que receberam solução salina, e que estes não

dependiam do procedimento cirúrgico. Mazur et al. observaram que, em ratos adultos (P90) que passaram por HI, o comprimento da passada era menor que nos animais SHAM (Mazur et al., 2010). Ratos que passaram por ligadura permanente unilateral das artérias uterinas em E17 (Maxime-Delcour et al., 2011) apresentam alterações cinéticas durante a marcha, como comprimento, amplitude, velocidade e angulação das juntas, apesar de parecerem normais na roda giratória (“treadmill locomotor test”). Interessante neste estudo foi a observação de que animais SHAM apresentavam maior variabilidade na passada que animais isquêmicos com 30 dias de vida, enquanto com 65 dias os resultados se invertiam, sugerindo que entre as idades estudadas a aquisição de habilidades motoras ainda está em desenvolvimento, o que reforça que a idade dos animais a serem avaliados é uma variável importante a ser considerada.

Nossos resultados demonstraram que a hipóxia-isquemia prenatal altera o padrão de desenvolvimento do cerebelo além de levar a alterações comportamentais em ratos jovens adultos. A administração de MK801 reverte parte dos danos celulares causados pela HI. Entretanto, não conseguimos demonstrar uma recuperação funcional com o protocolo de administração de MK801 utilizado neste estudo, o que sugere que estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão dos efeitos da inibição do receptor NMDA neste modelo de lesão.

5 CONCLUSÕES

Nossos resultados nos levam a concluir que:

- a) HI altera o desenvolvimento da arborização dendrítica das células de Purkinje em animais P9. A administração de MK801 não reverte este efeito, e é neurotóxica quando administrada em animais que não sofreram eventos de HI, reforçando que a modulação dos receptores NMDA é importante para a arborização dendrítica, mas não é o único fator importante afetado pela HI;
- b) HI altera a distribuição do transportador de glutamato GLAST na glia de Bergmann. A administração de MK801 reverte parcialmente esta alteração, o que reforça que outros mecanismos estejam envolvidos na modulação da distribuição do transportador GLAST;
- c) Animais HI apresentam maior número de progenitores de oligodendrócitos após administração de MK801, o que sugere que o MK801 mantém a capacidade proliferativa desses progenitores por mais tempo;
- d) A administração de MK801 reverte parcialmente os efeitos da HI sobre a expressão/distribuição da MBP;
- e) Tanto a HI quanto a administração de MK801 exercem efeitos importantes sobre vários aspectos do comportamento. No teste do LCE e no ROTAROD não observamos efeitos da HI e/ou da administração de MK801;
- f) HI altera o desempenho motor no teste de caminhada sobre barras e a administração de MK801 não demonstrou nenhum efeito neste teste. Não observamos efeitos da HI nos testes do comprimento da passada e do campo vazado, enquanto vários efeitos foram observados com a administração de MK801;
- g) O conjunto dos resultados observados no leva a concluir que o regime de administração e a dosagem utilizada neste estudo precisam ser ajustadas para melhor compreender tanto os efeitos da HI quanto da inibição do receptor NMDA nesse modelo de HI perinatal.

REFERÊNCIAS

- Akillioglu K, Melik EB, Melik E, Kocahan S. The investigation of neonatal MK-801 administration and physical environmental enrichment on emotional and cognitive functions in adult Balb/c mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2012; 102: 407–14
- Albus JS. A theory of cerebellar function. *Math Biosci*. 1971; 10: 25–61.
- Aldridge JW, Berridge KC, Rosen AR. Basal ganglia neural mechanisms of natural movement sequences. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004; 82:732–9.
- Alix JJP, Zammit C, Riddle A, Meshul CK, Back SA, Valentino M, et al. Central axons preparing to myelinate are highly sensitivity to ischemic injury. *Annals of Neurology*. 2012; 72, Issue 6, pages 936–51.
- Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science*. 1997; 275: 1940–3.
- Altman DI, Young RSK, Yagel SK. Effects of dexamethasone in hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol Neonate*. 1984; 46: 149–56.
- Altman J. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol*. 1972; 145: 465–513.
- Andersson K, Blum M, Chen Y, Eneroth P, Gross J, Herrera-Marschitz M, et al. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport*. 1995; 26; n.6(2): 375-8.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 4155–60.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2003; 34(4-5): 325-37.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci*. 2004; 61(6): 657-68.
- Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2006; 12(2): 129-40.

Back SA, Craig AS, Kayton R, Luo NL, Meshul C, Allcock N, et al. Hypoxia-ischemia preferentially triggers glutamate depletion from oligodendroglia and axons in perinatal cerebral white matter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27: 334–47.

Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, et al. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci.* 2002a; 22(2): 455-63.

Back SA, Luo N, Borenstein N, Levine J, Volpe J, Kinney H. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci.* 2001; 21 (4): 1302–12.

Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Volpe JJ, Kinney HC. Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002b; 61(2): 197-211.

Baig MS, Joseph V. Activation of NMDA receptors prevents excessive metabolic decrease in hypoxic rat pups. *Respir Physiol Neurobiol.* 2006; 152(1): 61-71.

Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke.* 2007; 38: 674-6.

Barks JDE, Post M, Tuor UI. Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 1991; 29: 558–63.

Barres BA, Koroshetz WJ, Swartz KJ, Chun LL, Corey DP. Ion channel expression by white matter glia: the O-2A glial progenitor cell. *Neuron.* 1990 Abril;4(4): 507-24.

Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmontiel T, Zupan V, Fernandez H, et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1h, interleukin-6 and TNF α in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1999; 106:72–7.

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews.* 2001;81(2):871-927.

Bear MF, Connors BW, Paradiso, MA. *Neuroscience: Exploring the Brain.* Pennsylvania: Williams e Wilkins, 1996.

Bearzatto B, Servais L, Cheron G, Schiffmann SN. Age dependence of strain determinant on mice motor coordination. *Brain Res.* 2005; 1039: 37-42.

Ben-Hur T, Rogister B, Murray K. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursor of the postnatal brain. *Journal of Neuroscience.* 1998; 18: 5777-88.

Berntson GG, Jang JF, Ronca AE. Brainstem systems and grooming behaviors. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1988; 525: 350–62.

Berntson GG, Potalicchio Jr SJ, Miller NE. Evidence for higher functions of the cerebellum: eating and grooming elicited by cerebellar stimulation in cats (fastigial nucleus/superior cerebellar peduncle). *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973; 70: 2497–9.

Berntson GG, Torello MW. The paleocerebellum and the integration of behavioral function. *Physiological Psychology* 1982;10: 2–12.

Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res*. 1991; 543:1-9.

Bloedel JR. Functional heterogeneity with structural homogeneity: how does the cerebellum operate? *Behav Brain Sci*. 1992; 15:666–78.

Blomfield S, Marr D. How the cerebellum may be used. *Nature*. 1970; 227: 1224–8.

Boycott HE, Dallas M, Boyle JP, Pearson HA, Peers C. Hypoxia suppresses astrocyte glutamate transport independently of amyloid formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 7;364:100-4.

Burke RE, Kent J, Kenyon N, Karanas A. Unilateral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat results in a persistent increase in the density of striatal tyrosine hydroxylase immunoperoxidase staining. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991; 58:171-9.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005; 29(8): 1193-205.

Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*. 1995; 15:711–20.

Chen SH, Desmond JE. Cerebrocerebellar networks during articulatory rehearsal and verbal working memory tasks. *Neuroimage*. 2005; 24: 332–8

Clark SL, Hankins GD. Temporal and demographic trends in cerebral palsy—fact and fiction. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188:628-33.

Craig A, Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, Back SA. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol*. 2003; 181:231-40.

Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA, et al. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci*. 2007; 27:3946-55.

Dammann O, Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 1997; 42: 1–8.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 2001; 65:1–105.

Decker L, French-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *Journal of Neuroscience.* 2004; 24(15):3816-25.

de Haan M, Wyatt JS, Roth S, Vargha-Khadem F, Gadian D, Mishkin M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci.* 2006; 9(4): 350-8.

Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci.* 1998; 18:3606–19.

Deng W, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. Calcium-permeable AMPA/kainate receptors mediate toxicity and preconditioning by oxygen-glucose deprivation in oligodendrocyte precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:6801-6.

Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, Tan S. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. *Stroke.* 2007 Feb;38(2 Suppl):731-5.

DeSilva TM, Kabakov YA, Goldhoff PE, Volpe JJ, Rosenberg PA. Regulation of Glutamate Transport in Developing Rat Oligodendrocytes. *J Neurosci.* 2009; June 17; 29(24): 7898–908.

Desmond JE, Gabrieli JD, Glover GH. Dissociation of frontal and cerebellar activity in a cognitive task: evidence for a distinction between selection and search. *Neuroimage.* 1998; 7: 368–76.

de Vries H, de Jonge JC, Schrage C, van der Haar ME, Hoekstra D. Differential and cell development-dependent localization of myelin mRNAs in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 1997; Mar 1;47(5):479-88.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc (Baltim).* 1957; 46, 3:208-9.

du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol.* 1997; 24(3):627-54.

Dupont JL, Gardette R, Crepel F. Postnatal development of the chemosensitivity of rat cerebellar Purkinje cells to excitatory amino acids. An in vitro study. *Brain Res.* 1987; 431(1):59-68.

Dutly F, Schwab ME. Neurons and astrocytes influence the development of purified O-2A progenitor cells. *Glia.* 1991;4(6):559-71.

Eisenman LM, Schalekamp MP, Voogd J. Development of the cerebellar cortical efferent projection: an in-vitro anterograde tracing study in rat brain slices. *Brain Res Dev Brain Res.* 1991;60:261–6.

Eliasof S, Arriza JL, Leighton BH, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J Neurosci*. 1998; 18:698–712.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*. 1995; 375:599–603.

Fern R, Moller T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes: a fatal glutamate release feedback loop. *J Neurosci*. 2000; 20:34–42.

Ferriero DM, Arcavi LJ, Sagar SM, McIntosh TK, Simon RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 1988; 24:670–6.

Ferriero DM, Sheldon RA, Black SM, Chuai J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 1995; 38: 912-8.

Fiez JA, Raife EA, Balota DA, Schwarz JP, Raichle ME, Petersen SE. A positron emission tomography study of the short-term maintenance of verbal information. *J Neurosci*. 1996; 16: 808-22.

Filloux FM, Adair J, Narang N. The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia–ischemia in the neonatal rat. *Brain Res Dev Brain Res*. 1996; 94: 81–91.

Follett PL, Rosenberg PA, Volpe JJ, Jensen FE. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci*. 2000; 20:9235-41.

Ford M, Sanberg PR, Norman AB, Fogelson MH. MK-801 prevents hippocampal neurodegeneration in neonatal hypoxic–ischemic rats. *Arch Neurol*. 1989; 46:1090–6.

Fraga-Marques MC; Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MCF, et al. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav*. 2009; 55(2): 272-9.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Oliveria-Silva J, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MCF, et al. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res*. 2010; 206: 147–50.

Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004; 28, 4 (Jul):365-78.

- Fukamachi S, Furuta A, Ikeda T, Ikenoue T, Kaneoka T, Rothstein JD, et al. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001; 31;132(2):131-9.
- Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience*. 1997; 81:1031–42.
- Galeano P, Blanco Calvo E, Madureira de Oliveira D, Cuenya L, Kamenetzky GV, Mustaca AE, et al. Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *Int J Dev Neurosci*. 2011; 29(6):609-19.
- Gallo V, Patneau DK, Mayer ML, Vaccarino FM. Excitatory amino acid receptors in glial progenitor cells: molecular and functional properties. *Glia*. 1994; 11:94-101.
- Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC.
- Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block. *J Neurosci*. 1996; Apr 15;16(8):2659-70.
- Garthwaite G, Yamini JR, Garthwaite J. Selective loss of Purkinje and granule cell responsiveness to N-methyl-D-aspartate rat cerebellum during development. *Dev Brain Res*. 1987; 36: 288-92.
- González MI, Ortega A. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Res*. 2000; Jun 2;866(1-2):73-81.
- Gordon KE, Simpson JS, Statman D, Silverstein FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke*. 1991; 22: 928–32.
- Gunn AJ, Mydlar T, Bennet L, Faul RLM, Gorter S, Cook C, et al. The neuroprotective actions of a calcium channel antagonist, flunarizine, in the infant rat. *Pediatr Res*. 1989; 25: 573–76.
- Hagberg H, Gilland E, Diemer NH, Andine P. Hypoxia/ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol Neonate*. 1994; 66: 205–213.
- Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: preliminary data for 2005. *National Vital Statistics Reports*. 2006; 55,1–18.
- Hardy R, Reynolds R. Neuron-oligodendroglial interactions during central nervous system development. *Journal of Neuroscience Research*. 1993; 36(2):121-26.
- Hart IK, Richardson WD, Heldin CH, Westermark B, Raff MC. PDGF receptors on cells of the oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) cell lineage. *Development*. 1989; 105(3):595-603.

Hattori H, Morin AM, Schwartz PH, Fujikawa DG, Wasterlain CG. Posthypoxic treatment with MK-801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat. *Neurology*. 1989; 39(5):713-8.

Haynes RL, Folkerth RD, Keefe R, Sung I, Swzeda LI, Rosenberg PA, et al. Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes is accompanied by microglial activation in periventricular leukomalacia in the human premature infant. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62:441–50.

Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*. 2000; 39(5): 806-16.

Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen A, Kavanaugh B, Coulter D, et al. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem*. 2002; 81: 390–402.

Ivry RB, Baldo JV. Is the cerebellum involved in learning and cognition? *Curr Opin Neurobiol*. 1992; 2: 212–6.

Jacobs PS, Taylor BM, Bardgett ME. Maturation of locomotor and Fos responses to the NMDA antagonists, PCP and MK-801. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000; Jul 30;122(1):91-5.

Jelinski SE, Yager JY, Juurlink BH. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res*. 1999; Jan 2;815(1):150-3.

Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res*. 2001; Jun;49(6):735-41.

Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol*. 2000; Feb;5(1):75-86.

Józwiak L, Lukawski K, Sieklucka-Dziuba M. Cerebral oligemic hypoxia and MK-801 treatment: effect on alternation behavior in mice. *Pharmacol Rep*. 2006; 58(5):770-3.

Kadhim HJ, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 2001; 56: 1278–84.

Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*. 1992; 360:467–71.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. London: Mc Graw Hill, 2000.

Kapfhammer JP. Cellular and molecular control of dendritic growth and development of cerebellar Purkinje cells. *Prog Histochem Cytochem*. 2004; 39(3):131-82.

Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*. 2005; 438(7071):1162-6

Kavanaugh B, Beesley J, Itoh T, Itoh A, Grinspan J, Pleasure D. Neurotrophin-3 (NT-3) diminishes susceptibility of the oligodendroglial lineage to AMPA glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *J Neurosci Res*. 2000; 60: 725–32.

Kettenmann H, Blankenfeld GV, Trotter J. Physiological properties of oligodendrocytes during development. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 633:64-77.

Kim SG, Ugurbil K, Strick PL. Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science*. 1994; 265: 949–51.

Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol*. 1998; 5(3):180-9.

Krepa M, Crepel F. Transient sensitivity of rat cerebellar Purkinje cells to N-methyl-D-aspartate during development. A voltage-clamp study in in vitro slices. *Eur J Neurosci*. 1990; 2:312-6.

Kuban KC, Leviton A. Cerebral palsy. *N Engl J Med*. 1994; 20; 330(3):188-95.

Lalonde R, Strazielle C. Grooming after cerebellar, basal ganglia, and neocortical lesions. In: Kalueff AV, LaPorte JL, Bergner CL, editors. *Neurobiology of Grooming Behavior*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 145–55

Lalonde R, Strazielle C. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Res*. 2007; 1140:51-74.

Larsen WJ. *Human embryology*. London: Churchill Livingstone, 1993.

Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ*. 2005; 83(6):409-17.

LeBlanc MH, Vig V, Smith B, Parker CC, Evans OB, Smith EE. MK-801 does not protect against hypoxic–ischemic brain injury in piglets. *Stroke*. 1991; 22:1270–5.

Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*. 1995; 15:1835–53.

Le Mellédo JM, Mahil N, Baker GB. Nitric oxide: a key player in the relation between cardiovascular disease and major depressive disorder? *J Psychiatry Neurosci*. 2004; 29(6):414-6.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990; 60(4):585-95.

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

LeVine SM, Goldman JE. Embryonic divergence of oligodendrocyte and astrocyte lineages in developing rat cerebrum. *J Neurosci*. 1988; 8(11):3992-4006.

Li C, Lin X, Xiuyun L, Wenjing Y, Weiran S, Chun H, Guang Y, Cheng H. A Functional Role of NMDA Receptor in Regulating the Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells and Remyelination. *Glia*. 2013 Feb 26; DOI: 10.1002/glia.22469. [Epub ahead of print]

Lino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, et al. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*. 2001; 292:926–9.

Liu HN, Giasson BI, Mushynski WE, Almazan G. AMPA receptor-mediated toxicity in oligodendrocyte progenitors involves free radical generation and activation of JNK, calpain and caspase 3. *J Neurochem*. 2002 Jul;82(2):398-409.

Manhães AC, Guthierrez MC, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*. 2008; 193(2):216-24.

Maxime D, Michaël R, Mamta A, Olivier B, Véronique P, Mary FB, et al. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behavioural Brain Research* 2012; 232: 233–44.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002; 62: 609-14.

Marin-Padilla M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage:II. white matter lesions of the neocortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(3): 219–35.

Marin-Padilla M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage: III. gray matter lesions of the neocortex. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999; 58(5):407–29.

Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol*. 1969; 202: 437–70.

Martin JA, Kung HC, Mathews TJ, Hoyert DL, Strobino DM, Guyer B, et al. Annual summary of vital statistics: 2006. *Pediatrics*. 2008; 121: 788–801.

Martínez-Lozada Z, Hernández-Kelly LC, Aguilera J, López-Bayghen E, Ortega A. Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int*. 2011; 59(6):871-9.

Matute C, Alberdi E, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Pérez-Samartín A, Sánchez-Gómez MV. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci*. 2001 Apr;24(4):224-30.

Matute C, Alberdi E, Ibarretxe G, Sánchez-Gómez MV. Excitotoxicity in glial cells. *Eur J Pharmacol.* 2002 Jul 5;447(2-3):239-46.

Mazur M, Miller RH, Robinson S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. *J Neurosurg Pediatr.* 2010 6(3):206-21.

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainite receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med.* 1998; 4: 291–7.

Metz GA, Whishaw IQ. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *J. Vis. Exp.* 2009;(28):e1204. DOI:10.3791/1204.

Micu I, Jiang Q, Coderre E, Ridsdale A, Zhang L, Woulfe J, et al. NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature.* 2006; 439: 988–92.

Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology.* 2002; 67(6):451-67.

Nakayama M, Aihara M, Chen YN, Araie M, Tomita-Yokotani K, Iwashina T. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. *Mol Vis.* 2011;17:1784-93.

Northington FJ. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J.* 2006;47(1):32-8.

Nelson K, Grether J, Dambrosia J, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, et al. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res.* 2003; 53(4): 600–7.

Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *Journal of Neuroscience Research.* 1996;43(3):315-30.

Olivier P, Baud O, Evrard P, Gressens P, Verney C. Prenatal ischemia and white matter damage in rats. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64:998-1006.

Olsson T, Wieloch T, Smith ML. Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Res.* 2003; Aug 29;982(2):260-9.

Otis TS, Kavanaugh MP, Jahr CE. Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science.* 1997; 277:1515–8.

Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DE. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res.* 1993; 33:405–11.

Paxinos G, Watson C. The rat brain – In stereotaxic coordinates. 4th ed. USA: Academic Press; 1998.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985; 14(3):149-67.

Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in Cell Biology*. 1993; 3: 191-7.

Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*. 1992; 360:464–7.

Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hübner C, Olney JW, et al. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; Mar 2;96(5):2508-13.

Pundik S, Robinson S, Lust WD, Zechel J, Buczek M, Selman WR. Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient hypoxia/ischemia. *Metabolic Brain Disease*. 2006; 21(4):309-17.

Raff MC. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*. 1989; 243(4897):1450-5.

Rakic P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J Comp Neurol*. 1971; 141(3):283-312.

Reynolds R, Wilkin G. Development of macroglial cells in rat cerebellum II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development*. 1988; 102: 409-25.

Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981; 9(2):131-41.

Riddle A, Luo NL, Manese M, Beardsley DJ, Green L, Rorvik DA, et al. Spatial heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury. *J Neurosci*. 2006; 26: 3045–55.

Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, Dechant A, Tabrizi N, et al. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol Dis*. 2005; 18(3): 568-81.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A; Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(3): 289-304.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997; 21(6): 801-10.

Roeling TA, Veening JG, Peters JP, Vermelis ME, Nieuwenhuys R. Efferent connections of the hypothalamic "grooming area" in the rat. *Neuroscience*. 1993 Sep;56(1):199-225.

Romijn HJ, Hanszen AWJW, Van Voorst MJD, Buijs RM, Balazs R, Swaab DF. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. The proportion of GABA-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res*. 1992; 592:17–28.

Rosenberg PA, Dai W, Gan XD, Ali S, Fu JM, Back SA, et al. Mature myelin basic protein expressing oligodendrocytes are insensitive to kainate toxicity. *J Neurosci Res*. 2003; 71:237–45.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. 2000; 403(6767):316-21.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*. 1994; 13:713–25

Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*. 2005; 438: 1167–71.

Santiago MF, Berredo-Pinho M, Costa MR, Gandra M, Cavalcante LA, Mendez-Otero R. Expression and function of ganglioside 9-O-acetyl GD3 in postmitotic granule cell development. *Mol Cell Neurosci*. 2001;17:488–99.

Savignon T, Costa E, Tenorio F, Manhães AC, Barradas PC. Prenatal hypoxic-ischemic insult changes the distribution and number of NADPH-diaphorase cells in the cerebellum. *PLoS One*. 2012 7(4): e35786. DOI:10.1371/journal.pone.0035786

Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2004;16: 367–78.

Skoff RP, Bessert DA, Barks JD, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci*. 2001; Apr;19(2):197-208.

Silverstein FS, Johnston MV. Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol*. 1984; 15:342–7.

Silverstein FS, Naik B, Simpson J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: An in vivo microdialysis study. *Pediatr Res*. 1991; 30:587–90.

Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier MV, Matthieu JM, Zalc B. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia*. 1996; 18(1):39-48.

Sontheimer H, Perouansky M, Hoppe D, Lux HD, Grantyn R, Kettenmann H. Glial cells of the oligodendrocyte lineage express proton-activated Na⁺ channels. *J Neurosci Res*. 1989; Dec 24(4):496-500.

Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V, Karkavelas G, Simeonidou C, Pazaiti A, Guiba-Tziampiri O. Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*. 2005; 31;1045(1-2):22-30.

Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:10955–9.

Tanaka K. Pharmacological characterization of a cloned rat glutamate transporter (GluT-1). *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 21:167–70.

Tekkok S, Goldberg M. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *J Neurosci*. 2001; 15: 4237–48.

Tekkok SB, Faddis BT, Goldberg MP. AMPA/kainate receptors mediate axonal morphological disruption in hypoxic white matter. *Neurosci Lett*. 2005 15;382(3):275-9.

Tyson JE, Saigal S. Outcomes for extremely low-birth-weight infants: Disappointing news. *Journal of the American Medical Association*. 2005; 294: 371–3.

Venerosi A, Cutuli D, Chiarotti F, Calamandrei G. C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats. *Behav Brain Res*. 2006; 15;168(1):56-63.

Venerosi A, Valanzano A, Cirulli F, Alleva E, Calamandrei G. Acute global anoxia during C-section birth affects dopamine-mediated behavioural responses and reactivity to stress. *Behav Brain Res*. 2004; 154(1): 155-64.

Volpe J. Cerebral white matter injury of the premature infant: more common than you think. *Pediatrics*. 2003; 112(1): 176–80.

Volpe J. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res*. 2001; 50(5): 553–62.

Volpe JJ. Cerebellum of the Premature Infant: Rapidly Developing, Vulnerable, Clinically Important. *J Child Neurol*. 2009; September; 24(9): 1085–104.

Volpe JJ. *Neurology of the Newborn*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008.

Wadiche JI, Jahr CE. Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron*. 2001; 32:301–13.

- Wyllie DJ, Mathie A, Symonds CJ, Cull-Candy SG. Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rat cerebellar cultures. *J Physiol.* 1991; Jan;432:235-58.
- Xin WJ, Weng HR, Dougherty PM. Plasticity in expression of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in spinal dorsal horn glial cells following partial sciatic nerve ligation. *Molecular Pain.* 2009; 5:15.
- Yacubova E, Komuro H. Intrinsic program for migration of cerebellar granule cells in vitro. *J Neurosci.* 2002; 15;22(14):5966-81.
- Yoshioka A, Yamaya Y, Saiki S, Kanemoto M, Hirose G, Beesley J, et al. Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors mediate oxygen–glucose deprivation-induced oligodendroglial injury. *Brain Res.* 2000; 854: 207–15.
- Younes-Rapozo V, Felgueiras LO, Viana NL, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Manhães AC, et al. A role for the MAPK/ERK pathway in oligodendroglial differentiation in vitro: stage specific effects on cell branching. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27(8):757-68.
- Yuan X, Eisen AM, McBain CJ, Gallo V. A role for glutamate and its receptors in the regulation of oligodendrocyte development in cerebellar tissue slices. *Development.* 1998; 125(15):2901-14.
- Zagon IS, McLaughlin PJ, Smith S. Neural populations in the human cerebellum: estimations from isolated cell nuclei. *Brain Res.* 1977; 127: 279–82.
- Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma.* 2000; 17(10):857-69.