



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Marcia Martins Dias Ferraz

Efeitos da hipóxia-isquemia perinatal sobre o comportamento motor, distribuição da Tirosina Hidroxilase na substância negra e da NADPH diaforase no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos

Rio de Janeiro
2010

Marcia Martins Dias Ferraz

**Efeitos da hipóxia-isquemia perinatal sobre o comportamento motor,
distribuição da Tirosina Hidroxilase na substância negra e da NADPH diaforase
no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos**



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/A

F381 Ferraz, Marcia Martins Dias.
Efeitos da hipóxia-isquemia perinatal sobre o comportamento motor, distribuição da Tirosina Hidroxilase na substância negra e da NADPH diaforase no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos / Marcia Martins Dias Ferraz - 2010.
119 f. : il.

Orientadora: Penha Cristina Barradas Daltro Santos.
Coorientador: Marcos Rochedo Ferraz.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-Graduação em Biociências.

1. Tirosina 3-Monooxigenase - Teses. 2. NADPH desidrogenase - Teses. 3. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 4. Óxido nítrico - Teses. 5. Substância negra - Teses. 6. Teste de desempenho do Rota-Rod - Teses. I. Daltro-Santos, Penha Cristina Barradas. II. Ferraz, Marcos Rochedo. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.831-005.4

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

Assinatura

Data

Marcia Martins Dias Ferraz

**Efeitos da hipóxia-isquemia perinatal sobre o comportamento motor,
distribuição da Tirosina Hidroxilase na substância negra e da NADPH
diaforase no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos**

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

Aprovada em 5 de março de 2010.

Orientadora:

Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Coorientador:

Prof. Dr. Marcos Rochedo Ferraz
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

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

Prof. Dr. Ronald Marques dos Santos
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Arthur Giraldo-Guimarães
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

A minha filha Isabela

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, pelo amor, pela ajuda constante, pela paciência, pelo exemplo de caráter... E por se orgulharem e acreditarem em mim!

Ao meu marido e co-orientador Marcos por quem tenho infinita admiração. Agradeço por toda a ajuda prestada neste trabalho, nos anteriores e para os que ainda virão. Nossa parceria é eterna! Obrigada por cuidar do jardim, do meu jantar, do céu e do mar, e de nós.

A minha orientadora Penha Cristina por ter aceitado me orientar, por me acolher em seu laboratório, e contribuir efetivamente com este trabalho.

Ao professor Frank Tenório pelas inúmeras vezes que me ajudou (me salvou, na verdade), mas principalmente por sua valiosa amizade.

Ao querido Everton que esteve presente em quase todos os momentos da realização deste trabalho. Dividimos os erros e acertos, e aprendemos juntos. Orgulho!!!

A minha ex-orientanda e amiga-amada Ive (que em breve voltará a ser orientanda) que me ajudou a protocolar o modelo, e na edição final da tese. E, principalmente, por ter estado ao meu lado estes 4 anos. A sua dedicação, e o seu suporte emocional não tem preço!

A professora e amiga Olga pela revisão da tese, e por sua preciosa amizade. Não podíamos ter feito melhor escolha para a madrinha de nossa filha! Obrigada por cuidar dela tão bem (e, por conseqüência, me ajudar também)!

Aos amigos queridos Fabio e Gabi porque, pra mim, nós seremos eternamente uma equipe. É em vocês que eu confio, que conto, que desabafo... e “só por hoje” não falaremos de ninguém!

A Vivi e Andréa minhas queridas amigas e companheiras de percurso. Obrigada pelo afeto, pela dedicação, pelas conversas... Vocês me proporcionaram dias mais felizes!

Ao meu “enteado” e amigo Anicet Okinga pelo seu carinho em primeiro lugar, e por ser uma pessoa humana e prestativa sempre!

A Bruninha-discípula, Bia-babá-da-Bebela, e a Aline que são os meus xodós! Obrigada por todos os momentos, e por todas as risadas...

Ao Tiago, ao Luiz, ao Serginho, ao Michael (não precisa agradecer!), ao Leo e ao P. Paulinho que me ajudaram sempre! Nem que fosse só pra me fazer dar boas gargalhadas...

Obrigada também a Suelen e ao André, que estão apenas começando, mas já contribuíram, e me ajudaram. Bem vindos!

As meninas do laboratório de Neurofisiologia, principalmente Andréia, por me ajudarem diversas vezes com o criostato, estufa...

Ao meu amigo e bioterista Nelcir por toda a ajuda prestada, por dividir seu conhecimento comigo, e pela dedicação com que desenvolve o seu trabalho (e consequentemente o de todos).

A professora Tânia Tano pela enorme contribuição a este trabalho, pelo empréstimo do ROTAROD e por ter me ensinado a usá-lo. Mas principalmente pela amizade que sempre nos prestou, pela sua simpatia e bondade.

A dor é inevitável.
O sofrimento é opcional.

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

FERRAZ, Marcia Martins Dias. *Efeitos da hipóxia-isquemia perinatal sobre o comportamento motor, distribuição da Tirosina Hidroxilase na substância negra e da NADPH diaforase no hipocampo durante o desenvolvimento em ratos*. 2010. 119 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A hipóxia isquemia (HI) pré-natal é uma das principais causas de mortalidade e doenças neurológicas crônicas em neonatos, que podem apresentar *déficits* permanentes como: retardamento, paralisia cerebral, dificuldade de aprendizado ou epilepsia. Estes prejuízos, provavelmente, estão relacionados com o atraso no desenvolvimento neural, astrogliose e com a perda de neurônios e oligodendrócitos. Déficits funcionais e cognitivos estão associados à degeneração de vias dopaminérgicas e de estruturas hipocampais. A enzima tirosina hidroxilase (TH) é a enzima limitante na síntese de dopamina e seus níveis são alterados em eventos de HI. O óxido nítrico (NO) é um gás difusível que atua modulando diferentes sistemas, participando de eventos como plasticidade sináptica e neuromodulação no sistema nervoso central e é produzido em grandes quantidades em eventos de injúria e inflamação, como é o caso da HI. O presente estudo teve por objetivos avaliar, utilizando o modelo criado por Robinson e colaboradores em 2005, os efeitos da HI sobre o comportamento motor e avaliar o desenvolvimento de estruturas encefálicas relacionadas a este comportamento como a substância negra (SN) e o complexo hipocampal. A HI foi induzida a partir do clampeamento das artérias uterinas da rata grávida, por 45 minutos no décimo oitavo dia de gestação (grupo HI). Em um grupo de fêmeas a cirurgia foi realizada, mas não houve clampeamento das artérias (grupo SHAM). A avaliação do comportamento motor foi realizada com os testes ROTAROD e de campo aberto em animais de 45 dias. Os encéfalos foram processados histologicamente nas idades de P9, P16, P23 e P90, sendo então realizada imunohistoquímica para TH e histoquímica para NADPH diaforase (NADPH-d), para avaliação do NO. Nossos resultados demonstraram redução da imunorreatividade para a TH em corpos celulares na SN aos 16 dias no grupo HI e aumento na imunorreatividade das fibras na parte reticulada aos 23 dias, com a presença de corpos celulares imunorreativos nesta região no grupo HI. Demonstramos também aumento do número de células marcadas para NADPH-d no giro dentado nos animais HI, nas idades analisadas, assim como aumento na intensidade de reação no corno de Ammon (CA1 e CA3) aos 9 dias no grupo HI, e posterior redução nesta marcação aos 23 e 90 dias neste mesmo grupo. Nos testes comportamentais, observamos diminuição da atividade motora no grupo HI com uma melhora do desempenho ao longo dos testes no ROTAROD, sem entretanto atingir o mesmo nível do grupo SHAM. Os animais HI não apresentaram maior nível de ansiedade em relação ao grupo SHAM, descartando a hipótese das alterações observadas nos testes de motricidade estarem relacionadas a fatores ansiogênicos. O modelo de clampeamento das artérias uterinas da fêmea se mostrou uma ferramenta importante no estudo das alterações decorrentes do evento de HI pré-natal, por produzir diversos resultados que são similares aos ocorridos em neonatos que passam por este evento.

Palavras-chave: Tirosina. Monooxigenase. NADPH desidrogenase. Hipocampo (Cérebro). Óxido nítrico. Substância negra. Teste de desempenho do Rota-Rod.

ABSTRACT

Perinatal hypoxia-ischemia (HI) is one of the major causes of mortality and chronic neurological diseases in newborns that can show permanent effects such as mental retardation, cerebral palsy, learning difficulty and epilepsy. It is probable that these impairments may be related to a delay in the neural development, astrogliosis and to the death of neurons and oligodendrocytes. Cognitive and functional deficits are related to degeneration of dopaminergic pathways and hippocampus. The enzyme tyrosine hydroxylase (TH) is a limiting step in the dopamine synthesis and its levels are impaired in HI insults. Nitric oxide (NO) is a diffusible gas that acts by modulating different systems and participates in several phenomena such as synaptic plasticity and neuromodulation in the central nervous system and is produced in higher levels in events of injury and inflammation as in the case of HI. This study aimed to evaluate the effects of HI on the motor behavior and to evaluate the development of brain structures related to this behavior as the substantia nigra (SN) and the hippocampal complex, using the model developed by Robinson and colleagues in 2005. HI was induced by clamping the uterine arteries of pregnant rats, for 45 minutes, on the eighteenth day of gestation (group HI). In a group of females, the surgery was performed, but no clamping of the arteries (group SHAM) was made. Assessment of motor behavior was performed with the ROTAROD test and open field test in animals of 45 days (P45) of age. The brains were processed histologically at ages P9, P16, P23 and P90, and then submitted to immunohistochemistry for TH and NADPH diaphorase (NADPH-d) histochemistry for evaluation of NOS. Our results demonstrated an apparent decrease in TH immunoreactivity in cell bodies in the SN at P16 in the HI group and an increase in immunoreactivity of the fibers in the SN pars reticulata at P23 with the presence of TH immunoreactive cell bodies at this same region in the HI group. We also showed an increase in the number of NADPH-d stained cells in the dentate gyrus in the HI group, at all ages, as also an increase in the intensity of staining in the Ammon's horn (CA1 and CA3) at P9 in the HI group and, after that, a decrease in this staining at P23 and P90 in this same group. In the behavioral tests we observed a decrease in the motor activity in the HI group with a partial recovery all over the several sessions in the ROTAROD test, however this group did not reach the same performance as the SHAM group. HI animals did not show a higher level of anxiety when compared to SHAM animals, ruling out the hypothesis that angiogenic factors may be impairing the results in the motor behavior tests. Our results showed that the model of uterine arteries clamping could be an important tool in the study of the effects of perinatal HI, by producing several consequences that are very similar to the effects observed in newborn children who suffered an HI event.

Keywords: tyrosine hydroxylase, NADPH diaphorase, hippocampus, nitric oxide, substantia nigra, ROTAROD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Projeções das vias dopaminérgicas	25
Figura 2	Estrutura e vias do hipocampo.....	36
Figura 3	Vias hipocampais.....	37
Figura 4	Imagem esquemática de um corte sagital do hipocampo mostrando as camadas, tipos morfológicos neuronais, e vias da região do corno Ammon	40
Figura 5	Via L-arginina-óxido nítrico	44
Figura 6	Cirurgia de clampeamento das artéria uterinas em E18.....	51
Figura 7	Análise macroscópicas de animais adultos da mesma ninhada e animais HI e SHAM P9	59
Figura 8	Médias de massa corporal de machos e fêmeas controles e HI	61
Figura 9	Médias do total de ambulações no teste de campo aberto dos controles e HI	62
Figura 10	Médias de ambulações na periferia e no centro no teste de campo aberto	63
Figura 11	Comparação entre a ambulação no centro e na periferia corrigido pelo número de retângulos de cada região no teste de campo aberto	64
Figura 12	Médias da latência para a queda no cilindro giratório.....	65
Figura 13	Médias de tempo de permanência no ROTAROD	66
Figura 14	Número de entradas no braço aberto superior e inferior	67
Figura 15	Tempo de permanência no braço aberto superior e inferior.....	68
Figura 16	Imunohistoquímica para TH na substância negra de ratos nas idades de P16, P23 e P90 nos grupos HI e Sham.....	71
Figura 17	Histoquímica pra NADPH-d nas regiões hipocampais de animais HI e SHAM na idade de P9	73
Figura 18	Padrão de marcação da NADPH-d no GD de animais P23	74
Figura 19	Padrão de marcação da NADPH-d no corno de Ammon do grupo P23	75
Figura 20	Padrão de marcação da NADPH-d no GD de animais do grupo P90	76

Figura 21	Padrão de marcação da NADPH-d no corno de Ammon de animais do grupo P9	77
Figura 22	Número de células NADPH-d+ no giro dentado de animais submetidos à HI em comparação com o grupo SHAM em três idades.....	78

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- 5-HT – 5-hidroxitriptamina
- 6-OHDA – 6-hidroxidopamina
- A9 – A17 – Regiões dopaminérgicas
- ALdh1a1 – Retinaldeído desidrogenase, ou Raldh 1
- ALV – Alveus
- AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor glutamatérgico
- AMPC - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- Amyg – Amígdala
- ANOVA – Análise de variância de repetição
- Anti-IgG – Anti-imunoglobulina G
- APOM – Área pré-óptica medial do hipotálamo
- ATV – Área tegmental ventral
- BA – Braços abertos do teste Cruz elevada
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BF – Braços fechados do teste Cruz elevada
- bFGF – Fator básico de crescimento de fibroblasto
- BH₄ – Tetrahidrobiopterina
- CA – Corno de Ammons
- Ca²⁺ - Cálcio
- CE – Córtex entorrinal
- CNPase - 2', 3'- nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase
- COMT – Catecol-orto-metil transferase
- DA – Dopamina
- DAB – 3,3-diaminobenzidinatetrahidrocloro
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- E18 – Décimo oitavo dia embrionário
- E22 – Vigésimo segundo dia embrionário
- EBA – Entradas nos braços abertos
- EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio
- eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

EP – Adrenalina
FAD – Dinucleotídeo adenina-flavina
Fe³⁺ - Íon férrico
fim – Via fímbria
FMN – Mononucleotídeo flavina
FUG – Giro fusiforme
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GAD – Descarboxilase do ácido glutâmico
GC – Guanilato ciclase
GD – Giro dentado
GDNF – Fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial
Gi – Proteína G inibitória
GMPc – Guanosina monofosfato cíclico
GnRH – Hormônio liberador de Gonadotropinas
GR – Camada granular
Gs – Proteína G estimuladora
GTP – Guanosina trifosfato
H₂O – Água
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HI – Hipóxia isquemia
HRP – Peroxidase de raiz forte
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
i.p. – Intraperitoneal
K⁺ - Potássio
KCL – Cloreto de Potássio
kDa – Kilodalton
KH₂PO₄ - di-hidrogenofosfato de potássio monobásico
L-DOPA – 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
LTP – Potenciação de longo prazo
MAB 318 – Anticorpo anti-tirosina hidroxilase monoclonal
MAO – Monoamino oxidase
mf – Fibras musgosas
Mg⁺⁺ - Magnésio
MO – Camada molecular

Na₂PO₄ – Fosfato de sódio
Na⁺ - Sódio
NaCl – Cloreto de Sódio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH-d – Dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
NBT – nitro blue tetrazol
NE – Noradrenalina
NGS – Soro normal de cabra
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NMDA N-metil D-aspartato receptor glutamatérgico
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
Nr4a2 ou Nurr1 – Sinalizadores de precursores neuronais
O.C.T.- Optimal cutting temperature (meio de inclusão)
O₂ – Oxigênio
OR – Stratum oriens
P7 – Sete dias pós-natal
P9 – Nove dia pós-natal
P16 – Dezesesseis dias pós-natal
P23 – Vinte e três dias pós-natal
P45 – Quarenta e cinco dias pós-natal
P90 – Noventa dias pós-natal
PAS – Parasubiculum
PBS – Tampão fosfato salino
PC – Paralisia cerebral
PKA – Proteína cinase A
PKG – Proteína cinase G
PM – Camada de neurônios polimórficos
pp – Via perforante
PPSE - Potencial pós-sináptico excitatório
PVN – Núcleo periventricular
Py – Camada piramidal
RAD – Stratum radiatum
RNAm – Ácido ribonucléico mensageiro

ROS – Espécies reativas de oxigênio
ROTAROD – Teste do cilindro giratório
RPC – Córtex perirrinal
RPM – Rotações por minuto
SARRN – Síndrome da angústia respiratória do recém-nascido
sc – Via colateral de Schaffer
sGC – Guanilato ciclase solúvel
SHAM – Controle cirúrgico
SM – Stratum moleculare
SN – Substância negra
SNC – Sistema nervoso central
SO – Stratum oriens
SP – Stratum pyramidal
SR – Stratum radiatum
SUB – Subículo
TBA – Tempo de permanência nos braços abertos
TDAH – Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TH – Tirosina hidroxilase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	MODELOS DE HIPÓXIA ISQUEMIA	20
2	O MODELO DE CLAMPEAMENTO DAS ARTÉRIAS UTERINAS E18	22
3	TESTES COMPORTAMENTAIS COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE HI	23
4	SISTEMA DOPAMINÉRGICO CENTRAL	24
4.1	As vias dopaminérgicas	24
4.1.1	<u>Sistema mesotelencefálico</u>	26
4.1.2	<u>Sistema diencefálico</u>	27
4.2	Dopamina: síntese e metabolismo	28
4.2.1	<u>Tirosina hidroxilase</u>	29
4.3	Origem e Desenvolvimento	31
5	O HIPOCAMPO	33
5.1	Neuroanatomia funcional do complexo hipocampal	35
6	ÓXIDO NÍTRICO	42
6.1	NO, aprendizado e potenciação a longo prazo	45
6.2	Hipóxia e NO	48
7	OBJETIVOS	49
8	METODOLOGIA	50
8.1	Animais	50
8.1.1	<u>Realização da hipóxia isquemia</u>	52
8.2	Procedimento histológico	52
8.2.1	<u>Perfusão</u>	52
8.2.2	<u>Imunohistoquímica</u>	52
8.2.3	<u>Procedimento histoquímico</u>	53
8.2.4	<u>Análise das lâminas e aquisição de imagens</u>	54
8.3	Análise comportamental	54
8.3.1	<u>Teste de locomoção forçada no cilindro giratório (ROTAROD)</u>	55
8.3.2	<u>Testes de campo aberto</u>	55
8.3.3	<u>Teste do labirinto em cruz elevada</u>	56

8.3.3.1	Medidas de ansiedade.....	57
8.3.3.2	Medidas de atividade.....	58
8.4	Análise estatística.....	58
9	RESULTADOS.....	59
9.1	Análise macroscópica.....	59
9.2	Análise funcional de testes comportamentais.....	62
9.2.1	<u>Teste de campo aberto.....</u>	62
9.2.2	<u>Teste de locomoção forçada no cilindro giratório (ROTAROD).....</u>	65
9.2.3	<u>Teste do labirinto em cruz elevada.....</u>	67
9.3	Análise morfológica da substância negra no desenvolvimento.....	69
9.4	Análise morfológica do complexo hipocampal no desenvolvimento...	70
10	DISCUSSÃO.....	79
10.1	Considerações gerais.....	79
10.2	Características macroscópicas dos animais submetidos à HI.....	80
10.3	Efeitos da hipóxia sobre o comportamento motor e ansiedade.....	81
10.4	Efeitos da hipóxia sobre o desenvolvimento da substância negra.....	86
10.5	Efeito da hipóxia sobre o NO no hipocampo.....	87
10.6	Considerações finais.....	90
11	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

INTRODUÇÃO

Lesões cerebrais podem acarretar inúmeros e diferentes danos ao indivíduo, e os prejuízos ocorrem de acordo com a natureza da lesão, da área afetada, da sua extensão, e do momento no desenvolvimento. Estudos clínicos e experimentais demonstram que a diminuição do aporte de oxigênio na gestação, a hipóxia isquemia pré-natal (HI), acarreta a longo prazo, diversos prejuízos à criança – e mais tarde ao adulto – como a hiperatividade, dificuldade de concentração, dificuldade de aprendizado, déficit de memória e outros danos mais graves, como a epilepsia e a paralisia cerebral (PC) (Gross e col.,1993; Filloux e col.,1996; Du Plessis e col., 1997). Essas conseqüências são provavelmente devido ao atraso no desenvolvimento neural, astrogliose, a perda de neurônios e oligodendrócitos (Marin-Padilla, 1997; 1999; 2000).

A HI é a segunda principal causa de mortalidade e doenças neurológicas crônicas em neonatos, perdendo apenas para a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SARRN anteriormente chamada de doença da membrana hialina). A asfixia sistêmica pré-natal pode ocorrer tanto por um processo mecânico como por outros fatores entre eles o tabagismo materno, anemia, hipotensão, gestações múltiplas e uso de drogas (Pundik e col., 2006). Existem trabalhos que relacionam também o estresse durante a gravidez com alterações na morfologia do sistema nervoso central (SNC) demonstrando que podem ocorrer lesões de regiões hipocampais, através da perda de neurônios piramidais, após a exposição de níveis elevados de corticosteróides (McEwen e col., 1999; Souza e col., 2000). Estresse, ou administração de glicocorticóides, ocorrido no período pré-natal tem recebido muita atenção nas últimas décadas por serem fatores que contribuem para o atraso do desenvolvimento do aprendizado, e para as desordens afetivas e esquizofrenia (para revisão: Kofman, 2002).

Estudos epidemiológicos indicam que de dois a quatro recém-nascidos em mil nascimentos passaram por um evento de asfixia sistêmica. E em recém-nascidos prematuros (ou baixo peso) a incidência de asfixia é de 60%. De 20 a 50% dos bebês que passaram pelo evento de hipóxia exibem encefalopatias durante os seus primeiros meses de vida. Dos que sobrevivem, mais de 25% exibem *déficits*

neurofisiológicos permanentes como: retardamento, paralisia cerebral, dificuldade de aprendizado ou epilepsia (Vanucci, 1997).

A paralisia cerebral pode ser definida como qualquer comprometimento das funções neurológicas, sem indícios de progressão, e caracterizada por evidentes *déficits* motores. Pode afetar um único membro, um lado do corpo (hemiplegia espástica) ou ambos os braços e pernas (quadriplegia espástica). A paralisia cerebral apresenta uma forma discinética, que é caracterizada pela distonia, isto é, movimentos involuntários contínuos, repetidos e lentos devido a uma contratura muscular que pode causar “congelamento” no meio de uma ação. Esses prejuízos na motricidade estão frequentemente associados com a degeneração das vias dopaminérgicas e patologias dos gânglios da base, mais particularmente do estriado (para revisão: Burke e col., 1991).

Através da caracterização de modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo dos efeitos e mecanismos da HI, foi possível desenvolver, ao longo das décadas, várias intervenções farmacológicas que amenizaram as neuropatologias ocorridas após uma injúria no desenvolvimento, ou na fase adulta, incluindo o uso de glicocorticóides (Nelson, 2003), antagonistas de receptores glutamatérgicos (Mc Donald e col., 1987), inibidores de radicais livres, bloqueadores de canais de cálcio entre outros (Altman e col., 1984; Gunn e col., 1989; Barks e col., 1991; Palmer e col., 1993; Hagberg e col., 1994).

Portanto é de extrema importância se obter informações sobre o evento de HI através de modelos que elucidem os mecanismos da lesão como as vias de neurotransmissores envolvidas que podem estar alteradas e suas consequências, visando o desenvolvimento de futuras terapêuticas mais eficazes - ou preventivas - que minimizem os danos ocorridos no SNC do indivíduo.

1 MODELOS DE HIPÓXIA ISQUEMIA

O clássico modelo de HI obtido pela oclusão unilateral das artérias carótidas no rato adulto foi criado por Levine em 1960 (Levine, 1960). Mais tarde, Rice e colaboradores (Rice e col., 1981), modificaram o modelo animal criado por Levine e a oclusão passou a ser feita no sétimo dia pós-natal. Os danos ocorrem restritamente ao hemisfério ipsilateral, e são observados no córtex cerebral, subcortical e substância branca periventricular, estriado e hipocampo. Diversos pesquisadores passaram a utilizar este modelo para verificar as conseqüências das lesões na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (Silverstein e Johnston, 1984; Romijn e col., 1992), na neurotoxicidade glutamatérgica (Silverstein e col., 1991; Gordon e col., 1991), da neurotoxicidade do óxido nítrico (Ferriero e col., 1988; 1995) e nos sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI (Burke e col., 1991; Romijn e col., 1992).

Dados epidemiológicos mostram que uma das conseqüências da HI perinatal é aumentar o risco de epilepsia no decorrer da vida do indivíduo. Primeiramente foi verificada a participação de interneurônios GABAérgicos inibitórios como a possível causa de epilepsia em macacos em estágios iniciais de vida (Sloper e col., 1980). Em 1992 através do modelo de oclusão de carótida, Romijn e colaboradores demonstraram que após a primeira semana de hipóxia pode ocorrer uma degeneração preferencial destes neurônios e/ou a perda de imunorreatividade para GABA, considerando o fato que estas células podem mudar a imunorreatividade de acordo com seu estado metabólico funcional.

Przedborski e colaboradores (1991) avaliaram, através do modelo de oclusão unilateral da carótida no sétimo dia pós-natal, os efeitos da HI nos níveis de dopamina e seus metabólitos, bem como nos receptores dopaminérgicos D1 e D2 e na recaptação neuronal de dopamina. Os autores observaram um decréscimo na marcação, para as duas famílias de receptores, nos locais onde ocorreram as lesões, sobretudo no estriado. Esse dado pode ser interpretado como uma conseqüência da perda de neurônios após a injúria. A lesão do estriado é caracterizada por uma diminuição da região que pode estar associada à gliose, perda neuronal e anormalidade da bainha de mielina. Em compensação, não houve efeitos significativos nos níveis de dopamina e seus metabólitos sugerindo que as estruturas pré-sinápticas dopaminérgicas foram preservadas.

Em um outro modelo de HI pré-natal criado por Bjelke e colaboradores (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 removidos e reanimados. O rato que é servido de controle é retirado por cesariana antes desse procedimento. Através desse modelo foi 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 foi 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 e col., 1995). Em 2002, também foi observado que um insulto de anóxia, em estágios iniciais de vida, tem efeito ao longo prazo na expressão de astrócitos e de bFGF, e influencia na neuro-adaptação ao estresse na vida adulta (Flores e col., 2002)

Gross e colaboradores (2005) observaram através do modelo de Bjelke a plasticidade dos sistemas dopaminérgicos mesoestriatal e mesolímbico pós-asfixia. A asfixia produziu um aumento nos níveis de RNAm para TH nas regiões da SN e ATV logo após o nascimento (6 horas) e uma semana depois, mas não após um dia (24 horas). Nas projeções límbicas e no estriado, os níveis de RNAm para TH não se alteram após o nascimento mas aumentam após uma semana. Esses dados mostram que os níveis de RNAm para TH possuem especificidade de acordo com a região e com o tempo pós-lesão.

2 O MODELO DE CLAMPEAMENTO DAS ARTÉRIAS UTERINAS EM E18

No modelo em que se baseia nosso estudo, criado por Robinson e colaboradores em 2005, a HI foi induzida a partir do clampeamento das artérias uterinas da rata grávida no décimo oitavo dia de gestação (E18), por 15 a 45 minutos, reduzindo assim o aporte de oxigênio aos fetos. A gestação do rato Wistar tem aproximadamente vinte e dois dias. Os resultados demonstraram astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos, e ruptura axonal tanto na substância branca como no córtex cerebral (Robinson e col., 2005), alterações que são similares às observadas em cérebros humanos que passaram por hipóxia perinatal (Marin-Padilla, 1997; 1999). Uma hipótese para as complicações ocorridas após a lesão é a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (Kinney e Back, 1985) ao aumento de radicais livres (Volpe, 2001; 2003), ao aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Leviton, 1997; Baud e col., 1999; Dammann e Nelson e col., 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (Kavanaugh e col., 2000; Tekkok e Golberg, 2001; Itoh e col., 2002).

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 císticas severas (Robinson e col., 2005).

Embora existam outros modelos de lesão 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 e col., 2001), e que provavelmente são uma causa importante de nascimentos prematuros e de baixo peso (Pundik e col., 2006). 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 verificação das mudanças nos sistemas de neurotransmissores envolvidos com o controle motor, com o aprendizado, e com a memória.

3 TESTES COMPORTAMENTAIS COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA HI

Existem poucos trabalhos feitos em modelos animais experimentais a respeito das alterações comportamentais relacionados às perdas sensoriais, motoras e cognitivas, após um insulto de asfixia. Em 2005, Spandou e colaboradores verificaram as conseqüências da HI em ratos recém-natos através de testes comportamentais. Os autores também observaram os efeitos neuroprotetores da eritropoietina, uma citocina que atua no sistema nervoso central ativando proteínas cinases específicas, inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de glutamato, modulando neurotransmissores, atenuando a apoptose e estimulando a angiogênese. Os ratos submetidos ao insulto HI apresentaram déficit motor em diversos testes comportamentais como o teste do cilindro giratório (ROTAROD), o *placing limb* e o *grip test*. A Eritropoietina administrada sete dias antes do insulto HI, ou mesmo imediatamente após, ofereceu uma neuroproteção significativa, atenuando concomitantemente o *déficit* motor observado nos testes comportamentais (Spandou e col., 2005).

No estudo pioneiro do uso do modelo de HI utilizado nesta tese, Robinson e colaboradores demonstraram que ratos jovens e adultos submetidos ao insulto isquêmico apresentam déficit motores persistentes, em relação ao controle, após avaliação no teste de campo aberto (open-field) e no teste *Stride length* (Robinson e col., 2005). Segundo os autores, estes achados seriam consistentes com o modo de andar espástico de crianças que desenvolveram paralisia cerebral. Entretanto, não há dados na literatura relacionando as possíveis alterações no sistema dopaminérgico nigroestriatal e as alterações funcionais observadas em animais submetidos a este modelo de HI.

Mais recentemente, Girard e colaboradores, utilizando outro modelo de HI, observaram decréscimo para a marcação da TH em corpos celulares e em neuritos nos animais experimentais em relação ao grupo controle, associado à redução da atividade locomotora no ROTAROD (Girard e col., 2009). No modelo utilizado por Girard e colaboradores, os animais sofreram oclusão unilateral irreversível de carótida em P1, além de que, durante a vida pré-natal, suas genitoras foram infectadas com endotoxina bacteriana.

4 SISTEMA DOPAMINÉRGICO CENTRAL

4.1 As vias dopaminérgicas

Os neurônios dopaminérgicos são encontrados nas seguintes posições listadas a seguir da região caudal para a rostral. Os corpos celulares localizados no mesencéfalo ventral são divididos em dois núcleos: Substância Negra Compacta (A9) e a Área Ventral do Tegmento Mesencefálico (A10). Neurônios dopaminérgicos localizados nestas áreas são, provavelmente, uma aquisição recente das aves e mamíferos na escala evolutiva dos vertebrados, em comparação com neurônios dopaminérgicos da retina, bulbo olfatório e hipotálamo que são encontrados em todos os animais, em regiões cerebrais equivalentes (Smeets e Reiner, 1994; Smeets e Gonzalez, 2000).

No encéfalo do rato, o grupo de células dopaminérgicas mesencefálicas é composto de 45.000 neurônios, 5% dos quais estão localizadas na região A8 e as restantes, estão divididas igualmente entre as regiões A9 e A10 (German e Manaye, 1993). Na região A9 a maioria das células é encontrada na parte compacta da substância negra, mas aproximadamente 8% destas localizam-se na parte reticulada da substância negra. Essas equivalências são aplicáveis ao encéfalo humano que contém em torno de 590.000 neurônios na região mesencefálica, nas primeiras quatro décadas de um indivíduo normal (Vernier e col., 2004).

Corpos de neurônios encontrados no diencefalo do rato compreendem as regiões A11 a A15 com aproximadamente 1000 células. Os grupos de neurônios localizados no hipotálamo posterior compreendem a A11, e na Zona Incerta do Tálamo ventral, área A13 (Dahlström e Fuxe, 1996). No telencéfalo, existem corpos de neurônios em duas regiões: A16 onde se encontra o grupo dos interneurônios periglomerulares do bulbo olfatório; e A17, o grupo de interneurônios amácrinos da retina (Skagerberg e col., 1984). Desses grupos de neurônios, projeções são enviadas à região alvo a ser inervada, dividindo basicamente o sistema dopaminérgico em dois grandes sistemas: o sistema mesotelencefálico, que apresenta pericários localizados no mesencéfalo que enviam seus axônios a diferentes estruturas telencefálicas; e o sistema diencefálico, constituído por vias curtas, intrínsecas ao hipotálamo.

O sistema mesotelencefálico pode ser dividido em três vias ascendentes, denominadas respectivamente: via nigroestriatal, via mesocortical e via mesolímbica. Tem sido proposto a existência de vias dopaminérgicas mesohipocampais, cujos corpos celulares localizam-se tanto na substância negra, quanto no tegmento mesencefálico, e cujas fibras projetam-se para o hipocampo, com papel importante na atenção e no aprendizado motor (Gasbarri e col., 1997). O sistema diencefálico é constituído pelas vias tuberoinfundibular, meduloperiventricular e incertohipotalâmica (Graeff e col., 1999). (Figura 1.1)

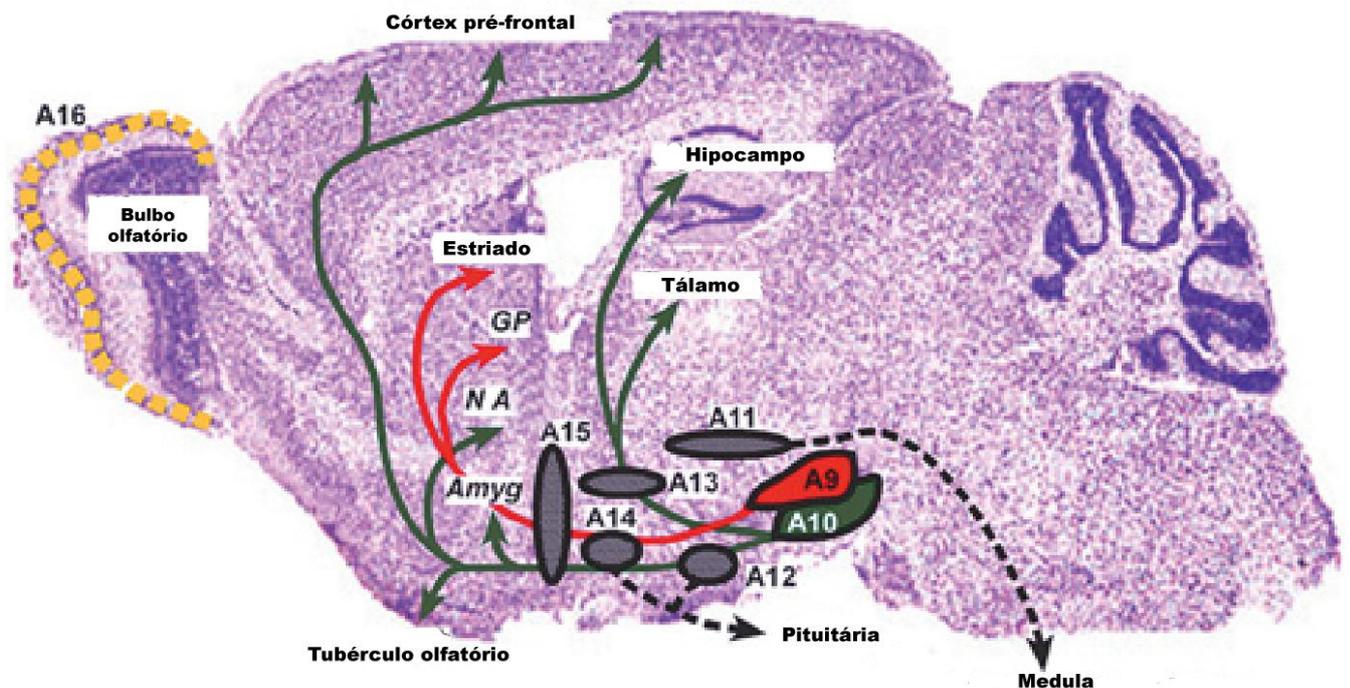


Figura 1 – Projeções dos diferentes grupos celulares dopaminérgicos vistos em plano sagital no encéfalo adulto de ratos. Amyg – amígdala; GP - globus pallidus; NA - nucleus accumbens. A área A9, em vermelho, corresponde a substância negra compacta, seus neurônios projetam-se ao estriado (núcleo caudado e putamen) formando a via nigroestriatal. A área 10, em verde, corresponde à área tegmental ventral que envia projeções para o córtex pré-frontal formando a via mesocortical e, para o sistema límbico, amígdala, tubérculo olfatório e núcleo *accumbens*. Conexões adicionais da área A10 são formadas com as do tálamo e do hipocampo. Regiões A11 a A15 do diencefalo fazem projeções para a medula e pituitária. A região A16 do telencéfalo consiste no grupo dos interneurônios periglomerulares do bulbo olfatório. Área 17, os interneurônios amácrinos da retina foram omitidos da figura. (modificado de Prakash e Wurst, 2006)

4.1.1. Sistema mesotelencefálico

A via nigroestriatal é parte do sistema nervoso extrapiramidal e participa do controle dos movimentos (para revisão: Graeff e col., 1999; Stahl, 2002). Possui corpos celulares situados na substância negra, mais precisamente na região A9, que enviam projeções para a região dos gânglios da base (estriado dorsolateral e caudado putamen). O papel desta via está relacionado com a iniciação e a execução de movimentos voluntários. A sua degeneração está associada à doença de Parkinson. O uso de antipsicóticos clássicos, que bloqueiam receptores dopaminérgicos estriatais, pode ocasionar em médio prazo um parkinsonismo farmacológico e a longo prazo a discinesia tardia (Zhang e col., 2002; Stahl, 2002).

A via mesolímbica e a via mesocortical possuem neurônios situados na região ventral do tegmento mesencefálico, área A10. A via mesolímbica envia projeções para as diferentes estruturas do sistema límbico, como a amígdala, o tubérculo olfatório e, sobretudo, para o núcleo *accumbens*. O papel desta via envolve o controle de comportamentos emocionais, do sistema de recompensa cerebral, do comportamento sexual, do comportamento de esquiva a estímulos nocivos, da dependência de drogas e também participa da regulação do comportamento de comer e beber (Brandão, 1995; Hull e col., 1997). A hiperatividade desta via está relacionada a distúrbios psicóticos tais como a esquizofrenia, e pode ser induzida pelo uso de fármacos psicoestimulantes que produzem delírios e alucinações, como, por exemplo, anfetaminas e o ecstasy (Zhang e col., 2002; Stahl, 2002). Os neurônios da via mesocortical fazem projeções ascendentes ao córtex pré-frontal e também participam juntamente com a via mesolímbica, da modulação e controle da cognição, da emoção e do comportamento de recompensa.

Por diversos anos a presença da inervação do sistema dopaminérgico no hipocampo foi controversa. Inicialmente se acreditava que a presença desta, se devia apenas pela biossíntese de noradrenalina, devido às baixas concentrações de dopamina obtidas, comparadas ao estriado (para revisão: Gasbarri e col., 1997). Anos mais tarde, Wyss e col., 1979 demonstraram evidências da existência de uma via mesohipocampal. Neste estudo, foram feitas seguidas injeções de peroxidase de raiz forte (HRP) no hipocampo. Células marcadas foram encontradas na área tegmental ventral e na substância negra compacta. Para a caracterização, e posterior evidência, dos neurônios mesencefálicos que faziam projeção ao

hipocampo, foi utilizada a combinação de traçadores fluorescentes e imunofluorescência (Swanson, 1982). Com os resultados dessa pesquisa, que utilizava combinação simultânea de um protocolo para marcação da TH nos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos e o “*true blue*”, um transportador retrógrado, houve a evidência definitiva da existência da via dopaminérgica mesohipocampal. Injeções de *true blue* nas regiões CA1, CA3 e no giro dentado (GD) resultaram em marcação retrógrada de DA nas regiões A9 e A10. A degeneração dos aferentes dopaminérgicos obtida pela injeção de 6-OHDA intrahipocampal levou a um severo decréscimo nos níveis dopaminérgicos na formação hipocampal dorsal de ratos, que foram pré-tratados com desmetilimipramina para prevenir a destruição de terminais noradrenérgicos. Esses resultados indicam que uma parte das aferências hipocampais são dopaminérgicas (Itoh e Uchumura, 1981; Muzzio e col., 2009). Scatton e colaboradores (1980) sugeriram que a maioria das aferências hipocampais dopaminérgicas originam das regiões A9 – A10. Em um modelo de injúria cerebral controlada (Kobori e Dash, 2006), a administração de uma única dose de SCH23390, antagonista dopaminérgico seletivo do receptor D1, reverteu o déficit de memória em ratos verificado no teste comportamental “*Morris Water Maze*”. Este efeito foi relacionado pelos autores à supressão da expressão de GAD67 nos córtices pré-límbico e infralímbico do córtex pré-frontal medial. Em 2005, Addy e colaboradores verificaram que a clozapina, um antipsicótico atípico, também melhorava a memória operacional em ratos normais e em ratos com lesão no hipocampo, mais restritamente na fimbria-fórnix.

4.1.2 Sistema diencefálico

A via incertohipotalâmica e a via tuberoinfundibular exercem função no controle neuroendócrino (Ben-Jonathan e Hnasko, 2001). A via incertohipotalâmica é constituída por um pequeno grupo de células localizado na região rostral da zona medial incerta, área A13. Esta via irá inervar o núcleo periventricular (PVN) e a área pré-óptica medial do hipotálamo (APOM) que está relacionada ao controle do comportamento sexual masculino (Bitran e col., 1988; Pehek e col., 1988; Damsma e col., 1992; Giuliani e Ferrari, 1996; Hull e col., 1997; Giuliano e Allard, 2001) e na regulação da liberação do hormônio gonadotropina (GnRH). A via tuberoinfundibular

é responsável pela secreção de prolactina. Constituída por dois grupos de células localizados na região da A12 (núcleo arqueado) e A14 (núcleo periventricular rostral), que faz projeções a pituitária (para revisão: Ben-Jonathan e Hnasko, 2001; Hnasko e col., 2007).

4.2 Dopamina: síntese e metabolismo

A dopamina (DA), a noradrenalina (NE) e a adrenalina (EP), são os neurotransmissores catecolaminérgicos presentes no sistema nervoso central dos vertebrados. São sintetizados por uma via de biossíntese comum, a partir do aminoácido L-tirosina, que é transportado ativamente para a célula através de um carreador específico. No citoplasma, o aminoácido é convertido a 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (*L*-DOPA) pela enzima chave da reação, a tirosina hidroxilase. A 3,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina) é a precursora para as demais catecolaminas, e é formada na segunda etapa da reação, através da descarboxilação da *L*-DOPA pela enzima descarboxilase de *L*-aminoácido aromático.

A dopamina do citoplasma, após ser sintetizada, é armazenada no interior de grânulos ou em vesículas sinápticas, através de um transportador pouco seletivo, ou pode ser metabolizada pela monoamino oxidase (MAO) das mitocôndrias, resultando no ácido di-hidroxifenilacético. A chegada do impulso nervoso faz com que algumas vesículas coalesçam com a membrana pré sináptica, liberando a DA na fenda. Sua liberação é dependente da entrada de Ca^{2+} através de canais dependentes de voltagem. Uma vez na fenda sináptica, a DA pode atuar em receptores pós e pré sinápticos ou pode ser recaptada através de um transportador extremamente seletivo localizado na membrana neuronal. A DA pode ainda ser metabolizada por enzimas extraneurais como a MAO e pela catecol-*orto*-metil transferase (COMT) resultando na formação do ácido homovanílico (para revisão: Stahl, 2002).

Os cinco receptores dopaminérgicos conhecidos são metabotrópicos e divididos em duas famílias: D1-símile (receptores D1 e D5); e D2-símile (D2, D3 e D4). Os receptores pré-sinápticos conhecidos são do tipo D₂ e estão localizados tanto nos terminais axonais, quanto nos corpos celulares. Quando ativados, promovem um feedback negativo por inibir a síntese e liberação de dopamina (Graeff e col., 1999; Undie e col., 2000; Stahl, 2002; Baldessarini e Tarazi, 2007). Os

receptores pós sinápticos conhecidos podem ser tanto da família D₁-símile como da família D₂-símile. Os receptores dopaminérgicos D₁ e D₅ ativam por meio da proteína G_s a enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis citosólicos de AMPc. O principal efeito conhecido deste segundo mensageiro é promover a indução de uma enzima cinase específica, denominada proteína cinase A (PKA). Esta, por sua vez, promove fosforilação de diferentes proteínas intracelulares, incluindo canais iônicos, fatores de transcrição gênica e receptores (Graeff e col., 1999; Undie e col., 2000; Stahl, 2002; Baldessarini e Tarazi, 2007). Os receptores da família D₂-like inibem, por meio da proteína G_i a mesma enzima resultando na diminuição nos níveis de AMP_c, na redução da atividade da PKA e, em última análise, na suspensão da corrente de Ca²⁺ e ativação das correntes de K⁺ (Graeff e col., 1999; Undie e col., 2000; Stahl, 2002; Baldessarini e Tarazi, 2007). Kostic e colaboradores, em 1991, observaram que após um evento de HI, houve um decréscimo na marcação para as duas famílias de receptores nos locais onde as lesões ocorreram, sobretudo na região do estriado.

Assim como os demais neurotransmissores monoaminérgicos, a dopamina apresenta localização bastante específica no sistema nervoso central (SNC) e desempenha um papel importante na regulação de diferentes funções neurobiológicas. Em muitos sistemas, a dopamina regula a transmissão de ambos os neurotransmissores aminoácidos: glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA). Leveque e colaboradores (2000) demonstraram que, em culturas de células do estriado, a ativação de receptores D₂ e D₁ respectivamente pela dopamina inibe e favorece a ativação dos receptores NMDA glutamatérgicos.

4.2.1 Tirosina hidroxilase

A TH tem sido largamente utilizada em estudos como um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos, por ser a primeira enzima da via de biossíntese e ponto de regulação das catecolaminas. Sua estrutura química espacial é formada por um tetrâmero com subunidades idênticas pesando cada uma delas 60 KDa aproximadamente, (Weiner e Molinoff, 1994). A TH utiliza o oxigênio molecular e tetrahydrobiopterina (BH₄) para catalisar a adição de um grupo hidroxila na posição meta do anel aromático do aminoácido L-tirosina, formando L-DOPA, dihidropterina

e H₂O. A TH é uma enzima solúvel localizada no citosol de processos neurais e está presente apenas em células que sintetizam catecolaminas.

Existem diversos mecanismos de regulação da atividade e da expressão da TH: a regulação alostérica, a regulação por fosforilação e a regulação pela transcrição gênica (para revisão: Kumer e Vrana, 1996). Todas as catecolaminas produzem “feedback” negativo, inibindo a TH por antagonizar de modo competitivo o sítio de ligação da pterina (BH₄). Esse mecanismo funciona como um sensor da concentração do produto final da enzima. Além deste mecanismo, a dopamina combina-se com íons férricos (Fe³⁺), formando um complexo que interage com o centro ativo da TH, deixando-a em um estado de baixa atividade.

Alguns agentes como a heparina, fosfolípido, e poliânions aumentam a atividade da TH ao ligarem-se em sítios alostéricos localizados na região amino-terminal desta enzima (para a revisão: Kumer e Vrana, 1996). A modulação da TH também ocorre ao longo prazo através do controle dos níveis de RNAm. Algumas mudanças no estado fisiológico de animais (como lesões, estresse, dor, a administração de fármacos, e hipóxia) podem alterar os níveis constantes desse ácido nucléico e conseqüentemente da TH (Burke e col., 1991). Burke e colaboradores, utilizando o modelo de oclusão unilateral da carótida que é feito irreversivelmente no sétimo dia de vida pós-natal (P7), observaram um significativo e persistente aumento na densidade de marcação positiva para a enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado e no núcleo *accumbens*, após a injúria HI neonatal. Gross e colaboradores (2005) verificaram no modelo de imersão dos cornos uterinos em salina que a HI pré-natal induz mudanças nos níveis de RNAm para TH e dos receptores dopaminérgicos de acordo com o tempo de asfixia. Os níveis de receptores dopaminérgicos (famílias D1 e D2), os transportadores de dopamina, além dos níveis de RNAm para TH, não sofrem alteração na SN, na ATV e no estriado após um período de 5 minutos de asfixia. Não houve alteração desses níveis em qualquer outra região. Esses dados foram obtidos após 1 e 4 semanas do evento. As mudanças só foram vistas a partir de 15 minutos de asfixia quando houve aumento dos níveis de RNAm pra TH no estriado em 1 semana após HI e para os demais regiões após 4 semanas.

4.3 Origem e desenvolvimento do sistema dopaminérgico

O mecanismo de desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos tem sido um grande objeto de estudo nas últimas décadas. Compreender melhor o controle, a biologia celular e molecular desse sistema, pode ajudar a traçar estratégias de restaurar lesões nessas áreas após um evento de HI, por exemplo, e futuramente chegar a uma terapêutica para doenças degenerativas como a doença de Parkinson relacionada com a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra (para revisão: Klockgether, 2004); e transtornos psicóticos como a esquizofrenia ligada a desregulação da transmissão dopaminérgica no sistema mesocorticolímbico, derivada da perda neuronal no córtex pré-frontal (para revisão: Sesack e Carr, 2000).

Neurônios dopaminérgicos são considerados assim quando se tornam capazes de expressar a TH e, portanto, supostamente capazes de produzir dopamina. O curso temporal da ontogênese dos neurônios dopaminérgicos é conservado entre camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*). Sendo que em camundongo os eventos precedem o do rato com uma diferença de um ou dois dias.

Existe apenas um marcador de progenitor dopaminérgico que é a Retinaldeído Dehidrogenase (ALdh1a1, também conhecida como Raldh 1). Os progenitores DA são primeiramente encontrados no mesencéfalo ventral, no nono dia embrionário do camundongo. A primeira célula reativa para TH surge aproximadamente dois dias depois desse evento na região médio basal do mesencéfalo, mais especificamente na placa do teto do mesencéfalo (Kawano e col., 1995). Estudos mostram que a via migratória dessas células inicia na zona ventricular, de onde elas migram radialmente em direção à superfície do mesencéfalo ventral. Primeiro elas alcançam a zona marginal do mesencéfalo e movem-se paralelamente e lateralmente para a superfície até o seu destino final na SN e na ATV. Essa via migratória também é chamada de “modelo de fonte invertida” devido ao movimento rostro-caudal dos neurônios dopaminérgicos.

O exato momento do aparecimento do primeiro neurônio pós-mitótico dopaminérgico é ainda um assunto controverso. Di Porzio e colaboradores (1990) demonstraram em seu estudo o surgimento em E9 – E9,5 da primeira célula TH – positiva no mesencéfalo ventral do camundongo. Outros estudos (Riddle e Pollock,

2003; Smidt e col., 2003) mostram o aparecimento em E10. Essas células são caracterizadas também por expressarem, neste mesmo período, Nr4a2 ou Nurr1, sinalizadores de precursores neuronais (Wallen e col., 1999).

Os grupos celulares dopaminérgicos surgem em diferentes momentos da ontogênese. Os neurônios da substância negra compacta, por exemplo, são gerados primeiramente em E10 e E13 em camundongos, sendo que o pico de surgimento ocorre no final, entre E12 e E13, ocorrendo, aparentemente, um gradiente rostralateral para o caudomedial na neurogênese dessas células (Bayer e col., 1995). Neste mesmo período, no mesencéfalo ventral, esses neurônios já possuem neuritos direcionados, com base na sua via migratória a sua área de projeção no prosencéfalo (onde se encontram as futuras regiões alvo).

Um dia depois do aparecimento da imunorreação positiva para TH, a primeira fibra dopaminérgica alcança o estriado. Nos dias subseqüentes e nas primeiras semanas pós-nascimento, começa a ocorrer migração dos neurônios para o seu destino final no mesencéfalo ventral e inervação das áreas alvo. No rato, este momento do desenvolvimento, também denominado como maturação, parece finalizar em torno da terceira semana pós-natal, adquirindo então a morfologia e a funcionalidade do sistema dopaminérgico de um adulto (Voorn e col., 1988).

Um momento importante no desenvolvimento do sistema dopaminérgico é o evento natural de morte celular, de natureza apoptótica, que ocorre na SN tanto em ratos como em camundongos. Esse evento é bifásico, ocorrendo em dois momentos: o primeiro – e maior – é imediatamente após o nascimento, e o segundo após a segunda semana pós-natal. A regulação é feita a partir da interação dos terminais dopaminérgicos com seu alvo: o estriado (Burke, 2004; Krieglstein, 2004). Um potente fator neurotrófico derivado do alvo para neurônios dopaminérgicos *in vivo* é o fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial, o GDNF (Kholodilov e col., 2004; Oo e col., 2003).

5 O HIPOCAMPO

O hipocampo está localizado no lobo temporal médio, e anatomicamente, é uma continuação elaborada do córtex cerebral, que estreita em uma única lâmina muito densa e ondulada de neurônios, formando um “S”. Juntamente com a amígdala (com quem está intimamente ligado), núcleo accumbens, hipotálamo, área tegmental ventral e outras regiões que beiram a linha do córtex, o hipocampo compõe o sistema límbico (*limbus* = fronteira) (Amaral e col., 2006). A importância desse circuito no mecanismo das emoções como o medo, a raiva, dor e prazer, foi apontada inicialmente por Papez em 1937. Em seu estudo teórico especulativo, Papez apontou as drásticas alterações do comportamento emocional causado pelo vírus da raiva. Mais tarde se observou que as lesões causadas por este vírus ocorriam preferencialmente no hipocampo. Lesões bilaterais do hipocampo em macacos resultam em um aumento da agressividade destes animais (para revisão: Machado, 1991).

Algumas décadas depois das descobertas de Papez, estudos demonstraram que o hipocampo, além da regulação do comportamento emocional, desenvolvia outra importante função: o processamento de informações e a consolidação da memória espacial. O'Keefe e Nadel (para revisão: O'Keefe e Nadel, 1978) desenvolveram considerações detalhadas acerca dos efeitos de lesões hipocámpais no comportamento animal. Uma das mais importantes previsões de sua teoria propõe que, tais efeitos podem ser interpretados como uma perda da aprendizagem de lugar (ou perda da capacidade de utilização do sistema de mapeamento) e do comportamento exploratório. A teoria do mapa cognitivo sustenta que os animais possuem um sistema que codifica o ambiente sob a forma de mapas cognitivos e, segundo a proposta dos autores, a formação hipocámpal constitui o substrato neural para a aprendizagem e armazenamento de tais processos.

O papel do hipocampo como estrutura responsável pela consolidação da memória recente, vem sendo bem estabelecida, enquanto que o armazenamento da memória de longo prazo seria função do córtex cerebral (Kandel, 2000). Evidências clínicas indicam que lesões hipocámpais não interferem com memórias ditas de referência, como o aprendizado de línguas e de instrumentos, mas resultam em perda de memória espacial e de memórias para eventos ocorridos após a lesão (amnésia anterógrada) (Buzsáki, 2002). Lesões hipocámpais podem ser decorrentes

de diversos fatores como epilepsia, idade avançada, doenças como Alzheimer, esquizofrenia e depressão (Campbell e Macqueen, 2004), ou consequência de um evento de hipóxia. A perda de neurônios piramidais da região CA1 do complexo hipocampal é o bastante para acarretar amnésia anterógrada severa (Campbell e Macqueen, 2004).

Tem sido proposto que estruturas compostas de substância cinzenta, como é o caso do hipocampo, são muito vulneráveis a atrofia por diversas condições. Dentre estas, podemos citar doenças como Alzheimer, a esquizofrenia, os transtornos afetivos bipolares, o transtorno de estresse pós-traumático e a hipóxia (para revisão: Stahl, 2002). A atrofia também pode estar associada à idade avançada. A redução do volume do complexo hipocampal pode ser resultado da remodelagem de elementos celulares chaves, envolvendo a retração de dendritos, decréscimo na neurogênese no giro dentado (GD) e perda de células gliais. A diminuição da formação de novos neurônios pode ter fatores implícitos, como o aumento dos níveis de glicocorticóides devido ao estresse, e a suspensão do ciclo celular. Os glicocorticóides suspendem a atividade do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), tornando o neurônio não responsivo a estímulos promotores de neurogênese, e inibindo a arborização dendrítica (Campbell e Macqueen, 2004).

Por diversas décadas acreditou-se que a neurogênese fosse um fenômeno que acontecia apenas na fase de desenvolvimento do sistema nervoso. Mas, em meados do século XX, alguns estudos demonstraram que, em muitas espécies, a formação de novos neurônios ocorria também no encéfalo maduro, e muito provavelmente, por toda a vida do indivíduo. Porém a neurogênese seria um evento localizado, e ocorreria principalmente em duas regiões encefálicas, localizadas mais especificamente no GD: zona subventricular e zona subgranular. As células formadas no GD migram para dentro da camada granulosa e diferenciam-se tanto em células gliais, quanto em neurônios. Os axônios destes projetam-se, então, para além da camada granulosa, passando pelas fibras musgosas, alcançando a região CA3; e os dendritos destes novos neurônios seriam enviados para o interior da camada molecular (Thornberry e col., 1997; Doetsch e col., 1999; Aberg e col., 2008).

5.1 Neuroanatomia funcional do complexo hipocampal

A lâmina que constitui o complexo hipocampal consiste no GD, no hipocampo propriamente dito (ou corno de Ammon), no complexo subicular (subículo, parasubículo e pré-subículo) e no córtex entorrinal. O corno de Ammon, quando observado em secção coronal, pode ser dividido em regiões CA1, CA2, CA3 e CA4, baseado na morfologia dos neurônios piramidais, sensibilidade à anóxia e no desenvolvimento da região. As células piramidais glutamatérgicas e as células granulares representam 90% dos neurônios hipocampais e os 10% restantes são compreendidos de interneurônios inibitórios. As células inibitórias hipocampais possuem grande diversidade de formas, e inibem outras células pela liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA). Alguns estudos também observaram que há a participação de acetilcolina, noradrenalina, e serotonina nesta região, devido à presença de receptores para estes neurotransmissores (Parra e col., 1998).

A maior parte das aferências glutamatérgicas, recebidas pelos neurônios piramidais da região CA1, vem do córtex entorrinal, que também formam sinapses com os dendritos das células granulares do GD. As fibras musgosas, que são originadas nas células granulares, são projetadas aos dendritos das células piramidais da região CA3, e estas por sua vez, projetam-se à região CA1. Axônios oriundos das células localizadas nesta região podem se comunicar diretamente ou indiretamente com o córtex entorrinal por duas vias principais: (1) por projeções eferentes ao subículo, através do fórnix e do núcleo anterotalâmico; ou (2) por projeções eferentes ao córtex entorrinal, através do qual, fibras hipocampais alcançam o córtex associativo, o córtex pré-frontal e o lobo temporal. Danos limitados ao complexo hipocampal e ao córtex entorrinal têm sido associados com a amnésia retrógrada e anterógrada (Campbell e Macqueen, 2004). (Figura: 1.2)

O complexo hipocampal possui três grandes vias aferentes: (1) a via perfurante que tem origem no córtex entorrinal e forma conexões excitatórias com as células granulares do GD. (2) A via das fibras musgosas onde os axônios dos neurônios da camada granular do GD vão se conectar com os neurônios piramidais da região CA3 e; (3) a via dos colaterais de Schaffer constituída pelos axônios dos neurônios piramidais da região CA3 que vão se projetar para as células piramidais da região CA1. (Figura: 1.3)

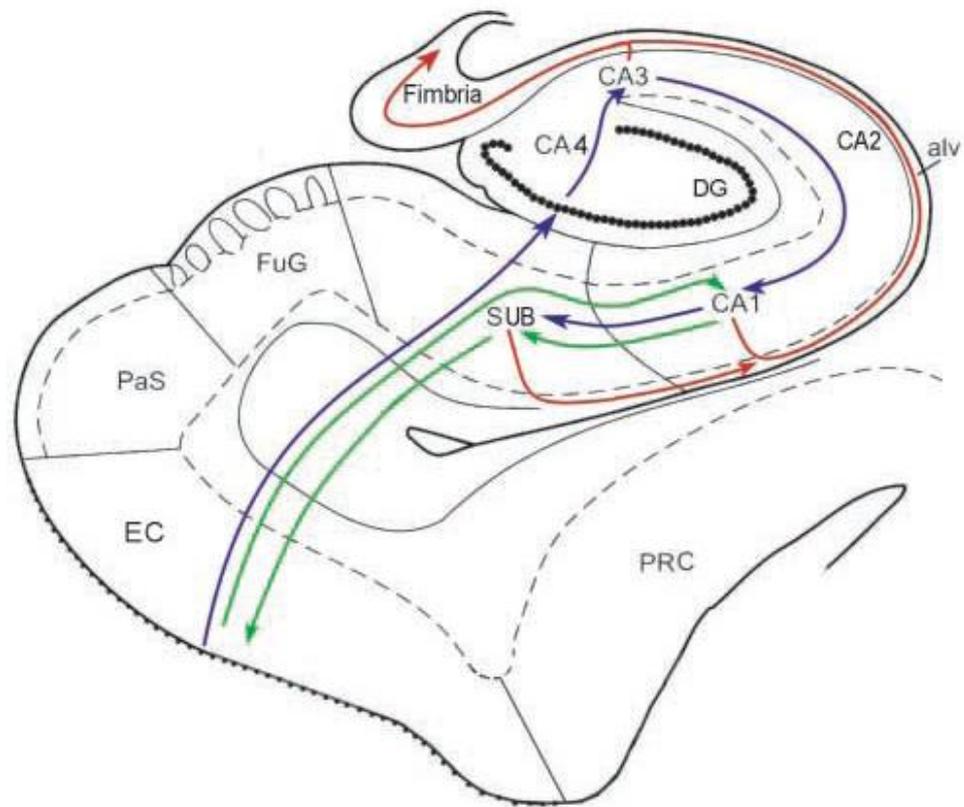


Figura 2 - Vias hipocampais. A linha verde representa o caminho direto da camada 3 do córtex entorrinal (EC = CE) para a região CA1 e depois para o subículo (SUB). A partir do *subiculum*, informações podem retornar para o córtex entorrinal, ou podem alcançar o alveus (ALV) e depois a fimbria para influenciar a neurotransmissão em outras regiões corticais (linha vermelha). A via polisináptica aferente é representada pela linha azul: axônios do córtex entorrinal entram no giro denteado (DG = GD), e dendritos das células granulosas contactam esses axônios glutamatérgicos. As fibras musgosas das células granulares projetam para os neurônios piramidais da região CA3, que depois irão dar origem às fibras eferentes aos alveus (em vermelho), ou fibras Schaffer colateral para a região CA1. As células piramidais da região CA1 podem projetar-se ao subículo (azul) ou o alveus (vermelho). Outras regiões indicadas incluem o córtex perirrinal (PRC = RPC), o parasubículo (PAS) e do giro fusiforme (FUG). (adaptado de: Campbell, MSc e MacQueen, 2004)

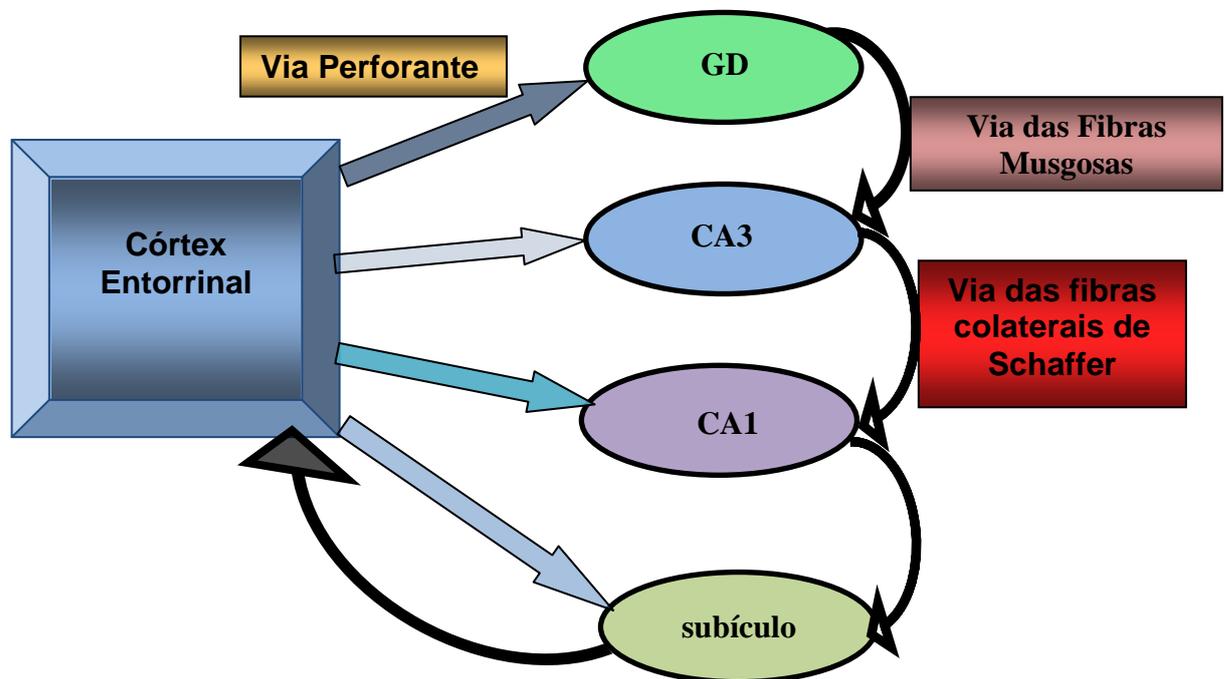


Figura 3 - Vias hipocâmpicas. GD – giro denteado; CA – corno de Ammon. Adaptado de Kandel, 2000.

Regiões do complexo hipocâmpal:

O complexo hipocâmpal é formado pelo giro denteado (GD) e pelo corno de Ammon (CA) (Figura 1.4). As regiões do corno de Ammon são bem estruturadas e claramente definidas em camadas.

- **Alveus:** constituído de fibras aferentes e eferentes principalmente que vão originar a fímbria/fórnix, que é uma das principais eferências (vias de “*outputs*”) do hipocampo. É a camada mais superficial, e contém os axônios dos neurônios piramidais.
- **Stratum oriens** é a próxima camada abaixo do *alveus*. Os corpos celulares das células inibitórias e das células horizontais trilaminares estão localizados neste estrato. Os dendritos e os axônios basais dos neurônios piramidais

também estão localizados nesse estrato, e é onde “*inputs*” de outras células piramidais (conexões recorrentes das regiões CA2 e CA3) aferem.

- ***Stratum pyramidale*** contém os corpos celulares dos principais tipos de neurônios da região CA, os neurônios piramidais. Na região CA3, este estrato contém sinapses das fibras musgosas (também conhecidas como fibras de Moss), que cursam através do *stratum lucidum*. Este estrato também contém os corpos de muitos neurônios inibitórios, tais como as células em cesto (*baskets cells*), os neurônios biestratificados, e os neurônios trilaminares radiais.

- ***Stratum lucidum*** é um dos mais finos estratos do hipocampo. As fibras musgosas das células granulares do GD cursam através desse estrato até a região CA3.

- ***Stratum radiatum***, assim como o *stratum oriens*, contém fibras comissurais e septais. Também contém fibras colaterais de Schaffer que são projetadas para as regiões CA3 a CA1. Alguns interneurônios podem ser encontrados mais superficialmente nessa lâmina incluindo as células em forma de cesto, as biestratificadas e as radiais trilaminares.

- ***Stratum lacunosum*** é formado pelas ramificações dos dendritos apicais das células piramidais, é uma camada fina contendo fibras Schaffer, e fibras da via perfurante das camadas do córtex entorrinal. Devido ao seu pequeno tamanho geralmente é agrupado com o estrato molecular em um único estrato chamado *stratum lacunosum-moleculare*.

- ***Stratum moleculare*** é o mais profundo estrato do hipocampo. Aqui a via de fibras perfurantes forma sinapses com os dendritos apicais e distais das células piramidais.

- **Fissura hipocampal:** ou sulco hipocampal, é uma região sem células que separa a região CA1 do GD. Devido à variação sistemática da oscilação *Theta* (onda que ocorre no hipocampo em estado de atividade - “ligado”) em todos os estratos, esta fissura é freqüentemente utilizada como “um ponto de referência fixo”, facilmente identificável, nos registros do eletro-encefalograma.

O GD é composto de estratos similares às regiões CA1-CA4:

- **Camada polimórfica (ou hilo):** é a camada mais superficial do GD. Esta camada contém muitos interneurônios e os axônios das células granulares do GD passam através do estrato em direção a CA3.
- **Camada Granulosa:** contém os corpos celulares das células granulares do giro dentado.
- **Camada molecular:** é a mais profunda dos estratos, localiza-se superficialmente na fissura hipocampal, através do estrato molecular da camada CA1. A via perfurante passa através desse estrato fazendo sinapses excitatórias nos dendritos apicais distais das células granulares (Amaral e col., 2006).

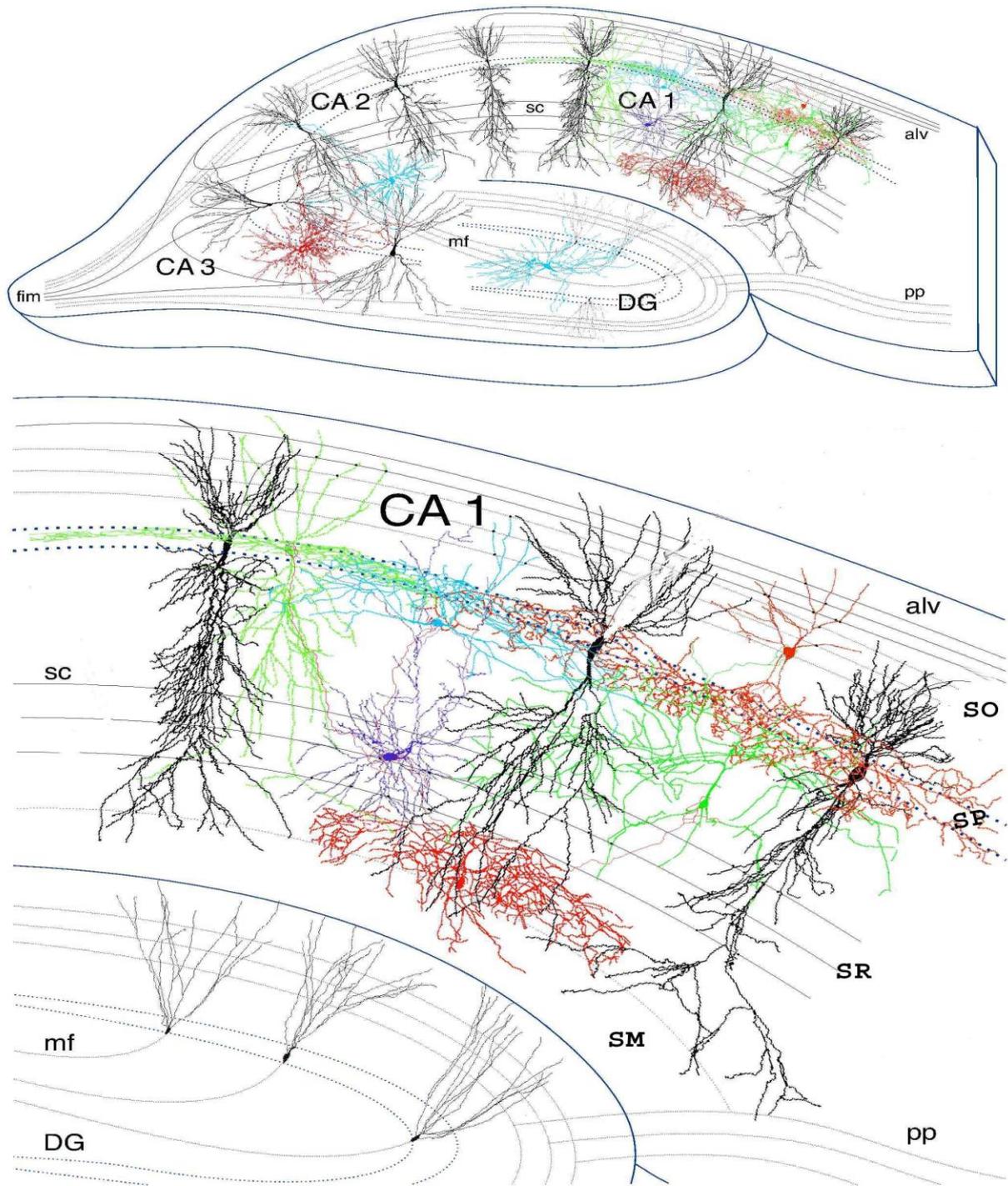


Figura 4 - Imagem esquemática de um corte sagital do hipocampo mostrando as camadas, tipos morfológicos neuronais, e vias da região do corno Ammon. Em preto - neurônios excitatórios piramidais; em outras cores: neurônios inibitórios. DG – giro dentado; sc – via colateral de Schaffer; mf – fibras musgosas; pp – via perforante; fim – via fimbria ; alv – alveus; SO – stratum oriens; SP – stratum pyramidal; SR – stratum radiatum; SM – stratum moleculare. (modificado de: www.stanford.edu)

Diversos neurotransmissores têm sido identificados no hipocampo incluindo norepinefrina, dopamina, acetilcolina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido gama aminobutírico (GABA), glutamato (Storm-Mathisen, 1977; Straughan, 1975), histamina (Barbin e col., 1976) e peptídeos como o polipeptídeo intestinal vasoativo, somatostatina, colecistocinina, encefalinas, (Emson, 1979) e óxido nítrico (NO) (Moritz e col., 1999).

6 ÓXIDO NÍTRICO

Há algumas décadas atrás o NO era conhecido apenas como um gás tóxico, componente da fumaça do cigarro, da poluição do ar e também como um produto derivado do metabolismo de bactérias. Em 1980, Furchgott e Zawadzki identificaram o NO como uma molécula mensageira, um produto das células dos mamíferos. Este estudo demonstrou que as células endoteliais quando estimuladas pela acetilcolina liberavam um vasodilatador, inicialmente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (endothelium-derived relaxing factor, EDRF). Posteriormente, essa molécula sintetizada pelo endotélio e com propriedades relaxadoras do músculo liso foi identificada como sendo o NO (Moncada e col., 1988).

O NO é um gás inorgânico com uma meia vida curta (menos de 30 segundos em sistemas biológicos), produzido por diferentes tipos de células, controlando ou influenciando importantes processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão. A descoberta do NO, como molécula mensageira atuante no sistema nervoso, mudou o conceito convencional de comunicação interneurônios, devido às suas características incomuns para um neurotransmissor como: não ser armazenado em vesículas e ser liberado na fenda após uma despolarização da membrana; não se ligar a receptores; e não ser degradado após recaptação neuronal. Pelo fato do NO ser um gás, a comunicação entre neurônios ocorre através da difusão; seu alcance pode ir muito além de sua célula de origem; e sua atividade é finalizada apenas quando reage com o seu substrato.

Nos mamíferos, o NO é sintetizado a partir do aminoácido essencial L-arginina por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS: tipo I ou neuronal (nNOS), encontrada em todas as regiões do cérebro, sendo que se apresenta em maior quantidade no cerebelo (Bishop e Anderson, 2005); tipo II ou induzível (iNOS); e tipo III ou endotelial (eNOS). As duas isoformas encontradas no sistema nervoso central são eNOS e a nNOS, ambas são constitutivas e suas atividades reguladas pelo Ca^{2+} intracelular e pela calmodulina, uma proteína associada ao Ca^{2+} (Simon e col., 2007). A NOS encontrada em neurônios é dependente de íons Ca^{2+} e calmodulina, que estão associados à modulação de neurotransmissores como: a acetilcolina (receptor M_3), histamina (receptor H_1), bradicinina (receptor B_2), entre outros (Simon e col., 2007; Skidgel e Erdős, 2007; Rang e col., 2007). Em contraste, iNOS é Ca^{2+} e calmodulina-

independente, podendo ser induzida por citocinas e endotoxina, produzindo grande quantidade de NO por longo período de tempo (Simon e col., 2007). A L-arginina é convertida a NO e citrulina pela NOS através de uma via com duas etapas, uma hidroxilação e uma redução, exigindo a presença de O₂ e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Outros co-fatores necessários para a síntese de NO (Figura 1.5) são o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD), o mononucleotídeo flavina (FMN) e o BH₄ (Bredt e Snyder, 1990; Schulz, 2008). A imunoreatividade enzimática da NOS pode ser correlacionada à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d) (Hope e col., 1991). Estudos histoquímicos da NOS são baseados na atividade da NADPH-d, podendo ser considerada como um co-fator presente em todas as isoformas de NOS, funcionando assim como um marcador histoquímico específico para neurônios que produzem NO (Hope e col., 1991).

O NO é um gás extremamente difusível pelas membranas biológicas e depois de ser sintetizado se difunde livremente de célula para célula e interage quimicamente com diversos sítios, sendo a guanilato ciclase solúvel (sGC) o sítio mais importante. Em condições fisiológicas, baixos níveis de NO produzidos pelas nNOS e eNOS irão ativar a sGC através da ligação ao grupamento heme da enzima, induzindo a sua atividade catalítica. A sGC ativada quebra a guanosina trifosfato (GTP) levando à produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Bredt e Snyder, 1990). O GMPc funciona como segundo mensageiro, induzindo a enzima proteína cinase G (PKG) que afeta a atividade de vários neurotransmissores, fatores de transdução e canais iônicos por fosforilação. O GMPc também atua diretamente na ativação de outras cinases como a proteína cinase A (PKA), que é normalmente ativada pelo AMPc (para revisão: Irvine e col., 2008). O GMPc também está associado a uma série de processos fisiológicos como, por exemplo: relaxamento do músculo liso vascular; inibição da agregação e adesão plaquetárias; e sinalização no cérebro (Pinto e col., 2008).

O NO também pode se ligar covalentemente por S-nitrosilação a diversos tipos de proteína através de um resíduo de cisteína, modificando sua atividade, como é o caso de quando o NO interage com o complexo de proteínas envolvidas na interação das vesículas sinápticas e a membrana da porção terminal do axônio, promovendo a exocitose de neurotransmissores (Meffert e col., 1996). Em elevadas concentrações, especialmente na presença de radicais superóxidos, o NO pode inibir vários processos metabólicos e causar dano direto no DNA. O NO pode

também estar envolvido em doenças neurológicas degenerativas incluindo as doença de Parkinson e Huntington, talvez por um desequilíbrio entre sua geração e a síntese de superóxido (Vallance, 1997).

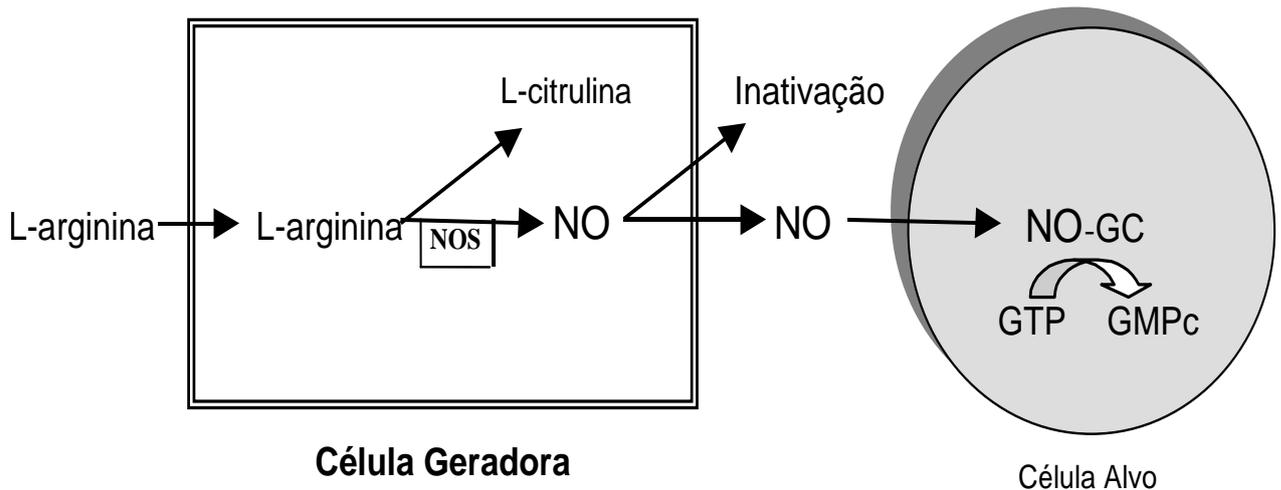


Figura 5 - A via L-arginina-óxido nítrico. NOS=óxido nítrico sintase; GC=guanilato ciclase; GTP=guanosina trifosfato; GMPc= guanosina monofosfato cíclica.

No SNC o NO modula outros sistemas de neurotransmissores (Stahl, 2002; Edwards e Rickards, 2007; Simon e col., 2007). Uma das principais funções do NO parece ser na manutenção da memória e aprendizado. No hipocampo, o NO liberado age nos neurônios pré-sinápticos como um neurotransmissor retrógrado, levando à liberação de glutamato, o que leva a um aumento estável na transmissão sináptica que constitui a base para formação e potencialização da memória de longo prazo (Edwards e Rickards, 2007). O NO também está relacionado ao desenvolvimento do córtex e da visão, à nocicepção e olfato; à regulação do humor (Bishop e Anderson, 2005) e do comportamento sexual (Hull e col., 1994; 1997).

6.1 NO, aprendizado e a Potenciação a Longo Prazo (LTP)

Aprendizado e memória estão longe de ser um processo único e indissociável. Diversas variáveis podem afetar um ou ambos os processos, de acordo com o tempo em que ocorrem, se no momento do aprendizado ou se após, durante o processo de memorização ou consolidação da memória (Susswen e col., 2004). A contribuição do NO no aprendizado e no processo de consolidação de memória tem sido exaustivamente estudada através de vários modelos animais, culturas de célula, e em tecidos isolados, sendo bem estabelecido nos dias atuais.

Estudos têm demonstrado que a memória de longo prazo e a memória de curto prazo são processos diferentes que podem ser evocados por mecanismos neurofisiológicos próprios. A memória de curto prazo é um processo que é medido em minuto ou dezenas de minutos após o aprendizado. As mudanças sinápticas ocorridas nesse evento requerem modificações covalentes em proteínas e não precisam de neo-síntese protéica (para revisão: Kandel, 2000). Estas modificações covalentes estão associadas a cascatas de segundos mensageiros, proteína cinases e fosforilação protéica. Quando é utilizado treinamento de aprendizado associativo, como a habituação, dois ou mais sistemas de segundos mensageiros podem ser ativados, e a interação entre eles pode levar às modificações observadas nos neurônios (Byrne, 1987). O NO, como já mencionado, afeta vários sistemas de segundos mensageiros ratificando o papel do sistema nitrérgico na memória de curto prazo.

No hipocampo, os efeitos do NO na plasticidade sináptica estão sendo investigados e relacionados à formação de memória declarativa (ou memória explícita - memória de fatos, pessoas, lugares) e da memória espacial (para revisão: Susswein e col., 2004). A potenciação de longo prazo (LTP) está associada com a formação de memória no hipocampo, e as células piramidais da região CA1 estão sendo apontadas como as possíveis responsáveis por este evento fisiológico (Shors e Matzel, 1997), embora ainda existam muitas controvérsias sobre o tema. Estudos demonstraram que camundongos *knock-out* para receptor glutamatérgico NMDA no hipocampo, cuja ativação é de extrema importância para a formação de LTP, têm obstrução do processo de memória, e mutantes que possuem aumento da atividade desses receptores têm o armazenamento de memória preservado (Tang e col., 1999).

A LTP é iniciada por diversos potenciais de ação de alta frequência em seqüência, que ocorrem na via de fibras colaterais de Schaffer, com duração aproximada de uma hora. Em sua fase inicial não requer síntese protéica e tem muito em comum com a memória de curto prazo (para revisão: Kandel, 2000). As fibras de Schaffer liberam glutamato, que irá se ligar ao receptor glutamatérgico AMPA nas células piramidais pós-sinápticas da região CA1. Os receptores AMPA são do tipo ionotrópicos e estão acoplados a canais de Na^+ . A abertura dos canais de Na^+ promovida pela ativação de AMPA gera um potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) que despolariza o neurônio. Os receptores NMDA são também ionotrópicos, mas estão associados a correntes de Ca^{2+} , e são ativados simultaneamente pela despolarização promovida por AMPA, e pela ligação com o glutamato. É preciso que ocorra a ligação simultânea de duas moléculas de glutamato, em sítio específico, e da ligação de glicina em sítio alostérico para que ocorra a abertura do canal de Ca^{2+} . Além disso, para que o canal seja aberto, a ligação do glutamato deve estar pareada com uma competente despolarização das células piramidais (Milner e col., 1998). Esta despolarização irá deslocar a molécula de Mg^{2+} que bloqueia o canal. A ativação dos receptores NMDA promove influxo de cálcio nas células piramidais e inicia uma cascata de segundos mensageiros que promove o início da LTP. O cálcio, por sua vez, liga-se à calmodulina e, a ativação desta, induz a nNOS e promove a liberação de NO pelas células piramidais CA1. O NO funciona como neurotransmissor retrógrado atuando nas fibras colaterais e neurônios pré-sinápticos de Schaffer, e por ser difusível atua também em várias outras células nas adjacências (Schuman e Madison, 1991). O papel do NO na LTP no hipocampo foi evidenciado por estudos com animais *knockout* para as duas isoformas da NOS, estes trabalhos demonstraram que células piramidais da região CA1 do hipocampo não apresentam LTP, mas em outras regiões sim. Curiosamente animais nocauteados para apenas uma das isoformas da NOS continuam a exibir LTP no hipocampo, sugerindo que uma isoenzima pode compensar a ausência da outra (Son e col., 1996).

A memória de longo prazo produz efeitos sobre o comportamento que pode durar dias a anos. Após o aprendizado inicial é formada como o resultado de um processo de consolidação da memória, em que uma memória transiente é convertida em uma forma mais permanente. A consolidação é um processo relativamente lento, levando cerca de algumas horas para ser completado, que

requer tanto a transcrição gênica quanto a tradução protéica. Em alguns paradigmas de aprendizagem o NO desempenha um papel relevante na formação da memória de longo prazo durante o treinamento inicial, mas não subsequente ao treinamento. Estudos feitos com modelos de alimentação em aplísia (Katzof e col., 2002) e com modelos de memória tátil e visual em polvos (Robertson e col., 1996) demonstraram que a inibição da síntese de NO durante o treinamento impediu a subsequente memória, mas a mesma inibição após o treinamento não alterou a consolidação da memória. Por outro lado, em outros paradigmas de aprendizagem, o NO parece desempenhar um papel importante na consolidação da memória. Estudos feitos em camundongos, usando o teste de esquiva de choques elétricos (Baratti e Kopf, 1996), e em *Lymnaea sp.*, usando um teste de condicionamento operante (Kemenes e col., 2002), mostraram que a inibição da síntese de NO após o treinamento impediu o processo de consolidação da memória.

O NO parece estar particularmente associado com a formação de memórias olfativas, refletindo o fato de que o bulbo olfatório é extremamente rico em NOS. Estudos feitos em ovelhas (Kendrick e col., 1997) e em ratos (Samama e Boehm, 1999) demonstraram que a inibição da transmissão nitrérgica inibe a formação da memória olfativa, que ocorre logo após o nascimento dos filhotes, e que possibilita a ligação afetiva entre a mãe e seus filhotes. Uma vez que a memória foi formada, o bloqueio da síntese de NO ou de GMPc não afeta a memória (Kendrick e col., 1997; Samama e Boehm, 1999). O efeito Bruce em camundongos também é mediado pelo NO. Fêmeas prenhas costumam abortar quando são inseminadas por outro camundongo. No entanto, se são inseminadas pelo mesmo macho que as fertilizou, não abortam. Este fenômeno ocorre porque as fêmeas se lembram do odor do macho original. A administração de um doador de NO, junto com a exposição da fêmea aos feromônios do macho, produz a memória e ausência de abortamento mesmo sem ter havido o acasalamento, sugerindo que o NO atuou no lugar da atividade sexual como um reforçador do feromônio (Okere e col., 1996). A análise de RNAm para nNOS no bulbo olfatório acessório demonstrou um aumento no RNAm como o resultado do aprendizado (Okere e Kaba, 2000), sugerindo que o NO é parte do circuito de feedback positivo que regula a sua própria síntese.

6.2 Hipóxia e NO

O NO pode estar envolvido, ao mesmo tempo, em ações opostas como na manutenção da homeostase e mediando processos patológicos. Em situações de injúria e inflamação no SNC, o NO é produzido em grande quantidade pela iNOS dos macrófagos, microglia e astrócitos. Nestas condições patológicas, ocorre a facilitação de células do sistema imune de atravessarem a barreira hematoencefálica, levando a produção ainda maior de NO e superóxido (Pannu e Singh, 2006). Estudos em modelos de HI em fetos e ratos neonatos demonstraram que a atividade da NOS é elevada após o evento (Hamada e col., 1994) e que o aumento da nNOS ocorre nas áreas mais suscetíveis a lesão (Fullerton e col., 1998). Após a asfixia acredita-se que ocorra uma cascata de eventos neurotóxicos como o aumento do fluxo de cálcio (derivado da ativação de receptores NMDA) e a liberação em excesso de glutamato e NO. Este último contribuiria para o dano através da formação de radicais livres: o NO se ligaria ao radical superóxido, formando o peroxidonitrito (Bolaños e Almeida, 1999).

O aumento na produção de NO parece também estar envolvido na patogênese de uma série de doenças neurológicas como Parkinson, Alzheimer e esclerose múltipla (Pannu e Singh, 2006). Elucidando os mecanismos dessa elevação do NO em determinadas regiões, através de modelos de lesão, seria possível criar novas estratégias que evitassem os efeitos degenerativos causados pelo NO.

7 OBJETIVOS

Através do uso do modelo de clampeamento das artérias uterinas no décimo oitavo dia de gestação, o presente estudo teve por objetivos analisar o efeito da hipóxia-isquemia:

- 1 – no comportamento motor e nos níveis de ansiedades de animais experimentais (HI), em comparação com o grupo controle cirúrgico (SHAM) na idade pós-natal de 45 dias (P45).
- 2 – no desenvolvimento da substância negra, através da análise imunohistoquímica da expressão da enzima tirosina hidroxilase nos animais HI em relação ao grupo SHAM.
- 3 – distribuição da óxido nítrico sintase no hipocampo, através da histoquímica da NADPH-diaforase (NADPH-d), nos animais HI em relação ao grupo SHAM.

8 METODOLOGIA

8.1 ANIMAIS

Os experimentos descritos a seguir estão de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ, com a declaração de Helsinque e com o guia de cuidados e uso de animais adotado e promulgado pelo Instituto Nacional de Saúde (ENAED).

8.1.1 Realização da Hipóxia – Isquemia

Para a realização desse estudo utilizamos o modelo de clampeamento das artérias uterinas em E18 descrito por Robinson e colaboradores em 2005. Ratas Wistar grávidas no 18^o dia de gestação, foram anestesiadas com aproximadamente 8ml de Avertin® (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. Foi feita uma laparotomia e os cornos uterinos foram retirados da cavidade peritoneal. As quatro artérias uterinas foram obstruídas com pinças bulldog por 45 minutos (Grupo HI) – (Figura 3.1). Animais SHAM (Grupo SH) tiveram os úteros removidos da cavidade peritoneal, mas nenhuma oclusão das artérias uterinas foi realizada. Após a asfixia, os grampos de aneurisma foram removidos, e os cornos uterinos foram recolocados dentro da cavidade uterina. Após fechamento da parede abdominal foi administrada dipirona (10mg/100g de peso corporal, i.p.) para a analgesia. Ninhadas com menos de 4 animais foram descartadas e ninhadas com o número de ratos superior a 8 tiveram o excedente sacrificado.

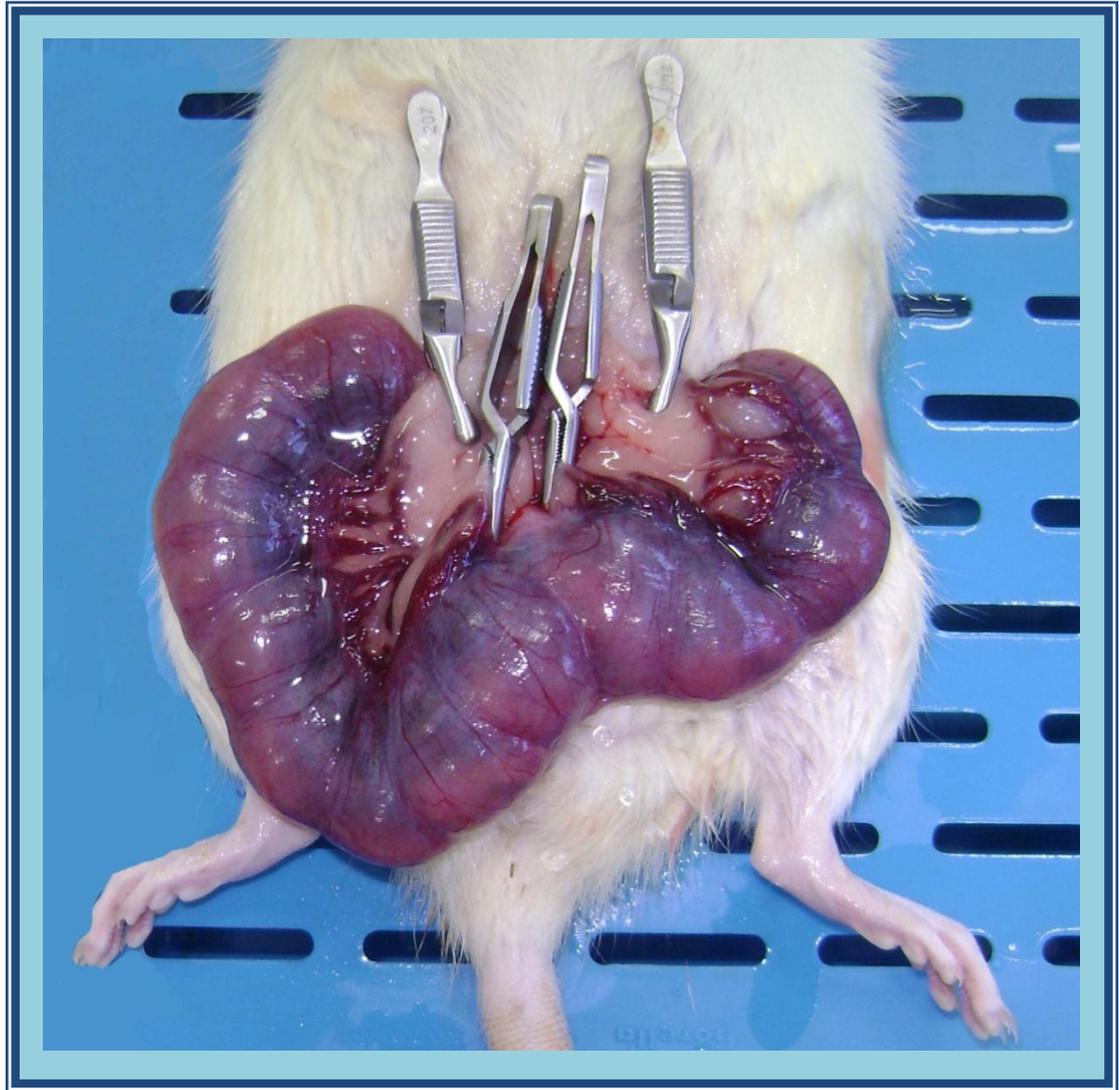


Figura 6 – Fotografia ilustrando a cirurgia realizada em ratas no décimo oitavo dia de gestação com o clampeamento das artérias uterinas. Modelo de hipoxia-isquemia desenvolvido por Robinson e colaboradores (2005).

8.2 Procedimento histológico

8.2.1 Perfusão

Ratos nas idades de P9, P16, P23, e P90 foram anestesiados com éter e perfundidos por via intracardíaca com: solução salina 0,9%, paraformaldeído 4% e paraformaldeído mais sacarose a 10%, nessa ordem. Os encéfalos foram retirados e armazenados em solução de sacarose 20%. Processada a crioproteção, foi feita a inclusão em meio de inclusão "*Optimal cutting temperature*" (OCT) para a criotomia: o congelamento rápido do bloco foi obtido por imersão em nitrogênio líquido.

Os cortes para a imunohistoquímica da TH, foram obtidos de ratos na idade de P16, P23 e P90, com espessura de 25µm, em plano coronal, e obtidos em criótomo. Foram montados em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%, de forma que os cortes adjacentes ficaram em lâminas adjacentes. Foram recolhidos 4 cortes em dez lâminas totalizando 40 cortes.

Os cortes para a histoquímica da NADPH-d tinham espessura de 50µm para a idade de P9, e para P23 e P90 os cortes foram feitos a 60µm em plano coronal. Foram coletados 4 cortes em 3 lâminas totalizando 12 cortes.

As regiões de interesse foram coletadas segundo as coordenadas obtidas do Atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 1998). As lâminas foram mantidas a -20°C, para posterior processamento imunohistoquímico.

8.2.2 Imunohistoquímica

Foi realizada a técnica de imuno indireta, utilizado o anticorpo anti-tirosina hidroxilase monoclonal (MAB 318 -Chemicon) na concentração de 1:200 para a identificação da TH na substância negra. A revelação foi feita com anticorpo anti-IgG de camundongo biotilado (Santa Cruz, 1:100), ligado com extravidina conjugada com peroxidase e revelada com 3,3' - diaminobenzedinatetrahydrocloroeto (DAB). As lâminas foram lavadas 6 vezes em PBS+ Triton 0,3% (salina tamponada com fosfato: KCl 2,7mM; KH₂PO₄ 1,47mM; NaCl 136mM e Na₂HPO₄ 8mM; pH 7,4) por 5 minutos cada lavagem. Após as lavagens os cortes foram incubados em soro normal de cabra (NGS) a 10% em PBS por duas horas. Após a incubação em NGS, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-TH durante a noite, a 4°C

em geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 6 vezes com PBS por 5 minutos e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a biotina 1:100, diluído em PBS, por 1 hora.

Após esse período, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase, por 30 minutos 1:150 em PBS. Seguiram-se três lavagens em tampão fosfato por 5 minutos, e posterior incubação por 15 minutos com DAB, e incubação com DAB e H₂O₂ por 5 a 15 minutos. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com tampão fosfato e 3 vezes com água destilada por 5 minutos. Após secagem durante a noite as lâminas foram sucessivamente imersas por períodos de três minutos em álcool a 70%, 80%, 90%, 95% e por cinco minutos em álcool absoluto, e imersas em xilol por 10 minutos para desidratação. Para posterior análise em microscópio óptico, as lâminas foram montadas com Entellan® (MERCK) como meio de montagem.

8.2.3 Procedimento histoquímico

Os cérebros foram aparados para serem cortados em plano coronal, impregnados em OCT. Os blocos foram congelados em nitrogênio líquido, e cortados em um criostato Slee a -20°C. Os cortes foram recolhidos em placas de 24 poços com 1 mL de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4, sendo lavados 2 vezes com o mesmo tampão. Estes cortes foram reagidos pela reação da NADPH-d direta, utilizando um protocolo modificado do de Vincent e Kimura (1992) (Tenório e col., 2003). O tempo de reação foi de 60 a 90 minutos em estufa a 37°C. A solução de reação utilizada continha 100 µl de Triton X-100 diluídos 12 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, 10mg de NADPH, 5 mg de azul de tetrazol (NBT) diluído em 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a marcação os cortes foram lavados 2 vezes em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, montados em lâminas gelatinizadas e deixados para secagem durante a noite. As lâminas foram sucessivamente imersas por períodos de três minutos em álcool a 70%, 80%, 90%, 95%, por cinco minutos em álcool absoluto, e subsequentemente imersas em xilol por 10 minutos para desidratação. Para posterior análise em microscópio óptico, as lâminas foram montadas com Entellan® (MERCK) como meio de montagem.

8.2.4 Análise das lâminas e aquisição de imagens

A análise foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus) acoplado a uma câmera de vídeo digital (Sony DXC 151A). As imagens foram obtidas com o programa “Digital Câmera Acquire” (Optronics).

A análise da substância negra foi obtida de secções coronais de 10 lâminas seqüenciais. Recolhemos estes cortes entre as posições Bregma - 4,8 mm até Bregma – 5,8 mm. Foram totalizados 40 cortes para cada animal (n=5) de cada grupo (HI e SHAM), nas três idades analisadas - P16, P23 e P90.

A análise da NADPH-diaforase foi obtida de secções coronais, entre o Bregma – 2,80 mm até o Bregma – 3,80 mm, de 3 lâminas seqüenciais dos grupos HI e SH, totalizando 12 cortes para cada animal (n=5) de 3 idades: P9, P23 e P90.

Para a idade inicial de P9 as coordenadas para as secções coronais foram correspondentes aos Bregmas indicados acima.

8.3 **Análise comportamental**

Para a avaliação dos comportamentos motor (incluindo a habilidade motora e o aprendizado motor), habituação e ansiedade utilizamos 36 animais (n = 18/grupo) com 45 dias de idade (P45). A avaliação comportamental foi realizada em 3 dias. Todos os animais foram submetidos ao teste de locomoção forçada no ROTAROD, que é um dos testes mais utilizados para avaliação da coordenação motora em roedores (Brooks e Dunnett, 2009; Lalonde e Strazielle, 2007). Para auxiliar a interpretação dos resultados obtidos no ROTAROD, parte dos animais (n=12/grupo) foi submetida a outros dois testes comportamentais: o teste de campo aberto, e avaliação da ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado. Todos os testes foram realizados na fase clara (entre 15:00 e 18:00h). O posicionamento dos aparelhos na sala de testes, a temperatura da sala e o horário de início das sessões foram mantidos ao longo de todo o estudo. Antes do início de cada teste, as caixas dos animais foram transportadas para a sala de teste onde os animais foram ambientados por 15 minutos.

8.3.1 Teste de locomoção forçada no cilindro giratório (ROTAROD)

Neste estudo foi utilizado o ROTAROD (Leticia Scientific Instruments, Barcelona, Espanha) para ratos. Apesar de o aparelho possuir quatro baias, com espaço de 8 cm para cada animal, apenas dois animais foram testados por vez. No ROTAROD, cada animal deve caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação para evitar a queda. A validade deste teste se baseia no fato de que o medo da queda faz com que o animal tente permanecer sobre o aparelho o máximo de tempo possível (Dunham e Miya, 1957; Lalonde e Strazielle, 2007). Considerando que a maior parte das tentativas de salto ocorre quando as condições do teste são incompatíveis com as capacidades motoras do animal, é bem aceita a idéia que quanto maior for a capacidade de coordenação motora do animal, mais tempo ele permanecerá sobre o cilindro (Brooks e Dunnett, 2009; Dunham e Miya, 1957; Lalonde e Strazielle, 2007).

Para a realização do teste, os animais eram colocados sobre o cilindro (diâmetro = 3,2cm, altura = 20cm), que acelerava continuamente de 4 a 40 rpm em 5 minutos. A latência para a queda foi registrada automaticamente através de um sensor mecânico localizado no chão do aparelho. Vale mencionar que o aparelho também registrava a velocidade do cilindro no momento da queda. Contudo, como houve uma alta correlação entre as medidas de latência e a velocidade (coeficientes de correlação de Pearson maiores que 0,99), optamos por apresentar apenas os resultados relativos às medidas de latência. Cada animal foi submetido a 5 sessões experimentais por dia com intervalo de 30 segundos entre cada sessão. Foram realizados 3 dias de teste.

A opção pelo protocolo no qual a velocidade é aumentada de 4 a 40 rpm/min em 5 minutos foi feita porque esta condição permite ao animal o ajuste gradual à velocidade de rotação do cilindro e minimiza a quantidade de saltos não associados à capacidade do animal se manter sobre o cilindro (Lalonde e Strazielle, 2007).

8.3.2 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto (Open Field) vem sendo amplamente utilizado para o estudo da atividade locomotora em roedores, desde o seu desenvolvimento (Hall, 1934) até os dias atuais (Prut e Belzung, 2003; Whishaw e col., 2006). Além disso,

com base no fato de que os roedores têm uma tendência inata de evitar espaços abertos, a atividade medida na parte central do campo é normalmente utilizada como um indicador de ansiedade (Choleris e col., 2001; Prut e Belzung, 2003). Um aumento da atividade ou permanência na porção central do campo pode ser interpretado como um grau menor de ansiedade, enquanto que o contrário, isto é, a diminuição destas medidas, um grau maior de ansiedade (Prut e Belzung, 2003).

O teste de campo aberto foi realizado uma hora após o término do ROTAROD. A arena do teste de campo aberto consiste de uma caixa retangular de acrílico revestida de papel contact preto (37,6 x 30,4 x 17cm), que foi dividida em 16 retângulos (9,4cm x 7,6 cm), sendo 12 periféricos e 4 centrais. Para a realização dos testes, os animais foram colocados sempre no centro da caixa. O tempo de duração da sessão experimental foi de 10 minutos. Após o fim de cada sessão, a caixa era lavada com água com o intuito de eliminar as excretas, e minimizar odores que poderiam interferir no comportamento dos animais testados subsequentemente. Todas as sessões foram gravadas por uma câmara de vídeo posicionada a um metro acima da caixa e a avaliação do comportamento foi feita a partir do material gravado.

Para análise do comportamento no campo aberto, foram registrados escores de deambulação ao longo do intervalo do teste. A deambulação foi medida pelo número de retângulos em que o animal coloca as quatro patas. Foram avaliadas a deambulação total, a deambulação nos quatro retângulos centrais (C), nos doze retângulos periféricos (P) e o percentual de atividade no centro ($C/(C+P)$). Considerando-se que os resultados referentes às comparações entre as medidas de centro e periferia podem ser influenciadas pelo maior número de retângulos na periferia da arena, as medidas de deambulação no centro e na periferia foram respectivamente divididas pelo número de retângulos em cada região da arena ($C/4$ e $P/12$).

8.3.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é um dos testes comportamentais mais utilizado para avaliar os níveis de ansiedade em ratos (Carobrez e Bertoglio, 2005). Os padrões comportamentais observados neste teste representam uma combinação de comportamento motor generalizado, comportamentos exploratórios e de esquiva

(Carobrez e Bertoglio, 2005). O labirinto em cruz elevado consiste em um aparelho de acrílico constituído por 4 braços, sendo dois abertos (BA) e dois fechados (BF), isto é, contendo paredes de proteção, dispostos em forma de cruz e elevado a 50 cm do chão. As medidas do aparelho são: braços abertos e fechados com 5 cm de largura e 29 cm de comprimento, sendo que os braços fechados contém paredes de 15 cm de altura.

Para a realização dos testes, os animais foram colocados sempre na interseção entre os braços, com a cabeça na direção de um dos braços fechados. A duração do teste foi de 3 minutos. Após o término de cada teste, o labirinto foi limpo com um pano umedecido com água para eliminar excretas e minimizar odores que pudessem interferir no comportamento dos demais animais a serem testados.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo de permanência dos animais nos braços abertos e braços fechados, assim como o número de entradas nos braços abertos e braços fechados. A partir dessas medidas, foram quantificados o percentual de tempo nos braços abertos e o percentual de entradas nos braços abertos. Os parâmetros utilizados como medidas de ansiedade foram: o tempo de permanência nos braços abertos, o percentual de tempo nos braços abertos, o número e o percentual de entradas nos braços abertos (Abreu-Villaça e col., 2008).

8.3.3.1 Medidas de ansiedade

Tempo de permanência nos braços abertos (TBA): foi medido a partir do momento que o animal dispunha as quatro patas no braço aberto. A contagem era interrompida quando o animal retirava as quatro patas do braço aberto.

Percentual de tempo nos braços abertos (%TBA): foi calculado a partir da razão entre o tempo gasto nos braços abertos e a soma dos tempos despendidos em ambos os braços abertos e fechados, segundo a fórmula: $\%TBA = \text{tempo BA} / (\text{tempo BA} + \text{tempo BF})$.

Entradas nos braços abertos (EBA): foram consideradas entradas todas as vezes que o animal colocava as quatro patas no braço aberto.

Percentual de entradas nos braços abertos (%EBA): foi calculado a partir da razão entre o número de entradas nos braços abertos e a soma do número de

entradas nos braços abertos e braços fechados, segundo a fórmula: %EBA = No de entradas BA / total de entradas BA + BF.

8.3.3.2 Medidas de atividade motora

Como medida adicional de atividade locomotora, a soma do número de entradas nos braços abertos e fechados foi utilizada como medida de atividade geral (Pellow e col., 1985; Abreu-Villaça e col., 2008).

8.4 Análise estatística

Os cálculos estatísticos dos dados experimentais obtidos através dos testes comportamentais foram realizados através do programa de computador GraphPadPrism 3.0. Os dados foram apresentados como médias e erros padrão da média. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, para verificar se as populações estudadas apresentavam homogeneidade de variância (Siegel, 1956). Para avaliar o efeito do experimento no ROTAROD foi utilizada análise de variância de repetição (ANOVAR). Os animais foram classificados em função do tratamento (HI ou SHAM). O fator de repetição para o ROTAROD foi a sessão. Posteriormente, aplicou-se o pós-teste de Tukey para comparar os grupos dois a dois, isto é, o grupo HI com o SHAM. Nos testes de campo aberto e no labirinto em cruz elevado, os dados foram analisados através do teste t bi-caudal. Em todos os casos, os animais foram classificados em função do tratamento (controle ou experimental).

A análise da contagem de células no giro dentado foi feita através do teste “t” student bi-caudal não pareado para comparação entre o grupo experimental e o SHAM em cada tempo do desenvolvimento avaliado.

Em ambos os testes, a hipótese de nulidade adotada assume que a resposta do grupo HI não diferiu do SHAM. Os resultados foram considerados significantes quando $p \leq 0,05$.

9 RESULTADOS

9.1 Análise macroscópica

Os filhotes foram observados diariamente de P1 até P16, e semanalmente de P16 até o dia do experimento comportamental (P45), para registro da massa corporal e de importantes marcos do desenvolvimento (isto é, abertura de olhos, desdobraimento de orelhas, crescimento de pelos) e aspectos gerais.

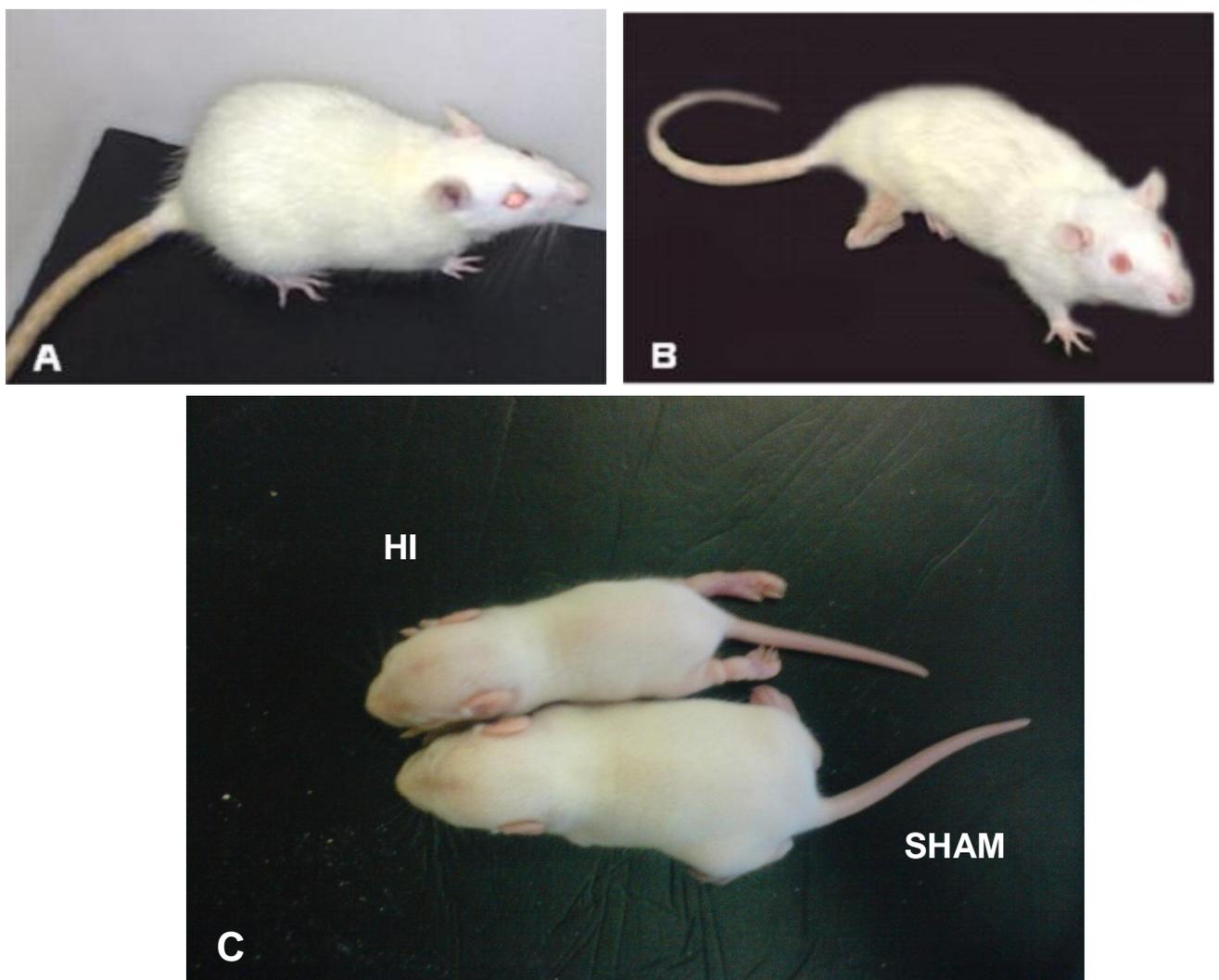


Figura 7 - Em A e B, animais P90 do grupo HI, da mesma ninhada, apresentando diferentes fenótipos motores: A – sem lesões motoras aparentes; B – com plegia dos membros traseiros. Em C, comparação entre um animal HI e SHAM em P9.

Animais submetidos ao clampeamento (HI) não apresentaram alterações motoras aparentes na sua maioria (Figura 4.1 A). Entretanto, 3% dos animais desenvolveram plegia dos membros traseiros o que sugere que nesses animais a lesão no sistema nervoso central seja mais severa (Figura 4.1 B). Os filhotes com estas alterações físicas aparentes foram descartados na análise dos testes motores e morfológicos, sendo mantidos apenas para um acompanhamento visual de seu desenvolvimento. Não observamos alterações nos marcos de desenvolvimento também nesses animais.

Os resultados obtidos demonstraram que animais HI nascem, em sua maioria, menores que os animais SHAM (figura 4.1 C). Houve diferenças em relação à massa corporal entre os grupos HI e SHAM (Figura 4.2, superior), como indicado pela ANOVA global ($F = 30,643$; $gl = 19/140$; $P < 0,0001$). No entanto, não observamos diferenças significativas entre os machos e as fêmeas em nenhum dos grupos estudados. Em P2 os animais HI apresentaram massa corporal menor que o grupo SHAM, como indicado pela ANOVA ($F = 8,280$; $gl = 3/103$; $P < 0,0001$), em animais de ambos os gêneros sexuais. Em P9 as diferenças de massa corporal entre os grupos HI e SHAM tornaram-se mais acentuadas ($F = 21,774$; $gl = 3/91$; $P < 0,0001$). Em P16 também observamos diferenças de massa corporal entre os grupos HI e SHAM ($F = 10,374$, $gl = 3/84$; $P < 0,0001$), mas essas diferenças foram menos acentuadas entre as fêmeas de cada grupo do que entre os machos. Em P23 a ANOVA indica que ainda existem diferenças entre os grupos ($F = 4,424$, $gl = 3/66$; $P = 0,0068$). No entanto, comparações subseqüentes, em ambos os gêneros, revelaram que não existem diferenças significativas entre os grupos HI e SHAM. Em P45 e P90 os animais de ambos os grupos não diferiram em relação à massa corporal (Figura 4.2, inferior).

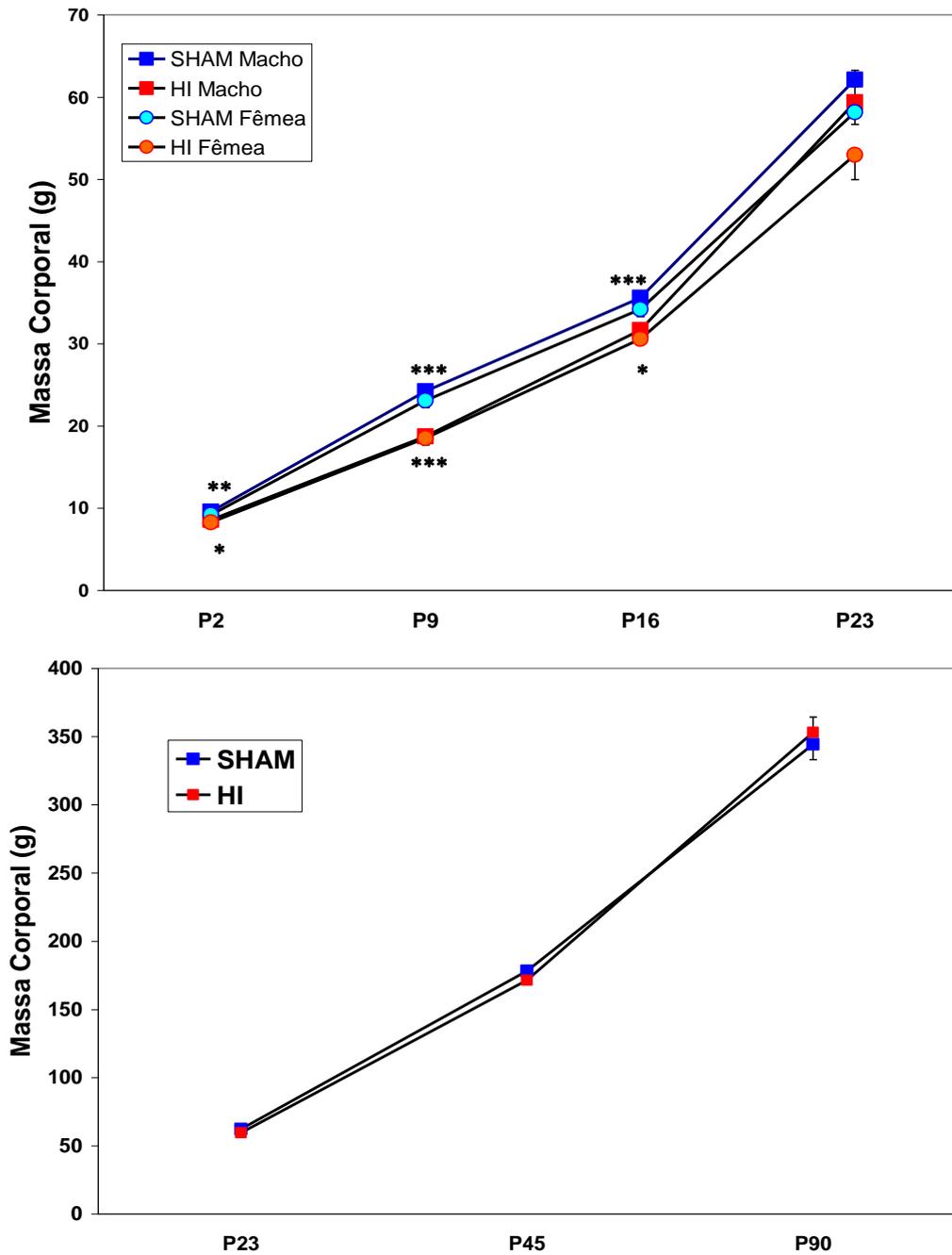


Figura 8 - Médias de massa corporal de machos e fêmeas controles (SHAM) e submetidos à isquemia por hipóxia pré-natal (HI), de P2 a P23 (Gráfico superior) e apenas dos machos de P23 a P90 (gráfico inferior). Notar que os animais HI, de ambos os gêneros, apresentaram diminuição na massa corporal em P2, P9 e P16, mas não em P23. Não observamos diferenças significativas na massa corporal entre os gêneros em nenhum dos grupos estudados. Comparações entre os resultados de cada grupo obtidos nas três idades entre os machos (acima) e fêmeas (abaixo): * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

9.2 Análise funcional de testes comportamentais

9.2.1 Teste de campo aberto

As Figuras 4.3 a 4.5 apresentam o desempenho dos animais HI e SHAM, em P90, no teste de campo aberto. Observamos que os animais HI apresentaram redução no número total de deambulações no campo aberto em relação ao grupo SHAM ($P = 0,0047$; $gl = 20$; $t = 3,184$) (Figura 4.3).

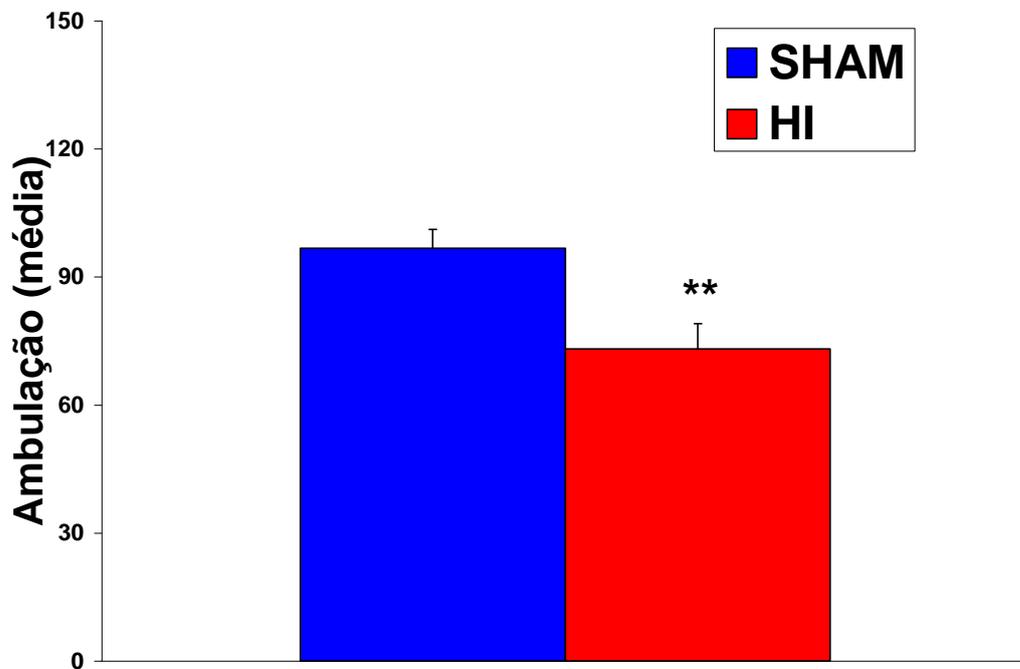


Figura 9 - Médias do total de deambulações no teste de campo aberto (OPEN FIELD) dos animais controles (SHAM) e submetidos à isquemia por hipóxia pré-natal (HI). Notar que os animais HI apresentaram diminuição na atividade motora de deambulação. Comparações entre os resultados de cada grupo obtidos nas três sessões: ** $P \leq 0,01$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

A maior parte da atividade ambulatoria no campo aberto ocorreu na periferia, tanto no grupo HI, quanto no SHAM ($F = 113,70$; $gl = 3/40$; $P < 0,0001$) (Figura 4.4). No entanto, considerando que cada animal possui igual probabilidade de estar sobre qualquer um dos retângulos, poderíamos supor que este resultado decorreu do simples fato de que o número de retângulos na periferia ($n = 12$) é maior que o do centro ($n = 4$). Quando corrigimos o número de deambulações pelo número de retângulos em cada região do campo aberto (Figura 4.5, superior), observamos que ambos os grupos HI e SHAM deambularam significativamente mais na periferia que no centro, e que os animais HI apresentaram menor atividade que os SHAM na periferia, mas não no centro ($F = 37,134$; $gl = 3/40$; $P < 0,0001$). Quando dividimos o número de deambulações no centro pelo total de deambulações (Figura 4.5, inferior), não observamos diferenças entre os grupos HI e SHAM.

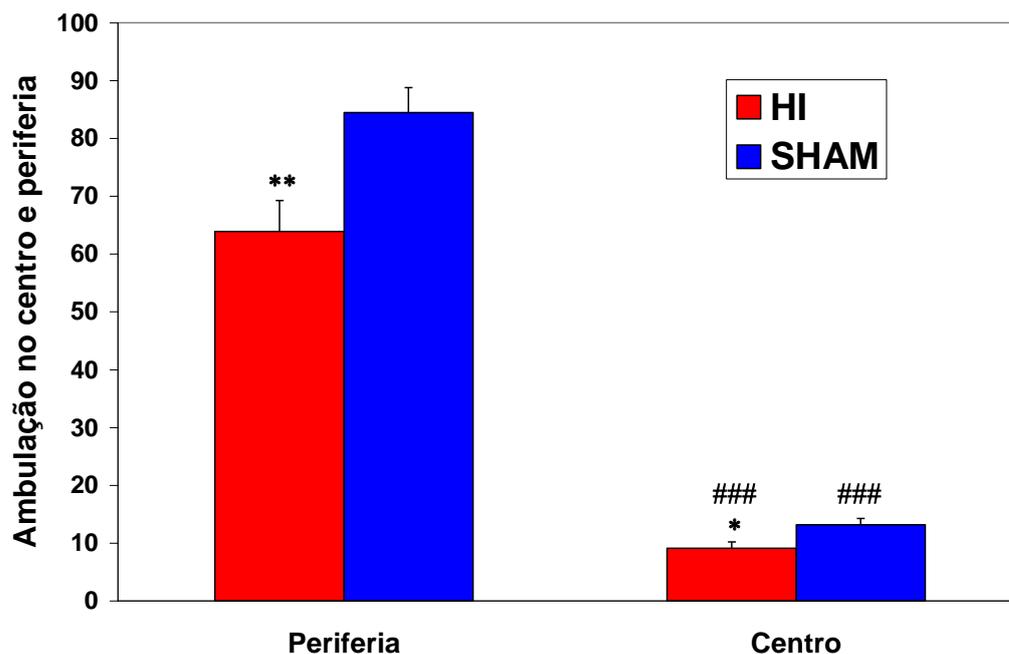


Figura 10 - Médias do total de deambulação no teste de campo aberto (OPEN FIELD) dos animais controles (SHAM) e submetidos à isquemia por hipóxia pré-natal (HI). Notar que os animais HI apresentaram diminuição na atividade motora de deambulação. Comparações entre os resultados do grupo HI em relação ao SHAM: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Comparações entre a atividade no centro em relação à periferia: ### $P \leq 0,001$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

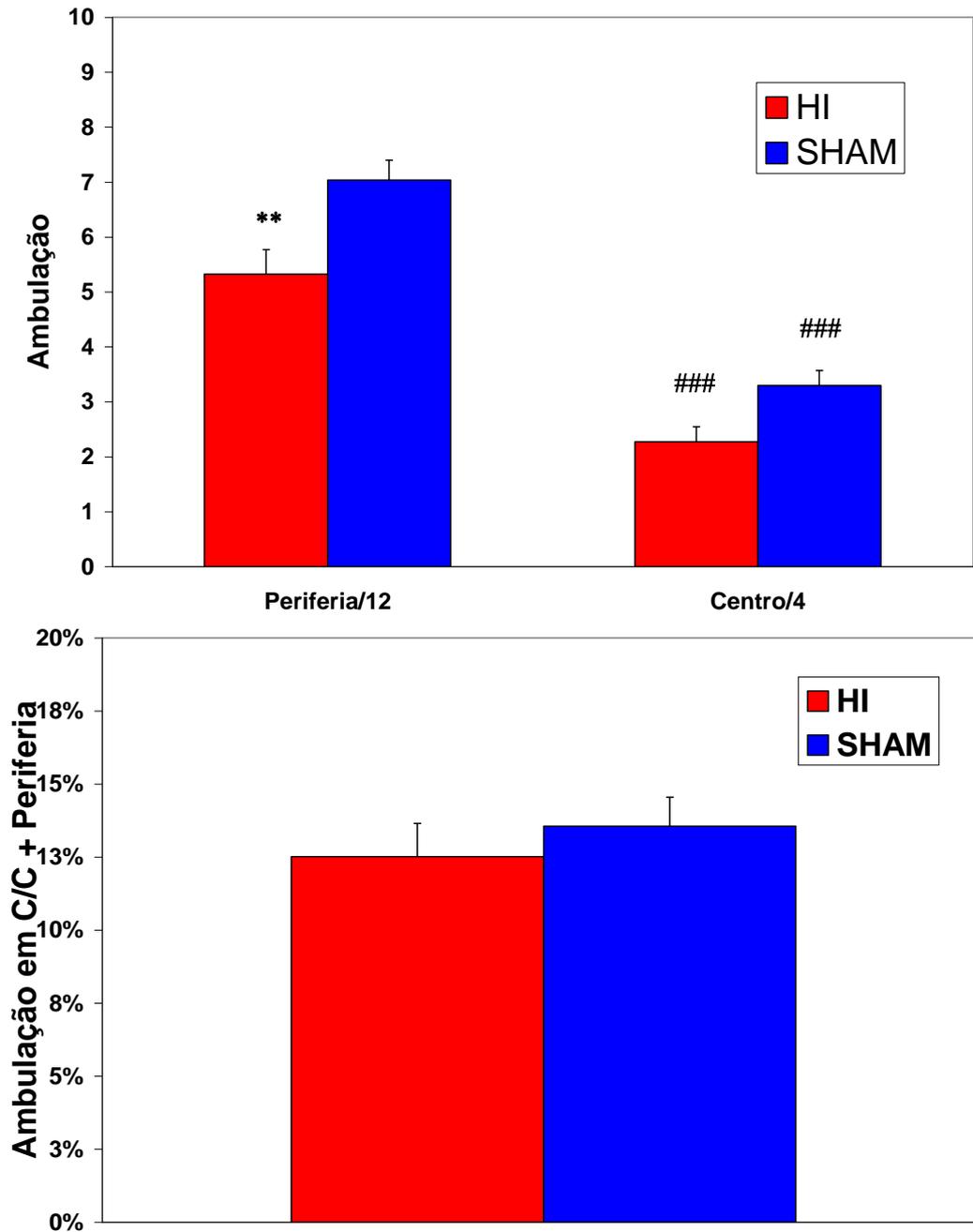


Figura 11 - Deambulação na periferia e no centro corrigidos pelos números de retângulos respectivos de cada região do campo aberto (superior) e relação entre deambulação no centro pelo total de retângulos (inferior). Notar que os animais HI e SHAM deambularam muito mais na periferia do que no centro da arena, e que os animais HI apresentaram menor atividade na periferia que o grupo SHAM, mas não observamos diferenças entre a atividade no centro da arena. Comparações entre os resultados do grupo HI em relação ao SHAM: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$. Comparações entre a atividade no centro em relação à periferia: ### $P \leq 0,001$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

9.2.2 Teste de locomoção forçada no cilindro giratório (ROTAROD)

Os resultados do teste de locomoção forçada no cilindro giratório estão apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7. A latência para queda aumentou ao longo das sessões experimentais tanto para o grupo HI ($F = 6.757$; $gl = 2/51$; $P = 0.0025$), quanto para o grupo SHAM ($F = 9.768$; $gl = 2/51$; $P = 0,0003$), sendo que as diferenças foram estatisticamente significantes da primeira para a segunda sessão (Figura 4.6). O grupo HI apresentou latências para queda significativamente menores que o grupo SHAM ao longo das três sessões ($F = 9.410$; $gl = 5/102$; $P < 0,0001$). Testes T bicaudais foram feitos subsequentemente para confirmar os resultados em cada sessão experimental: sessão 1: $P = 0,0369$; $gl = 34$; $t = 2,172$. Sessão 2: $P = 0,0424$; $gl = 34$; $t = 2,109$. Sessão 3: $P = 0,0320$; $gl = 34$; $t = 2,237$.

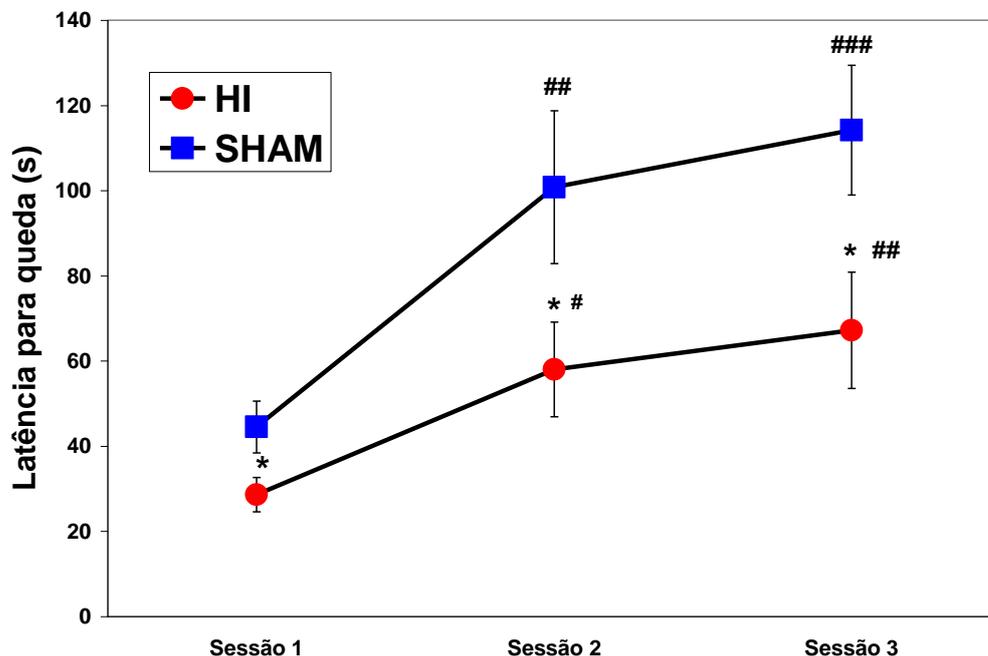


Figura 12 - Médias da latência para a queda no cilindro giratório (ROTAROD) dos animais dos grupos controle (SHAM) e submetidos à isquemia por hipóxia pré-natal (HI). Notar que ocorre aumento na latência através das sessões em ambos os grupos e que a atividade dos animais HI foi sempre menor que a do grupo SHAM em todas as sessões experimentais. Comparações entre os resultados do grupo HI e SHAM em cada sessão: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Comparações entre o desempenho intra-grupo nas sucessivas sessões: # $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$; ### $P \leq 0,001$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

O tempo de permanência no cilindro (Figura 4.7) foi significativamente menor no grupo HI em relação ao controle SHAM ($F = 9.230$; $gl = 5/102$; $P < 0,0001$). No grupo SHAM, observamos um aumento crescente no tempo de permanência da primeira para a última sessão ($F = 9,710$; $gl = 2/51$; $P = 0,0003$). No grupo HI, também observamos um aumento crescente no tempo de permanência no cilindro, da primeira para a última sessão ($F = 6.757$; $gl = 2/51$; $P = 0,0025$). Nas três sessões, no entanto, o tempo de permanência dos animais HI foi significativamente menor que os controles SHAM.

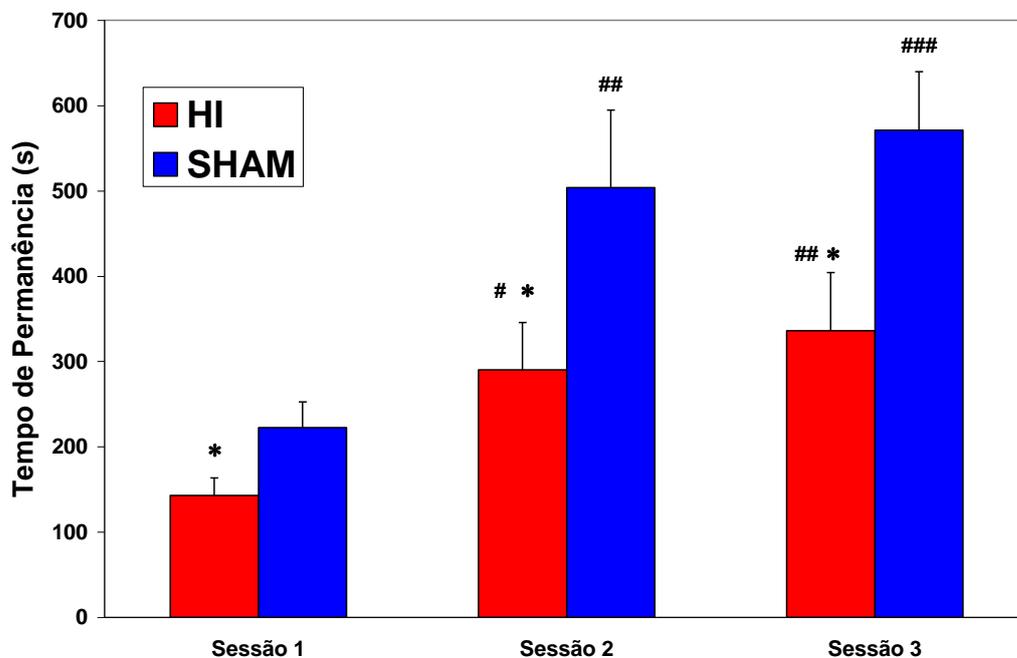


Figura 13 - Médias do tempo total de permanência em segundos no cilindro giratório (ROTAROD) dos animais dos grupos controle (SHAM) e submetidos à isquemia por hipóxia pré-natal (HI). Notar que o tempo de permanência no cilindro aumenta nas sucessivas sessões em ambos os grupos e que o tempo de permanência dos animais HI foi sempre menor que a do grupo SHAM em todas as sessões experimentais. Comparações entre os resultados do grupo HI e SHAM em cada sessão: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Comparações entre o desempenho intra-grupo nas sucessivas sessões: # $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

9.2.3 Teste do labirinto em cruz elevada

No teste do labirinto em cruz elevado, os animais HI não apresentaram comportamento diferente dos controles SHAM. Na Figura 4.8, podemos observar que o número de entradas nos braços abertos (BA) (superior) e a percentagem de entrada nos braços abertos não diferiram nos dois grupos. O tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Figura 4.9) e a percentagem de permanência nos braços abertos também não diferiu entre os grupos HI e SHAM.

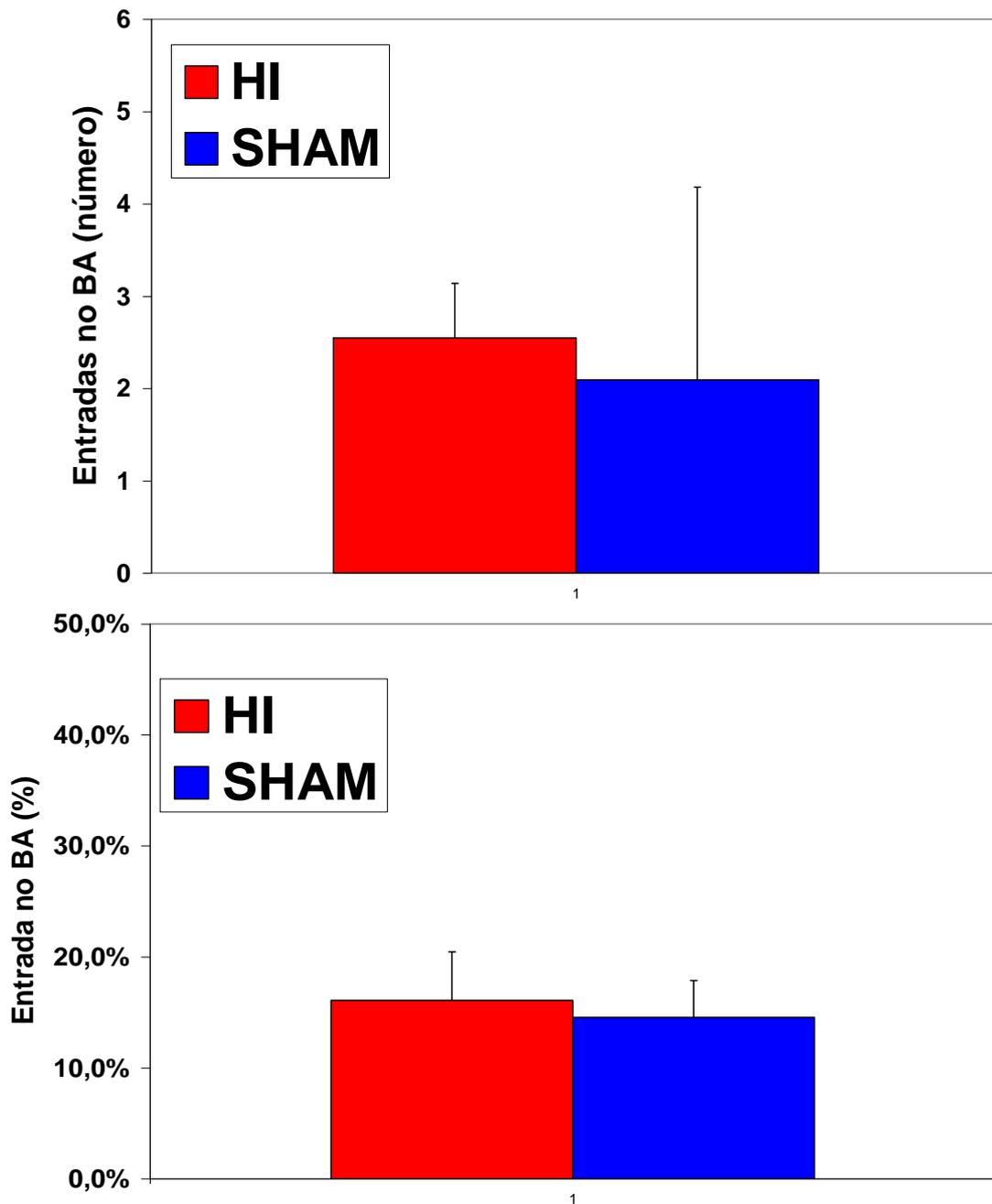


Figura 14 - Número de entradas no braço aberto (BA) (superior) e percentagem de entrada no BA (inferior). Notar que não houve diferenças entre os grupos HI e SH.

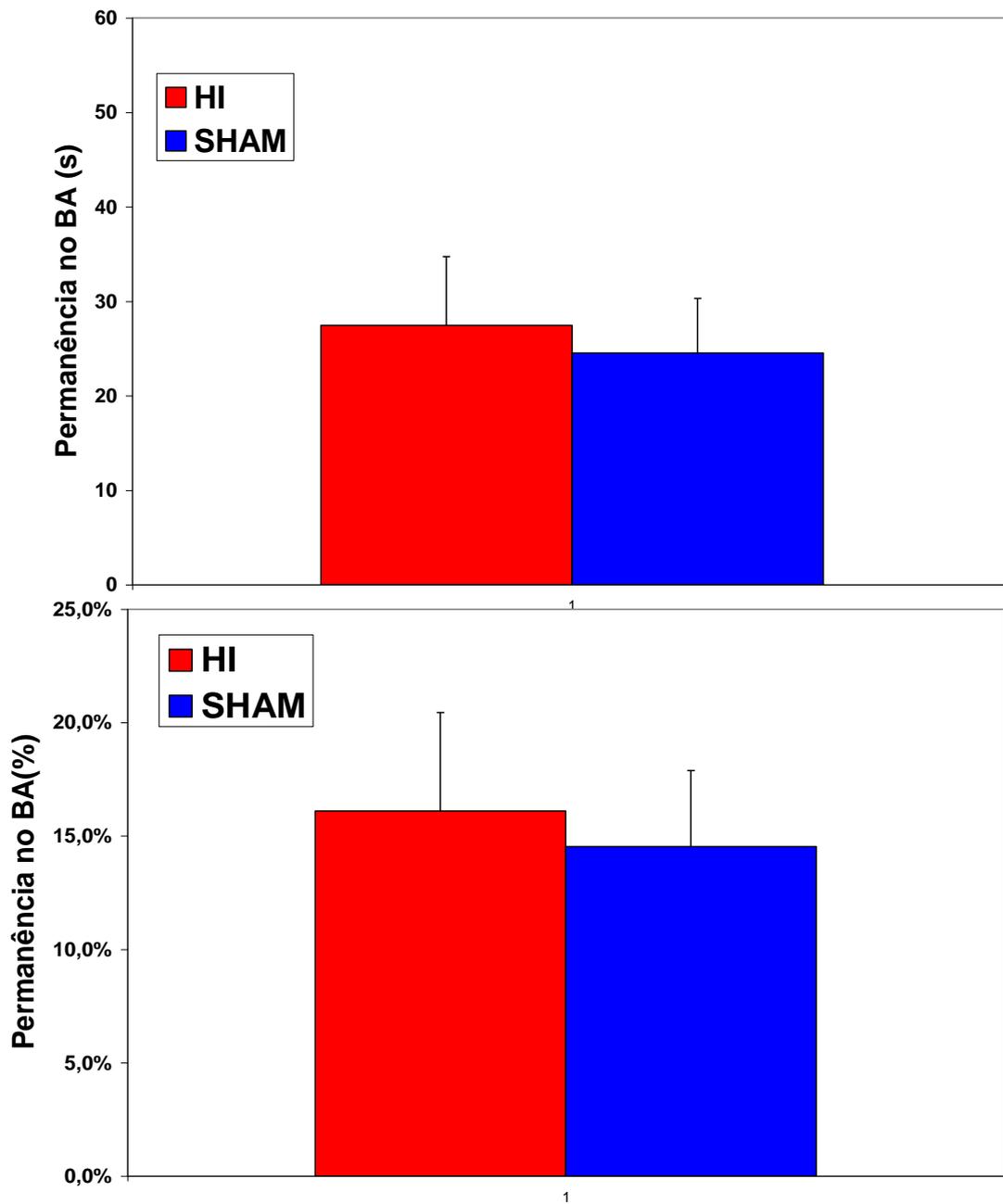


Figura 15 - Tempo de permanência em segundos no braço aberto (superior) e porcentagem de permanência no braço aberto (inferior). Notar que o tempo de permanência no braço aberto do grupo HI não diferiu do grupo SH.

Os resultados da análise de comportamento motor confirmam que os animais submetidos a este modelo de HI apresentam déficits motores e sugerem que o insulto isquêmico pode afetar regiões de controle motor como o sistema nigroestriatal. Por outro lado, os animais HI apresentaram melhora no desempenho, sugerindo que a capacidade de aprendizado motor pode ter sido preservada. Em virtude disto, investimos na análise morfológica da substância negra e do complexo hipocampal.

9.3 Análise Morfológica da substância Negra no desenvolvimento

No presente estudo, analisamos morfológicamente a substância negra dos animais HI e SHAM em três idades: P16, P23 e P90. A escolha das idades foi baseada no fato da maturação desse sistema ocorrer por volta do vigésimo primeiro dia. Deste modo, em P16 o sistema encontra-se imaturo, em P23 a maturação está completa. O objetivo de avaliar P90 foi verificar se as modificações observadas permaneceriam até a fase adulta do animal. A parte compacta da substância negra (área A9) contém os pericários de neurônios dopaminérgicos, e a parte reticulada as projeções dessas células, que se projetam para o neostriado para formar a via nigroestriatal. Esta via integra o sistema extrapiramidal e está implicada no controle de movimentos voluntários automáticos (para revisão: Stahl, 2002).

Na Figura 4.10, em A, ilustramos um corte coronal na altura do mesencéfalo, com destaque para as regiões da substância negra que apresentam imunorreatividade para TH representadas de B a G. Na mesma figura (em B, D e F) observamos a marcação para TH na substância negra dos animais controle cirúrgico – SHAM, respectivamente aos 16, 23 e 90 dias. Em C, E e G observamos a marcação para TH nos animais HI aos 16, 23 e 90 dias, respectivamente.

Na idade de P16 observamos uma aparente diminuição de marcação em corpos de neurônios, marcados para TH em animais submetidos à isquemia em relação ao grupo SHAM, tanto na substância negra reticulada quanto na substância negra compacta. O que não ocorre em relação aos plexos, que aparentemente estão mais marcados no grupo HI do que no grupo SHAM. Na idade de P23, observamos nos cortes dos animais HI um desarranjo da substância negra na região compacta e a presença de diversos neurônios deslocados na região reticulada, tornando os limites das regiões, inclusive, difíceis de delimitar. Na idade de P90, os animais HI

apresentaram um aumento da imunorreatividade em fibras, que persiste na região compacta mas não na reticulada, e aparentemente há uma menor marcação em corpos celulares. Este achado sugere que o insulto hipóxico-isquêmico em E18 desencadeou alterações no padrão de maturação no sistema dopaminérgico que se mantiveram na vida adulta desses animais.

9.4 Análise morfológica do complexo hipocampal no desenvolvimento

No presente estudo, avaliamos a distribuição da NADPH-d durante o desenvolvimento do hipocampo em ratos submetido à HI pré-natal, mais especificamente nas idades de P9, P23 e P90. Em P9 (Figura 4.11), podemos observar uma intensa marcação nos corpos celulares, nos prolongamentos e em vasos dos animais HI. Houve um aumento no número de células marcadas na região do giro dentado (GD) dos animais HI em relação ao grupo SHAM, As regiões CA1 e CA3 também aparentam estar alteradas no animal experimental mostrando uma marcação mais intensa e difusa em relação ao grupo SHAM.

Aos 23 dias (Figura 4.12 e 4.13), a marcação para as células NADPH-d positivas no animal HI é consideravelmente maior do que no grupo SHAM, e também maior do que no próprio animal HI na idade de 9 dias. A ocorrência de células marcadas é maior nas proximidades da camada granular do GD, com diferentes tipos morfológicos sendo evidenciados, e a marcação em vasos é menos intensa do que ocorre nos animais P9. Em CA1 e CA3, inversamente ao que observamos em P9, há uma marcação menos intensa nestas regiões no grupo HI em relação ao grupo SHAM. Entretanto, os corpos celulares estão mais evidentes no grupo HI.

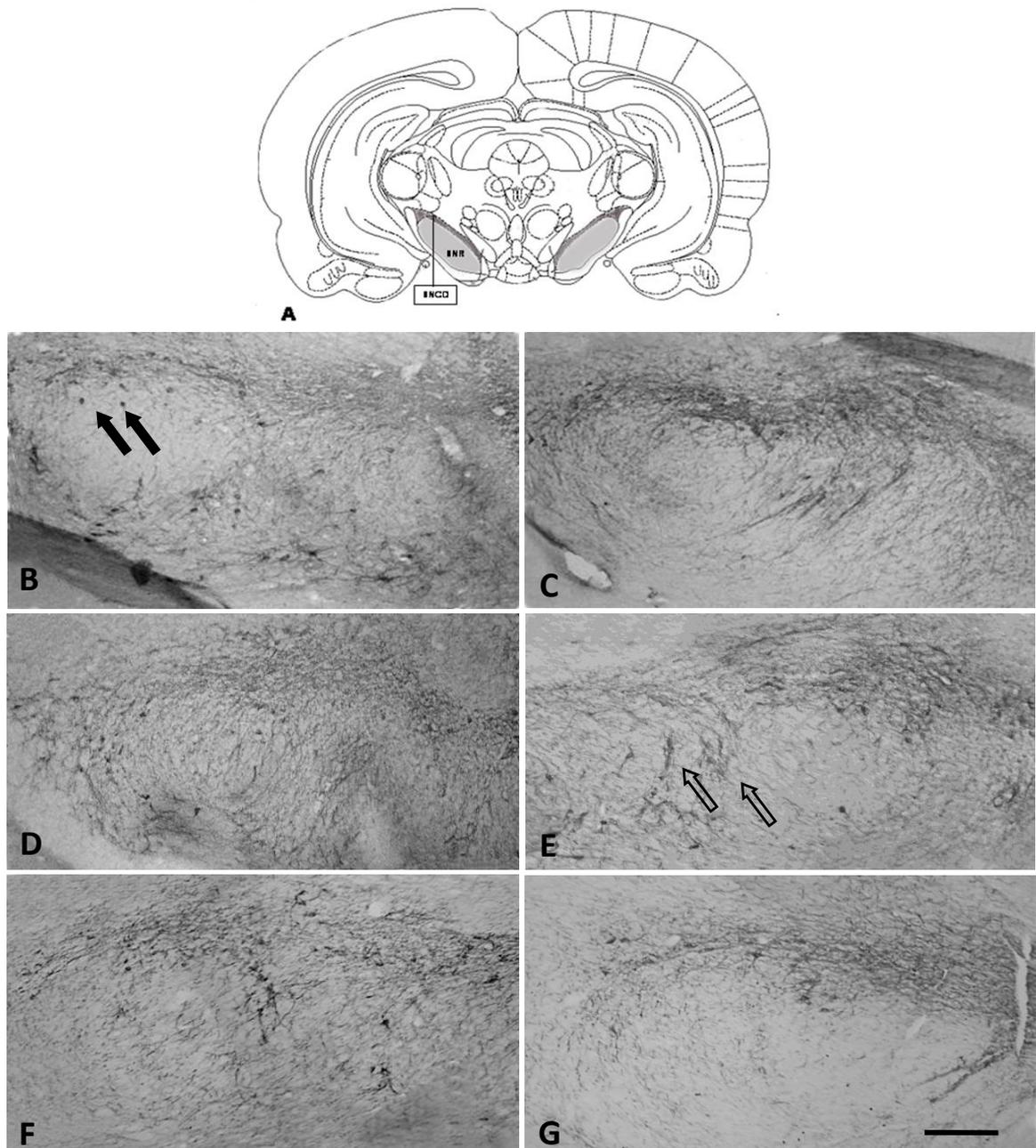


Figura 16 - Em A, representação esquemática de uma secção coronal de encéfalo de rato adulto (modificado de Paxinos e Watson, 1998), destacando as regiões que apresentam imunorreatividade para TH, ilustradas nas fotomicrografias de B a G. SNR – substância nigra reticulada; e SNCD – substância nigra região compacta dorsal. B/D/F – Animais SHAM; C/E/G – Animais HI. B e C animais P16; D e E animais P23; F e G animais P90. Observar em B e C diversos neurônios marcados no corte do animal do grupo SHAM, em comparação com o animal do grupo HI (seta sólida). Em D e E o grupo experimental (E) apresenta extensos perfis imunorreativos na região reticulada em relação ao grupo SHAM (D) – (seta vazada). Nos animais HI P90 (G), o padrão da imunorreatividade aumentada na região compacta permaneceu modificado em relação ao grupo SHAM. Barra de calibração=200µm.

Em P90 (Figuras 4.14 e 4.15), a marcação para a NADPH-d se apresenta menos intensa em vasos tanto nos animais SHAM, quanto nos animais HI, estando mais localizada em corpos celulares. O número de células NADPH-d positivas na região do GD, ainda, é maior no grupo HI do que no grupo SHAM, mas cai drasticamente em relação ao próprio animal HI em 23 dias. Tanto os animais SHAM quanto os animais HI possuem aumento na marcação de corpos celulares no GD durante o desenvolvimento. Nos animais SHAM e HI o maior número de células reativas ocorre aos 23 dias. O padrão de marcação da região CA3 nos animais HI e SHAM P90 é semelhante ao observado nos animais P23: nos animais HI a marcação é menos intensa em relação ao grupo SHAM. Já a região CA1, aparentemente, não apresenta diferenças visíveis.

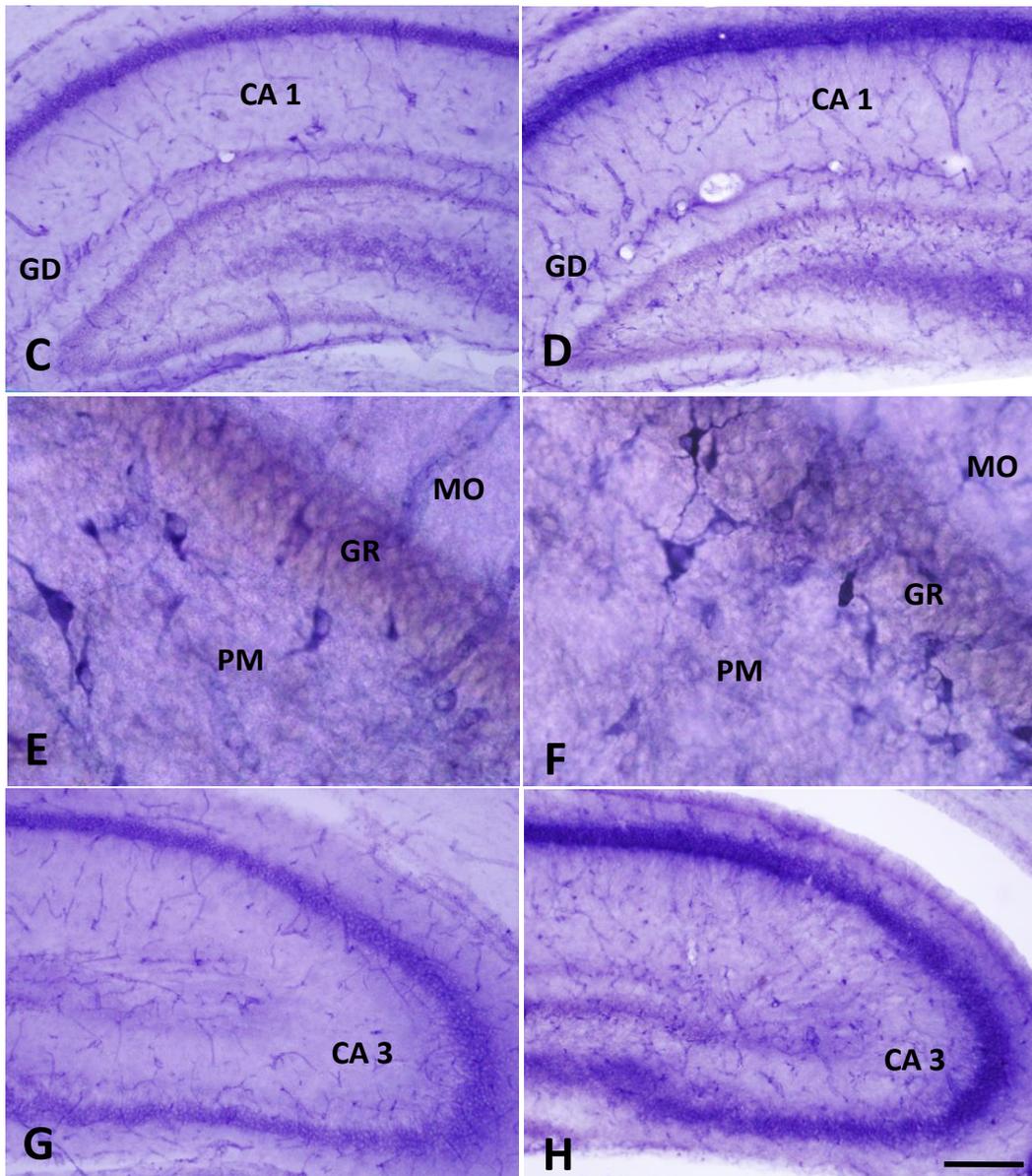
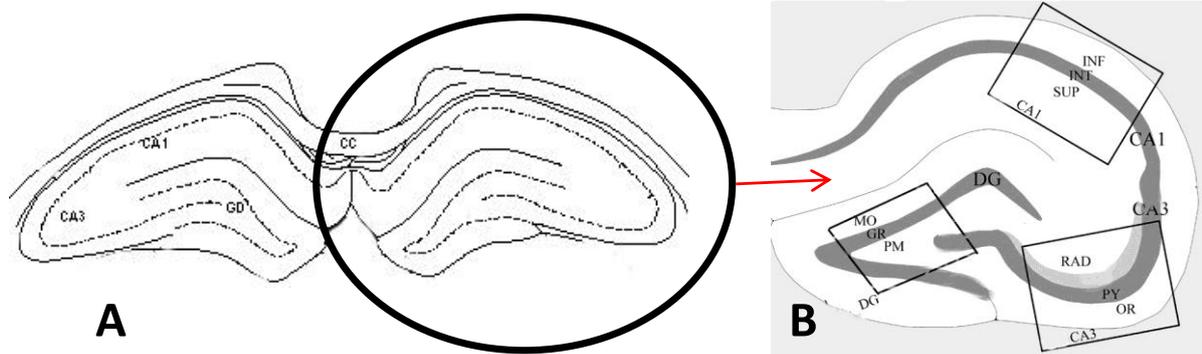


Figura 17 - Em A, representação esquemática das regiões do complexo hipocampal em seção coronal de encéfalo de rato (modificado de Paxinos e Watson, 1998), destacando as regiões do complexo hipocampal. Em B, destaque das regiões analisadas (modificado de Nishiga e col, 2002). GD giro dentado; MO camada molecular; GR camada granular; PM camada polimórfica; PY camada piramidal; OR *stratum oriens*; RAD *stratum radiatum*. De C a H - Padrão de marcação da NADPH-d no GD e no corno de Ammon (CA1 e CA3) em animais P9, em diferentes aumentos. Os animais SHAM estão à esquerda (C, E e G) e animais HI à direita (D, F e H). Notar no animal HI uma intensa marcação em corpos celulares e em vasos. E e F detalhe da camada granular. Em H detalhe de CA3 do animal HI mais intensamente marcada em relação ao grupo SHAM (G). Barra de Calibração: C, D, G e H 200 μ m; E e F 40 μ m.

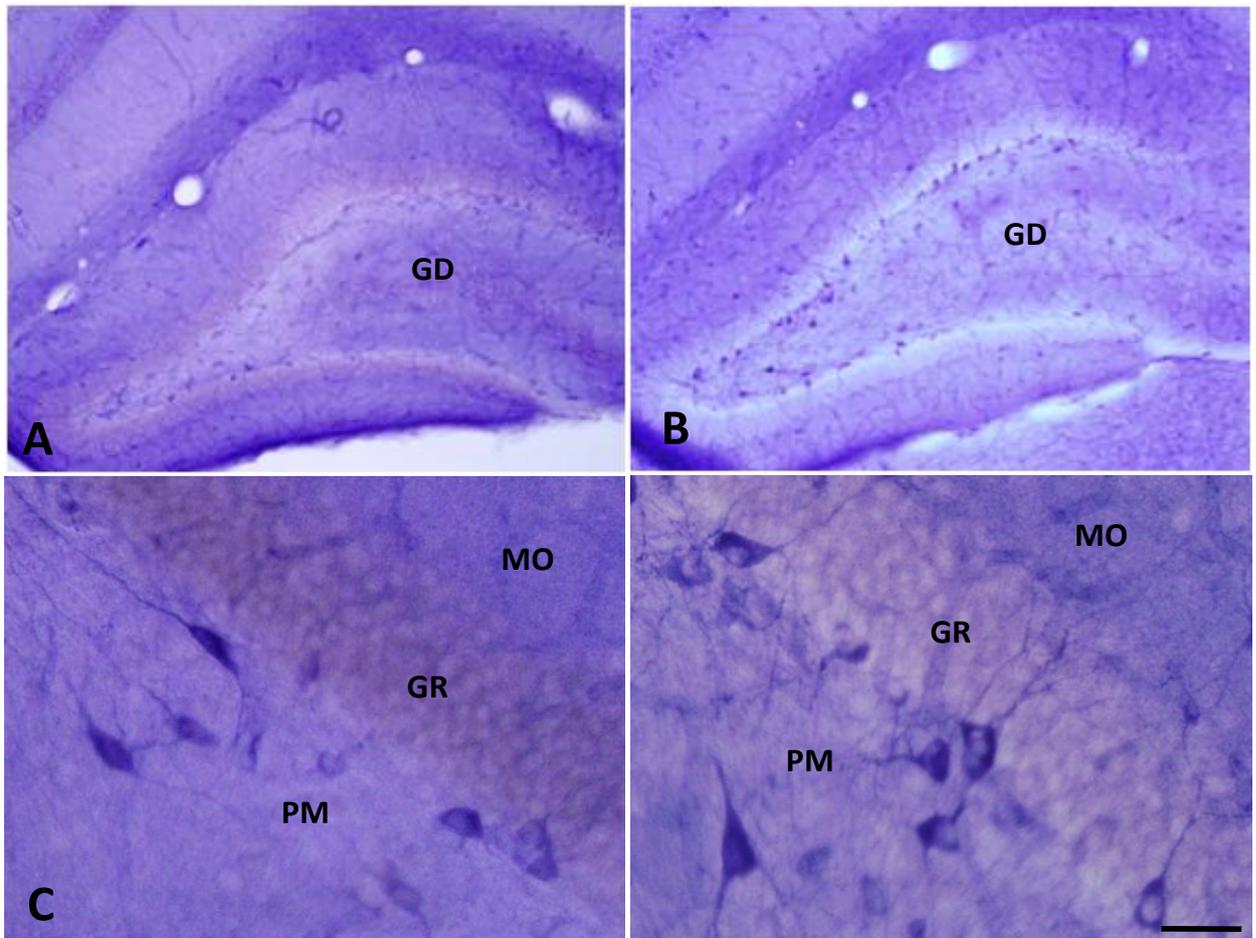


Figura 18 - Padrão de marcação da NADPH-d no GD de animais P23. GD giro dentado; MO camada molecular; GR camada granular; PM camada polimórfica. A, C animais SHAM e B, D animais HI. Notar no animal HI o aumento de marcação em corpos celulares. C e D detalhe da camada granular. Notar que os animais HI possuem diferentes tipos morfológicos de células NADPHd positivas. Barra de Calibração: A e B 200µm; C e D 40µm

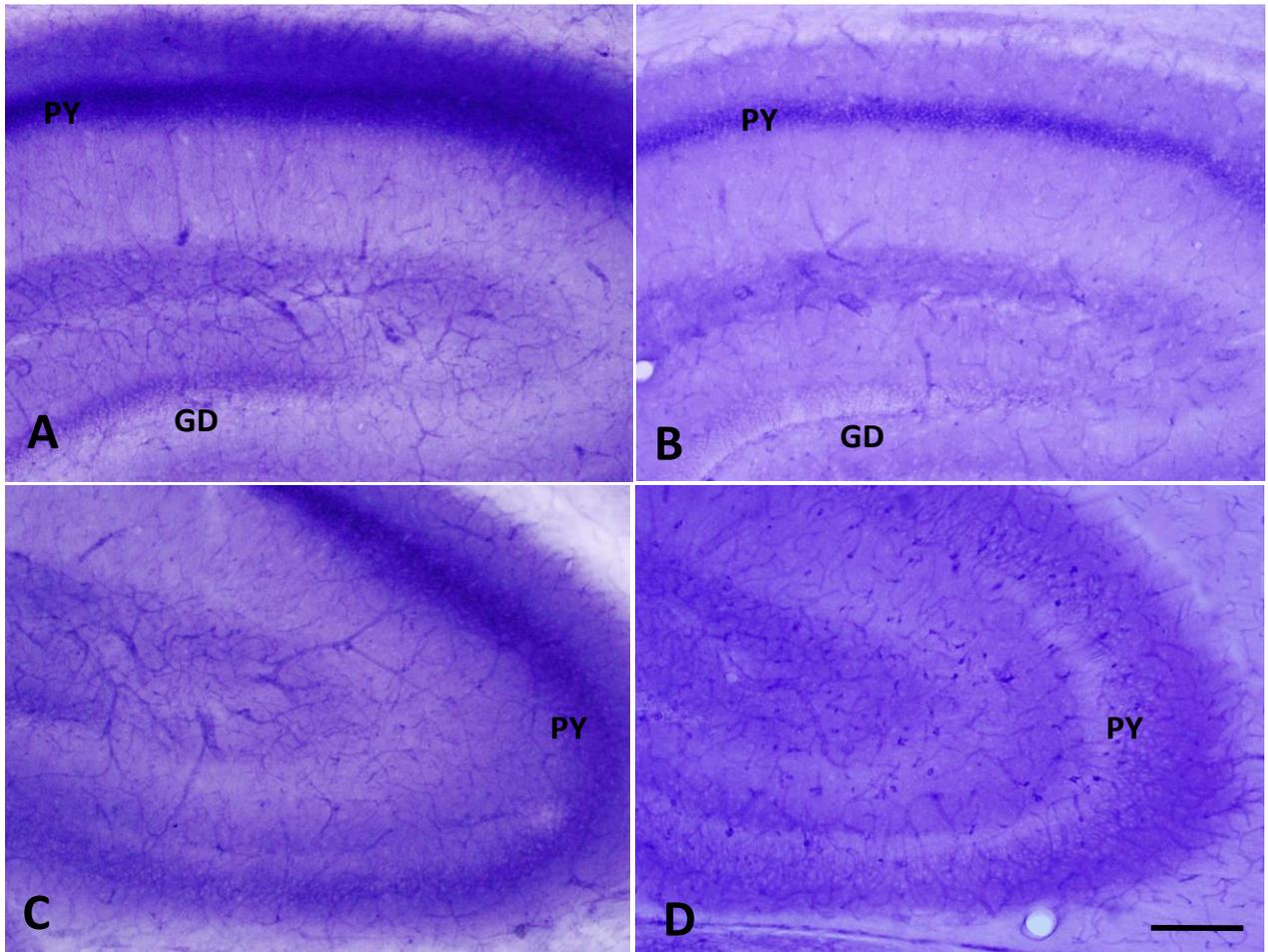


Figura 19 - Padrão de marcação da NADPH-d no corno de Ammon de animais do grupo P23. GD giro dentado; PY camada piramidal. A, C animais SHAM e B, D animais HI. Notar que no animal HI ocorre uma diminuição na intensidade de marcação difusa nas regiões da camada piramidal de CA1 (B) e na região da camada piramidal de CA3 (D), em relação ao grupo sham (A e C respectivamente). Barra de Calibração: 100 μ m;

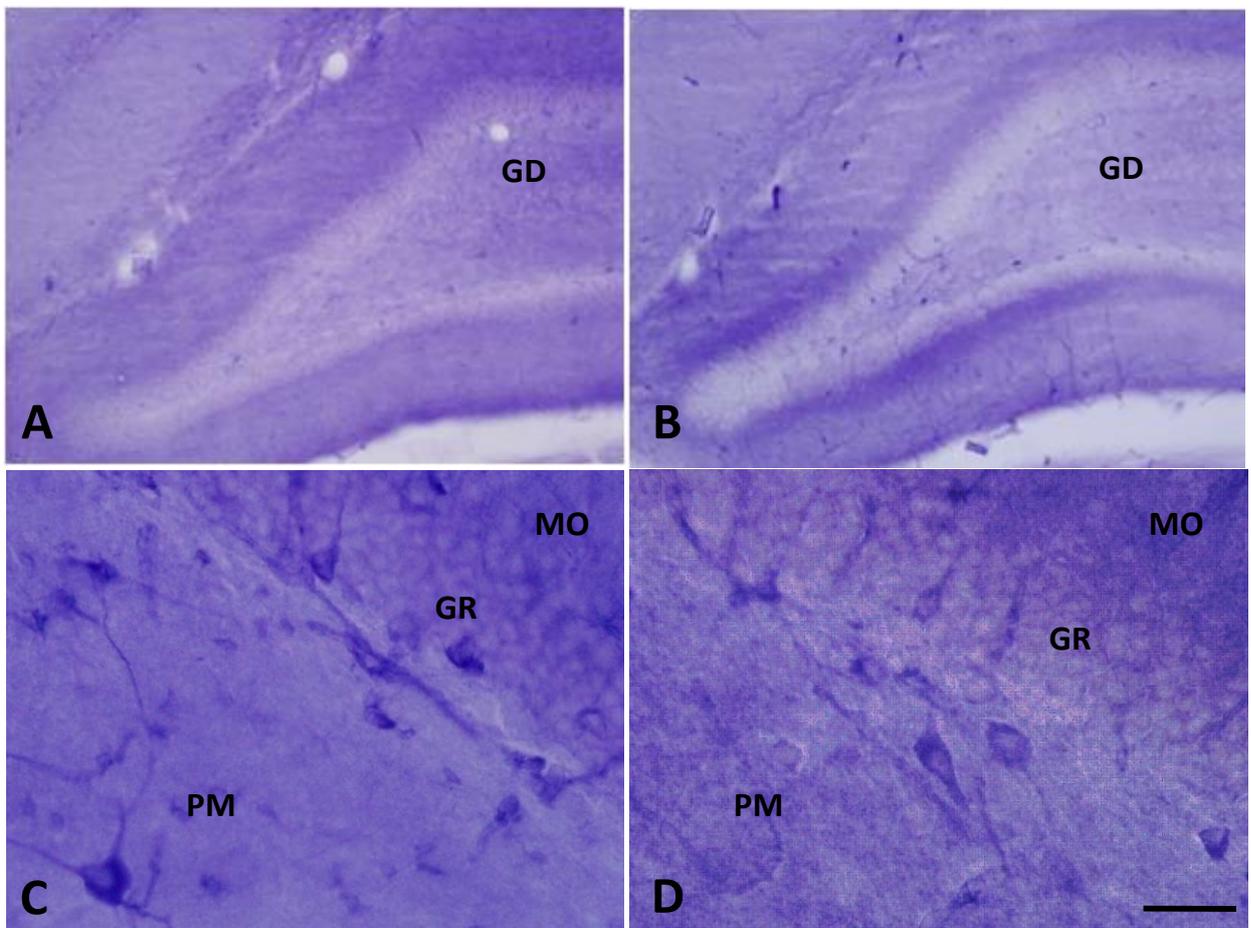


Figura 20 - Padrão de marcação da NADPH-d no GD de animais do grupo P90 MO camada molecular; GR camada granular; PM camada polimórfica. A, C animais Sham e B, D animais HI. Notar no animal HI o aumento de marcação em corpos celulares junto a camada granular. C e D detalhe dos neurônios próximos a camada granular. Barra de Calibração: A e B 200 μ m; C e D 40 μ m.

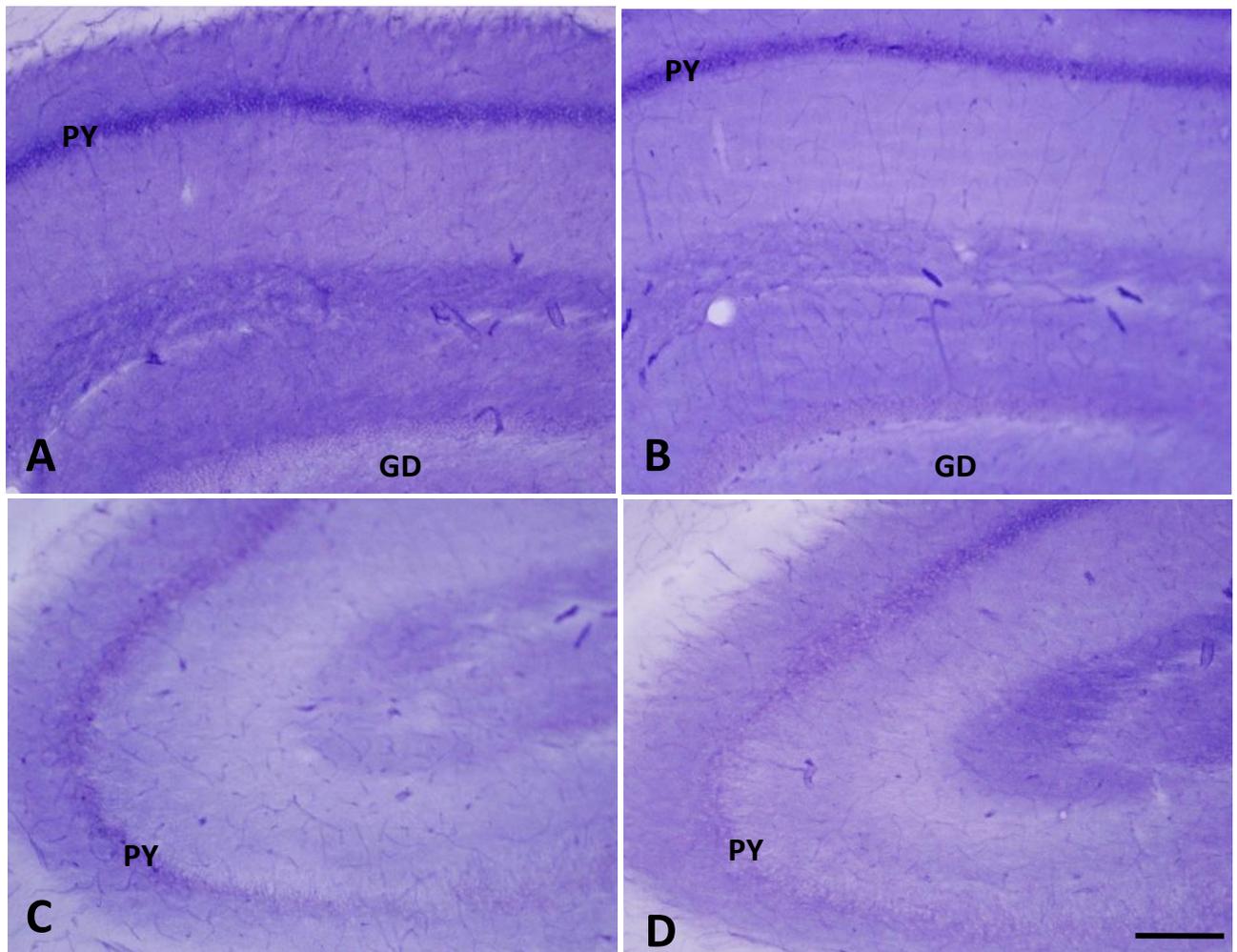


Figura 21 Padrão de marcação da NADPH-d no corno de Ammon de animais do grupo P90 A, C animais SHAM e B, D animais HI. Notar que no animal HI ocorre uma diminuição na intensidade de marcação difusa nas regiões da camada piramidal de CA3 (D) mas não na camada piramidal de CA1 (B), em relação ao grupo SHAM (C e A respectivamente). Barra de Calibração: 200 μ m;

A Figura 4.16 apresenta o número de células NADPHd+ no giro dentado de animais submetidos a HI em comparação com o grupo SHAM em três idades. A ANOVA revelou um aumento no número de células no grupo HI, em relação ao controle SHAM ($F = 78.473$; $gl = 5/24$; $P < 0,0001$), nas três idades avaliadas. O grupo SHAM apresentou um perfil de aumento no número de células de P9 a P23, com estabilização em P90 ($F = 42,662$; $gl = 2/12$; $P < 0,0001$). O grupo HI também apresentou um aumento no número de células de P9 a P23 ($F = 35,911$; $gl = 2/12$; $P < 0,0001$), mas o número de células em P90, apesar de maior que em P9, foi significativamente menor que em P23.

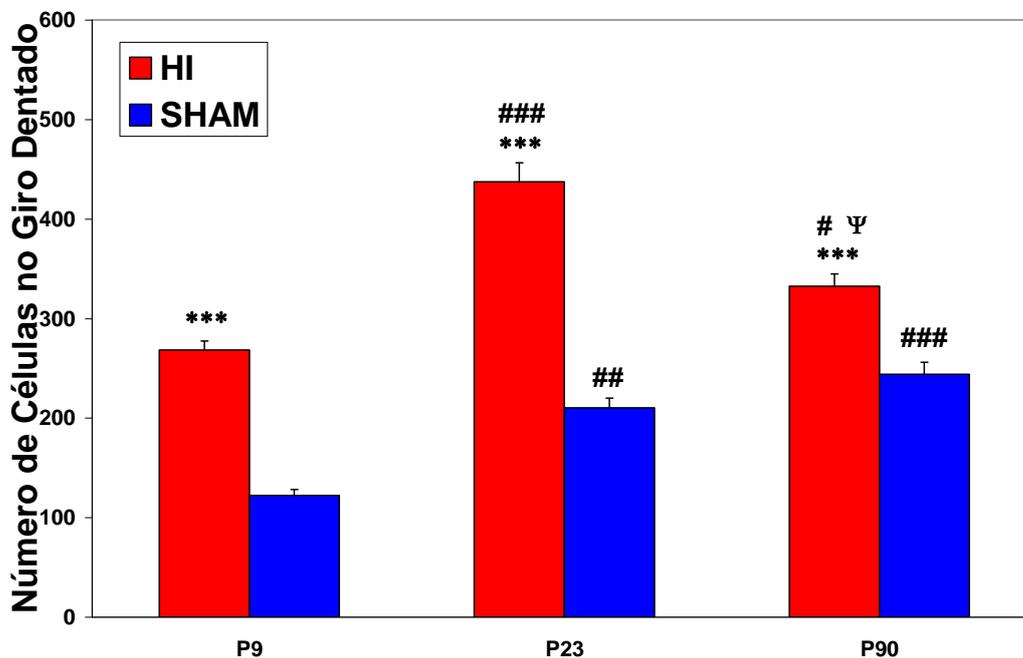


Figura 22 - Número de células NADPH-d+ no giro dentado de animais submetidos a HI em comparação com o grupo SHAM em três idades. Notar que nas três idades avaliadas o grupo HI apresentou um número de células aumentado, em relação ao controle. Notar também que nos dois grupos observamos um aumento do número de células de P9 para P23. Em P90, o número de células NADPH-d+ se estabiliza no grupo SHAM, enquanto no grupo HI observamos uma redução no número de células em relação a P23. Comparações entre os resultados do grupo HI e SHAM em cada idade: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$. Comparações entre o número de células intra-grupo entre P9 e as demais idades: # $P \leq 0,05$; ## $P \leq 0,01$. Comparação entre os resultados obtidos entre P23 e P90: Ψ $P \leq 0,05$. Linhas verticais representam erro padrão da média.

10 DISCUSSÃO

10.1 Considerações gerais

Existem diversos estudos na literatura utilizando modelos animais de HI para a avaliação de lesões encefálicas e suas consequências. No modelo de HI pré-natal, criado por Robinson e colaboradores em 2005 e baseado na oclusão das artérias uterinas em E18 por 15 a 45 minutos, o aporte de oxigênio é diminuído no décimo oitavo dia de gestação. Após a cirurgia de clampeamento das artérias, os animais ainda no útero ficam sob condições inflamatórias geradas pelo organismo da mãe, como o que ocorre em gestações humanas após, e durante, um insulto isquêmico. Em outros modelos de hipóxia pré-natal descritos na literatura, não há a participação de citocinas pró-inflamatórias, que, provavelmente, também influenciam na formação da lesão (Girard e col., 2009). O processo inflamatório gerado a partir da excitotoxicidade leva a morte celular causando mais excitotoxicidade, em um mecanismo de “feedback” positivo.

Em nosso laboratório, já havíamos reproduzido alguns dos resultados morfológicos obtidos por Robinson como a hipomielinização no córtex motor verificada através da diminuição da imunorreatividade para CNPase (Savignon, 2008). No presente trabalho verificamos que houve significativas mudanças funcionais relacionadas à habilidade motora nos animais submetidos a este modelo de HI, confirmando os resultados no teste open-field que Robinson e col. obtiveram (2005). Também foram observadas alterações morfológicas nas regiões compacta e reticulada da substância negra e em algumas regiões do complexo hipocampal, durante o desenvolvimento. Algumas dessas alterações persistiram na idade adulta.

Em outros modelos como, por exemplo, o de oclusão de carótida em P7 criado por Rice e colaboradores (1981), adaptado do modelo de Levine (Levine, 1960), e o de imersão dos cornos uterinos da fêmea em salina em E22, criado por Bjelke e colaboradores (Bjelke e col., 1991), os animais são submetidos ao insulto isquêmico fora do organismo materno. Os dias de escolha para a realização da hipóxia nestes modelos foram baseados no desenvolvimento do SNC dos animais, em comparação com o de humanos. Tem sido proposto que os filhotes de ratos depois de sete dias de nascidos estariam com um desenvolvimento equivalente ao de um bebê humano ao nascer; e que no vigésimo segundo dia de gestação do rato

o desenvolvimento do SNC é similar ao de bebês humanos no momento do parto (Rice, 1981; Bjelke e col., 1991). De acordo com dados na literatura, o padrão de lesão está associado ao estágio de desenvolvimento de quando o insulto ocorreu (Yager, 2004). Até o modelo de HI proposto por Robinson e colaboradores (Robinson e col., 2005), nenhum modelo animal de HI mimetizava os insultos ocorridos no final do segundo terço de gestação humano, que é a principal causa de nascimentos prematuros e de paralisia cerebral (Cummins e col., 1993). Por este motivo, isto é, pelo fato dos animais estarem expostos às condições muito semelhantes ao que ocorre em humanos, escolhemos, para este trabalho, o modelo de HI proposto por Robinson e colaboradores. Existe ainda grande controvérsia nos resultados obtidos nos diferentes trabalhos publicados na literatura e esta pode ser decorrente do fato de que em cada modelo de HI empregado, os insultos isquêmicos ocorrem em momentos diferentes do desenvolvimento. Além disso, estes resultados conflitantes, encontrados nos diferentes modelos animais de hipóxia, podem estar relacionados à ausência de citocinas pró-inflamatórias da mãe (no caso dos modelos de Rice e Bjelke) e da presença da neuroproteção pré-parto, que está provavelmente relacionada à progesterona materna (Sayeed e Stein, 2009), no modelo utilizado por nós.

10.2 Características macroscópicas dos animais submetidos a HI

Em nosso estudo, animais submetidos à HI apresentaram redução na massa corporal ao nascer, em relação ao controle. Não observamos diferenças entre gêneros sexuais. Estas diferenças persistiram em P16, mas não se mantiveram em P23. Ao nascer, os filhotes SHAM são visivelmente maiores que os animais experimentais que, aparentemente, apresentam mais dificuldade em deslocar-se que os controles. A perda ponderal pode ser devida à dificuldade desses animais de se alimentarem, embora não possamos descartar a hipótese de que o insulto isquêmico possa ter provocado alterações na nutrição fetal. Conforme vai se desenvolvendo, o animal HI tem o peso recuperado em relação ao grupo SHAM.

Tem sido proposto que em um ambiente gestacional adverso, fetos humanos e de outros mamíferos respondem à falta de nutrientes com mudanças permanentes em sua estrutura e seu metabolismo (Stocker e col., 2005; Zecchin e col., 2005). Tais modificações, benéficas num primeiro momento, levam ao surgimento de uma

gama de doenças na vida adulta, incluindo hipertensão arterial, acidente vascular cerebral e doença coronariana, afetando diretamente órgãos-alvo como os rins e o coração, caracterizando assim, o processo de programação fetal (Lucas, 1991; Barker e Clark, 1997; Langlely-Evans e col., 2003a,b). Atualmente, sugere-se que a restrição dietética, assim como estados de excesso nutricional durante a gestação e lactação, causaria um aumento do estresse oxidativo durante períodos críticos do desenvolvimento, podendo ser este o principal responsável pelas alterações que levariam à programação fetal. Estudos descrevem que ROS em altas concentrações podem agir tanto diretamente, através da oxidação do DNA e/ou modulando a expressão gênica, quanto indiretamente pela oxidação de lipídeos, induzindo apoptose e influenciando outras moléculas importantes para o desenvolvimento (Luo e col., 2006). As conseqüências do baixo peso ao nascer dos animais HI precisam ser investigadas. É factível supor que muitos problemas metabólicos na vida adulta podem estar relacionados à HI durante a vida intra-uterina e durante o trabalho de parto em humanos. Portanto, novos estudos precisam ser realizados para elucidar esta questão.

Em nosso estudo há ocorrência de animais com plegia (3% dos nascimentos) entre os animais HI, estes animais não foram utilizados para a análise comportamental nem morfológica, porém acompanhamos o seu desenvolvimento até aproximadamente um mês. Os animais HI que nascem com plegia visível, apresentam peso muito menor que a média, e pouca atividade locomotora. No decorrer dos dias, aprendem a se locomover pela caixa, brincam com seus irmãos, e aos 23 dias conseguem se alimentar de ração, juntamente com os demais.

10.3 Efeitos da hipóxia sobre o comportamento motor e a ansiedade

Os resultados obtidos através da análise comportamental forneceram evidências de que animais submetidos à hipóxia isquêmica pré-natal, nas condições estudadas, apresentam déficit motor que persiste até a idade adulta. No ROTAROD, observamos que a latência para queda aumentou ao longo das sucessivas sessões, sugerindo que o treinamento melhora o desempenho dos animais. Os animais apresentaram melhora no desempenho motor ao longo das três sessões, como descrito na literatura (Spandou, 2005). Por outro lado, é factível supor que a melhora no desempenho motor possa estar associada ao fato dos animais apresentarem

habituação ao estresse inicial, provocado pela novidade que é o cilindro giratório, uma vez que ratos apresentam neofobia (Laviola e col., 2004), isto é, têm aversão por estímulos e situações desconhecidas. Por outro lado, o desempenho do grupo SHAM foi significativamente melhor que o do grupo experimental em todas as sessões experimentais, tanto quando mensuramos a latência de queda, quanto quando avaliamos o tempo total de permanência no ROTAROD. A segunda medida foi realizada porque observamos um perfil diferente de queda do cilindro nos dois grupos. Enquanto os animais do grupo SHAM aparentemente saltavam do cilindro giratório, os animais do grupo HI aparentemente caíam do cilindro. A nossa hipótese é que os animais SHAM aprendiam a sair do cilindro e o faziam para evitar o esforço físico ou o estímulo aversivo a que estavam sendo submetidos, enquanto o grupo HI simplesmente não conseguia se manter no cilindro, devido a suas capacidades motoras serem incompatíveis com as condições do teste. Os resultados obtidos demonstram claramente que os animais HI apresentaram desempenho motor inferior ao SHAM, uma vez que para as duas medidas adotadas, observamos diferenças significativas entre os dois grupos. Adicionalmente, embora os animais HI tenham apresentado melhora durante as sessões, jamais alcançaram o desempenho do grupo SHAM. A latência para queda no ROTAROD é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a coordenação motora, postura e equilíbrio em roedores (Bearzatto e col., 2005; Fujimoto e col., 2004; Hunter e col., 2000; Lalonde e 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 ou se tiverem sua resistência física debilitada (Lalonde e Strazielle, 2007). Observamos, inclusive, que alguns animais SHAM aprendiam a saltar do cilindro, o que reduziu dramaticamente sua latência de queda e, aumentou o desvio padrão da média do grupo. Para evitar que o cansaço físico tivesse maior influência no teste, o ROTAROD foi o primeiro dos testes comportamentais realizados por dia de experimento. O teste de campo aberto, extensamente empregado para avaliar

atividade locomotora e ansiedade em roedores (Prut e Belzung, 2003), foi utilizado para investigar estas duas possibilidades.

Os dados obtidos no teste de campo aberto revelaram que o desempenho motor dos animais HI foi significativamente inferior ao do grupo controle SHAM, o que foi consistente com os resultados obtidos no ROTAROD. Em conjunto, os dados sugerem que a capacidade locomotora dos animais HI está reduzida em relação ao controle. Não podemos descartar a hipótese de que esses animais apresentam uma redução do seu estado motivacional, uma vez que observamos que alguns ratos HI simplesmente permaneceram parados na arena, sem que o novo ambiente lhe desperte o comportamento exploratório comum em roedores (para revisão: Alcock, 2003). Por outro lado, tanto o grupo SHAM quanto o experimental deambularam muito mais na região periférica do que no centro da arena. Este resultado permaneceu consistente mesmo quando corrigimos o número de quadrados percorridos pelo total de quadrados na região. Os roedores em geral apresentam agorafobia no sentido literal, isto é, possuem medo inato de locais amplos. Este padrão comportamental é considerado uma estratégia evolutivamente estável porque é extremamente adaptativo, uma vez que roedores apresentam muitos predadores naturais (para revisão: Alcock, 2003). Como um dos mecanismos de defesa anti-predação, roedores tendem evitar locais abertos, que facilitem sua localização pelo predador. Deste modo, a mensuração do número de quadrados percorridos no centro e na periferia permite avaliar o estado de ansiedade dos animais. Os animais HI apresentaram elevado grau de ansiedade, quando sua resposta no teste de campo aberto é comparada com animais que não sofreram nenhuma manipulação (dados não apresentados). No entanto, os animais SHAM exibiram o mesmo padrão de ansiedade, uma vez que nossos dados não demonstraram diferenças significativas entre os animais dos grupos SHAM e HI. Deste modo, é pouco provável que o pior desempenho do grupo HI no ROTAROD tenha sido determinado por um estado de ansiedade aumentado.

Vários modelos animais têm sido utilizados para avaliar a ansiedade, tanto em pesquisas para desenvolver novos fármacos ansiolíticos, quanto para o entendimento dos mecanismos cerebrais envolvidos na ansiedade (Graeff e col., 1999). Dentre esses, o teste do labirinto em cruz elevado é um dos testes mais utilizados *in vivo* (Carobrez e Bertoglio, 2005), por ser econômico, rápido, extremamente funcional e de não requerer procedimentos invasivos ou o uso de

choques elétricos (Pellow e col., 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. Deste modo, os resultados obtidos nesse teste podem ser fortemente influenciados pelas condições ambientais e pelos procedimentos utilizados. Portanto, é essencial que o pesquisador reconheça e controle as diferentes variáveis ambientais quando este teste é utilizado. No presente estudo, o teste do labirinto em cruz elevado foi utilizado como ferramenta para aferir os níveis de ansiedade que os animais submetidos ao modelo de HI apresentaram em P45.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o grupo HI não apresenta níveis de ansiedade diferente dos controles SHAM, sugerindo que o evento de isquemia hipóxia não altera direta ou indiretamente o desenvolvimento de vias ansiogênicas.. Portanto, não podemos descartar a hipótese de que o estresse produzido pelo procedimento cirúrgico a que tanto o grupo HI quanto o SHAM foram submetidos, *per se*, possa ter sensibilizado as vias ansiogênicas dos animais. Novos experimentos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Considerando que os animais HI apresentaram respostas diferentes do SHAM nos testes motores empregados, e que esses efeitos não estão relacionados a diferenças no estado de ansiedade dos animais, sugerimos que o insulto isquêmico produzido pelo modelo utilizado neste estudo provocou perdas motoras importantes. Os resultados obtidos no teste ROTAROD demonstraram que os animais do grupo HI possuem diminuição da atividade motora e menos habilidade para permanecerem no cilindro giratório, mas que apresentam melhora no desempenho motor da primeira para a segunda sessão. No entanto, esses animais experimentais não melhoraram seu desempenho do segundo para o terceiro dia de teste. Por conta do seu caráter aversivo, que pode ser minimizado pela habituação, e por requerer uma habilidade motora, que pode ser melhorada com o treinamento, este teste permite avaliar mais do que o simples desempenho motor (Girard e col., 2009). Os resultados obtidos sugerem que a memória de habituação, a habilidade, e/ou aprendizado motor, podem ter sido preservados após o insulto isquêmico, funções estas que, provavelmente, são independentes da atuação do hipocampo que está

diretamente relacionado à memória explícita. O desempenho inferior obtido pelos animais HI no teste ROTAROD, aparentemente, se deve apenas ao déficit motor demonstrado também com o teste de campo aberto, verificado neste estudo e no trabalho de Robinson e col. (2005), e não a um déficit de memória. Talvez seja possível que o desempenho dos animais experimentais melhore ainda mais, com um maior número de treinamentos. Já foi descrito na literatura que o exercício físico e o enriquecimento ambiental podem recuperar determinados déficits motores e cognitivos (Fischer e col., 2007; Knieling e col., 2009). A provável perda de neurônios e da falta de refinamento das sinapses no córtex cerebral, ocasionadas pela hipóxia (Robinson e col., 2005), pode alterar a eficiência destes animais no desenvolvimento motor, fazendo com que eles necessitem de um tempo maior para alcançar uma melhora no desempenho. Possivelmente, para que ocorra essa recuperação, é preciso que ocorra plasticidade, com a formação de novas sinapses e/ou refinamento das árvores dendríticas. Os animais SHAM têm, *a priori*, seus circuitos intactos, e por isso apresentam desempenho superior no ROTAROD. Por outro lado, o próprio teste ROTAROD poderia funcionar como um fator de enriquecimento ambiental, o que pode ter contribuído para o desempenho do grupo experimental ter aumentado ao longo das sessões.

O controle da motricidade envolve circuitos dopaminérgicos, que integram a via nigroestriatal (Prakash e Wurst, 2006). Evidências na literatura demonstraram que vias mesohipocampais, possivelmente, possuem participação em processos de aprendizado motor e na atenção, entre outras funções (Gasbarri e col., 1997). Em ratos, a destruição seletiva de terminais dopaminérgicos por injeções da neurotoxina catecolaminérgica seletiva 6-OHDA no hipocampo dorsal atenua a hipermotilidade induzida por meta-anfetamina (Itoh e col., 1984). Estes resultados são consistentes com dados prévios que indicam que injeções intra-hipocampais de apomorfina em coelhos aumentam espontaneamente a atividade locomotora exploratória (Smialowski, 1976), e com os estudos de Grecksch e Matthies, em 1981. Os autores demonstraram que injeções de apomorfina intra-hipocampal, após o treinamento, aumentavam a memória em um teste discriminatório e sugeriram que mudanças macromoleculares induzidas pela transmissão dopaminérgica poderiam mediar processos de memória no hipocampo. Porém outros estudos atentam para o fato de que lesões hipocampais não afetam memórias de tarefas discriminatórias simultâneas (Hirsh, 1974; OKeefe e Nadel, 1978). No presente estudo, os dados

comportamentais sugerem que o insulto isquêmico provocou alterações no controle da motricidade. Para investigar esta hipótese, avaliamos os efeitos da HI sobre o desenvolvimento da substância negra.

10.4 Efeitos da hipóxia sobre o desenvolvimento da substância negra

Tem sido descrito na literatura que os neurônios dopaminérgicos são extremamente sensíveis às condições de hipóxia (Przedborski e col., 1991; Bjelke e col., 1991; Gross e col., 2005). Przedborski e colaboradores, em 1991, verificaram o decréscimo na marcação para as duas famílias de receptores dopaminérgicos (D1 e D2), e de transportadores de dopamina, nos locais de lesão após evento isquêmico. No mesmo ano, Bjelke e colaboradores observaram que o número de corpos celulares imunorreativos para TH estava aumentado na substância negra. Gross e colaboradores, em 2005, verificaram que a asfixia produziu um aumento nos níveis de RNAm para TH nas regiões da SN e ATV em diferentes momentos do desenvolvimento. Os resultados do presente estudo são consistentes com estes dados da literatura, uma vez que observamos alterações na substância negra dos animais submetidos a HI: um visível aumento na marcação em neuropilo na substância negra compacta e nas fibras na parte reticulada nos animais experimentais em relação aos animais do grupo SHAM, durante o desenvolvimento, em P16 e P23. Em P16, aparentemente existe uma menor quantidade de corpos de neurônios marcados no grupo experimental. Nesta idade, o sistema dopaminérgico ainda está em desenvolvimento e os neurônios ainda se encontram em migração. Em P23 observamos aumento da imunorreatividade em fibras e neurônios na região reticulada dos animais experimentais, o que sugere um atraso na migração dos neurônios e falta de refinamento das sinapses e dendritos. Em P90, ainda existe um aumento da imunorreatividade na parte compacta dos animais experimentais e diminuição do número de corpos celulares marcados mostrando que, possivelmente, a síntese de dopamina na via nigroestriatal permanece alterada até o amadurecimento do animal. Essas modificações permanentes podem ser decorrentes da tentativa da via nigroestriatal compensar a possível perda de neurônios, aumentando a síntese dopaminérgica. Porém, a lesão causada pela HI pré-natal, aparentemente, afetou o desenvolvimento, atrasando o processo de migração, e conseqüentemente, o evento de morte celular e o refinamento da

região, o que levou às mudanças nesta via de modo irrecuperável, levando às alterações no padrão motor dos animais HI.

Uma vez que o aprendizado motor envolve o hipocampo, avaliamos a marcação para a NADPH-d no hipocampo para investigar se a HI promoveu alterações e se estas persistem na idade adulta.

10.5 Efeito da hipóxia sobre o NO no hipocampo

Dados epidemiológicos mostram que crianças submetidas a um insulto isquêmico durante a gestação podem desenvolver, mais tarde, epilepsia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), déficit de aprendizado e de memória e transtornos motores, tais como os associados a paralisia cerebral (Vanucci, 1997). Considerando-se a prevalência elevada da HI, que é uma das principais causas, se não a maior, de prejuízos entre os neonatos (Nelson, 2003), e as conseqüências para a qualidade de vida das pessoas (Nelson e Chang, 2008), é importante entender a relação entre o insulto isquêmico pré-natal e as alterações cerebrais subjacentes às alterações na motricidade, no aprendizado e memória.

Como já descrito na literatura, estresse durante a gravidez pode gerar alterações na morfologia, como por exemplo, lesões em regiões hipocampais, através da perda de neurônios piramidais (McEwen e col., 1999; Souza e col., 2000). Estudos prévios têm indicado que a maioria das células piramidais começa a ser gerada em E17, e que este evento se estende até E19 (Schlessinger e col., 1978; Bayer, 1980; Altman e Bayer, 1990). Portanto, a hipóxia realizada em nosso estudo, em E18, provavelmente compromete o processo de amadurecimento do principal tipo morfológico de neurônio hipocampal.

Nas três idades estudadas, P9, P23 e P90, houve um aumento para marcação de células NADPH-d positivas no giro dentado nos animais HI em relação ao grupo SHAM. As alterações em CA1 e CA3 foram diferentes para cada idade. Em P9 as regiões CA1 e CA3 dos animais SHAM possuem uma marcação menos intensa do que nos animais experimentais, demonstrando que tanto no giro dentado como no corno de Ammon dos animais HI P9 a produção de NO está alterada. A marcação em vasos é intensa nos dois grupos, mas é maior no grupo experimental sugerindo que há aumento na atividade da eNOS, provavelmente como conseqüência do evento de hipóxia. A eNOS no cérebro está envolvida em

situações de isquemia, e com a formação de “áreas de penumbra” (Sallustio e col., 2007). Em P23 o número de células NADPH-d positivas no grupo HI foi maior do que no grupo SHAM. Porém a marcação no corno de Ammon foi mais fraca no grupo experimental, e a marcação em vasos foi menor. O mesmo ocorreu na idade de P90 com a diferença que a marcação nos dois grupos é mais difusa. O animal experimental ainda apresentou um número de células NADPH-d positivas maior no giro dentado, mas existe uma considerável diminuição em relação ao animal experimental com 23 dias. A marcação em vasos no animal P90 é muito menor em ambos os grupos.

As alterações observadas na marcação para NADPH-d nas regiões do corno de Ammon nas três idades estudadas, isto é um aumento na marcação em P9 e depois um decréscimo na marcação nas idades de P23 e P90, precisam ser investigadas. Uma vez que esta região representa o substrato estrutural para mecanismos envolvidos nos processos de aprendizado e memória. Portanto, é necessária a utilização de testes comportamentais mais adequados para a análise do aprendizado e da memória associados com essas regiões hipocâmpais. No caso, testes que avaliem memória de curto prazo, como a memória espacial. É conhecido que os resultados destes testes refletem funcionalidade da memória episódica e requerem interação entre a região CA1, CA3 e o giro dentado através das fibras musgosas (Kesner, 2007).

O número elevado de células NADPH-d positivas nos animais HI nas três idades observadas pode ser decorrente da atividade das três isoformas da NOS: a neuronal, a induzível e a endotelial. Foi observado que em animais experimentais as células marcadas possuíam morfologia diferente, além dos tipos morfológicos celulares encontrados no animal SHAM. O número de células pode ter sido alterado pela presença de microglia e astrócitos, comuns em estados inflamatórios. Entretanto, observamos, um aumento específico no número de neurônios piramidais marcados para NADPHd, em relação ao grupo SHAM, no GD. Os neurônios piramidais são conhecidamente excitatórios, isto é, glutamatérgicos. O fato de estes neurônios estarem em maior número, ou de expressarem aumento de marcação para NADPHd, sugere que existe um aumento da atividade do sistema NO-glutamato-NMDA nesta região. O NO funciona como neurotransmissor reverso (Stahl, 2002; Susswein e col., 2004; Simon e col., 2007), ou seja, é produzido pela nNOS e liberado pelo neurônio pós-sináptico. A nNOS é ativada pelo sistema Ca^{2+} -

calmodulina em resposta ao influxo de cálcio provocado pela ativação dos receptores NMDA glutamatérgicos. Uma vez produzido, o NO difunde-se livremente e atua na célula pré-sináptica glutamatérgica, promovendo liberação de mais glutamato, fechando o circuito de *feedback* positivo. Deste modo, o aumento na marcação para NOS no giro dentado, que ocorreu no grupo HI em comparação com o SHAM, nas idades de P9 a P90, pode refletir um aumento na atividade deste sistema excitatório, que está relacionado tanto a LTP, quanto à excitotoxicidade, isto é apoptose, por ativação ulterior das caspases (para revisão: Stahl, 2002).

Por outro lado, não podemos descartar a hipótese da presença de astrócitos e microglia expressando a NADPH-d, além dos neurônios NADPH-d+, que é consistente com a hipótese da persistência de um processo inflamatório na região. Se esta hipótese estiver correta, o insulto isquêmico em E18 provocou direta ou indiretamente uma reação inflamatória que persiste até a idade adulta, provavelmente por ativar mecanismos de feedback positivos, que podem envolver o sistema NO e receptores NMDA glutamatérgicos. A ativação do sistema NO-glutamato-NMDA pode gerar mais lesão neuronal, mais liberação de mediadores inflamatórios tais como citocinas e, portanto, mais inflamação. A redução da marcação no corno de Ammon nos animais HI, em P23 e em P90, sugere uma recuperação da região, por mecanismos neuroprotetores cujo efeito foi observado apenas quando os animais alcançaram a maturidade do SNC. Novos estudos se fazem necessários para investigar esta hipótese e explicar o papel deste fenômeno na fisiopatologia da lesão provocada pela HI.

O hipocampo é uma estrutura que recebe aferências de quase todo o cérebro. Tem sido demonstrado que neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e da substância negra compacta projetam-se para o hipocampo, que possui receptores para dopamina. O papel dessas projeções dopaminérgicas para o hipocampo ainda é controverso, mas é factível que parte da habilidade motora dos animais, relacionada ao aprendizado, pode estar relacionada a estes circuitos neurais (Muzzio e col., 2009). Outro aspecto que pode ser de grande valor no estudo das vias mesohipocampais é que estas podem ter grande relevância em doenças neurodegenerativas associadas com a perda de memória, como a esquizofrenia e Alzheimer. Pacientes com doença de Parkinson, antes de desenvolverem perda motora, também relatam perda de memória (Tadaiesky e col., 2008). O déficit motor ocorre quando mais de 60% dos neurônios dopaminérgicos foram perdidos, e de 60

a 80 % de dopamina foi reduzida no estriado. Também é factível supor que quando a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra for suficiente para afetar o controle motor no estriado, os efeitos sobre a via dopamino-hipocampal poderão ser ainda mais dramáticos.

As lesões provocadas pela HI podem modificar a funcionalidade do sistema nigro-hipocampal, com efeitos relevantes sobre a atenção e, portanto, sobre a memória e o aprendizado. Novos estudos precisam ser desenvolvidos para testar esta hipótese.

10.6 Considerações finais

Os resultados do presente estudo mostram uma dramática redução do desempenho motor nos testes ROTAROD e campo aberto associada com as alterações na expressão da TH, na substância negra, e da NADPH-d, no hipocampo, sugerindo que o insulto isquêmico em E18 provocou alterações morfofuncionais permanentes nos animais. Além disso, assim como ocorre no insulto isquêmico produzido pela hipóxia pré-natal em humanos, o modelo de HI utilizado em nosso estudo produz um conjunto de lesões difusas, extremamente variáveis. Observamos desde ratos com desenvolvimento aparentemente normal, como aqueles com plegias incapacitantes.

A alteração na marcação para NADPH-d encontrada por nós no hipocampo dos animais HI pode estar correlacionada com déficits cognitivos descritos na literatura. O hipocampo está altamente envolvido no armazenamento, codificação e recuperação da memória explícita, como a memória espacial. Uma das características importantes deste processo é que este requer um componente de atenção. Não há conhecimento, ainda, sobre os mecanismos pelos quais o processo de atenção modula a estocagem e outras funções de memória hipocampo-dependente. Sabe-se que em parte existe o envolvimento da dopamina atuando através de receptores D1/D5 (Muzzio e col., 2009). Como já dito anteriormente, é descrito na literatura que crianças que passam por um evento de HI desenvolvem entre outros problemas, déficit de atenção e problemas de aprendizado. Em nosso estudo verificamos que em nosso modelo, animais que passam por este mesmo evento possuem alterações dopaminérgicas na substância negra e nitrérgicas no hipocampo. Novos estudos se fazem necessários para analisar o envolvimento

desses sistemas no déficit cognitivo, utilizando protocolos comportamentais que estão diretamente relacionados com a via mesohipocampal.

Deste modo, propomos que o modelo experimental utilizado neste estudo funciona como uma ferramenta valiosa para o entendimento das lesões no SNC, decorrentes da hipóxia pré-natal; e, sobretudo, para o desenvolvimento de procedimentos clínicos com o fim de prevenir ou minimizar as seqüelas deste evento.

11 CONCLUSÕES

O presente estudo concluiu que:

1. Ratos submetidos ao modelo de clampeamento das artérias uterinas, em E18, apresentam alterações estruturais do sistema dopaminérgico na região da substância negra compacta e reticulada. Também foram observadas modificações na distribuição da NADPHd no complexo hipocampal. Estas alterações foram observadas no desenvolvimento, e algumas destas foram permanentes até a idade adulta.

2. A HI pré-natal foi capaz de reduzir a motricidade dos animais experimentais. Este resultado foi verificado em dois testes comportamentais: o teste de campo aberto e o ROTAROD. Acreditamos que este déficit pode ser decorrente das alterações morfológicas encontradas na substância negra.

3. Os animais HI não apresentaram maior nível de ansiedade em relação ao grupo SHAM, descartando a hipótese de as alterações observadas nos testes de motricidade estar relacionadas a fatores ansiogênicos.

4. O modelo de clampeamento das artérias uterinas da fêmea se mostrou uma ferramenta importante no estudo das alterações decorrentes do evento de HI pré-natal, por produzir diversos resultados que são similares aos ocorridos em neonatos que passam por este evento.

REFERÊNCIAS

- Aberg E, Perlmann T, Olson L, Brené S. Running increases neurogenesis without retinoic acid receptor activation in the adult mouse dentate gyrus. *Hippocampus*. v.18, n.8, p.785-92. 2008
- Abreu-Villaca, Y, Nunes F, Queiroz-Gomes F, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, v.33, n.3, Feb, p.599-610. 2008.
- Addy, NA, Pocivavsek A, Levin ED. Reversal of clozapine effects on working memory in rats with fimbria-fornix lesions. *Neuropsychopharmacology*, v.30, n.6, Jun, p.1121-7. 2005.
- Alcock, J. In: *Animal Behavior. An evolutionary approach*. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. Fifth edition. 2003
- Altman DI, Young RSK, Yagel SK. Effects of dexamethasone in hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol Neonate*. v. 46, p.149–156. 1984.
- Altman J, Bayer SA. Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol*. v. 301, n.3, p.343-64. 1990.
- Amaral D, Lavenex P, Andersen P, Morris R, Bliss T, O'Keefe J. Ch 3: Hippocampal Neuroanatomy. *The Hippocampus Book*, Oxford University Press 2006.
- Andersson K, Blum M, Chen Y, Eneroth P, Gross J, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Bolme P, Diaz R, Jamison L, e col. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport*. v.26; n.6(2), Jan, p.375-8. 1995.
- Back S, 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*. v. 21, n.4, p.1302– 1312. 2001.
- Baldessarini RJ e Tarazi FI. In: *Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. XI Edição. Ed. McGraw-Hill. São Paulo. p. 411-446. 2007.
- Baratti CM e Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem*, v.65, n.3, May, p.197-201. 1996.
- Barbin G, Garbarg M, Schwartz JC, Storm-Mathisen J. Histamine synthesizing afferents to the hippocampal region. *J Neurochem*, v.26, n.2, Feb, p.259-63. 1976.
- Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod*. v. 2, p. 105-112. 1997.

Barks JDE, Post M, Tuor UI. Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res.* v.29, p.558–563. 1991.

Baud O, Emilie D, Pelletier E, Lacaze-Masmontiel T, Zupan V, Fernandez H, Dehan M, Frydman R, Ville Y. Amniotic fluid concentrations of interleukin-1h, interleukin-6 and TNFa in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* v. 106, p. 72– 77. 1999.

Bayer SA. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. *J Comp Neurol*, v.194, n.4, Dec 15, p.845-75. 1980.

Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp. Brain Res.* v. 105, p. 191–199. 1995.

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

Ben-Jonathan N. e Hnasko R. Dopamine as a prolactin inhibitor. *Endocr. Rev.* v. 22, p. 724–763. 2001.

Bishop A e Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology.* v. 208, p. 193-205. 2005.

Bitran, D., Hull, E.M., Holmes, G.M., Lookingland, K.J. Regulation of male rat copulatory behavior by preoptic incertohypothalamic dopamine neurons. *Brain Res. Bull.* v.20, p. 323-331. 1988.

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*, v.543, n.1, Mar 8, p.1-9. 1991.

Bolanos JP e Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta*, v.1411, n.2-3, May 5, p.415-36. 1999.

Brandão M L. *Em Psicofisiologia.* Ed. Atheneu, São Paulo. 1995.

Bredt DS e Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 2, n. 87, p. 682-685. 1990.

Brooks, S. P. e S. B. Dunnett. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*, v.10, n.7, Jul, p.519-29. 2009.

Burke RE, J Kent, 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*, v.58, n.2, Feb 22, p.171-9. 1991.

Burke RE. Ontogenic cell death in the nigrostriatal system. *Cell Tissue Res*, v.318, n.1, Oct, p.63-72. 2004.

Buzsáki G. Theta Oscillations in the hippocampus. *Neuron*.v. 33, p. 1-20. 2002

Byrne J.H. Cellular analysis of associative learning. *Physiol Rev*. v. 67, p. 329 – 439. 1987.

Campbell S e MacQueen G. The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J. Psychiatry Neurosci*. v. 29, n. 6, p. 417-426. 2004.

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

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev*, v.25, n.3, May, p.235-60. 2001.

Cummins SK, Nelson KB, Grether JK, Velie, E.M. Cerebral palsy in four northern California counties, births 1983–1985. *J. Pediatr*. v. 123, p. 230– 237. 1993

Dahlström A e Fuxe K. Monoamines and the pituitary gland. *Acta Endocrinol*. v. 51, p. 301–314. 1966.

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

Damsma G, Pfaus JG, Wenkstern D, Phillips AG, Fibiger HC. Sexual behaviour increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Sci*. v. 1056, n. 1, p.181-191. 1992.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.20, Sep 28, p.11619-24. 1999.

Dunham, N. W. e T. S. Miya. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)*, v.46, n.3, Mar, p.208-9. 1957.

Di Porzio U, Zuddas A, Cosenza-Murphy DB, Barker J. L. Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the mesencephalon of mouse embryos. *Int. J. Dev. Neurosci*. v. 8, p. 523–532. 1990.

Du Plessis AJ, Johnston MV. Hypoxic–ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection, *Clin. Perinatol*. v. 24, p. 627– 654. 1997.

Edwards TM e Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev.* v. 3, n. 31, p. 413-25. 2007.

Emson, P. C. Peptides as neurotransmitter candidates in the mammalian CNS. *Prog. Neurobiol.* v. 13, p. 61-116. 1979.

Ferriero D.M., Arcavi L.J., Sagar S.M., McIntosh T.K., Simon R.P. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* v. 24, p. 670–676. 1988.

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.* v.38, n.6, Dec, p.912-8. 1995.

Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, v.447, n.7141, May 10, p.178-82. 2007.

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.* v. 94, p. 81–91. 1996.

Flores C, Stewart J, Salmaso N, Zhang Y, Boksa P. Astrocytic basic fibroblast growth factor expression in dopaminergic regions after perinatal anoxia. *Biol Psychiatry*, v.52, n.4, Aug 15, p.362-70. 2002.

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.* v. 28, n. 4, Jul, p. 365-378. 2004.

Fullerton HJ, Ditelberg JS, Chen SF, Sarco DP, Chan PH, Epstein CJ, Ferriero DM. Copper/zinc superoxide dismutase transgenic brain accumulates hydrogen peroxide after perinatal hypoxia ischemia. *Ann Neurol*, v.44, n.3, Sep, p.357-64. 1998.

Furchgott, R. F. e J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.

Gasbarri A, Sulli A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v.21, n.1, Jan, p.1-22. 1997.

German DC e Manaye KF. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol*, v.331, n.3, May 15, p.297-309. 1993.

Girard S, Kadhim H, Beaudet N, Sarret P, Sebire G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal

hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*, v.158, n.2, Jan 23, p.673-82. 2009.

Giuliani, D. e F. Ferrari. Differential behavioral response to dopamine D2 agonists by sexually naive, sexually active, and sexually inactive male rats. *Behav Neurosci*, v.110, n.4, Aug, p.802-8. 1996.

Giuliano, F. e J. Allard. Dopamine and male sexual function. *Eur Urol*, v.40, n.6, Dec, p.601-8. 2001.

Gordon, K. E., J. Simpson, Statman D, Silverstein FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke*, v.22, n.7, Jul, p.928-32. 1991.

Graeff FG, Guimarães FS, Zuardi AW Em: Fundamentos de Psicofarmacologia. Ed. Atheneu, São Paulo, Brasil, c. 5, p.69-92, 1999.

Grecksch G e H Matthies. Differential effects of intrahippocampally or systemically applied picrotoxin on memory consolidation in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, v.14, n.5, May, p.613-6. 1981.

Gross J, A Lun, Berndt C. Early postnatal hypoxia induces long-term changes in the dopaminergic system in rats. *J Neural Transm Gen Sect*, v.93, n.2, p.109-21. 1993.

Gross J, Andersson K, Chen Y, Müller I, Andreeva N, Herrera-Marschitz M. Effect of perinatal asphyxia on tyrosine hydroxylase and D2 and D1 dopamine receptor mRNA levels expressed during early postnatal development in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, v.134, n.2, Apr 4, p.275-81. 2005.

Gunn AJ, Mydlar T, Bennet L, Faul RLM, Gorter S, Cook C, Johnston BM, Gluckman PD. The neuroprotective actions of a calcium channel antagonist, flunarizine, in the infant rat. *Pediatr Res*. v. 25, p. 573–576. 1989.

Hagberg H, Gilland E, Diemer N-H, Andine P. Hypoxiaischemia in the neonatal rat brain: histopathology after posttreatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol Neonate*. v. 66, p. 205–213. 1994.

Hamada Y, Hayakawa T, Hattori H, Mikawa H. Inhibitor of nitric oxide synthesis reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res*, v.35, n.1, Jan, p.10-4. 1994.

Hirsh R. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory. *Behav Biol*, v.12, n.4, Dec, p.421-44. 1974.

Hnasko TS, Hnasko RM, Sotak Bn, Kapu RP, Palmiter RD. Genetic disruption of dopamine production results in pituitary adenomas and severe prolactinemia. *Neuroendocrinology*, v.86, n.1, p.48-57. 2007.

Hope BT, Michael GJ, Knigger KM, Vincent SR Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natn Acad. Sci. USA*. v. 88, p. 2811-2814.

Hull EM, Du J, Lorrains DS, Matuszewich L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res. Bull.* v. 44, n. 4, p. 327-333. 1997;

Hull EM, Lumley LA, Matuszewich L, Dominguez J, Moses J, Lorrain DS. The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacol.* v. 33, n. 11, p. 1499-1504. 1994.

Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology.* v. 39, n. 5, p. 806-816. 2000.

Irvine, J. C., R. H. Ritchie, e col. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci*, v.29, n.12, Dec, p.601-8. 2008.

Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen AS, Kavanaugh B, Coulter DA, Grinspan JB, Pleasure D. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem*, v.81, n.2, Apr, p.390-402. 2002.

Itoh K, Fukumori R, Suzuki Y. Effect of methamphetamine on the locomotor activity in the 6-OHDA dorsal hippocampus lesioned rat. *Life Sci*, v.34, n.9, Feb 27, p.827-33. 1984.

Itoh M e Uchmura H. Regional differences in cofactor saturation of glutamate descarboxylase (GAD) in discrete brain nuclei of the rat. Effect of repeated administration of haloperidol on GAD activity in the substantia nigra. *Neurochem. Res.* Dec; v. 6, n. 12, p. 1283-9. 1981

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

Katzof A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ. Nitric oxide is necessary for multiply process after learning that a food is inedible in *Aplysia*. *Neurosci.* v. 22, p. 9581 – 9594. 2002

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.* v. 60, p. 725–732. 2000.

Kawano H., Ohyama K., Kawamura K. and Nagatsu I. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Dev. Brain Res.* v. 86, p. 101–113. 1995.

Kemenes I, Kemenes G, Andrew RJ, Benjamin PM, O’Shea M. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J Neurosci*, v.22, n.4, Feb 15, p.1414-25. 2002.

Kendrick KMR, Guevara-Guzman, Zorrilla, Hinton J, Broad MR, Mimmack KD, Ohkura MS. Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide. *Nature*, v.388, n.6643, Aug 14, p.670-4. 1997.

Kesner RP. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem*, v.14, n.11, Nov, p.771-81. 2007.

Kholodilov N, Yarygina O, Oo TF, Zhang H, Sulzer D., Dauer W, Burke RE. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *J. Neurosci.* v. 24, p. 3136–3146. 2004.

Kinney H, Back S. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin. Pediatr. Neurol.* v. 3, p. 180–189. 1985.

Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, v.26, n.4, Jun, p.457-70. 2002.

Kobori, N e Dash PK. Reversal of brain injury-induced prefrontal glutamic acid decarboxylase expression and working memory deficits by D1 receptor antagonism. *J Neurosci*, v.26, n.16, Apr 19, p.4236-46. 2006.

Klockgether T. Parkinson's disease: clinical aspects. *Cell Tissue Res*, v.318, n.1, Oct, p.115-20. 2004.

Knieling M, Metz GA, Antonow-Schlorke I, Witte OW. Enriched environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*, v.163, n.3, Oct 20, p.759-69. 2009.

Kostic VS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Cadet JL, Burke RE. Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain injury on striatal dopamine uptake sites and D1 and D2 receptors in adult rats. *Neurosci Lett*, v.129, n.2, Aug 19, p.197-200. 1991.

Kriegstein K. Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tissue Res*, v.318, n.1, Oct, p.73-80. 2004.

Kumer SC, Vrana, KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J. Neurochemistry.* v.67, n. 2, p.443-461. 1996.

Lalonde R e Strazielle C. Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfunctions: behavior and neurochemistry. *Brain Res*, v.1140, Apr 6, p.51-74. 2007.

Langley-Evans AJ e Langley-Evans SC. Relationship between maternal nutrient intakes in early and late pregnancy and infants weight and proportions at birth: prospective cohort study. *J R Soc Promot Health.* v. 123, n. 4, p. 210-216. 2003. - a

Langley-Evans SC, Langley-Evans AJ, Marchand MC. Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch Physiol Biochem* v. 111, p. 8-16. 2003. - b

Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology (Berl)*. v. 175, n. 2, p. 196-205. 2004.

Leveque J, Macias W, Rajadhyaksha A, Carlson RR, Barczak A, Kang S, Li X, Ccoyle JT, Haganir RL, Heckers S, Konradi C. Intracellular modulation of NMDA receptor function by antipsychotic drugs. *J. Neurosci*. v.20, n.11, p.4011-4020. 2000.

Levine S. Hypoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol*. v. 36, Jan, p. 1-17. 1960.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. v. 156, p. 38-50. 1991.

Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong, X, Walker M. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses*. v. 66, p. 38-44. 2006.

Machado A. in: *Neuroanatomia Funcional*. 2ª. Edição. Capítulo 27. Editora atheneu, São Paulo. 1991

Marin-Padilla, M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage: II. white matter lesions of the neocortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. v. 56, n. 3, p. 219–235. 1997.

Marin-Padilla, M. Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage: III. gray matter lesions of the neocortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. v. 58, n. 5, p. 407–429. 1999.

Marin-Padilla, M. Perinatal brain damage, cortical reorganization (acquired cortical dysplasias), and epilepsy. *Neocortical Epilepsies*. v. 84, p. 153– 172. 2000.

McDonald JW, Silverstein FS, Johnston MV. MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *Eur J Pharmacol*. v. 40, p. 359–361. 1987.

McEwen BS, de Leon MJ, Lupien SJ, Meaney M.J. Corticosteroids, the aging brain and cognition. *Trends Endocrinol Metab*. v. 10, p. 92 –96. 1999.

Meffert, MK, Calakos NC, Scheller RH, Schulman H. Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking fusion reactions. *Neuron*, v.16, n.6, Jun, p.1229-36. 1996.

Milner B, Squire LR, Kandel E.R. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20: 445 -468. 1998.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension*. v.12; p. 365-372. 1988.

Moritz GC, Tenório F, Allodi S, Mendez-Otero R. Expression of Nitric Oxide synthase in the developing rat hippocampus. *Neuroscience letters*. v. 263, p. 89-92. 1999.

Muzzio IA, Kentros C, Kandel E. What is remembered? Role of attention on the encoding and retrieval of hippocampal representations. *J Physiol*, v.587, n.Pt 12, Jun 15, p.2837-54. 2009.

Nelson KB. Can we prevent cerebral palsy? *N Engl J Med*. v. 349, n. 18, p. 1765–1769. 2003.

Nelson K, Grether J, Dambrosia J, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, Nelson P, Dickens B, Phillips T. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr. Res*. v. 53, n. 4, p. 600–607 . 2003.

Nelson KB e Chang T. Is cerebral palsy preventable? *Curr Opin Neurol*. v. 21, n. 2, p. 129–135. 2008.

O'Keefe J e Nadel L. in: *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press. 1978.

Okere CO e Kaba H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice. *Eur J Neurosci*, v.12, n.12, Dec, p.4552-6. 2000.

Okere CO, Kaba H, Higuchi T. Formation of an olfactory recognition memory in mice: reassessment of the role of nitric oxide. *Neuroscience*, v.71, n.2, Mar, p.349-54. 1996.

Olsen RW. Gaba and inhibitory synaptic transmission in the brain. *Semi.Neurosc*. v. 3, p. 175-181. 1991.

Oo TF, Kholodilov N, Burke RE. Regulation of natural cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra by striatal glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *J. Neurosci*. v. 23, p. 5141–5148. 2003.

Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DE. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res*. v. 33, p. 405–411. 1993.

Pannu, R. e I. Singh. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochem Int*, v.49, n.2, Jul, p.170-82. 2006.

Parra P, Gulyas AI, Miles R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron*, v.20, n.5, May, p.983-93. 1998.

Paxinos G e Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York. 1998.

- Pehek EA, Warner RK, Bazett TJ, Bitran D, Band LC, Eaton RC, Hull EM. Microinjection of cis-flupenthixol, a dopamine antagonist, into the medial preoptic area impairs sexual behavior of male rats. *Brain Res.* v. 443, p. 70-76. 1988.
- 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.* v. 14, n. 3, Aug, p. 149-67. 1985
- Pinto VL, Brunini TM, Ferraz MR, Okinga A, Mendes-Ribeiro AC. Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxid *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* v. 6, n. 2, Apr, p. 142-149. 2008.
- Prakash N e Wurst W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci,* v.63, n.2, Jan, p.187-206. 2006.
- Prut L e Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol,* v.463, n.1-3, Feb 28, p.3-33. 2003.
- Przedborski S, Kostic V, Lewis VJ, Cadet JL, Burke RE Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain injury in the rat on Dopamine D1 and D2 receptors and uptake sites: a quantitative autoradiographic study. *Journal of Neurochem.* v. 57, n. 6, Dec, p. 1951-61. 1991.
- Pundik S, Robinson S, Lust WD, Zechel J, Buczek M, Selman WR. Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient. *Metabolic Brain Disease.* v. 21, n. 4, p. 309-317. 2006.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. In: Rang e Dale *Farmacologia.* VI Edição. Ed. Elsevier. 2007.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* v. 9, p. 131–141. 1981.
- Riddle R e Pollock J. D. Making connections: the development of mesencephalic dopaminergic neurons. *Dev. Brain Res.* v. 147, p. 3–21. 2003.
- Robertson JD, Bonaventura J, Kohm A, Hiscat M. Nitric Oxide is necessary for visual learning in *Octopus vulgaris.* *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* v. 263, p. 1731 – 1743. 1996.
- Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, DeChant AD, Tabrizi N, Bucek M, Lust D, Miller RH. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol. Dis.* v. 18, p. 568-581. 2005.
- 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.* v. 592, p. 17–28. 1992.

Sallustio, F., M. Diomedei, Centonze D, Satanzione P. Saving the ischemic penumbra: potential role for statins and phosphodiesterase inhibitors. *Curr Vasc Pharmacol*, v.5, n.4, Oct, p.259-65. 2007.

Samama, B. e Boehm N. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiol Learn Mem*, v.71, n.2, Mar, p.219-31. 1999.

Savignon T. Efeitos da lesão por hypoxia-isquemia pré-natal sobre o desenvolvimento do sistema motor: córtex e cerebelo. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. 2008.

Sayeed I e Stein DG. Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog Brain Res*, v.175, p.219-37. 2009.

Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S. Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neurosci Lett*, v.18, n.2, Jun, p.125-31. 1980.

Schlessinger AR, WM Cowan, Swanson LW. The time of origin of neurons in Ammon's horn and the associated retrohippocampal fields. *Anat Embryol (Berl)*, v.154, n.2, Aug 18, p.153-73. 1978.

Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008.

Schuman EM e Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, v.254, n.5037, Dec 6, p.1503-6. 1991.

Seidler FJ, Slotkin TA. Effects of acute hypoxia on neonatal rat brain: regionally selective, long-term alterations in catecholamine levels and turnover, *Brain Res. Bull.* v. 24, p. 157–161. 1990.

Sesack SR e Carr DB. Selective prefrontal cortex inputs to dopamine cells: implications for schizophrenia. *Physiol. Behav.* v. 77, p. 513–517. 2002.

Shors TJ e Matzel LD. Long-term potentiation: what's learning got to do with it? *Behav Brain Sci*, v.20, n.4, Dec, p.597-614; discussion 614-55. 1997.

Siegel S. In: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Ed. McGraw-Hill, New York. 1956.

Silverstein FS, Naik B, Simpson J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: An in vivo microdialysis study. *Pediatr Res.* v. 30, p. 587–590. 1991.

Silverstein FS e Johnston MV. Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol.* v. 15, p. 342–347. 1984.

Simon BA, Moody EJ, Johns RA. In: Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. XI Edição. Ed. McGraw-Hill. São Paulo. p. 347-358. 2007.

Skagerberg G, Lindvall O, Bjorklund A. Origin, course and termination of the mesohabenular dopamine pathway in the rat. *Brain Res*, v.307, n.1-2, Jul 30, p.99-108. 1984.

Skidgel RA, Erdös EG. In: Goodman e Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. XI Edição. Ed. McGraw-Hill. São Paulo. P. 563-584. 2007.

Sloper JJ, Johnson P, Powell TPS. Selective degeneration of interneurons in the motor cortex of infant monkeys following controlled hypoxia: a possible cause of epilepsy. *Brain Res*. v. 198, p. 204-209. 1980.

Smeets WJ e Gonzalez A. Catecholamine systems in the brains of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res. Brain Res. Rev.* v. 33, p. 308–379. 2000.

Smeets WJ e Reiner A. Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates, Cambridge University Press, Cambridge. 1994.

Smialowski A. The effect of intrahippocampal administration of dopamine or apomorphine on EEG of limbic structures in the rabbit brain. *Pol J Pharmacol Pharm*, v.28, n.6, Nov-Dec, p.579-85. 1976.

Smidt MP, Smits SM, Burbach J. P. H. Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur. J. Pharmacol.* v. 480, p. 75–88. 2003.

Son H, Hawkins RD, Martin K, Kiebler M, Huang PL, Fishman MC Kandel ER. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87: 1015 – 1023. 1996

Souza N., Lukoyanov N.V., Madeira M.D., Almeida O.F.X., Paula-Barbosa M.M. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience*. v. 97, p. 253 – 66. 2000.

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*, v.1045, n.1-2, May 31, p.22-30. 2005.

Stahl SM. In: *Psicofarmacologia, Bases neurocientíficas e aplicações práticas*. 2nd. Ed., Ed. Medsci, Rio de Janeiro, Brasil, c.10, p. 357-390, 2002.

Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne M.A. Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc*, v.64, n.2, May, p.143-51. 2005.

Storm-Mathisen J. Localization of putative transmitters in the hippocampal formation: with a note on the connections to septum and hypothalamus. Ciba Found Symp, n.58, p.49-86. 1977.

Straughan DW. Neurotransmitters and the hippocampus. In: The hippocampus. Vol. I. Structure and development, R. L. Isaacson and K. H. Pribram (Eds.), Plenum Press, New York. 1975.

Susswein AJ, Katzoff A, Miller N, Hurwitz I. Nitric oxide and memory. Neuroscientist, v.10, n.2, Apr, p.153-62. 2004.

Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. Brain Res Bull, v.9, n.1-6, Jul-Dec, p.321-53. 1982.

Tadaiesky MT, Dombrowski PA, Figueiredo CP, Cargnin-Ferreira E, da Cunha C., Takahashi D.R. N. Emotional cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage modelo of Parkinson's disease. Neuroscience 156: 830-840. 2008.

Tang YP, Shimizu E, Bangal MW, Carew TJ. Molecular mechanism underlying a unique intermediate phase of memory in *Aplysa*. Neuron 19: 143 – 154. 1999

Thornberry NA, Rano TA, Peterson E P, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. J Biol Chem, v.272, n.29, Jul 18, p.17907-11. 1997.

Tekkok S e Goldberg M. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. J. Neurosci. v. 15, p. 4237– 4248. 2001.

Tenório F, Giral-di-Guimarães A., Mendez-Otero R. Removal of the cortical projections alters expression of NOS in the different cell types of the superficial layers of the superior colliculus in rat. An Acad Bras Ciências, v. 74, n. 4, p. 677-681. 2003.

Undie AS, Berki AC, Beardsley KB. Dopaminergic behaviors and signal transduction mediated through adenylate ciclase and phospholipase C pathways. Neuropharmacol. p. 39, v.1, p. 75-87. 2000.

Vallance P. Exploring vascular nitric oxide in health and disease. The Goulstonian Lecture 1996. J R Coll Physicians Lond, v.31, n.3, May-Jun, p.321-7. 1997.

Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: Clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ, editors. Neonatal-perinatal medicine IV. Philadelphia: Mosby-Yearbook, Inc. p 877–891. 1997.

Vernier P, Moret F, Callier S, Snapyan M, Wersinger C., Sidhu A. The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and

evolution of the mesostriatocortical system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1035, p. 231–249. 2004.

Vincent SR e Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* v. 46, n. 4, p. 755-84. 1992.

Volpe, J. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr. Res.* v. 50, n. 5, p. 553– 562. 2001.

Volpe, J. Cerebral white matter injury of the premature infant—More common than you think. *Pediatrics.* v. 112, n. 1, p. 176– 180. 2003.

Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ. The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience.* v. 25, p. 857–887. 1988.

Wallen A, Zetterstrom RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L. and Perlmann T. Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in *Nurr1* mutant mice. *Exp. Cell Res.* v. 253, p. 737–746. 1999.

Weiner N e Molinoff PB. in: *Basic Neurochemistry*, Siegel G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P.B. Ed., 5th Ed. Eaven Press. Cap. 12, p. 261-282. 1994.

Whishaw IQ, Gharbawie OA, Clark BJ, Lehmann H. The exploratory behavior of rats in an open environment optimizes security. *Behav Brain Res*, v.171, n.2, Aug 10, p.230-9. 2006.

Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM. A study of subcortical afferents to the hippocampal formation in the rat. *Neuroscience*, v.4, n.4, p.463-76. 1979.
www.stanford.edu website da universidade de Standford.

Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol*, v.11, n.1, Mar, p.31-46. 2004.

Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saas MJA. In: *Síndrome Metabólica* Ed. Godoy-Matos A.F. São Paulo: Editora Atheneu. p. 19-46. 2005.

Zhang K, Davids E, Tarazi FI, Baldessarini RJ. Effects of dopamine D4 receptor-selective antagonists on motor hyperactivity in rats with neonatal 6-hydroxydopamine lesions. *Psychopharmacology (Berl)*, v.161, n.1, Apr, p.100-6. 2002.