



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

Everton Luis Nunes Costa

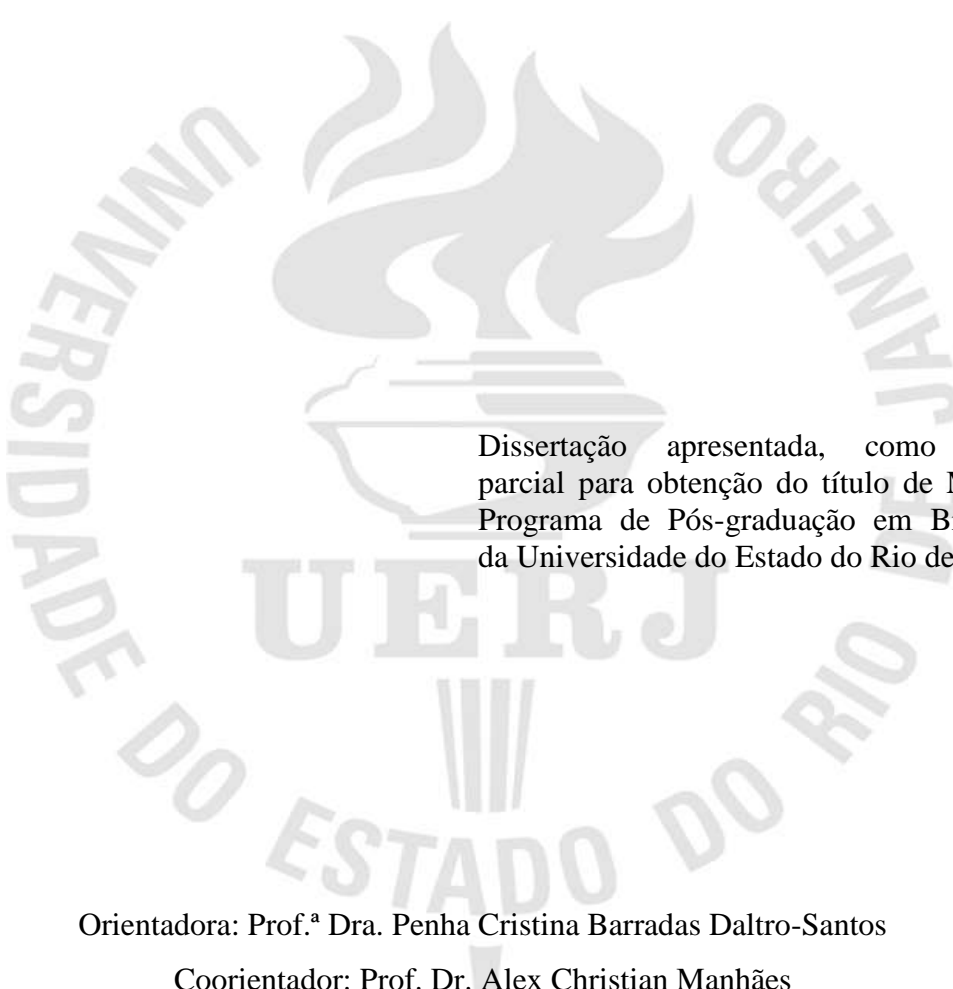
**Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a
um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal**

Rio de Janeiro

2014

Everton Luis Nunes Costa

Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Coorientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Rio de Janeiro

2014

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

C837 Costa, Everton Luis Nunes.
Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal / Everton Luis Nunes Costa. – 2014
83 f.

Orientadora: Penha Cristina Barradas Daltró-Santos.

Coorientador: Alex Christian Manhães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Hipóxia-Isquemia Encefálica - Complicações. 2. Hipóxia Fetal - Complicações. 3. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 4. Desenvolvimento Fetal - Fisiologia. 5. Memória - Teses. 6. Manifestações neurocomportamentais - Teses. I. Daltró-Santos, Penha Cristina Barradas. II. Manhães, Alex Christian. 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 dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Everton Luis Nunes Costa

Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de março de 2014.

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

Banca Examinadora:

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

Prof.^a Dra. Yael Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Profa. Dra. Cecília Hedin Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

A minha família, amigos e ao meu amor Priscila Soares do Nascimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora prof^a. Dr^a. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos por todos esses anos de trabalho e orientação. Por tudo que fez e faz por mim. Sou muito grato pela contribuição profissional e por ter sido a pessoa chave nessa grande conquista. Por todo tempo dedicado a orientação (mesmo no período de suas férias) e por ser um exemplo de profissional e ser humano. Minha irmã mais nova disse uma vez que para conseguirmos trabalhar bem com uma pessoa ela tem que ter duas qualidades: ser boa no que faz e ter caráter. Há oito anos eu trabalho com a Penha. Muito obrigado.

Ao professor Alex Christian Manhães, por me co-orientar e por ter me ajudado com os testes comportamentais.

A toda minha família por sempre acreditar no meu potencial. Por investir no meu futuro e me apoiar nos caminhos que trilhei, por mais pretenciosos que poderiam parecer. A todos o meu sincero obrigado.

Ao professor Frank Tenório por ter me ensinado a técnica NADPH-diaforase, grande contribuição que me rendeu muitos frutos, e por todas as broncas no início da minha jornada na Iniciação Científica. Isso facilitou compreender o quão importante e perigoso é o trabalho laboratorial científico.

Ao professor Marcos Ferraz, embora não tenhamos trabalhado diretamente no desenvolvimento de projetos científicos.

A Márcia Ferraz por toda contribuição técnico-científica, filosófica, moral, cívica, por toda sabedoria de vida compartilhada. Por sanar dúvidas que sempre começavam com: “Marcia, eu tenho um amigo...” E pelas conversas de cinco minutos no corredor que sempre foram muito construtivas. Muito obrigado.

Ao meu amor, Priscila Soares do Nascimento, por todo carinho, atenção, contribuição para este trabalho (mesmo não sendo sua área) e por sempre se sujar com molho shoyu e assim me fazer sorrir.

Ao Michael Rocha, por toda ajuda oferecida e por ser um profissional fantástico. Por toda amizade. E pelos debates sobre os diversos temas. Agradeço por toda informação compartilhada e por ser tão solícito.

Ao Alan Costa pelas dicas compartilhadas sobre diversos assuntos. Por dividir o fardo de gerar as ninhadas necessárias a esse estudo e a outros estudos também. Pela amizade e incontáveis discussões.

A todos os amigos, principalmente, ao Léo e ao André dos quais trabalhei por um tempo. Por tudo. Conversas, alegrias e frustrações compartilhadas. “Gostaria de mandar um salve”.

A aluna de graduação Camila Pinto por me ajudar nos procedimentos laboratoriais e por demonstrar tamanha boa vontade. Você vai longe.

A Juliana por todas as soluções e vídeos analisados. E por ser sempre simpática e prestativa.

A todos do laboratório, que faz o ambiente ser agradável e que contribui para o crescimento do nosso grupo.

Aos que já estiveram no laboratório (Sebastião Serjo, Tiago Augusto e Viviane Rapozzo) por suas respectivas contribuições.

Agradeço ao Jorge Neves por me ensinar inúmeras técnicas de histologia e por me ajudar principalmente nas tardes de sexta-feira.

Agradeço ao Nelcir pelos ensinamentos no manejo de animais e por sua amizade.

Agradeço a Mariana Magalhães por todo auxílio na geração de animais, pela atenção e disponibilidade e por sua amizade.

E por fim agradeço a todos que contribuíram, acreditaram, auxiliaram em algum momento, por mais remoto que seja. Agradeço por terem de certa forma feito parte dessa conquista.

Ele não sabia que era impossível. Foi lá e fez.

Jean Cocteau.

RESUMO

COSTA, Everton Luis Nunes Costa. *Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A diminuição do aporte de oxigênio e nutrientes na vida perinatal resulta em danos, como astrogliose, morte de neurônios e de células proliferativas. Déficits cognitivos podem estar relacionados a danos no hipocampo. Neste trabalho avaliamos a citoarquitetura do giro dentado (DG) durante o desenvolvimento e a memória de ratos submetidos à HI. Para tal, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para marcador de proliferação celular (KI67), neurônio jovem (DCX), de astrócitos (GFAP) e de óxido nítrico sintase neuronal (NOSn). Para avaliar a memória de curta e de longa duração foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos (RO). Ratas Wistar grávidas em E18 foram anestesiadas (tribromoetanol) e as quatro artérias uterinas foram ocluídas com grampos de aneurisma (Grupo HI). Após 45 minutos, os grampos foram removidos e foi feita a sutura por planos anatômicos. Os animais do grupo controle (SHAM) sofreram o mesmo procedimento, excetuando a oclusão das artérias. Os animais nasceram a termo. Animais com idades de 7 a 90 dias pós-natal (P7 a P90), foram anestesiados e perfundido-fixados com paraformaldeído a 4%, e os encéfalos submetidos ao processamento histológico. Cortes coronais do hipocampo (20µm) foram submetidos à imunohistoquímica para KI67, DCX, GFAP e NOSn. Animais P90 foram submetidos ao RO. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética (CEA/019/2010). Observamos menor imunomarcagem para KI67 no giro dentado de animais HI em P7. Para a marcação de DCX nesta idade não foi observada diferença entre os grupos. Animais HI em P15, P20 e P45 tiveram menor imunomarcagem para DCX e Ki67 na camada granular. Animais P90 de ambos os grupos não apresentaram marcação para KI67 e DCX. Vimos aumento da imunomarcagem para GFAP nos animais HI em todas as idades. A imunomarcagem para NOSn nos animais HI foi menor em todas as idades. O maior número de células NOSn positivas foi visto em animais P7 em ambos os grupos na camada polimórfica. Em P15, animais HI apresentam células NOSn+ em todo o DG. Em P30 animais HI apresentam células NOSn+ nas camadas polimórfica e sub-granular. Animais adultos (P90) de ambos os grupos apresentam células NOSn positivas apenas nas camadas granular e sub-granular. Embora animais HI P90 não apresentaram déficits de memória, estes apresentaram menor tempo de exploração do objeto. Comportamento correspondente a déficits de atenção em humanos. Nossos resultados sugerem que HI perinatal diminui a população de células proliferativas, de neurônios jovens, de neurônios NOSn+, além de causar astrogliose e possivelmente déficits de atenção. O modelo demonstrou ser útil para a compreensão dos mecanismos celulares das lesões hipóxico-isquêmicas e pode ser usado para testar estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia. Desenvolvimento. Hipocampo. Memória. Déficits de atenção e comportamento.

ABSTRACT

COSTA, Everton Luis Nunes Costa. *Morphofunctional evaluation of the hippocampal complex in rats submited to Perinatal hypoxia-ischemia pattern.* 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The supply of oxygen and nutrients decreasing in perinatal life may results in CNS damage such as deficits in memory and attention and increased susceptibility to epileptic disorders in adulthood. Perinatal hypoxia-ischemia (HI) results in astrogliosis in white matter and loss of cortical neurons (Robinson et al, 2005). Cognitive deficits may be related to hippocampal damage. In this study we evaluate the cytoarchitecture of the dentate gyrus (DG) during development and memory in rats submited to HI. We used the immunohistochemistry marker of cell proliferation (Ki67), young neuron (DCX), astrocytes (GFAP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). To evaluate the short-memory and long-lasting the recognition of objects (RO) test was used. Pregnant Wistar rats on E18 were anesthetized (tribromoethanol) and the four uterine arteries were occluded with aneurysm clips (Group HI). After 45 minutes, the clips were removed and the incision was sutured to the anatomical planes. The control group (SHAM) underwent the same procedure, except the occlusion of arteries. The animals were born at term. Animals aged 7 to 90 days postnatal (P7 to P90) were anesthetized and perfused-fixed with 4% paraformaldehyde, and their brains were subjected to histological processing. Coronal sections of the hippocampus (20µm) were subjected to immunohistochemistry for Ki67, DCX, GFAP and nNOS. Animals were subjected to RO P90. The procedures were approved by the ethics committee (CEA/019/2010). We observed lower Ki67 immunostaining in the dentate gyrus of animals HI at P7. For marking DCX at this age is no difference between the groups was observed. HI animals at P15, P20 and P45 had less immunostaining for DCX and Ki67 in the granular layer. Animals P90 in both groups showed no labeling for Ki67 and DCX. We have seen an increase in GFAP immunostaining HI in animals at any age. The immunostaining for nNOS in HI animals was lower at all ages. The greater number of positive cells was seen in nNOS P7 animals in both groups in the polymorphic layer. In P15 animals HI nNOS + cells present in the whole DG. In P30 animals HI feature nNOS + cells in the polymorphic layer and sub-granular. Adult animals (P90) of both groups have positive nNOS granular cell layers, and only in the sub-granular. Although HI P90 animals showed no memory deficits, these patients had shorter holding the object. Corresponding to attention deficits in human behavior. Our results suggest that perinatal HI decreases the population of proliferative cells, young neurons, nNOS+ neurons, and astrocytic and possibly cause attention deficits. The model proved to be useful for understanding the cellular mechanisms of hypoxic- ischemic injury and can be used to test therapeutic strategies.

Keywords: Hypoxia-ischaemia. Hippocampus. Developmental. Astrogliosis. Attention deficits.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem esquemática de um corte sagital do hipocampo mostrando as camadas, tipos morfológicos neuronais, e vias da região do corno Ammon.....	22
Figura 2 -	Esquema da formação hipocampal	24
Figura 3 -	Desenvolvimento hipocampal.....	26
Figura 4 -	Esquema de formação de potencial de longa duração (LTP).....	26
Figura 5 -	Esquema da produção do óxido nítrico pela óxido nítrico sintase.....	35
Figura 6 -	Fotografia da cirurgia realizada em ratas no 18º dia de gestação.....	41
Figura 7 -	Fotografia da habituação do animal na arena para o teste comportamental.....	46
Figura 8-	Teste de reconhecimento de objetos.....	47
Figura 9 -	Detalhe do objeto utilizado no teste de reconhecimento de objetos.....	47
Figura 10a -	Hipóxia isquemia diminui o número de células Ki67 positivas no período de lactação.....	51
Figura 10b -	Hipóxia isquemia diminui o número de células Ki67 positivas no período pós-lactação.....	52
Figura 11a -	Perfil da imunomarcção para doublecortina (DCX) na camada granular do DG do hipocampo no período de lactação.....	54
Figura 11b -	Perfil da imunomarcção para doublecortina (DCX) na camada granular do DG do hipocampo no período pós-lactação.....	55
Figura 12a -	Hipóxia isquemia aumenta a imunomarcção para GFAP durante o período de lactação.....	57
Figura 12b -	Hipóxia isquemia aumenta a imunomarcção para GFAP durante o período pós-lactação.....	58
Figura 13a -	Hipóxia-isquemia diminui a imunomarcção para NOSn no DG de animais HI durante o período de lactação.....	60
Figura 13b -	Hipóxia-isquemia diminui a imunomarcção para NOSn no DG de animais HI no período pós-lactação.....	61
Figura 14 -	Período gestacional de ratos submetidos ao teste de reconhecimento de objetos.....	63
Figura 15 -	Massa corporal dos animais utilizados no teste comportamental.....	64
Figura 16 -	Produção de pelotas fecais durante os treinos do teste de reconhecimento de objetos.....	65

Figura 17 -	Número de vezes que o animal se dirige ao objeto para explorá-lo.....	67
Figura 18 -	Latência de ida ao objeto.....	68
Figura 19a -	Índice de amnésia.....	69
Figura 19b -	Índice de amnésia (percentual).....	69
Figura 20a -	Animais HI exploram menos ambos os objetos se comparado aos animais SHAM.....	71
Figura 20b -	Porcentagem de exploração do objeto novo.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A1	Objeto utilizado na sessão de treino
A2	Objeto utilizado na sessão de treino
A3	Objeto utilizado na sessão de teste que é idêntico aos objetos A1 e A2
ATP	Adenosina trifosfato
B	Objeto utilizado na sessão de teste
BSA:	Albumina bovina sérica
CA1 - CA4:	Corno de Ammon regiões 1 a 4
DCX:	Doublecortina
GABA:	Ácido gama-aminobutírico
GFAP:	Proteína glial fibrilar ácida
GD:	Giro dentado
GMF:	Fator de maturação de glia
GMP-cíclico:	Monofosfato cíclico de guanosina
HI:	Hipóxia-isquemia
IgG:	Imunoglobulina G
Ki67:	Proteína presente em células proliferativas
Ki67+:	Células que apresentam Ki67
E18:	Décimo oitavo dia embrionário
E22:	Vigésimo segundo dia embrionário
NO:	Óxido nítrico
NOS:	<i>Óxido nítrico-sintase</i>
NOSn:	<i>Óxido nítrico-sintase neuronal</i>
NOSn+:	Células que apresentam NOSn
OCT:	Optimal cutting temperature
P7:	Idade de 7 dias pós-natal
P9:	Idade de 9 dias pós-natal
P10:	Idade de 10 dias pós-natal
P15:	Idade de 15 dias pós-natal
P20:	Idade de 20 dias pós-natal
P23:	Idade de 23 dias pós-natal
P30:	Idade de 30 dias pós-natal

P45: Idade de 45 dias pós-natal

P90: Idade de 90 dias pós-natal

SHAM: Grupo controle cirúrgico

SNC: Sistema nervoso central

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	MODELOS DE HIPÓXIA ISQUEMIA	17
1.1	Modelo de hipóxia isquemia perinatal por remoção dos cornos uterinos em E22	17
1.2	Modelo de HI pré-natal por oclusão temporária das artérias uterinas em E18	18
2	HIPOCAMPO	19
2.1.1	Breve histórico	19
2.1.2	Neuroanatomia hipocampal	19
2.1.3	Desenvolvimento morfológico e expansão volumétrica no hipocampo	23
2.1.3.1	<u>Parasúbiculo e pré-subículo</u>	25
2.1.3.2	<u>Subículo e corno de Ammon</u>	27
2.1.3.3	<u>Giro dentado</u>	28
2.1.3.4	<u>Fímbria e fórnix</u>	29
3	MEMÓRIA	30
3.1	Memória sensorial motora	30
3.2	Memória de ordem temporal	31
3.3	Memória de curto prazo	31
3.4	Memória de longo prazo	31
3.5	Óxido nítrico	33
3.5.1	<u>NO, aprendizado e potenciação a longo prazo (LTP)</u>	36
4	OBJETIVO	39
4.1	Objetivos específicos	39
5	METODOLOGIA	40
5.1	Obtenção dos animais	40
5.2	Realização da hipóxia-isquemia	40
5.3	Processamento histológico	42
5.4	Imunohistoquímica	43
5.5	Análise morfológica qualitativa	44
5.6	Teste comportamental	45
5.6.1	<u>Avaliação do estresse</u>	45
5.6.2	<u>Avaliação da memória e do aprendizado</u>	45

5.6.3	<u>Análise estatística: aspectos preliminares</u>	48
5.6.3.1	Tempo de gestação e bolos fecais.....	48
5.6.3.2	Parâmetros comportamentais do teste de reconhecimento de objetos.....	48
5.6.3.3	Aspectos complementares.....	49
6	RESULTADOS	50
6.1	Imunohistoquímica	50
6.1.1	<u>Ki67</u>	50
6.1.2	<u>Doublecortina (DCX)</u>	53
6.1.3	<u>Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)</u>	56
6.1.4	<u>Óxido nítrico sintase neuronal (NOSn)</u>	59
6.2	Resultados comportamentais e biométricos	62
6.2.1	<u>Dados comportamentais e biométricos</u>	62
6.2.1.1	Período gestacional.....	62
6.2.1.2	Massa corporal.....	64
6.2.2	<u>Dados comportamentais</u>	65
6.2.2.1	Produção de pelotas fecais.....	65
6.2.3	Parâmetros comportamentais do teste de reconhecimento de objetos.....	66
6.2.3.1	Número de idas ao objeto.....	67
6.2.3.2	Latência de ida ao objeto.....	68
6.2.3.3	Déficits de memória.....	68
6.2.3.4	Exploração do objeto.....	70
7	DISCUSSÃO	72
7.1	Considerações iniciais	72
7.2	Efeitos da HI no período gestacional	72
7.3	Efeitos da HI na massa corporal	73
7.4	Efeitos da HI na morfologia hipocampal	73
7.5	Efeitos da HI no comportamento de ratos	77
7.5.1	<u>Produção de pelotas fecais durante o teste de reconhecimento de objetos</u>	77
7.5.2	<u>Número de idas ao objeto e latência de exploração ao objeto</u>	77
7.5.3	<u>Exploração do objeto</u>	77
7.5.4	<u>Déficits de memória</u>	78
	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80

INTRODUÇÃO

A diminuição de oxigênio e nutrientes proveniente da hipóxia-isquemia durante a vida perinatal (HI) pode acarretar danos ao sistema nervoso central (SNC). Estes danos desencadeiam déficit de memória, dificuldade de concentração e de aprendizado e epilepsia em crianças (Volpe, 2001; 2003. Haynes, 2013. Perrone, 2013). O cérebro infantil humano submetido à HI apresenta astrogliose, morte neuronal, hipomielinização e alterações no desenvolvimento cortical (Marin-Padilla, 1997). O cérebro em desenvolvimento é mais suscetível a hipóxia, uma vez que mudanças nos níveis de ATP, de espécies reativas e de glutamato podem desencadear morte de progenitores, ativação de macrófagos e astrócitos e excitotoxicidade por influxo de cálcio (Perrone, 2013). Além disso, o cérebro imaturo possui altas concentrações de ácidos graxos e íons de ferro livres, além de um sistema enzimático antioxidante imaturo, o que o torna mais vulnerável ao dano oxidativo (Yager et al, 2004; Mclean e Ferriero, 2004; Lafemina et al, 2006). Estudos em modelos animais (Rice et al, 1981; Bjelke, 1991; Vannuci, 1996; Sheldon, 1998; Renolleau et al, 1998; Robinson et al, 2005) apontam que HI resulta em morte de neurônios e de oligodendrócitos, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de glutamato, ruptura axonal, astrogliose na substância branca, infarto em regiões como córtex cerebral, hipocampo, estriado e tálamo, além de alterações nas funções cognitivas, alterações similares às observadas em crianças que passaram por HI perinatal (Robinson et al, 2005; Back et al., 1998; Fern & Moller, 2000; Follett et al., 2000; Volpe, 2001).

No Brasil, a mortalidade neonatal compõe cerca de 70% das mortes de menores de cinco anos. No ano de 2010, as maiores causas das mortes eram afecções perinatais, como prematuridade, malformações congênitas, infecções e asfixia/hipóxia. (IBGE, 2006; Brasil, 2012). No período entre 1996 e 2010 a taxa de mortalidade infantil caiu de 34,8 a cada mil nascidos vivos para 16,2. Após a queda da mortalidade infantil, o componente neonatal ganhou maior importância devido a sua grande representatividade. A porcentagem do total de mortes de neonatos aumentou de 59% para 70% (Alves, 2008). Apesar dos crescentes avanços na medicina neonatal, o número de crianças com déficits neurológicos após injúria perinatal tem se mantido estável nos últimos anos (Ahman, 2004).

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 et al, 2006). Modelos animais vêm auxiliando no desenvolvimento de

terapias para reverter ou atenuar os efeitos de neuropatologias acarretadas por HI. A administração de glicocorticóides (Nelson, 2003), antagonistas de receptores glutamatérgicos (Mc Donald et al., 1987), inibidores de radicais livres, bloqueadores de canais de cálcio entre outros (Altman et al, 1984; Gunn et al, 1989; Barks et al, 1991; Palmer et al, 1993; Hagberg et al, 1994) pode melhorar tais danos. É de extrema importância estudar os mecanismos de eventos hipóxico-isquêmicos para que sejam elucidados possíveis abordagens terapêuticas mais eficazes.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN D. I.; YOUNG, R. S. K.; YAGEL, S.K. Effects of dexamethasone in hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol Neonate*, v. 46, p. 149–156. 1984.
- ALVES A.C. et al. Principais causas de óbitos infantis pós-neonatais em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1996 a 2004. *Rev Bras Saude Mater Infant.*, v. 8, n. 1, p. 27-33. 2008.
- AMARAL, D. et al. Ch 3: Hippocampal Neuroanatomy. In: _____. *The Hippocampus Book*, Oxford University Press, 2006.
- BACK, S. A. et al. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J. Neurosci.* v. 18, n. 16, p. 6241-6253. 1998.
- BACK, S. A. et al. 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.
- BARKS, J. D. E; POST, M.; TUOR, U. I. Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr. Res.* v. 29, p. 558–563. 1991.
- BARONE, F. C. et al. Cold-restraint stress increases rat fecal pellet output and colonic transit. *Am. J. Physiol.* v. 258, n. 3, Pt 1, p. 329-337. 1990.
- BAYER, S. A. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis in the rat amygdala. *J. Comp. Neurol.*, v.194, n. 4, p. 845-875. 1980.
- BERNARD, C.; WHEAL, H. V. Model of local connectivity patterns in CA3 and CA1 areas of the hippocampus. *Hippocampus.* v. 4, n. 5, p. 497-529. 1994.
- BJELKE, B. et al. 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, p. 1-9. Mar, 1991.
- 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.
- DOUPE, A. J. Seeds of instruction: hippocampus and memory in food-storing birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 91, n.16, p. 7381-7384. 1994.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain. Res.*, v. 31, n. 1, p. 47-59. 1988.
- FERN, R. E.; MOLLER, T. Rapid ischemic cell death in immature oligodendrocytes A fatal glutamate release feedback loop. *J. Neurosci.*, v. 20, n. 1, p. 34-42. 2000.

FOLLETT, P. L. et al. NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J. Neurosci.*, v. 20, n. 24, p. 9235–9241. 2000.

GROVE, E. A.; TOLE, S. Patterning events and specification signals in the developing hippocampus. *Cereb. Cortex.*, v. 9, n. 6, p. 551-561. 1999.

GUNN, A. J. et al. The neuroprotective actions of a calcium channel antagonist, flunarizine, in the infant rat. *Pediatr. Res.*, v. 25, p. 573–576. 1989.

HAGBERG, H. et al. Hypoxiaischemia in the neonatal rat brain: histopathology after posttreatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol. Neonate.*, v. 66, p. 205–213. 1994.

ISHIZUKA, N.; COWAN, W. M.; AMARAL, D. G. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, v. 362, n. 1, p. 17-45. 1995.

KAIMORI, J. Y. et al. Induction of glia maturation factor-beta in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through the p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 35, p. 33519-33527. 2003.

KHAN, M. M. et al. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. *Neurochem. Int.*, v. 62, p. 379–388. 2013.

KUHN, H. G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* v. 16, n. 6, p. 2027-2033. 1996.

LAFEMINA, M. J.; SHELDON, R. A.; FERRIERO, D. M. Acute Hypoxia-Ischemia Results in Hydrogen Peroxide Accumulation in Neonatal But Not Adult Mouse Brain. *Pediatric Research.*, v. 59, n. 5, p. 680–683. 2006.

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

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, n. 13, p. 7526-7531. 1999.

LIU, G.; CHOI, S.; TSIEN, R. W. Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron.* v. 22, n. 2, p. 395-409. 1999.

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.

- MCDONALD, J. W.; SILVERSTEIN, F. S.; JOHNSTON, M. V. MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage. *Eur J Pharmacol.*, v. 40, p. 359–361. 1987.
- MCLEAN, C.; FERRIERO, D. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Seminars in Perinatology.*, v. 28, n. 6, p. 425-432. 2004.
- MULLIGAN, S. J.; MACVICAR, B. A. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature*, v. 431, n. 7005, p. 195-199. 2004.
- MULLIGAN, S. J.; MACVICAR, B. A. VRACs CARVe a path for novel mechanisms of communication in the CNS. *Sci STKE.*, v. 2006, n. 357, p. 42. 2006.
- NELSON, K. B. Can we prevent cerebral palsy? *N. Engl. J. Med.* v. 349, n. 18, p. 1765–1769. 2003.
- PALMER, C. et al. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr. Res.*, v. 33, p. 405–411. 1993.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1998.
- PUNDIK, S. et al. Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient. *Metabolic Brain Disease.* v. 21, n. 4, p. 309-317. 2006.
- RAMÓN Y CAJAL, S. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés*. Paris: A. Maloine, 1909.
- RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.*, v. 9, p. 131–141. 1981.
- ROBINSON, S. et al. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol. Dis.*, v. 18, p. 568-581. 2005.
- RENOLLEAU, S. et al. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. v. 29, n. 7, p. 1454-1460. 1998.
- SAVIGNON, T. et al. Prenatal Hypoxic-Ischemic Insult Changes the Distribution and Number of NADPH-Diaphorase Cells in the Cerebellum. *PLoS ONE*. v. 7, n. 4. 2012.
- SHELDON, R. A.; SEDIK, C.; FERRIERO, D. M. Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia–ischemia. *Brain Research.*, v. 810, n. 1–2. 1998.
- SHERWOOD, N. M.; TIMIRAS, P. S. *A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain*. Berkeley: University of California Press, 1970.
- SONG, H.; STEVENS, C. F.; GAGE, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.*, v. 417, n. 6884, p. 39-44. 2002.

TITA, A. T.; ROUSE, D. J. Progesterone for preterm birth prevention: an evolving intervention. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 200, n.3, p. 219-24. 2009.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage: Evolution of an Animal Model. *Dev. Neurosci.* v. 27, n. 2-4, p. 81-86. 2005.

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.

WETTA, L.; TITA, A. T. Early term births: considerations in management. *Obstet Gynecol Clin. North. Am.*, v. 39, n.1, p. 89-97. 2012.

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

ZAHEER, A. et al. Decreased copper-zinc superoxide dismutase activity and increased resistance to oxidative stress in glia maturation factor-null astrocytes. *Neurochem. Res.* v. 29, n. 8, p. 1473-80. 2004.