



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marta Cristina da Cunha Rodrigues

**Alterações na modulação do GABA no hipocampo e redução de
aprendizado e memória em ratos jovens submetidos à hipóxia-
isquemia transitória pré-natal**

Rio de Janeiro

2018

Marta Cristina da Cunha Rodrigues

Alterações na modulação do GABA no hipocampo e redução de aprendizado e memória em ratos jovens submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal

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

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

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

R696 Rodrigues, Marta Cristina da Cunha.
Alterações na modulação do GABA no hipocampo e redução de aprendizado e memória em ratos jovens submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal / Marta Cristina da Cunha Rodrigues – 2018.
135 f.

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

1. Encefalopatia hipóxico-isquêmica – Complicações e sequelas - Teses. 2. Gravidez – Complicações e sequelas - Teses. 3. Hipocampo (Cérebro) – Teses. 4. Glutamato descarboxilase – Teses. 5. Sistema nervoso central – Teses. 6. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.831-005.6:618.3-06

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Marta Cristina da Cunha Rodrigues

Alterações na modulação do GABA no hipocampo e redução de aprendizado e memória em ratos jovens submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal

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

Aprovada em 26 de fevereiro de 2018.

Banca examinadora:

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

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

Prof.^a Dra. Karin da Costa Calaza
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Pablo Pandolfo
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Maria Marta da Cunha Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Nesta etapa de fechamento de um ciclo tão marcante, muitos são aqueles a quem devo agradecimentos. Em primeiro lugar, ao Criador, de onde provém toda graça e toda luz.

Agradeço imensamente à minha mãe, atualmente minha única família, por ter sempre compreendido as dificuldades desta caminhada mesmo quando seu coração estava dilacerado por minha culpa.

À minha orientadora Prof.^a Penha Barradas, amiga e companheira já há oito anos, exemplo de sabedoria na ciência e na vida. Ao saudoso Prof. Frank Tenório, cuja presença sempre ficará marcada na memória daqueles que disfrutaram de seu convívio.

A Paulo Cesar Araujo, melhor amigo e futura família, pela companhia nas melhores e piores partes de mais uma etapa vencida.

Aos alunos de Iniciação Científica que me acompanharam durante o doutorado e que tornaram a realização desse trabalho possível e muito mais divertida: Cassiana Balduci, Gustavo Diniz, Caroline Matias e Kethely Lima.

Aos amigos que já passaram pelo Laboratório de Neurobiologia mas ainda parecem fazer parte dele, em especial, Ana Carolina Bastos, Luiza Spiegel e Paulo Luciano Guedes.

A Mariana Magalhães por todo apoio com o cuidado dos nossos animais.

Aos amigos da UNIRIO, Carlos Fernando Araujo, Lucas Vellasco e Mariele Souza, que sempre se fazem presentes para compartilhar a dor e a delícia da vida acadêmica.

Ao Prof. Rodrigo Cunha, que acreditou no meu trabalho e me deu um voto de confiança me convidando para seu laboratório. À Dra. Paula Canas, pela preciosa orientação durante meu estágio no CNC.

A todos os colegas do *Purines at CNC*, cuja colaboração contribuiu não só para uma parte dos resultados desta tese, mas muito para a minha formação acadêmica.

Às amigas que nasceram em Coimbra e que ajudaram a formar um oásis brasileiro na terrinha, a Daniel Moreira e Felipe Gouveia, Julia Pecky, Adrielson Furtado, Fernanda Rego e Luciana Agostinho.

If any faculty of our nature may be called more wonderful than the rest, I do think it is memory. The memory is sometimes so retentive, so serviceable, so obedient – at others, so bewildered and so weak – and at others again, so tyrannic, so beyond control! We are, to be sure, a miracle every way; but our powers of recollecting and of forgetting do seem peculiarly past finding out.

Jane Austen

RESUMO

RODRIGUES, Marta Cristina da Cunha. *Alterações na modulação do GABA no hipocampo e redução de aprendizado e memória em ratos jovens submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal*. 2018. 135f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Condições adversas intrauterinas podem ser responsáveis por danos duradouros que impactam a saúde mesmo durante a fase adulta. Eventos de hipóxia-isquemia (HI) representam uma causa relevante de mortalidade neonatal e são o principal fator que leva a lesões cerebrais permanentes. Utilizando um modelo em que o fluxo uterino e ovariano da rata grávida é obstruído por 45 minutos, já foram descritos morte de oligodendrócitos, astrogliose e perda neuronal. Neste trabalho, nós investigamos a população neuronal do hipocampo quanto a componentes de sinapses excitatórias e inibitórias e realizamos uma avaliação funcional do aprendizado e memória de ratos adolescentes que foram afetados pela HI pré-natal. Ratas Wistar no 18º dia de gestação foram anestesiadas e tiveram os cornos uterinos expostos e as artérias ovarianas e uterinas obstruídas por 45 minutos (grupo HI). Animais falso-operados (grupo SH) tiveram os cornos expostos, mas nenhuma artéria foi clampeada. Foi realizada a avaliação histológica com o objetivo de se caracterizar a população neuronal hipocampal de ratos adolescentes, além da investigação dos níveis de proteínas envolvidas na transmissão glutamatérgica e GABAérgica no hipocampo, em sua fração total e em terminais sinápticos. Também foram avaliados fenômenos de plasticidade sináptica no hipocampo através de registros eletrofisiológicos. A memória de ratos de ambos os grupos foi testada através do reconhecimento de objeto novo e de objeto deslocado, bem como no labirinto em Y. Foi possível observar aumento da imunomarcagem de parvalbumina e dos níveis da enzima GAD no grupo HI apesar da perda do número total de neurônios hipocampais. Embora não tenha se revelado alteração quanto à amplitude de LTP e despotenciação no grupo HI, a avaliação comportamental indicou uma diferença marcante relacionada à capacidade de aprendizado e memória do grupo HI. Machos HI também apresentaram comportamento similar à ansiedade em uma das condições testadas. Nossos resultados refletem danos permanentes relativos à função de GABA que podem alterar a homeostase de neurotransmissores, levando aos déficits de aprendizado e memória observados.

Palavras-chave: Lesão pré-natal. Ratos. Hipocampo. GAD. Neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

RODRIGUES, Marta Cristina da Cunha. *Alterations in GABA modulation in the hippocampus and reduction of learning and memory in young rats submitted to transient prenatal hypoxia-ischemia*. 2018. 135f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Intrauterine adverse conditions may be responsible for long-lasting damages which impact health even during adult phase. Hypoxic-ischemic (HI) events are a relevant cause of newborn mortality and the principal factor leading to permanent brain lesions. Using a model in which the ovarian and uterine flux of a pregnant rat is obstructed for 45 minutes we have described oligodendrocyte death, astrogliosis and neuronal loss. In this work we investigated hippocampal neuronal population in relation to components of excitatory and inhibitory synapses and performed a functional evaluation of learning and memory of adolescent rats that had been affected by prenatal HI. Anesthetized Wistar rats on the 18th gestation day had the uterine horns exposed and the ovarian and uterine arteries clamped for 45 minutes (HI group). Sham-operated rats (SH group) had the horns exposed but no arteries were clamped. Histological evaluation was performed in order to characterize hippocampal neuronal population in adolescent rats. We also investigated the levels of proteins involved in glutamatergic and GABAergic transmission in the hippocampus, in its total fraction and in synaptic terminals. Synaptic plasticity phenomena in the hippocampus were also evaluated through electrophysiological records. The memory of rats from both groups was tested through novel and displaced object recognition tests as well as in Y-maze. It was possible to observe an increased parvalbumin immunostaining and increased levels of GAD enzyme in HI group although the total number of hippocampal neurons was decreased. Despite of the absence of alterations in LTP and depotentiation amplitude, behavioral assessment indicated a marked difference concerning HI learning and memory abilities. Males HI also displayed anxiety-like behavior in one of the tested conditions. Our results reflect permanent damages concerning GABA function which may disturb neurotransmitter homeostasis leading to the observed deficits in learning and memory.

Keywords: Prenatal lesion. Rats. Hippocampus. GAD. Neurodevelopment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Alterações comportamentais decorrentes de diferentes protocolos de hipóxia ou HI.....	23
Figura 1 - Linha de tempo ilustrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal.....	26
Figura 2 - Posição do hipocampo no encéfalo do rato.....	28
Figura 3 - Vias hipocampais.....	30
Quadro 2 - Papel das citocinas e quimiocinas na HIE.....	36
Quadro 3 - Proteínas sinápticas e breve descrição de suas funções e domínios	39
Figura 4 - Neurotransmissão glutamatérgica.....	42
Figura 5 - Representação do clampeamento das artérias da rata grávida.....	47
Quadro 4 - Anticorpos primários utilizados no <i>western blotting</i>	52
Quadro 5 - Anticorpos secundários utilizados no <i>western blotting</i>	52
Quadro 6 - Anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica.....	53
Quadro 7 - Anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica.....	54
Figura 6 - Esquema representativo dos protocolos de testes comportamentais.....	60
Tabela 1 - Massa corporal (em gramas) dos grupos experimentais.....	61
Figura 7 - Avaliação da população neuronal no hipocampo SH e HI em P45.....	63
Figura 8 - Identificação da distribuição de parvalbumina no hipocampo de animais SH e HI em P45.....	65
Figura 9 - Análise dos níveis de NR2B, EAAT1 e GAD65/67 no hipocampo de animais SH e HI em P45.....	66

Figura 10 - Análise dos níveis de sinaptofisina, SNAP 25, syntaxina, VGLUT, VGAT e PSD 95 em sinaptossomas de hipocampo de animais SH e HI em P45.....	68
Figura 11 - Quantificação da porcentagem de terminais sinápticos glutamatérgicos e GABAérgicos.....	69
Figura 12 - Efeitos da HI pré-natal sobre registros eletrofisiológicos extracelulares na via colateral de Schaffer após indução de LTP e depotenciação.....	70
Figura 13 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: número de entradas.....	72
Figura 14 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: tempo de permanência.....	73
Figura 15 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: distância percorrida.....	74
Figura 16 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: número de entradas.....	76
Figura 17 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: tempo de permanência.....	77
Figura 18 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: distância percorrida.....	78
Figura 19 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: entradas no centro.....	80
Figura 20 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: tempo de permanência.....	80

Figura 21 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: distância percorrida.....	81
Figura 22 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: número de rotações.....	82
Figura 23 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: episódios de imobilidade.....	83
Figura 24 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: número de entradas.....	85
Figura 25 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: tempo de permanência.....	86
Figura 26 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: distância percorrida.....	87
Figura 27 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: entradas no centro.....	89
Figura 28 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: tempo de permanência.....	89
Figura 29 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: distância percorrida.....	90
Figura 30 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: número de rotações.....	91

Figura 31 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: episódios de imobilidade.....	91
Figura 32 - Avaliação dos efeitos de HI sobre as funções de aprendizado e memória através do teste de reconhecimento de objeto novo.....	93
Figura 33 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial de machos através do teste de reconhecimento de objeto deslocado.....	95
Figura 34 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial de fêmeas através do teste reconhecimento de objeto deslocado.....	97
Figura 35 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial através do teste do labirinto em Y modificado realizado por machos.....	99
Figura 36 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial através do teste do labirinto em Y modificado realizado por fêmeas.....	101
Quadro 8 - Resumo dos resultados.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	<i>Stratum alveus</i>
ACSF	Fluido cerebrospinal artificial
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
AMPA _r	Receptor AMPA
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA _r	Análise de variância com medidas repetidas
ANOVA _u	Análise de variância univariada
ap	Via alvear
AP	Fosfatase alcalina
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
BMP	Proteína morfogenética do osso
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Corno de Ammon
C/A	Projeção comissural/associacional
Ca ²⁺	Íons cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
CNC	Centro de Neurociências e Biologia Celular
CO ₂	Dióxido de carbono
DFP	Departamento de Farmacologia e Psicobiologia
DG	Giro denteado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Córtex entorrinal
<i>En</i>	<i>Enésimo</i> dia embrionário
EAAC1	Carreador de aminoácidos excitatórios do tipo 1
EAAT _n	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo <i>n</i>
ECF	Quimiofluorescência aumentada
ECL	Quimioluminescência aumentada

EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro padrão da média
EPSP	Potencial pós-sináptico excitatório
EROs	Espécies reativas de oxigênio
fEPSP	Potencial pós-sináptico excitatório de campo
fMRI	Ressonância magnética por imagem funcional
g	Camada granular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAT-1	Transportador de GABA 1
GluR n	Subunidade n do receptor AMPA
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etano-sulfônico
HI	Hipóxia-isquemia
HIE	Encefalopatia hipóxico-isquêmica
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HRP	Peroxidase de raiz forte
Hz	Hertz
IGF	Fator de crescimento similar à insulina
IgG	Imunoglobulina G
iGluR	Receptor ionotrópico de glutamato
IL	Interleucina
imI	Camada molecular interna
IPSP	Potencial pós-sináptico inibitório
KCl	Cloreto de potássio
KA	Cainato/ ácido caínico
kDA	kiloDalton
Im	Stratum lacunosum-moleculare
LTP	Potenciação de longa duração
M	Molar
MAO-B	Monoamino oxidase B
MF	Fibras musgosas
MgSO ₄	Sulfato de magnésio

mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
min	minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil D-aspartato
NMDAr	Receptor NMDA
NO	Óxido nítrico
NR _n	Receptor NMDA tipo <i>n</i>
o	<i>Stratum oriens</i>
oml	Camada molecular externa
p	<i>Stratum pyramidale</i>
po	Camada polimórfica
P _n	<i>Enésimo</i> dia pós-natal
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBSt	Solução salina tamponada com fosfato acrescida de Triton
PDGFr- α	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
PF	Paraformaldeído
PKA	Proteína quinase A
pp	Via perfurante
PSD 95	Proteína da densidade pós-sináptica 95
PSP	Privação de sono paradoxal
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
QI	Quociente de inteligência
r	<i>Stratum radiatum</i>
s	Segundo
S	Polo septal
SC	Colaterais de Schaffer
SDS - PAGE	Gel de poliacrilamida – dodecilsulfato de sódio

Sept	Projeção septal
SH	<i>Sham</i> /Controle cirúrgico
SNAP 25	Proteína associada a sinaptossoma de 25 kDa
SNC	Sistema nervoso central
SUB	Subículo
T	Polo temporal
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TBSt	Solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween
TH	Tirosina hidroxilase
TNF α	Fator de Necrose Tumoral- α
T _{od}	Tempo de exploração do objeto deslocado
T _{of}	Tempo de exploração do objeto familiar
T _{on}	Tempo de exploração do objeto novo
TRANS	Eixo transversal
T _t	Tempo total de exploração
UA	Unidades arbitrárias
UC	Universidade de Coimbra
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VAMP	Proteína associada à membrana da vesícula sináptica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VGAT	Transportador vesicular de GABA
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	Modelos experimentais de hipóxia-isquemia	21
1.2	Desenvolvimento do sistema nervoso central	25
1.3	Hipocampo	27
1.4	Aprendizado e memória	30
1.4.1	<u>Memória episódica</u>	32
1.5	Eventos celulares decorrentes de HI	34
1.6	Glutamato	37
1.7	GABA	43
2	OBJETIVOS	45
2.1	Objetivos gerais.....	45
2.2	Objetivos específicos.....	45
3	METODOLOGIA	46
3.1	Procedimento cirúrgico	46
3.2	Avaliação da massa corporal	48
3.3	Processamento histológico	48
3.4	Coloração fluorescente de Nissl	48
3.5	Imunofluorescência	49
3.6	Preparação de amostras	50
3.6.1	<u>Fração total</u>	50
3.6.2	<u>Sinaptossomas</u>	51
3.7	<i>Western Blotting</i>	51
3.8	Imunocitoquímica	53
3.9	Registros eletrofisiológicos extracelulares	54
3.10	Teste de campo aberto	55
3.11	Teste de reconhecimento de objeto novo	56
3.12	Teste de reconhecimento de objeto deslocado	57
3.13	Teste do labirinto em Y modificado	57
3.14	Análise estatística	58

4	RESULTADOS	61
4.1	Massa corporal	61
4.2	População neuronal no hipocampo	62
4.3	Distribuição de parvalbumina	64
4.4	Receptor e transportador de glutamato e glutamato descarboxilase	66
4.5	Marcadores sinápticos	67
4.6	Terminais glutamatérgicos e GABAérgicos	69
4.7	Plasticidade sináptica	70
4.8	Atividade locomotora de machos em campo aberto	71
4.8.1	<u>Período noturno, iluminação branca</u>	71
4.8.2	<u>Período diurno, iluminação branca</u>	75
4.8.3	<u>Período diurno, iluminação vermelha</u>	79
4.9	Atividade locomotora de fêmeas em campo aberto	84
4.9.1	<u>Período noturno, iluminação branca</u>	84
4.9.2	<u>Período diurno, iluminação vermelha</u>	88
4.10	Reconhecimento de objeto novo	92
4.11	Reconhecimento de objeto deslocado	94
4.11.1	<u>Machos</u>	94
4.11.2	<u>Fêmeas</u>	96
4.12	Memória espacial em labirinto em Y modificado	98
4.12.1	<u>Machos</u>	98
4.12.2	<u>Fêmeas</u>	100
5	DISCUSSÃO	103
	CONCLUSÕES	114
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO – Artigo científico aceito para publicação	135

INTRODUÇÃO

Lesões pré e perinatais alteram o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), ocasionando diferentes danos, de acordo com o tipo de insulto, o período do desenvolvimento em que ocorrem, a intensidade e a área afetada. Apesar dos avanços na medicina neonatal, permanece elevada a proporção de crianças com déficits neurológicos após sofrerem insultos perinatais (MCINTYRE et al., 2013).

Uma dessas lesões, a hipóxia-isquemia (HI), é caracterizada pela interrupção momentânea ou permanente do fluxo sanguíneo e do aporte de oxigênio. A asfixia sistêmica pré-natal pode ocorrer tanto por um processo mecânico, insuficiência placentária, trabalho de parto prolongado ou dobras no cordão umbilical (DE HAAN et al., 2006; MARTINEZ-BIARGE et al., 2012), além de eventos de pré-eclâmpsia e sangramento materno (PAOLO, 2012). Há ainda outros fatores de risco, entre eles o tabagismo, anemia, hipotensão, nascimentos múltiplos e uso de drogas (PUNDIK et al., 2006).

Eventos de HI, além de levarem recém-natos a óbito, consistem também no principal fator desencadeante de encefalopatia e lesão cerebral permanente em crianças (JOHNSTON et al., 2011; VOLPE, 2012). A encefalopatia hipóxico-isquêmica perinatal (HIE) afeta de 1 a 3 a cada mil nascidos a termo (LAI; YANG, 2011). Destas crianças, 15 a 20% morrem no período pós-natal, caracterizando a HIE como uma das mais expressivas causas de mortalidade neonatal. Das que sobrevivem, 25% desenvolvem consequências neurofisiológicas permanentes (CHEN et al., 2009; VANNUCCI, 2000).

Em recém-nascidos prematuros (ou baixo peso), os números são ainda mais alarmantes, uma vez que a incidência de asfixia pré-natal corresponde a cerca de 60% e entre 20 e 50% dos bebês que passaram pelo evento de HI exibem déficits posteriores, como dificuldade de concentração, atraso cognitivo (DU PLESSIS et al., 1997; FILLOUX et al., 1996; GROSS et al., 2005), disfunções visuais, motoras e perceptivas, hiperatividade (PERLMAN, 2006; VANNUCCI, 2000) e, em casos ainda mais graves, epilepsia e paralisia cerebral (NELSON et al., 2003).

A paralisia cerebral é uma desordem debilitante, não progressiva, afetando principalmente o sistema motor e sendo fortemente relacionada com agravos cerebrais perinatais (KUBAN; LEVITON, 1994; VOLPE, 2001). A prematuridade e a

corioamniotite também têm sido associadas com a paralisia cerebral como um fator de risco (SPINILLO et al., 1998; TERZIDOU; BENNETT, 2001; WU; COLFORD, 2000).

Danos cognitivos, apesar de fortemente associados a déficits neuromotores, podem ser verificados em crianças que sofreram HIE, na presença ou ausência de deficiências motoras (VAN HANDEL et al., 2007). Estas sequelas podem marcar a fase escolar, uma vez que essas crianças apresentam quocientes de inteligência (QI) abaixo da média (PAPPAS et al., 2015) e atrasos no aprendizado (ROBERTSON; PERLMAN, 2006). Em prematuros, problemas de aprendizado são considerados ainda mais comuns, havendo um risco de 3 a 5 vezes maior de estas serem afetadas na leitura, fala, matemática ou escrita (AYLWARD, 2002). Além disso, os prejuízos podem persistir ao longo da adolescência, com intensa redução da memória episódica (GADIAN et al., 2000) e baixa performance em funções executivas e de memória visual e verbal (MAÑERU et al., 2001).

Em relação a possíveis tratamentos de recém-nascidos expostos a insultos hipóxico-isquêmicos pré-natais, não é conhecida ainda uma terapia padronizada e universalmente aceita. A hipotermia como intervenção terapêutica tem sido extensivamente investigada em bebês diagnosticados como portadores de HIE (SIMBRUNER et al., 2010; HIGGINS et al., 2011) Alguns estudos demonstram que a indução de hipotermia moderada seria capaz de reduzir a mortalidade e os danos motores, resultando em melhorias significativas para neonatos que sofreram insultos moderados, mas não graves (HIGGINS et al., 2011). Apesar disto, outros autores demonstram que tais efeitos benéficos estariam limitados a nascidos a termo (PERLMAN, 2006; REES et al., 2011) e que para uma maior eficácia, o tratamento deveria ser iniciado dentro de 6h após o nascimento, indicando uma “janela de oportunidade” para a redução dos danos derivados de HI (HIGGINS et al., 2011).

Com a finalidade de se obter terapias para a prevenção de mortalidade e tratamento de deficiências, a exploração de certos fatores-chave envolvidos nestes danos torna-se essencial. Estudos em modelos animais vêm revelando potenciais candidatos à intervenção terapêutica, como o bloqueio de receptores de glutamato, inibição de óxido nítrico sintases, prevenção de apoptose e formação de radicais livres, bem como a administração de fatores de crescimento e neurotróficos (ALTMAN et al., 1984; BARKS et al., 1991; HAGBERG et al., 1994; GUNN et al., 1989; PALMER et al., 1993).

Portanto, é evidente a importância da compreensão dos eventos que decorrem de lesões de HI no desenvolvimento do SNC, assim como as diversas estruturas que podem ser afetadas e suas consequências. A terapêutica futura e as estratégias de prevenção necessitam de conhecimentos gerados a partir destes estudos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Modelos experimentais de hipóxia-isquemia

Em 1960, Levine criou o primeiro modelo de HI, baseado na oclusão unilateral das artérias carótidas, momentânea ou permanentemente, no rato adulto. Em 1981, Rice e colaboradores o modificaram, realizando a oclusão em ratos no sétimo dia pós-natal (P7). Neste modelo, os danos ocorrem no hemisfério ipsilateral, com o hemisfério contralateral servindo como controle do experimento. Os prejuízos são observados no córtex cerebral, substância branca periventricular, estriado e hipocampo (RICE et al., 1981). Diversos pesquisadores passaram a utilizar este modelo para verificar as consequências das lesões na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (SILVERSTEIN; JOHNSTON, 1984; ROMIJIN et al., 1992), na neurotoxicidade glutamatérgica (SILVERSTEIN et al., 1991; GORDON et al., 1991), na neurotoxicidade do óxido nítrico (FERRIERO et al., 1988; FERRIERO et al., 1995) e nos sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI (BURKE et al., 1991). Apesar dos inúmeros achados observados neste modelo, uma crítica que pode ser feita consiste no fato de ele não mimetizar uma lesão sistêmica, a qual frequentemente ocorre em humanos.

Algumas variações foram feitas nesse modelo, associando a ligação unilateral das carótidas com um período variável em uma câmara hipobárica, ou mesmo realizando a ligação bilateral das artérias carótidas. Foram observados aumento de apoptose no hipocampo, tálamo laterodorsal, assim como áreas corticais e núcleos da base (NAKAJIMA et al., 2000) e infarto do córtex frontotemporal (MARK et al., 2004). Em 2003, Arteni e colaboradores, utilizando o modelo de ligação unilateral das artérias carótidas, encontraram danos comportamentais em ratos machos adultos: déficits de aprendizado e memória relacionados ao hemisfério lesionado.

Em outro modelo de HI pré-natal proposto por Bjelke e colaboradores (1991), os cornos uterinos da fêmea são expostos e imersos em água a 37° C por 15 a 21 minutos, no vigésimo segundo dia de gestação (E22). Depois da asfixia, os filhotes são retirados do útero e ressuscitados, sendo os filhotes controles removidos por cesariana antes do procedimento de asfixia. Através desse modelo, foi verificado um

aumento no número de corpos celulares imunorreativos para a tirosina hidroxilase (TH) na zona compacta da substância negra. 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 substância negra quanto na área tegmental ventral (ANDERSSON et al., 1995). Ratos adolescentes que passaram por este modelo de hipóxia não apresentaram alterações em teste de comportamento de busca e discriminação de objetos novos, enquanto animais adultos apresentaram diminuição de atividade locomotora e menor comportamento estereotipado (VENEROSI et al., 2004). Em outro estudo, foram observadas alterações comportamentais tanto nos animais submetidos apenas à cesariana quanto naqueles que passaram por hipóxia (VENEROSI et al., 2006).

Tan e colaboradores (1998) descreveram um modelo de hipóxia em que um balão de ar é inflado dentro das artérias uterinas de coelhas em E29 (nascimento aos 32 dias). Nesse modelo foi detectada imediata bradicardia nos fetos e diminuição da microcirculação no córtex cerebral. Também foi observada a formação de nitrotirosina, um marcador da produção de espécies reativas derivadas de óxido nítrico (NO) como peroxinitrito. Houve um aumento significativo de óxidos de nitrogênio, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas, com diminuição concomitante da capacidade antioxidante. Nesse mesmo modelo, Derrik e colaboradores (2004) mostraram hipertonia em coelhos com um dia de vida, através de uma bateria de testes neurocomportamentais desenvolvidos especificamente para esses animais. Os filhotes do grupo que sofreu a lesão hipóxica apresentavam alterações em testes de locomoção espontânea, atividade motora de reflexo, e coordenação no ato de sugar e engolir.

Golan e Huleihel (2006) já discutiram a observação de padrões distintos de déficits comportamentais descritos na literatura referente à hipóxia/HI. Estas variações de efeitos podem estar diretamente relacionadas a fatores como a idade em que o insulto é realizado e a localização da lesão, ou serem causadas, em parte, devido à variabilidade de protocolos de hipóxia, associada ou não à isquemia (Quadro 1).

Quadro 1 - Alterações comportamentais decorrentes de diferentes protocolos de hipóxia ou HI

Condições	Idade	Espécie	Oclusão	O ₂ %	CO ₂ %	Duração	Idade estudada	Alterações de comportamento					
								Reflexo	Motor	Aprendizado	Circadiano	Campo aberto	Social
Pré-natal	E5-E20	rato		10	0	15 dias	3, 10 semanas		x		x		
	E5-E20	rato		10	0	15 dias	7,9 meses				x		
	E11-E22	rato		Anemia		11 dias	5,19,23 meses			x		x	x
	E10-E14	pinto		14	0	5 dias				x			
	E14-E18	pinto		14	0	5 dias				x			
	E13	rato		7	0	180 min	0-4 semanas	x	x	x			
	E17	rato	x			30 min	0-4 semanas		x	x		x	
	E17	rato	x				5,7,10 semanas		x				
	E17	camundongo		9	3	120 min	0,1,2,16 semanas		x	x			
	E17	camundongo		9	3	120 min	0-4 semanas	x					
E18	rato	x			45 min	P2, P5, P9, P13			x		x		
Neonatal	P1	rato		0	0	20 min		x	x	x			
	P1, P2	rato	x	5,6	0	180 min			x				
	P7	rato	x	8	0	90 min	P55			x			
	P7	rato	x	8	0	100 min	P42	x					
	P7	rato	x	8	0	105 min	P10,P24						
	P7	rato	x	8	0	120 min	4-5 semanas			x			
	P7	rato	x	8	0	120 min	10-15 semanas			x			
	P7	rato	x	8	0	120 min	1-4 semanas	x	x			x	
	P7	rato	x	8	0	150 min	3-4 semanas			x			
	P7-P11	rato		10	0	4 dias	P23, P35, P53, P80			x	x	x	
	P7	camundongo	x	8	0	30,60 min	P7, P8, 8 semanas	x		x			
	P7	camundongo	x	8	0	30 min	3 semanas		x				
	P9	rato	x	8	0	60 min	7-18 semanas			x			

Legenda: Dia embrionário (E); dia pós-natal (P).

Fonte: Adaptado de GOLAN; HULEIEL, 2006.

Com o intuito de se criar um método capaz de mimetizar os eventos que podem ocorrer em humanos, Robinson e colaboradores estabeleceram em 2005 um modelo de HI pré-natal, em que o fluxo das artérias uterinas da rata grávida é obstruído por 15, 30 ou 45 minutos em E18 (nascimento em E22). Neste modelo foram observadas astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos, e lesão axonal tanto na substância branca como no córtex cerebral, principalmente nos animais submetidos à HI por 45 minutos (ROBINSON et al., 2005), alterações estas que são similares às observadas em cérebros humanos que passaram por hipóxia perinatal (MARIN-PADILLA, 1997, 1999).

Morfologicamente, 87% dos ratos jovens que foram submetidos à HI no modelo proposto por Robinson 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 severas. Algumas hipóteses para as lesões celulares ocorridas após HI são a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (KINNEY; BACK, 1998), o aumento do nível de radicais livres (VOLPE, 2003), o aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (BAUD et al., 1999; DAMMANN; LEVITON, 1997; NELSON et al., 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (KAVANAUGH et al., 2000; ITOH et al., 2002; TEKKOK; GOLBERG, 2001).

Baseando-se nos dados reportados por Robinson e colaboradores (2005), nosso laboratório passou a empregar o método de HI pré-natal transitória em animais Wistar, também em E18 e por 45 minutos (SAVIGNON et al., 2012; BARRADAS et al., 2016). A diferença principal entre o nosso modelo e o anteriormente descrito consiste na seleção das artérias que são obstruídas durante o procedimento cirúrgico. Enquanto Robinson e colaboradores (2005) realizam o clampeamento apenas das duas artérias uterinas, nós bloqueamos adicionalmente o fluxo ovariano, que pode ser compensatório à circulação uterina.

Embora existam outros modelos de dano cerebral e de HI que estudam os mecanismos das lesões nos sistemas de neurotransmissores e da plasticidade cerebral no desenvolvimento, esses não mimetizam integralmente insultos sistêmicos ocorridos no final do segundo terço/início do último trimestre de gestação humano (BACK et al., 2001), e que provavelmente são uma causa importante de nascimentos prematuros e de baixo peso (PUNDIK et al., 2006). 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 de diversas estruturas cerebrais relacionadas com o controle motor, com o aprendizado e a memória.

1.2 Desenvolvimento do sistema nervoso central

Em humanos, o último trimestre da vida fetal e os dois primeiros anos da infância são cruciais para o desenvolvimento inicial do SNC devido ao estabelecimento de janelas temporais críticas para a fisiologia de células neuronais e gliais. Durante este período, os neurônios passam por proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e mielinização (RICE, 2000). Dessa forma, qualquer perturbação ocorrida nestes intervalos pode acarretar alterações celulares, como eventos de migração neuronal, morte celular por apoptose ou necrose, que poderão comprometer a função neural ao longo da vida. Danos a uma via ou circuito específico no SNC em desenvolvimento podem produzir mudanças estruturais ou funcionais, resultando em alterações comportamentais (COSTA et al., 2004; RICCERI et al., 2006).

No desenvolvimento inicial do SNC, ocorre a histogênese neural e migração celular. Estes dois eventos estão entre os primeiros processos a ocorrer no encéfalo de mamíferos e são bastante precoces. No córtex de mamíferos, neurônios têm origem na zona ventricular e células gliais tem origem na zona subventricular (DOETSCH et al., 1997), a qual consiste em um mosaico de progenitores multipotentes. Um grande número de fatores tróficos e de outras pistas ambientais pode influenciar o destino e a sobrevivência destas células (JENSEN; RAFF, 1997).

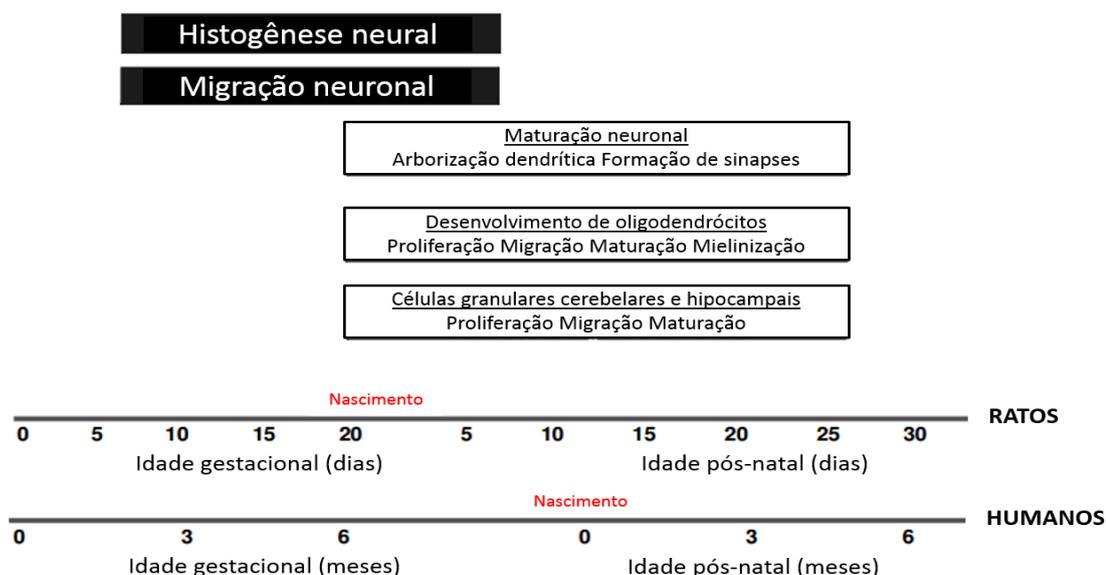
A expressão temporal de genes específicos, como da proteína morfogenética de osso (BMP), Notch, entre outras, e interações célula-célula, induzindo ou inibindo a diferenciação de células precursoras em neurônios ou células gliais é de fundamental importância para que o sistema nervoso tenha o número normal de células neurais. Durante a diferenciação, os neurônios começam a estender seus axônios e a estabelecer contatos sinápticos com células-alvo. Este processo depende de moléculas-guia, repulsivas ou atrativas às células em migração, e da expressão de genes referentes a proteínas localizadas em sinapses, resultando na formação,

acúmulo e tráfego direcional de vesículas transportando complexos proteicos pré e pós-sinápticos. Axônios e dendritos começam a fazer contatos, por vezes transitórios. A definição das sinapses corretas é controlada por diversos fatores tróficos liberados no meio, receptores e moléculas sinalizadoras, que tornam os neurônios mais receptivos a formar sinapses (para revisão ver Waites et al., 2005).

Outra fase corresponde a um período mais tardio do desenvolvimento, onde também ocorrem a proliferação, migração e diferenciação neuronal do cerebelo e hipocampo (KOIBUCHI; CHIN, 2000; GOULD et al.,1991). A fase final pode ser considerada o encéfalo maduro, apesar de que isto não significa a ausência de mudanças, mas sim, uma aparente estabilidade. Processos como neurogênese no hipocampo adulto, assim como a mielinização continuam a ocorrer por um período longo da vida.

As fases do desenvolvimento neural ocorrem em diferentes tempos de acordo com a espécie. Em ratos, inicia-se na segunda semana de vida intrauterina e se completa nas primeiras 4 semanas de vida pós-natal. A formação do hipocampo e do cerebelo, especificamente, começa por volta de E14 e continua até P20 (RICE, 2000). A Figura 1 mostra, de maneira geral, os eventos do desenvolvimento neural e compara em escala temporal o que ocorre em humanos e ratos.

Figura 1 - Linha de tempo ilustrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal



Fonte: Adaptado de ANDERSON et al., 2003.

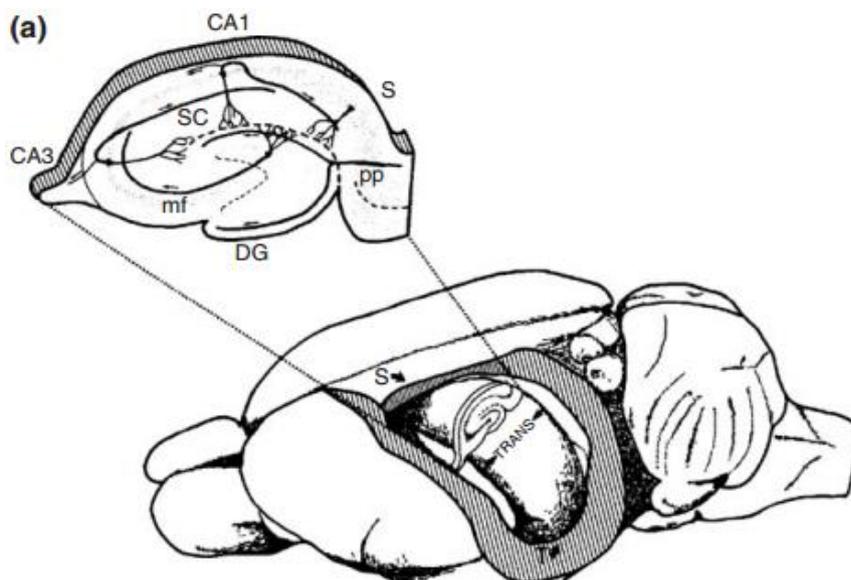
1.3 Hipocampo

Uma das regiões cerebrais altamente vulneráveis às consequências de adversidades na vida pré-natal é o hipocampo. Este consiste em uma estrutura que se forma ao final da vida embrionária e continua sua morfogênese ao início do período pós-natal, desenvolvendo-se rapidamente em humanos ao longo dos dois primeiros anos de vida pós-natal e, depois, mais gradualmente até atingir seu pico de volume entre as idades de 9 e 11 anos. Entretanto, após esse período, ocorre ainda um aumento de especialização das regiões hipocampais, juntamente com o desenvolvimento estrutural de vias entre hipocampo e córtex cerebral (NOSARTI; FROUDIST-WALSH, 2016). O hipocampo também se conecta a demais regiões como a amígdala (FRENCH et al., 2003; ISHIKAWA; NAKAMURA, 2006), o hipotálamo (LIMA et al., 2013; SOUSSI et al., 2015), o tálamo (VERTES, 2015), a área tegmental ventral (KAHN; SHOHAMY, 2013) e o cerebelo (ARRIGO et al., 2014; YU; KROOK-MAGNUSON et al., 2015).

O hipocampo atrai muitas atenções devido à sua associação única com os processos cognitivos cerebrais. Dispõe-se atualmente de um grande número de estudos que não apenas contribuem para a compreensão da natureza da memória, mas também tendem a revelar o hipocampo como uma área relacionada a outros papéis igualmente relevantes. Assim, seu estudo também vem tendo participação na descoberta dos mecanismos envolvidos em funções cerebrais gerais.

Nos roedores, o hipocampo apresenta-se como uma estrutura alongada, em formato de C, que se estende desde o núcleo septal na extremidade rostral-dorsal-medial, curvando-se sobre o diencéfalo, até o lobo temporal na sua extremidade caudal-ventral-lateral (Figura 2). O eixo principal do hipocampo é referido como eixo septotemporal, dorsal-ventral ou longitudinal. Já o eixo ortogonal é denominado eixo transversal. O hipocampo propriamente dito é denominado corno de Ammon (CA) consiste em três sub-regiões principais (CA1-CA3). Outras sub-regiões que participam da formação hippocampal são o giro denteado (DG), o complexo subicular e o córtex entorrinal (SCHULTZ; ENGELHARDT, 2014).

Figura 2 - Posição do hipocampo no encéfalo do rato.



Legenda: Representação dos eixos do hipocampo e corte coronal exibindo as principais regiões e suas vias. CA – Corno de Ammon; DG – Giro denteado; S – Polo septal, T – Polo temporal; TRANS – eixo transversal; SC – colaterais de Schaffer; MF: fibras musgosas; pp: via perfurante.

Fonte: DESHMUKH; KNIERIM, 2012.

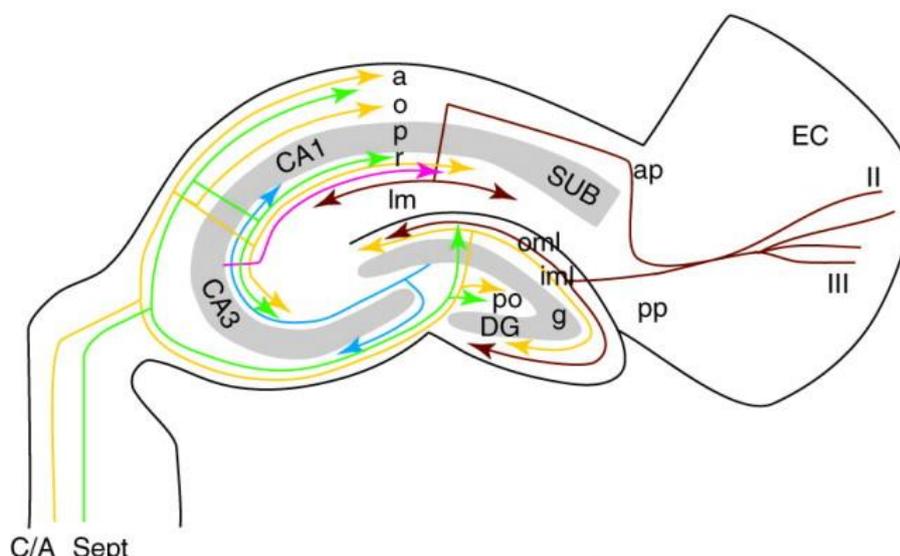
A sub-região do DG é visualizada em cortes coronais do cérebro como uma estrutura horizontal em formato de U ou V, sendo composta por duas lâminas, uma superior e uma inferior. O DG pode ser ainda dividido em estratos: molecular, granular e polimórfico. A camada granular contém os principais neurônios do DG, as células granulares, cujos dendritos estendem-se até a camada molecular e recebem *inputs* excitatórios dos neurônios do córtex entorrinal através da via perfurante. Os axônios das células granulares (fibras musgosas) podem liberar tanto o glutamato quanto o ácido gama-aminobutírico (GABA), dependendo do estágio de desenvolvimento e do nível de atividade neuronal (GUTIERREZ et al., 2005). As fibras musgosas projetam-se para o CA3, além de darem origem a colaterais que se conectam com alguns neurônios da camada polimórfica, incluindo células musgosas. As células musgosas da camada polimórfica do DG são neurônios glutamatérgicos que projetam para as células granulares e para interneurônios inibitórios ao longo do eixo septotemporal. Assim, as células granulares e musgosas formam alças de *feedback* bi e trissinápticas (DESHMUKH; KNIERIM, 2012).

O CA também pode ser dividido em camadas ou *strata* (no singular: *stratum*), da mais superficial para a mais profunda: *alveus*, *oriens*, *pyramidale*, *lucidum*, *radiatum*, *lacunosum* e *moleculare*. No CA3, o *stratum pyramidale* consiste em uma camada celular bem definida com início entre as duas lâminas do DG. As células deste *stratum*, células piramidais, recebem *inputs* das fibras musgosas e dos neurônios do córtex entorrinal através da via perfurante. As células piramidais do CA3 dão origem a duas grandes projeções dentro do hipocampo. O sistema colateral compreende axônios do CA3 que realizam sinapses excitatórias ou inibitórias com outras células do CA3 (SZABADICS, 2010). Esses mesmos axônios também projetam para o CA1 em uma via chamada de sistema colateral de Schaffer. Os colaterais de Schaffer estão associados a sinapses excitatórias e mostram uma organização topográfica de suas projeções ao longo do eixo transversal do CA1. O CA1 também recebe *inputs* excitatórios vindos do córtex entorrinal (ANDERSON et al., 2014)

Inicialmente, acreditava-se que a fisiologia do hipocampo estaria limitada à via trissináptica, compreendendo os axônios do córtex entorrinal conectando-se ao DG, as conexões do DG ao CA3 e as conexões do CA3 para o CA1. Dessa forma, uma seção transversal do hipocampo deveria possuir a via trissináptica completa. Esta era a base da hipótese lamelar de Andersen e colaboradores (1971). De acordo com essa hipótese, portanto, o hipocampo estaria organizado ao longo do eixo septotemporal como um conjunto de tais lamelas, cada uma operando como uma unidade funcional independente.

Evidências posteriores (AMARAL; WITTER, 1989) mostraram que a organização das vias aferentes e eferentes hipocámpais seria muito mais complexa (Figura 3). Com exceção das fibras musgosas que conectam o DG ao CA3, todas as vias na formação hipocámpal são mais divergentes ao longo de eixo septotemporal do que sugeria a hipótese lamelar. Além disso, a conectividade sináptica na formação hipocámpal é muito mais complexa do que a via trissináptica, possuindo um grande número de *inputs* paralelos e vias de *feedback* (WITTER; AMARAL, 2004).

Figura 3 - Vias Hipocampais



Legenda: Estão demonstradas as regiões da formação hipocampal (SUB: subículo; CA: Corno de Ammon; DG: Giro dentado), as camadas (a: *stratum alveus*; o: *stratum oriens*; p: *stratum pyramidale*; r: *stratum radiatum*; Im: *stratum lacunosum-moleculare*; oml: camada molecular externa; iml: camada molecular interna; g: camada granular; po: camada polimórfica), as áreas de projeção (EC: córtex entorrinal; C/A: projeção comissural/associacional; Sept: projeção septal). As vias estão representadas em diferentes cores. Em marrom, as vias perforante (pp) e alvear (ap); em amarelo, as vias comissurais/associacionais; em verde, as vias septais; em azul, as fibras musgosas; em rosa, os colaterais de Schaffer.

Fonte: SKUTELLA; NITSCH, 2001.

1.4 Aprendizado e memória

O papel do hipocampo na memória passou a ser compreendido de forma mais elaborada a partir dos estudos de Scoville e Milner (1957), que descreveram danos à formação hipocampal levando à amnésia profunda. Eles relataram que pacientes com lesões no lobo temporal medial pareciam esquecer os incidentes da vida diária tão rápido quanto eles ocorriam. A memória de curto-prazo desses pacientes parecia intacta, no entanto, eles esqueciam eventos assim que se distraíam. H.M., um dos pacientes acompanhado, revelou-se incapaz de formar novas memórias sobre fatos e eventos (amnésia anterógrada). H.M. também demonstrava uma amnésia retrógrada parcial, podendo se lembrar de eventos na infância com mais facilidade do que eventos que haviam ocorrido três anos antes da remoção do seu hipocampo. Posteriormente, H.M. também provou sua capacidade de aprendizado de procedimento e perceptual, porém sem apresentar nenhuma memória consciente dos

treinos que realizava. A observação desse fenômeno juntamente com os dados coletados a partir de testes com outros pacientes amnésicos formaram a base da hipótese de que há múltiplos tipos de memória e que o hipocampo participaria apenas de uma parte destes tipos (COHEN; SQUIRE, 1980; MILNER et al., 1968).

Tentativas de se caracterizar as propriedades do aprendizado dependentes do hipocampo têm contribuído para um grande número de hipóteses sobre o funcionamento hipocampal. Alterações na eficácia sináptica são consideradas o mecanismo principal de armazenamento de informações desde que Ramon y Cajal (1899) hipotetizou que neurônios comunicam-se uns com os outros nas sinapses. Hebb (1949) postulou uma hipótese formal para a plasticidade sináptica que declarou: “quando um axônio A está próximo o suficiente para excitar uma célula B e repetidamente e persistentemente participa da sua ativação, alguns processos de crescimento e alterações metabólicas ocorrem em uma ou nas duas células tal que a eficiência da célula A é aumentada”. Bliss e Lomo (1973) demonstraram a plasticidade descrita por Hebb nas sinapses entre as fibras musgosas e as células granulares do DG. Eles mostraram que a estimulação de alta frequência conduz ao aumento da eficácia sináptica, com duração prolongada. Este fenômeno passou a ser chamado de potenciação de longa duração (LTP). A LTP foi posteriormente demonstrada nas sinapses das fibras musgosas do DG com as células piramidais do CA3 e nas sinapses das fibras colaterais de Schaffer no CA3 com as células piramidais do CA1, além de numerosas áreas além da formação hipocampal.

Atualmente a atuação do hipocampo é reconhecida em diferentes etapas do processo de aprendizado e memória, auxiliando tanto na codificação de novas memórias quanto na consolidação destas memórias em representações mais duradouras. Durante períodos de exploração ativa, o *input* sensorial processado pelo córtex entorrinal coordena a atividade neuronal, auxiliando a codificação das memórias. Por outro lado, sendo comandado por *inputs* internos, o hipocampo transmite a informação armazenada com o objetivo de consolidá-la através de circuitos hipocampo-neocorticais (ANDERSON et al., 2014).

1.4.1 Memória episódica

Hoje é reconhecida a existência de múltiplos tipos de memória. Estas são divididas primariamente entre as formas tipicamente expressas de maneira explícita, isto é, através do acesso consciente à informação, caracterizando a memória declarativa, além daquelas expressas implicitamente através de alterações nas respostas comportamentais e fisiológicas na ausência de consciência, denominada memória não-declarativa (O'KEEFE; NADEL, 1978; BEAR et al., 2015).

A memória declarativa pode ainda ser subdividida. A memória de trabalho envolve a manutenção da informação na mente e, certas vezes, a manipulação da informação com um objetivo imediato. Quanto à memória declarativa de longo-prazo, existem os tipos: semântica e episódica. A memória semântica compreende conhecimentos aprendidos, porém, a informação sobre o local ou momento em que foram adquiridos geralmente não é conhecida. A memória episódica, por sua vez, baseia-se na capacidade de apreender, armazenar e recuperar informações sobre experiências únicas que ocorrem na vida diária. Essas memórias normalmente incluem informações contextuais sobre o momento e local do evento bem como detalhes sobre o evento propriamente dito (GLUCK et al., 2008)

As implicações do desenvolvimento da memória episódica são de longo alcance. Evidências demonstram déficits deste tipo específico após hipóxia ou isquemia cerebral (DE HAAN, 2012), lesão traumática (HANTEN et al., 2004), em distúrbios como a depressão (WHALLEY et al., 2009), estresse pós-traumático (MORADI et al., 2008; VASTERLING et al., 2009), ansiedade (AIRAKSINEN et al., 2005) e esquizofrenia (RAGLAND et al., 2003).

É importante destacar que a memória não-declarativa e algumas capacidades relativas à memória declarativa são primitivas. Apesar disso, uma forma particular de memória declarativa, a memória episódica, parece evolutivamente recente, sendo sua existência em espécies não-humanas ainda controversa (CLAYTON et al., 2003). Sugere-se que esses animais possuam um tipo de memória similar à episódica baseada na capacidade de se combinar fatores como “o quê”, “quando” e “onde”, formando um sistema de memória integrado.

Com o objetivo de investigar a memória similar à episódica em roedores, Ennaceur e Delacour (1988) desenvolveram testes comportamentais baseados no

reconhecimento de novos objetos ou novas localizações, os quais são amplamente utilizados hoje para a investigação de alterações de memória. Trata-se de ensaios comportamentais simples que dependem primariamente do comportamento exploratório inato característico do roedor. O teste consiste em uma etapa inicial na qual o animal explora dois objetos semelhantes, seguido de um segundo momento em que um novo objeto é apresentado juntamente com um dos objetos já familiares para o animal. Geralmente se observa que os ratos e camundongos testados passam a maior parte do tempo explorando o objeto novo e isto indica que o objeto familiar foi reconhecido (HAMPTON; SCHWARTZ, 2004).

Estudos já mostraram que a memória relacionada ao reconhecimento envolve vias de detecção da informação visual baseada nas características do objeto (formato, cor, textura) mediada pelo córtex perirrinal, entorrinal lateral e hipocampo (FRISCH, 2005; GILBERT; KESNER, 2004). Medidas do potencial evocado e de fMRI mostraram o aumento da atividade hipocampal frente à exposição a um novo estímulo (KNIGHT, 1996; KNIGHT; NAKADA, 1998). Além disso, a novidade é responsável por causar o aumento da atividade dos neurônios presentes especificamente no CA1, não sendo observadas alterações na atividade no CA3 (KARLSSON; FRANK, 2008; LARKIN et al. 2014). Esses dados levaram à proposta de que a região CA1 funcionaria como um detector de novidade (LISMAN; OTMAKHOVA, 2001), através da comparação de informações sensoriais do córtex entorrinal com representações armazenadas no CA3.

Ratos com lesões excitotóxicas no hipocampo mostram déficits significativos de reconhecimento de objetos em testes utilizando um intervalo de 5 minutos entre a etapa de familiarização e o teste propriamente dito (MUMBY et al., 2002). Clark et al. (2000) mostraram reconhecimento intacto após lesões citotóxicas e de radio-frequência em intervalos de 10 segundos e 1 minuto. Em intervalos de 10 min, contudo, os ratos lesionados apresentaram déficits significativos no teste. Além do intervalo empregado no teste de reconhecimento, o grau de lesão hipocampal também pode definir a ocorrência de danos comportamentais. Ainge e colaboradores (2006) descreveram que ratos cujos hipocampos apresentavam lesões entre 47 e 68% do tecido não mostraram déficits em intervalos de 10min, 1h e 4h. Por outro lado, ratos com 90 a 100% de hipocampo destruído apresentavam redução significativa do desempenho em qualquer um dos intervalos.

Dados anteriores do nosso grupo (COSTA, 2014) apontam que animais submetidos ao mesmo modelo deste trabalho não apresentam falhas no reconhecimento temporal de objetos de curta ou longa duração na idade adulta. Por outro lado, estes animais possuem alterações na atividade exploratória, que poderiam estar relacionadas a transtornos como o déficit de atenção.

1.5 Eventos celulares decorrentes de HI

A progressão da lesão hipóxico-isquêmica intrauterina no encéfalo durante o período pós-natal tem sido extensivamente investigada e revisada (VOLPE, 2001, 2012; FERRIERO, 2004; GUNN; BENNET, 2009). Acredita-se que as consequências de eventos de HI possam se desenvolver por dias ou até semanas após o evento (FERRIERO, 2004), tendo início no momento do insulto e se estendendo ao longo do período de recuperação.

Tais danos são presenciados em diferentes etapas. Em um primeiro momento, a asfixia promove no feto modificações sistêmicas, motivadas por adaptações circulatórias com o objetivo de redistribuir o débito cardíaco. Esta operação consiste em uma estratégia de preservação do SNC, do coração e das glândulas adrenais, que se tornam hiperperfundidos em detrimento dos demais órgãos. Entretanto, com o aumento da intensidade do processo hipóxico-isquêmico, os órgãos nobres inicialmente protegidos passam a sofrer também os efeitos deletérios decorrentes de HI. Destaca-se que, em se tratando de uma lesão pré-natal, a vulnerabilidade do encéfalo imaturo é capaz de ainda estender estes danos.

O encéfalo, como uma estrutura altamente dependente do fluxo sanguíneo contínuo para o suprimento de oxigênio e glicose, passa por consequências devastadoras durante e depois de HI. Com a interrupção ou redução do fluxo de oxigênio, há a diminuição da síntese de ATP e as células perdem sua capacidade de manter ativos seus processos dependentes de energia (SHALAK; PERLMAN, 2004). Nos neurônios pré-sinápticos, este evento reflete na despolarização da membrana e no influxo de íons Ca^{2+} (VOLPE, 2008). Em resposta, altos níveis de neurotransmissores excitatórios, principalmente do glutamato, são liberados e ocorre a hiperativação dos seus receptores presentes no terminal pós-sináptico, o que

acarreta o aumento da entrada de Ca^{2+} nestas células e, assim, ativam-se diversas vias de sinalização intracelular que levam a um impacto negativo quanto ao destino da célula (JOHNSTON et al., 2009). São iniciados, então, diferentes processos citotóxicos que podem culminar na morte neuronal, tanto por necrose quanto por apoptose (JOHNSTON et al., 2009). A geração de níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio (EROs), devido à redução do aporte de oxigênio, também afeta o influxo de Ca^{2+} , amplificando o processo de citotoxicidade (BUONOCORE; GROENENDAAL, 2007).

Em um momento posterior ao insulto, presencia-se a etapa de reperfusão, caracterizada pelo retorno do fluxo sanguíneo normal aos tecidos. Apesar da estabilidade cardiorrespiratória sistêmica, os danos neuronais persistem através da ativação de cascatas de morte celular, devido à ineficiência do metabolismo oxidativo. Este estágio também é marcado pelo surgimento da resposta inflamatória, a qual pode durar de horas a dias (HEDTJARN et al., 2004). A liberação de citocinas pró-inflamatórias (Quadro 2) contribui para exacerbar os danos relacionados à liberação de glutamato, através da indução do aumento do influxo de Ca^{2+} . Os elevados níveis intracelulares de Ca^{2+} , descritos tanto durante o insulto quanto ao longo da reperfusão, são responsáveis ainda pela geração de radicais livres, os quais também ativam as vias de morte neuronal dependentes da hiperativação de receptores glutamatérgicos.

Em um modelo experimental de HI que se aproxima do modelo utilizado neste trabalho já é descrito o aumento de IL-1 β e de IL-6 no líquido amniótico de ratas dentro de um período de 4 horas após terem sido submetidas à cirurgia de indução de HI (ROBINSON et al., 2005). Também foi verificada a ocorrência de níveis elevados de IL-6 e TNF α em amostras de lobo frontal dos filhotes um dia após a lesão hipóxico-isquêmica.

Embora seja reconhecida e amplamente estudada a relevância da ativação de vias que levam à morte neuronal devido à HI, a investigação acerca dos danos subletais decorrentes desta lesão também merece destaque. Têm sido descritas em diferentes tipos celulares modificações metabólicas e alterações na expressão gênica após hipóxia ou HI, as quais podem representar mais uma fonte de danos observados ao longo-prazo (HARTLEY et al., 2013). Jogi e colaboradores (2002) identificaram o aumento da expressão de genes relacionados a processos hipóxicos, como aqueles responsáveis pela TH, VEGF, IGF-2 e GAPDH em células humanas

Quadro 2 - Papel das citocinas e quimiocinas na HIE

Mediadores	Objetos de estudo	Estimulação	Expressão após estimulação	Efeitos sobre HIE
IL-1 α	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
IL-1 β	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
TNF- α	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
IL-18	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
	camundongos IL-18-/- (P9)	HIE		Benéfico
IL-2	crianças (4,5 anos)	AVC perinatal	↑ (efeito crônico)	
IL-6	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
IL-8	crianças (4,5 anos)	AVC perinatal	↑ (efeito crônico)	
IL-9	camundongos (P5)	ibotenate + IL-9		Deletério
IL-10	camundongos (P5)	ibotenate + IL-10		Benéfico
IL-4	camundongos (P5)	ibotenate + IL-4		Benéfico
IFN- γ	ratos (P1-3)	IFN- γ		Deletério
CCL3/MIP-1 α	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
CCL4/MIP-1 β	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
CCL5/RANTES	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
CCL2/MCP-1	ratos (P7)	HIE	↑	Deletério
CXCL12/SDF1	camundongos (P7)	HIE	↑	Deletério

Fonte: Adaptado de LIU; MCCULLOUGH, 2013.

de neuroblastoma humanas submetida à hipóxia, bem como a regulação de genes relacionados à diferenciação celular. É também conhecida a caracterização da hipóxia como um estresse capaz de alterar padrões de ativação de genes necessários para a sobrevivência da célula e sua adaptação à baixa tensão de oxigênio (RAGEL et al., 2007). Além disso, genes associados à neurogênese e regeneração neuronal foram fortemente reprimidos em momentos posteriores ao estresse (BURGULA et al., 2010; ZHOU et al., 2008). Outros estudos demonstram ainda que a hipóxia intermitente pode iniciar mudanças epigenéticas que levam à persistência do estresse oxidativo e posteriores manifestações de doenças cardiovasculares em ratos adultos (NANDURI et al., 2012).

Dados obtidos no nosso laboratório indicam que o insulto hipóxico-isquêmico em E18 é capaz de gerar alterações na expressão da óxido nítrico sintase no cerebelo, as quais podem ser percebidas por longos períodos após a lesão (SAVIGNON et al., 2012). Além de serem verificadas mudanças na distribuição da óxido nítrico sintase nas células de Purkinje ao longo do desenvolvimento pós-natal, astrócitos na substância branca cerebelar mantêm fenótipo reativo e expressam essa enzima, pelo menos até a quarta semana de vida pós-natal. Isto sugere que essas células possam desempenhar um papel importante na morte, por excitotoxicidade, de progenitores de

oligodendrócitos positivos para o receptor alfa de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFr- α) também observada nesses animais (SAVIGNON, 2013).

Além disso, em um trabalho anterior (Pinto, 2015), avaliamos os efeitos da HI sistêmica pré-natal sobre a população neuronal e distribuição de um receptor de glutamato no hipocampo de neonatos. Foram descritos importantes achados que reforçam a relevância de condições adequadas de perfusão para o desenvolvimento hipocampal. A densidade neuronal de neonatos do grupo HI encontra-se reduzida tanto no CA3 quanto no DG. Ratos HI apresentam ainda padrões de astrogliose identificados no DG e no CA3 na idade adulta.

1.6 Glutamato

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC de mamíferos, constituindo-se como o mediador de cerca de 80 a 90% das sinapses excitatórias centrais (MCKENNA, 2007). Este aminoácido participa da regulação de inúmeros processos fisiológicos fundamentais, tais como aprendizado e memória, formação de redes neurais durante o desenvolvimento e envelhecimento, além das etapas de proliferação, migração, diferenciação e morte celular (MCDONALD; JOHNSTON 1990; PRYBYLOWSKI; WENTHOLD, 2004).

Entretanto, apesar de seu importante papel fisiológico, as ações do glutamato também podem ter como consequência a neurotoxicidade. Em certas situações patológicas, ao ocorrer a hiperativação do sistema glutamatérgico, através de altos níveis de liberação de glutamato e da sinalização mediada por seus receptores, podem ser ativadas vias que levam à morte neuronal. Este fenômeno é conhecido como excitotoxicidade glutamatérgica (LIPTON; ROSEMBERG, 1994).

A síntese deste aminoácido não-essencial é realizada pelos neurônios a partir de precursores como a glutamina (HAWKINS, 2009). Esta é liberada pelas células gliais e captada por neurônios pré-sinápticos, onde é convertida a glutamato através da enzima mitocondrial glutaminase. A síntese de glutamato também pode ser obtida a partir da transaminação do 2-oxoglutarato, um intermediário do Ciclo de Krebs (PURVES et al., 2001; TORGNER; KVAMME, 1990).

A maior parte do glutamato sintetizado pelos neurônios permanece armazenada em vesículas nos terminais nervosos. As vesículas sinápticas de glutamato ou de outros neurotransmissores são dotadas de diversos componentes que possuem uma dinâmica complexa nos processos de tráfego e de exocitose. Vesículas sinápticas podem ser caracterizadas como elementos capazes de realizar exocitose que fazem uso da maquinaria de fusão de membrana sob regulação de um sensor de cálcio (SUSZKIW, 2012). A mobilização de vesículas é essencial para assegurar a disponibilidade de neurotransmissor durante períodos de intensa atividade sináptica. Acredita-se que a mobilização das vesículas envolva interações com o citoesqueleto reguladas pela fosforilação e defosforilação de proteínas associadas a vesículas, as sinapsinas (LLINAS et al., 1991; GREENGARD et al., 1993).

Já, o processo de ancoragem e fusão, é dependente não só de um componente, mas de uma classe de proteínas altamente conservadas denominadas SNAREs (SOLLNER et al., 1993). Esta classe é composta pela proteína vesicular sinaptobrevina (também conhecida como VAMP - proteína associada à membrana da vesícula sináptica) e pelas proteínas de membrana pré-sináptica: a sintaxina e a SNAP-25 (proteína associada à sinaptossoma de 25 kDa). Uma síntese da função de algumas proteínas sinápticas pode ser conferida no Quadro 3.

Nas vesículas sinápticas responsáveis por armazenar glutamato, são encontrados ainda os transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), que captam este neurotransmissor. VGLUTs consistem em uma família de três isoformas, que apresentam características de transporte similares, porém diferentes padrões de expressão. É conhecida uma regulação diferencial ao longo do desenvolvimento. Enquanto VGLUT2 e 3 são expressos em altos níveis durante os estágios iniciais da vida, a isoforma VGLUT1 é praticamente indetectável ao nascimento. Entretanto, sua expressão tende a aumentar ao longo do período pós-natal, substituindo a predominância de VGLUT2 em algumas regiões (MIYAZAKI et al., 2003, BOULLAND et al., 2004). No encéfalo adulto, VGLUT1 apresenta-se como a isoforma predominante no hipocampo e no córtex cerebral e cerebelar e o VGLUT2 é abundante no tálamo e no tronco encefálico (BELLOCCHIO et al., 2000, HAYASHI et al., 2001, HERZOG et al., 2001, TAKAMORI et al., 2001, FREMEAU et al., 2004). VGLUT1 e 2 são expressos exclusivamente em neurônios glutamatérgicos, sendo usados como marcadores destas células (MORIYAMA; YAMAMOTO, 2004).

Quadro 3 - Proteínas sinápticas e breve descrição de suas funções e domínios

Proteína	Descrição breve da função e domínios
Neurexina	Molécula pré-sináptica que interage com a neuroligina pós-sináptica que conecta as membranas pré e pós-sinápticas.
SNAP-25	Proteína Q-SNARE. É ancorada à membrana via cadeias laterais de palmitoil e possui alfa hélices que formam o complexo SNARE junto com a sinaptobrevina e a syntaxina.
Sinaptobrevina ou VAMP-2	Proteína vesicular R-SNARE. Contém um domínio transmembrana e alfa hélice que forma o complexo SNARE junto com SNAP-25 e syntaxina.
Sinaptofisina	Glicoproteína vesicular de função desconhecida. Contém quatro domínios transmembrana. Interage com a sinaptobrevina.
Sinaptotagmina	É uma proteína ligadora de cálcio ancorada às vesículas sinápticas na porção N-terminal por um domínio transmembrana e contém dois domínios citosólicos C-terminais.
Syntaxina	Proteína Q-SNARE. É ancorada à membrana via um domínio transmembrana e possui uma alfa hélice que forma o complexo SNARE junto com a sinaptobrevina e a SNAP-25.

Fonte: Adaptado de ASHERY et al., 2014.

A presença de VGLUT3, por outro lado, já foi encontrada em muitas populações neuronais não-glutamatérgicas, como neurônios colinérgicos, serotoninérgicos e GABAérgicos, possivelmente mediando a co-liberação de neurotransmissores (FREMEAU et al., 2002, GRAS et al., 2002)

Como consequência da estimulação do neurônio pré-sináptico e do correto funcionamento da dinâmica de proteínas de vesículas sinápticas, ocorre a fusão das vesículas com a membrana sináptica e a liberação de glutamato na fenda sináptica. Em seguida, o neurotransmissor pode interagir com seus receptores na célula pós-sináptica.

São descritos dois grandes grupos de receptores glutamatérgicos: os ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). Os receptores encontram-se estrategicamente situados em diferentes tipos celulares nas adjacências das sinapses glutamatérgicas, em neurônios pré e pós-sinápticos e astrócitos (TRAYNELIS et al., 2010).

A estrutura dos iGluRs compõe-se de proteínas de membrana integrais constituídas por 4 grandes subunidades (>900 resíduos) que formam um canal iônico central. A ativação destes receptores possibilita que a neurotransmissão seja efetivada de forma mais rápida, através do fluxo de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. A família dos

iGluRs é dividida em três grupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA), e cainato (KA). Esta classificação é baseada na similaridade de sequência de DNA e na ativação desses receptores por diferentes agonistas farmacológicos (GASPARINI; GRIFFITHS, 2013).

Os receptores NMDA (NMDAr) possuem elevada permeabilidade a íons Ca^{2+} , o que lhes confere um papel mais ativo em processos neurotóxicos, principalmente devido à ativação de processos de transdução de sinal dependentes de cálcio (LEE et al., 2003). NMDAr são constituídos por um complexo formado por uma combinação das 3 diferentes subunidades: NR1, NR2 e NR3. A subunidade NR1 apresenta oito isoformas formadas pelo *splicing* alternativo de um único gene, a subunidade NR2 apresenta quatro subtipos (NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), e a NR3 apresenta dois (NR3A e NR3B) (CURTIS et al., 2003, PAOLETTI; NEYTON, 2007; NIKAN; MELTZER, 2002; FURUKAWA et al., 2005).

Quanto ao seu funcionamento, em potencial de repouso, os NMDAr da membrana pós-sináptica, encontram-se bloqueados pelo íon Mg^{2+} , impedindo o influxo de Ca^{2+} . A despolarização permite o deslocamento de Mg^{2+} e, assim, a entrada de Ca^{2+} na célula pós-sináptica. Esta despolarização é exercida através da ativação dos receptores não-NMDA (AMPA e KA). Estes se diferenciam dos receptores NMDA por consistirem em canais independentes de voltagem, permeáveis a íons Na^+ e K^+ , porém com baixa permeabilidade ao Ca^{2+} .

Até o momento, foram descritas quatro subunidades de receptores AMPA (AMPAr) (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4), as quais combinam-se para a formação de tetrâmeros (PELLEGRINI-GIAMPIETRO, 1991).

O conhecimento acerca da fisiologia dos receptores de glutamato é especialmente relevante no estudo do aprendizado e da memória. Os receptores NMDA são críticos para a indução da LTP em muitas sinapses, incluindo aquelas entre a via perfurante e o DG e aquelas relativas aos colaterais de Schaffer na CA1.

Uma conhecida proteína pós-sináptica envolvida com a estabilização, recrutamento e o tráfego de receptores de glutamato, tanto NMDAr quanto AMPAr, tem sido destacada em estudos recentes de déficits de aprendizado, como observado em crianças portadoras de esquizofrenia e autismo (COLEY; GAO, 2017). Trata-se da proteína da densidade pós-sináptica-95 (PSD 95). A PSD 95 também se mostrou envolvida na plasticidade sináptica e na morfogênese de espinhas dendríticas durante o desenvolvimento (FUNKE et al., 2005, GILMAN et al., 2011)

A neurotransmissão é finalizada com a captação de glutamato, exercida majoritariamente pelos astrócitos adjacentes à sinapse, através dos transportadores EAAT, o que evita a sua permanência no espaço extracelular. Acredita-se que apenas quantidades muito reduzidas deste aminoácido se difundam para o exterior da sinapse (HAWKINS, 2009).

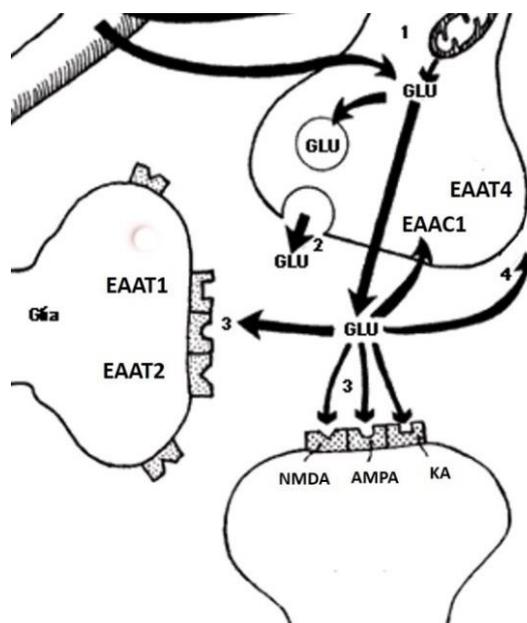
Através da ação da enzima glutamina sintetase, cumpre-se a conversão de glutamato a glutamina, sendo esta enzima descrita exclusivamente em células da linhagem astrocitária (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1977). A glutamina é, então, liberada para o meio extracelular, para ser transferida para neurônios antes de, mais uma vez, se converter a glutamato (BRÖER; BROOKES, 2001).

Para compensar os níveis totais de glutamato captado, os astrócitos possuem uma maquinaria de síntese de glutamato a partir da glicose via ciclo de Krebs e com o auxílio da enzima aspartato aminotransferase (PARDO et al., 2011). Esta capacidade de manter os níveis de glutamato para neurotransmissão tanto através da reciclagem quanto da síntese de glutamina tem sido conhecida como ciclo glutamato-glutamina. Trata-se de um importante mecanismo neuroprotetor de finalização da neurotransmissão glutamatérgica, ressaltando-se que a eficácia deste processo requer a coordenação entre a abundância de glutamato captado e a sua degradação (RAUEN; WIESSNER, 2000).

Os astrócitos, as células mais abundantes no SNC, podem exercer efeitos neuroprotetores no contexto da toxicidade excitatória do glutamato. O tamponamento de moléculas potencialmente neurotóxicas, como o glutamato consiste em uma das mais importantes funções destas células e é permitido através da atividade de transportadores específicos (Figura 4).

Cinco subtipos de transportadores de glutamato foram clonados até o momento: EAAT1 (STORCK et al., 1992; TANAKA, 1994); EAAT2 (PINES et al., 1992); EAAC1 (KANAI; HEDIGER, 1992); EAAT4 (FAIRMAN et al., 1995); EAAT5 (ARRIZA et al., 1997). A expressão desses transportadores ocorre em tipos celulares específicos. EAAT1 e EAAT2 são encontrados em células gliais (ROTHSTEIN et al., 1994; LEHRE et al., 1995), enquanto EAAC1 e EAAT4 são expressos em neurônios (FURUTA et al., 1997; DEHNES et al., 1998). EAAT5 está presente em glia e neurônios na retina (ELIASOF et al., 1998).

Figura 4 – Neurotransmissão glutamatérgica



Nota: O glutamato (GLU), liberado dos neurônios pré-sináptico (1) por meio de vesículas (2) liga-se a seus receptores na célula pós-sináptica (3). Os astrócitos ao redor das sinapses captam glutamato através de transportadores EAAT1 e EAAT2 (3). Uma parte reduzida do glutamato presente na fenda sináptica pode ser captada pelo neurônio através de transportadores EAAC1 e EAAT4 (4).

Fonte: SAVIGNON, 2013.

Durante um evento de hipóxia, que pode estar ou não associada com isquemia, o funcionamento dos transportadores de glutamato torna-se prejudicado pela despolarização dos terminais nervosos, devido à falta de ATP. Como resultado, ocorre a inversão dos transportadores, que liberam glutamato da célula ao invés de o retirarem da fenda sináptica (ROSSI et al., 2000; Dallas et al., 2007). Outra causa de ineficiência de captação de glutamato por este transportador ocorre devido à retração dos prolongamentos astrocitários (IINO et al., 2001).

O glutamato captado pelos astrócitos ao redor da fenda sináptica, ao se acumular, tende a se difundir para astrócitos vizinhos onde passa a ser metabolizado, gerando glutamina (ORELLANA et al., 2009). O tráfego de glutamato entre astrócitos é permitido por junções intercelulares do tipo gap, as quais vêm sendo amplamente estudadas em modelos de HI *in vivo* e *in vitro*.

1.7 GABA

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório presente em circuitos neurais maduros. O papel clássico deste aminoácido consiste na manutenção do equilíbrio elétrico entre excitação e inibição no SNC (TAKESIAN; HENSCH, 2013). Contudo, existe atualmente uma série de evidências que associam a sinalização GABAérgica a importantes funções durante o desenvolvimento e fase adulta, como na sinaptogênese emigração, além de sua atuação como fator neurotrófico (para revisão ver WAAGEPETERSEN et al., 1999)

A síntese do GABA apresenta semelhanças com o processo de formação do glutamato, uma vez que este é seu precursor. A glutamina presente nos astrócitos é transportada para neurônios GABAérgicos, onde é convertida a glutamato, sendo prontamente convertida a GABA através da enzima glutamato descarboxilase (GAD) (WALLS et al., 2015). A GAD possui duas isoformas, denominadas de acordo com o seu peso molecular: GAD-65 e GAD-67. Estas isoformas são produtos de dois genes regulados independentemente e co-expressos na maior parte dos neurônios GABAérgicos do SNC (SOGHOMONIAN; MARTIN, 1998). Acredita-se que o GABA sintetizado para a transmissão sináptica seja produzido pela ação da GAD-65, enquanto a GAD-67 estaria associada à produção do GABA envolvido na atividade metabólica (PINAL; TOBIN, 1998).

Uma vez que a glutamina possui sua origem em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), déficits no metabolismo energético celular, como aqueles decorrentes de redução da perfusão tecidual, podem ser responsáveis por alterações na síntese de glutamato e GABA. O desequilíbrio entre estímulos excitatórios e inibitórios é conhecido por contribuir para a espasticidade, epilepsia e outros déficits neurológicos associados a distúrbios ocorridos durante o desenvolvimento neural (ISAACSON; SCANZIANI, 2011). Em condições experimentais de HI, descreve-se o aumento da frequência de potenciais pós-sinápticos tanto excitatórios (EPSP) quando inibitórios (IPSP) (ALLEN; ATTWELL, 2004).

Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas pré-sinápticas e liberado nos terminais sinápticos. O transportador vesicular de GABA (VGAT) é responsável pela captação de GABA pelas vesículas sinápticas.

Após a liberação, a maior parte deste neurotransmissor é recaptada pelo neurônio pré-sináptico, através de transportadores GAT-1 e, em menor grau por astrócitos (SCHOUSBOE et al 2013). Em seguida, o GABA é metabolizado pela GABA-transaminase e glutaminase para a formação de glutamato, o qual pode ser novamente convertido a GABA e armazenado em vesículas para liberação posterior.

GABA pode atuar como neurotransmissor sobre receptores metabotrópicos ou ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos GABA_B pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e sua ativação inibe a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc e a atividade da proteína quinase A (PKA). A estimulação desses receptores também inibe canais de Ca²⁺ e ativa canais de K⁺ através das subunidades β/γ da proteína G.

Já os receptores GABA_A consistem em receptores ionotrópicos e sua ativação causa a abertura do canal formado no centro do complexo do receptor, o que permite a difusão de íons Cl⁻ através da membrana e sua hiperpolarização. Existem também receptores ionotrópicos conhecidos como GABA_C, identificados particularmente na retina de vertebrados (BOUE-GRABOT et al., 1998).

A liberação de GABA descrita durante a privação de energia produzida por hipóxia ou isquemia é sugerida como neuroprotetora já que o aumento dos níveis de GABA é capaz de hiperpolarizar os neurônios e reduzir a liberação de glutamato. Por outro lado, GABA pode exercer um papel prejudicial através da hiperativação do receptor GABA_A, facilitando o influxo de cloreto, com consequente aumento do volume celular e morte neuronal (ALLEN et al., 2004).

O hipocampo, uma vez que é associado a altos níveis de plasticidade desde o início da vida pós-natal até a fase adulta (GU et al., 2013; MURTY et al., 2016), é uma das regiões onde o equilíbrio entre excitação e inibição mostra-se crucial. Os circuitos hipocampais são capazes de regular sua atividade através da modulação da liberação de neurotransmissores, força pós-sináptica e de propriedades intrínsecas de excitabilidade da membrana (BATEUP et al., 2013).

Apesar de diferentes estudos terem proposto mecanismos para o tratamento de danos decorrentes de HI, ainda não estão claras as consequências da HI transitória pré-natal sobre o aprendizado e memória de animais em um período crítico de desenvolvimento, como a adolescência, e as características neuroquímicas, morfológicas e eletrofisiológicas hipocampais subjacentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do insulto hipóxico-isquêmico transitório pré-natal sobre o balanço excitatório/inibitório no hipocampo e a função cognitiva em ratos adolescentes.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos caracterizar os efeitos da HI pré-natal sobre:

- a) a densidade neuronal no hipocampo;
- b) os níveis de componentes sinápticos do hipocampo relacionados à neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica;
- c) a plasticidade sináptica hipocampal;
- d) a atividade exploratória e a ansiedade;
- e) o reconhecimento de novos objetos e a memória espacial de ratos adolescentes.

3 METODOLOGIA

3.1 Procedimento cirúrgico

Os procedimentos relacionados ao uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade (UERJ/CEA/019/2010 e UERJ/CEA/006/2016). Foram tomadas todas as medidas possíveis para minimizar o número de animais usados e a dor ou desconforto destes. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram gerados e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ (DFP/UERJ) em temperatura controlada e ciclo de luz (6h-18h) e escuridão (18h-6h), com acesso à água e alimento *ad libitum*. Utilizamos animais adultos (>P90) nos acasalamentos, sendo empregadas fêmeas nulíparas com massa corporal mínima de 200g. Registramos as massas das fêmeas imediatamente antes do acasalamento para posterior comparação. Os animais foram postos para acasalar (2♂:3♀ ou 1♂:2♀) no início da fase escura, por volta das 18h, e separados cerca de 14h depois. Após 17 dias, as fêmeas foram novamente avaliadas quanto a sua massa corporal para a confirmação da gravidez.

Uma parte dos animais estudados neste trabalho foi proveniente do biotério do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra (CNC/UC), cujos funcionários eram responsáveis por realizar os acasalamentos e disponibilizar as fêmeas grávidas mediante prévia solicitação. Após o recebimento das fêmeas, estas e, posteriormente, seus filhotes permaneciam na sala de manutenção de animais do Laboratório de Eletrofisiologia do CNC/UC, em *rackscom* sistema de ventilação individual, temperatura controlada, ciclo de luz (7h-19h) e escuridão (19h-7h) e acesso à água e alimento *ad libitum*.

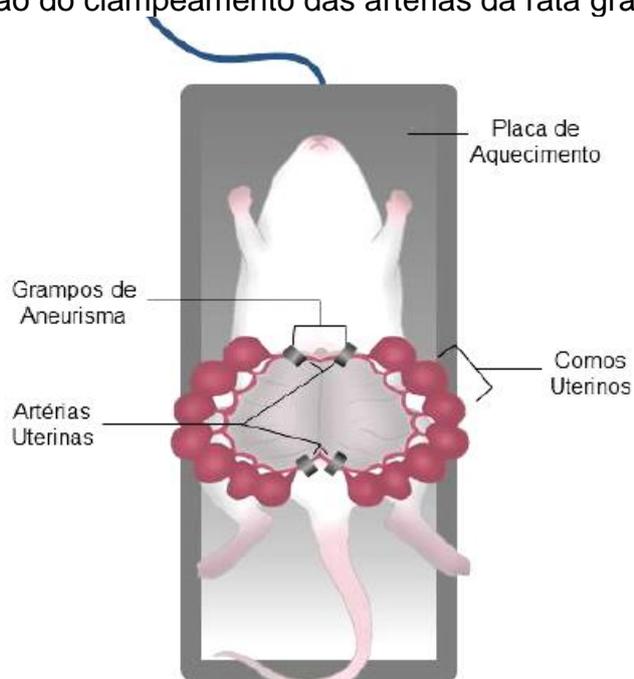
Em E18, as ratas do DFP/UERJ foram anestesiadas pela via intraperitoneal através do uso de Avertin[®] (0,5 g de tribromoetanol + 0,31 mL de 2-metil-2-butanol + 39,5 mL de água destilada), aplicado em duas injeções iniciais (3 e 2 mL) seguidas de doses fracionadas subsequentes (0,5mL) no decorrer do procedimento, de acordo com a resposta do reflexo de retração da pata. As fêmeas do CNC/UC foram anestesiadas pela via inalatória através do emprego de isofluorano (indução a 5%, início do procedimento a 2% e 1,5% ao longo da cirurgia). Após a tricotomia, as ratas

foram posicionadas sobre placas de aquecimento a uma temperatura de 37°C. Então, os cornos uterinos foram expostos e o fluxo uterino e ovariano obstruído com cliques de aneurisma por 45 minutos (Grupo HI) (Figura 5). Após este período, os cliques foram removidos e os cornos uterinos reposicionados na cavidade peritoneal, sendo suturada a parede abdominal.

Foram obtidos também animais falso-operados (Grupo SH) por meio da exposição de úteros sem oclusão das artérias. Após o término da cirurgia, as fêmeas permaneceram sob lâmpada de aquecimento até sua recuperação. A gestação prosseguia, sendo utilizados animais nascidos a termo. Nenhuma intervenção por parte do pesquisador foi realizada antes ou durante o parto, sendo considerado P0 o dia do nascimento. Em P1, o número de filhotes por ninhada era acertado para oito com o objetivo de se equilibrar o perfil lactotrófico entre as ninhadas.

Os experimentos contaram com o número amostral mínimo de 4 animais por idade por grupo, sendo estes provenientes de diferentes ninhadas. Nas análises morfológicas, neuroquímicas e eletrofisiológicas, utilizamos apenas machos. Já na avaliação da massa corporal e nos testes comportamentais, foram empregados machos e fêmeas.

Figura 5 - Representação do clampeamento das artérias da rata grávida



Nota: Encontram-se representados os grampos de aneurisma obstruindo o fluxo sanguíneo para os cornos uterinos.

Fonte: PINTO, 2015.

3.2 Avaliação da massa corporal

Os filhotes das ninhadas analisadas tiveram sua massa corporal aferida e registrada diariamente desde P1 até P15, além de P30 e P45, sempre entre as 18h e 21h. Foram utilizadas nove ninhadas de cada grupo, sendo calculadas as médias de massa corporal para fêmeas e machos.

3.3 Processamento histológico

Animais SH e HI do DFP/UERJ em P45 foram anestesiados e perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9%, seguido de paraformaldeído 4%/tampão fosfato pH7,4 (PF4%) e, em seguida, por PF4%+10% sacarose para crioproteção. Os encéfalos foram dissecados e imersos em tampão fosfato+20% sacarose *overnight* a 4°C e, então, emblocados em OCT (Sakura). Os blocos foram rapidamente congelados através de imersão em nitrogênio líquido e cortes coronais de 20 µm obtidos em criótomo (Leica Biosystems) a -20°C, sendo recolhidos em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%.

3.4 Coloração fluorescente de Nissl

Os cortes foram hidratados por 20 minutos em solução salina tamponada com fosfato 0,1M pH7,4 (PBS) à temperatura ambiente e, em seguida, lavados em PBS+0,1% Triton X-100 (PBSt 0,1%) com o objetivo de se permeabilizar o tecido. Após um banho em PBS, as lâminas foram incubadas com o corante fluorescente de Nissl (NeuroTrace®, ThermoFisher) diluído em PBS (1:300) por 20 minutos. O corante foi, então, removido e as lâminas lavadas novamente com PBSt 0,1% e PBS.

As imagens foram capturadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX40, Tokyo, Japan), acoplado a câmera de vídeo digital (Olympus DP71). Imagens de interesse dos tecidos analisados, como as regiões CA1, CA3 e DG do hipocampo,

foram obtidas através do uso da objetiva de aumento de 20x e a análise foi realizada através do software Image Pro-Plus.

Estabelecemos uma gráticula-padrão, a partir da qual era estabelecido um quadrado de 600 μm de lado, compondo uma área de 0,36 mm^2 . Dentro desta área, foi contabilizado manualmente o número de neurônios presentes no *stratum pyramidale* do CA e na camada granular do DG. Não foram consideradas na contagem células que cruzavam os limites do quadrado.

A espessura das camadas foi mensurada a partir da aplicação de gráticulas-padrão específicas para cada região (CA1: linhas ortogonais, espaçamento: 250x200; CA3: linhas concêntricas, raio: 500, 10 segmentos; DG: segmentos de linha ortogonais, espaçamento: 100x100, angulação: 45°x45°). O valor atribuído à espessura de cada camada foi constituído pela média de 5 segmentos equidistantes traçados a partir das gráticulas em cada imagem avaliada.

Foram utilizados nas análises dados obtidos a partir da média do número de células de 4 cortes de um mesmo encéfalo. O número amostral corresponde a 5 animais de cada grupo, sendo estes provenientes de, no mínimo, 4 ninhadas.

3.5 Imunofluorescência

Os cortes foram hidratados por 20 minutos em PBS à temperatura ambiente e lavados em PBSt0,1% com o objetivo de se permeabilizar o tecido. Em seguida, realizou-se o bloqueio para reações inespecíficas com albumina de soro bovino (BSA) a 5% em PBSt 0,1% por 30 minutos. A incubação com o anticorpo primário anti-Parvalbumina, IgG policlonal produzido em coelho (AbCam) diluído em PBSt 0,1% (1:2000) deu-se durante a noite a 4°C. No dia seguinte, foram feitas mais lavagens com PBS e a incubação com o anticorpo secundário (Anti-IgG de coelho, produzido em cabra, conjugado a Alexa 488) diluído em PBS (1:400) por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com N-propil galato.

As análises morfológicas foram feitas a partir de imagens obtidas através de microscópio de epifluorescência Olympus BX40, acoplado a câmera de vídeo digital (Olympus DP71). De forma similar à quantificação das células marcadas com

Neurotrace[®], nesta avaliação também foi utilizado o software Image Pro-Plus e as mesmas grátulas e áreas de interesse (0,36 mm²) já estabelecidas. Buscou-se identificar, de forma quantitativa, a imunomarcagem de parvalbumina no *stratum pyramidale* do CA e na camada granular do DG, através da densidade óptica obtida a partir de segmentação semi-automatizada.

A análise foi baseada na média da porcentagem da área marcada dentro da área de interesse de 4 cortes de um mesmo encéfalo, para cada região estudada. O número amostral corresponde a 5 animais de cada grupo, sendo estes provenientes de, no mínimo, 4 ninhadas diferentes.

3.6 Preparação de amostras

Em P45, animais dos grupos SH e HI foram decapitados sob anestesia e tiveram seus encéfalos removidos. Mergulhados em PBS, sobre uma placa de gelo, os hipocampos foram dissecados e imersos em nitrogênio líquido para congelamento instantâneo. Os tecidos foram armazenados a -80°C até o processamento. As amostras relativas aos animais do DFP/UERJ foram analisadas quanto ao conteúdo proteico total enquanto as amostras dos animais do CNC/UC foram submetidas à purificação dos terminais sinápticos através da preparação de sinaptossomas.

3.6.1 Fração total

As amostras de fração total proteica foram homogeneizadas em tampão de lise (Hepes 50mM; MgCl₂ 20mM; EDTA 10 mM, Triton X-100 1%) acrescido de coquetel de inibidores de proteases através do uso de pistilo e *dounce*. Os homogenatos foram submetidos à centrifugação a 4°C por 15 minutos a 15682g em centrífuga *Eppendorf*, sendo os sobrenadantes retirados para os ensaios e os precipitados descartados.

3.6.2 Sinaptossomas

Para a preparação dos sinaptossomas, os hipocampos foram inicialmente homogenizados em solução de sacarose (sacarose 0,32M; EDTA 1mM; Hepes 10mM; BSA 1mg/mL) pH7,4 e centrifugados a 3000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante recolhido foi submetido a uma segunda centrifugação, a 14000g por 12 minutos a 4°C. Após descarte dos sobrenadantes, o pellet foi ressuspendido em solução de Percoll a 45% e submetido à centrifugação por 2 minutos a 16000g, também a 4°C. A camada superficial foi recolhida e ressuspendida em solução KHR (Krebs HEPES Ringer) (NaCl 140 mM; EDTA-Na 1 mM; HEPES 10 mM; KCl 5 mM; glicose 5 mM). O conteúdo foi centrifugado novamente nas mesmas condições (2 minutos, 16000g, 4°C). Ao final deste processo, os sobrenadantes foram descartados e os pellets ressuspendidos em tampão de lise acrescido de inibidores de proteases.

3.7 **Western Blotting**

A concentração de proteína das amostras de fração total e de sinaptossomas foi definida através do método de Bradford ou a partir do método BCA em placa de 96 poços, empregando-se curva-padrão de BSA. Realizou-se a leitura das placas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Ao volume de cada amostra referente a 5, 15, 20 ou 30µg de proteína adicionou-se tampão de amostra. Feito isto, as proteínas das amostras foram desnaturadas por 3 min.

Estas amostras foram submetidas, assim, à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Utilizamos o sistema de eletroforese Bio-rad, além de géis em concentrações variando de 5% a 12%, e padrão de peso molecular *Full Range Rainbow* (GE Healthcare). Empregou-se o sistema de transferência *iBlot* (Life Technologies), de forma que as proteínas do gel fossem transferidas para membranas de nitrocelulose ou PVDF. Ao final desta etapa, as membranas foram hidratadas em água destilada por 20 minutos.

Para o bloqueio das membranas, utilizamos solução de BSA a 5% ou leite a 5%, ambos dissolvidos em solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween

20 a 0,1% (TBSt) sob agitação. Em seguida, as mesmas foram incubadas com anticorpo primário, também diluído em TBSt ou TBSt/leite 1%. Logo após a retirada do anticorpo primário (Quadro 4), foram feitas lavagens com TBSt e adicionou-se o anticorpo secundário correspondente conjugado à biotina, peroxidase (HRP) ou fosfatase alcalina (AP) (Quadro 5). Nas membranas incubadas com anticorpos secundários conjugados à biotina, foram realizadas mais lavagens com TBSt antes da incubação com streptavidina conjugada a HRP por 1h. Após lavagens, as membranas foram reveladas a partir da reação com ECL/Luminata/ECF (*Thermo Scientific*) sendo as bandas visualizadas através de um fotodocumentador (ChemiDoc/VersaDoc) onde as imagens foram obtidas e capturadas.

A quantificação das bandas obtidas deu-se por meio dos programas *Image Lab* (Bio-Rad) e *ImageJ* (NIH). O número amostral foi composto por 4 animais de cada grupo, provenientes de, no mínimo, 3 ninhadas.

Quadro 4 – Anticorpos primários utilizados no *western blotting*

Anticorpos Primários				
Anti-EAAT1	IgG	Policlonal produzido em coelho	1:10000	AbCam
Anti-GAD65/67	IgG	Policlonal produzido em coelho	1:7500	Chemicon
Anti-NR2B	IgG	Policlonal produzido em coelho	1:1000	Life Technologies
Anti-sinaptofisina	IgG	Policlonal produzido em coelho	1:10000	Millipore
Anti-sintaxina	IgG	Monoclonal produzido em camundongo	1:20000	Sigma-Aldrich
Anti-SNAP 25	IgG	Monoclonal produzido em camundongo	1:20000	Sigma-Aldrich
Anti-PSD 95	IgG	Monoclonal produzido em camundongo	1:10000	Sigma-Aldrich
Anti-VGLUT1	IgG	Produzido em porquinho da Índia	1:20000	Synaptic Systems
Anti-VGAT	IgG	Produzido em porquinho da Índia	1:1000	Synaptic Systems
Anti- β -actina	IgG	Policlonal produzido em coelho	1:10000	Sigma-Aldrich

Fonte: A autora, 2018.

Quadro 5 – Anticorpos secundários utilizados no *western blotting*

Anticorpos Secundários				
Anti-IgG de coelho	Produzido em cabra	Conjugado com biotina	1:20000	AbCam
Anti-IgG de porquinho da Índia	Produzido em coelho	Conjugado com HRP	1:5000	Sigma-Aldrich
Anti-IgG de camundongo	Produzido em cabra	Conjugado com HRP	1:5000	Thermo Scientific
Anti-IgG de coelho	Produzido em cabra	Conjugado com HRP	1:5000	Thermo Scientific
Anti-IgG de porquinho da Índia	Produzido em cabra	Conjugado com AP	1:5000	Sigma-Aldrich

Fonte: A autora, 2018.

3.8 Imunocitoquímica

Uma parte do conteúdo de sinaptossomas preparados foi utilizada também para uma análise imunocitoquímica. Para isso, lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-D-lisina receberam as amostras de sinaptossomas de animais dos grupos SH e HI. Após 1h a temperatura ambiente, ocorreu a fixação através do emprego de PF 4% por 15 min. Em seguida, sucederam-se lavagens com PBS e PBSt 0,2% por 10 min para fins de permeabilização. A etapa de bloqueio contou com a incubação das lamínulas com PBS acrescido de BSA 3% e soro de cavalo 5% por 1h a temperatura ambiente. Depois de lavagens com PBS/BSA 3%, os sinaptossomas foram incubados com anticorpos primários diluídos em PBS/BSA 3% por 1-2h, também a temperatura ambiente. Então, após mais lavagens com PBS/BSA 3%, foram adicionados os anticorpos secundários diluídos na mesma solução de lavagem, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Tendo decorrido 1h, as lamínulas foram lavadas com PBS, levemente secas com papel e montadas com o meio Prolong Antifade. Após obtenção de 15 a 20 imagens por indivíduo analisado, foram contabilizadas as marcações de VGLUT1 ou VGAT e sinaptofisina, bem como as colocalizações (VGLUT1/sinaptofisina ou VGAT/sinaptofisina).

Calcularam-se as médias referentes à porcentagem de perfis positivos para VGLUT1 ou VGAT dotados de marcação de sinaptofisina, isto é, a razão entre o número de marcações de VGLUT1 ou VGAT e o número de colocalizações. Foram comparadas, então, as porcentagens de terminais glutamatérgicos e GABAérgicos de hipocampus de animais SH e HI. O número amostral foi composto por 4 animais de cada grupo, provenientes de, no mínimo, 3 ninhadas.

Quadro 6 – Anticorpos primários utilizados na imunocitoquímica

Anticorpos Primários				
Anti-sinaptofisina	IgG	Policlonal produzido em camundongo	1:200	Sigma
Anti-VGLUT1	IgG	Produzido em porquinho da Índia	1:1000	Synaptic Systems
Anti-VGAT	IgG	Produzido em porquinho da Índia	1:1000	Synaptic Systems

Fonte: A autora, 2018.

Quadro 7 – Anticorpos secundários utilizados na imunocitoquímica

Anticorpos Secundários				
Anti-IgG de camundongo	Produzido em cabra	Conjugado com AlexaFluor 488	1:250	Thermo Fisher
Anti-IgG de porquinho da Índia	Produzido em cabra	Conjugado com AlexaFluor 594	1:250	Thermo Fisher

Fonte: A autora, 2018.

3.9 Registros eletrofisiológicos extracelulares

Os animais SH e HI do CNC/UC em P45 foram anestesiados sob atmosfera de halotano e decapitados por guilhotina. Os encéfalos foram rapidamente coletados e colocados em solução de fluido cerebrospinal artificial (ACSF) pH 7,4, gelada, com a seguinte composição: NaCl 124mM, KCl 4,4mM, MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 2mM, Na₂HPO₄ 1 mM, NaHCO₃ 25 mM e glicose 10 mM, gaseificada com uma mistura carbogênica de O₂95% e CO₂5%. Fatias coronais contendo o hipocampo dorsal (400 µm de espessura) foram obtidas em vibrátomo. As fatias foram, então, transferidas para uma pré-câmara que continha ACSF, sob gaseificação contínua com carbogênio, a 32 °C.

Após, no mínimo, 60min, as fatias foram transferidas para uma câmara de registro onde foram continuamente perfundidas com ACSF gaseificado e mantido a 30-32°C a uma taxa de 3 mL/min. O eletrodo de estimulação foi posicionado no *stratum radiatum* proximal do CA1 para estimulação das fibras de Schaffer. Registros de campo extracelular foram obtidos com micropipetas preenchidas com uma solução 4M de NaCl e localizadas no *stratum radiatum* do CA1, tendo como alvo os dendritos distais dos neurônios piramidais. Após amplificação, os registros foram digitalizados e analisados utilizando o software WinLTP. A relação entre a densidade de espinhas dendríticas e a sensibilidade ao estímulo sináptico foi determinada através de curvas estímulo/resposta, em que os potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo (fEPSP) foram plotados em relação à intensidade de estímulo.

Após registrar uma linha de base estável por 10min, a LTP foi induzida através de um estímulo de alta frequência (100 Hz por 1s). A LTP foi quantificada como a porcentagem de alteração entre dois valores: a média de cinco potenciais medidos entre 55 e 60min após a indução e a média dos fEPSP mensurados durante os 10min

que precederam a indução. A despotenciação, por sua vez, foi induzida através de estimulação de baixa frequência (900 pulsos de 1Hz por 15min) aplicada 60min depois da indução de LTP.

A quantificação considerou a porcentagem de alteração dos fEPSP antes e após a indução da despotenciação. O número amostral foi composto por 6 ou 7 animais de cada grupo.

3.10 Teste de campo aberto

Foram submetidas ao teste de atividade exploratória espontânea em campo aberto três coortes de animais P45 de cada grupo, em três condições distintas.

Duas coortes eram provenientes do biotério do DFP/UERJ e foram testadas na sala de testes comportamentais deste departamento. As gaiolas contendo animais da primeira coorte eram alocadas nesta sala por volta das 17h, permanecendo por 60 minutos em fase de habituação. Já, a segunda coorte era alocada na sala por volta das 8h, sendo os testes iniciados 60 minutos depois. Os testes eram efetuados nas mesmas condições da habituação, isto é, com a iluminação através de lâmpada fluorescente (branca).

A terceira coorte foi testada na sala de comportamento do Laboratório de Eletrofisiologia do CNC/UC. Os testes foram efetuados ao longo da fase clara, porém em sala iluminada apenas por lâmpadas fluorescentes vermelhas.

Nas três condições, empregou-se uma caixa de 50x50cm revestida de material adesivo escuro e fosco. A arena era virtualmente dividida em duas regiões: centro e periferia, sendo a área central correspondente a 30% da área total. O animal era individualmente colocado na caixa, entrando pela região periférica, com a cabeça voltada para o centro, e permanecia na arena por 5 ou 10 minutos.

No DFP/UERJ, os experimentos foram gravados por câmera de vídeo Sony (HDR-CX190) situada a cerca de um metro da arena e os vídeos foram posteriormente analisados através do *software* Smart Junior (Panlab Harvard Apparatus). Os parâmetros medidos foram: o número de entradas (total, na periferia e no centro); o tempo em que o animal permaneceu no centro e na periferia; a distância percorrida (total, na periferia e no centro).

Já, no CNC/UC, os experimentos comportamentais dispuseram de um sistema de análise simultâneo à realização do teste, que era composto por câmera sensível à luminosidade vermelha, presa ao teto da sala e conectada a um computador portátil localizado em uma antessala. Neste computador, através do *software* AnyMaze (Stoelting), eram obtidos os dados relativos ao número de entradas no centro, tempo de permanência do animal no centro e na periferia da arena, a distância percorrida (total, na periferia e no centro), além do número de rotações, e do número e da duração de episódios de imobilidade.

3.11 Teste de reconhecimento de objeto novo

O teste foi realizado na sala de testes comportamentais do DFP/UERJ e ocorreu em duas sessões (sessão de treino e sessão de teste), havendo um intervalo de 5 minutos entre elas (Figura 6A). A sessão de treino iniciou-se 5 ou 10 minutos após o término do teste de atividade em campo aberto. Dois objetos semelhantes em formato, cor e material foram posicionados a 10 cm da borda da caixa, com uma distância de 5 cm entre eles. O animal era colocado de frente para os objetos a uma mesma distância dos dois e era permitido que ele os explorasse por um período de 5 minutos. Após um intervalo de 5 minutos, era colocado um objeto igual ao anteriormente explorado (objeto familiar) e um objeto feito do mesmo material, mas com cor e formato distintos (objeto novo) e o animal voltava para a caixa, podendo explorá-la por 5 minutos. Os parâmetros analisados incluíram o número de visitas a cada um dos objetos e o tempo de exploração do objeto familiar (T_{of}), do objeto novo (T_{on}) e o tempo total de exploração (T_t), os quais foram calculados de forma manual. Foram comparadas as porcentagens relativas ao número de idas e ao tempo de exploração. Consideramos formas de exploração as ações de cheirar o objeto, mordê-lo ou tocá-lo com as patas, não sendo contabilizados os momentos em que o animal permanecia apenas descansando sobre o objeto.

Também se calculou o índice de discriminação para cada animal testado. Este índice pode ser obtido a partir da fórmula $(T_{on}-T_{of})/T_t$, isto é, consiste na diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e do objeto familiar dividida pelo tempo total de exploração. Animais sem danos cognitivos tendem a direcionar sua atenção para a

investigação do objeto novo, o explorando por mais tempo e obtendo, assim, um índice de discriminação superior a zero. Já indivíduos com prejuízos de aprendizado e memória podem apresentar índices de discriminação iguais a zero.

3.12 Teste de reconhecimento de objeto deslocado

Este teste foi realizado na sala de comportamento do Laboratório de Eletrofisiologia do CNC/UC. O experimento contou com uma sessão de treino, que era realizada 24h após a habituação do animal à arena e uma sessão de teste, respeitando o intervalo de 90 minutos após a sessão de treino (Figura 6B).

Em ambas as sessões, foram empregados dois objetos iguais que não poderiam ser movimentados pelo animal. Cada um destes objetos era posicionado próximo a um dos cantos superiores (esquerdo e direito) da arena durante a sessão de treino. Era permitido que o animal explorasse os objetos por 5 minutos durante o treino. Já, na sessão de teste, um dos objetos era deslocado para uma nova posição, próxima a um dos cantos inferiores da caixa, sendo intercalados os lados direito e esquerdo entre os animais testados. A sessão de teste também teve duração de 5 minutos e nela foram contabilizados manualmente os números de idas e tempo de exploração de cada um dos objetos, sendo comparadas as porcentagens referentes a estas variáveis. O índice de discriminação foi calculado a partir da fórmula $(T_{od} - T_{of})/T_t$, onde T_{od} corresponde ao tempo de exploração do objeto deslocado. Decorridas 24h após o término do teste de deslocamento de objeto, os animais foram submetidos ao teste do labirinto em Y modificado.

3.13 Teste do labirinto em Y modificado

Esta avaliação, também realizada no CNC/UC, empregou um aparato constituído por três braços fechados (*início*, *novo* e *outro*) que se comunicavam apenas com uma região central, dispostos de tal maneira que formassem o formato da letra Y (Figura 6C). Na sessão de treino, uma porta era colocada no limite entre o

centro e o braço *novo*, de modo que o animal era impedido de entrar neste braço. O rato era posicionado na extremidade do braço de *início* e era permitido, então, que explorasse por 5 minutos os braços de *início* e *outro*, além da região central. Decorridos 120 minutos após o término do treino, a porta era removida e o animal era recolocado no labirinto, também através de entrada pelo braço de início. Nessa sessão, ele teria a chance de explorar todas as regiões do labirinto por 5 minutos. Foram avaliados o número de entradas, o tempo e a distância que cada animal permaneceu em cada um dos braços do labirinto através do programa Any-Maze (Stoelting), sendo comparadas entre os grupos as porcentagens de entradas, tempo e distância relativos a cada um dos braços.

3.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* SPSS. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e avaliados quanto à sua distribuição utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnof. Em todos os testes empregados, as diferenças entre as variáveis analisadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A avaliação dos efeitos da HI sobre a massa corporal foi realizada a partir da análise de variância com medidas repetidas (ANOVAr), tendo como variável dependente a massa corporal e tendo como fator de repetição a idade, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Foram comparados, par a par, os quatro grupos: SH ♂, SH ♀, HI ♂ e HI ♀.

Na análise dos dados provenientes das avaliações morfológicas (coloração fluorescente de Nissl e imunofluorescência), neuroquímicas (*western blotting* e imunocitoquímica) e eletrofisiológicas (amplitude de LTP e de despotenciação), os grupos SH e HI foram comparados através do teste T de Student para amostras independentes.

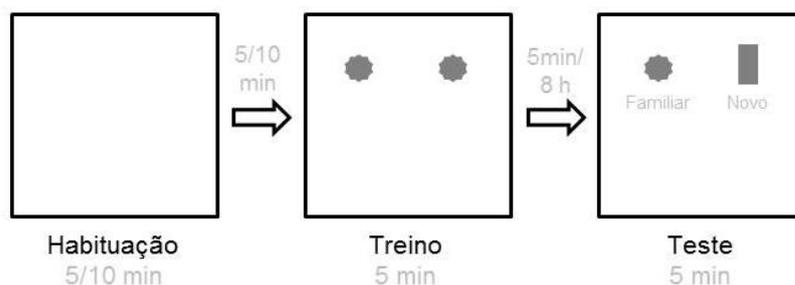
Considerando os testes comportamentais, as diferentes variáveis obtidas a partir do teste de campo aberto foram comparadas entre os grupos SH e HI, utilizando o teste T de Student para amostras independentes.

Já quanto à análise dos testes de reconhecimento de objeto, foi realizada a comparação entre as porcentagens de T_{of} e T_{on} (reconhecimento de objeto novo) ou T_{of} e T_{od} (reconhecimento de objeto deslocado), tanto para o grupo SH quanto para o grupo HI, através do teste T de Student para amostras independentes. Para os IDs calculados, a análise estatística foi feita a partir do teste T de Student para uma amostra (*one-sample*) com o objetivo de comparar os índices de SH e HI com zero.

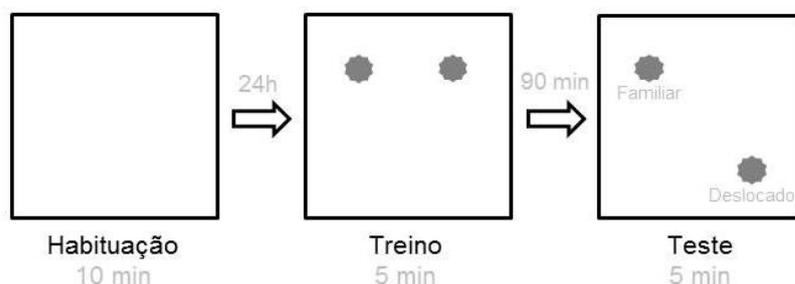
No teste do labirinto em Y, a comparação dos dados foi testada através da análise de variância univariada ANOVAu, tendo como variáveis os dados relativos aos braços de *início*, *outro* e *novo*. Após a verificação de diferenças significativas na ANOVAu, aplicou-se o teste *post hoc* de Tukey para as comparações par a par.

Figura 6 - Esquema representativo dos protocolos de testes comportamentais.

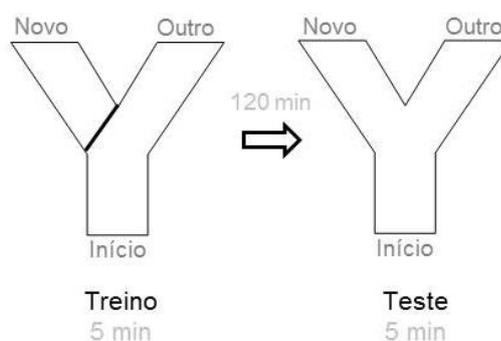
A) Teste de reconhecimento de objeto novo



B) Teste de reconhecimento de objeto deslocado



C) Teste do labirinto em Y modificado



Nota: O protocolo do teste de reconhecimento de objeto novo está representado em A e incluiu uma sessão de habituação (5 ou 10 minutos), seguida da sessão de treino, quando o animal era exposto a dois objetos idênticos por 5 minutos. Após um intervalo (5 minutos ou 8 horas), o rato era finalmente submetido à sessão de teste, em que um dos objetos já explorados (objeto familiar) era reposicionado na arena juntamente com um objeto novo. Em B está representado o teste de reconhecimento de objeto deslocado, que incluiu uma sessão de habituação (10 minutos), seguida da sessão de treino, quando o animal era exposto a dois objetos idênticos por 5 minutos. Após um intervalo de 90 minutos, era realizada a sessão de teste, em que um dos objetos era posicionado no mesmo local em que estava durante o treino e o outro era colocado em uma nova posição na arena. O protocolo do teste do labirinto em Y modificado está representado em C e incluiu uma sessão de treino, em que uma porta impedia o acesso do animal ao braço *novo*. O rato era posicionado no braço de *início* e, então, era permitido que explorasse apenas dois braços (*início* e *outro*) por 5 minutos. Após um intervalo de 120 minutos, o rato realizava a sessão de teste, em que a porta era removida, sendo liberado o acesso ao braço *novo*.

Fonte: A autora, 2018.

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal

A análise da massa corporal durante o desenvolvimento revelou alterações significativas, com efeito de grupo ($p < 0,001$) e de gênero ($p = 0,011$) (Tabela 1).

Ao longo de todos os dias desde P1 até P15 e em P30, tanto os machos quanto as fêmeas do grupo HI apresentaram massa corporal significativamente inferior à do grupo SH. Em P45, porém, não houve diferença entre SH e HI, nem para machos nem para fêmeas.

Quanto às comparações entre machos e fêmeas, observou-se que, dentro do mesmo grupo, SH ou HI, não houve influência do gênero na massa corporal desde P1 até P30. Contudo, em P45, machos SH apresentaram massa corporal superior à das fêmeas SH ($p = 0,022$) enquanto a massa corporal de machos HI e fêmeas HI não diferiu nesta idade.

Tabela 1 - Massa corporal (em gramas) dos grupos experimentais

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
SH	♀	7,23±0,17	8,37±0,20	10,01±0,17	11,63±0,23	13,37±0,26	15,00±0,36	16,43±0,54	18,26±0,57	20,33±0,73
	♂	7,22±0,16	8,43±0,19	10,00±0,23	11,43±0,31	13,36±0,35	14,93±0,41	16,42±0,57	17,90±0,80	19,85±0,80
HI	♀	5,53±0,08 ***	6,41±0,17 ***	7,36±0,18 ***	8,53±0,30 ***	10,02±0,30 ***	11,44±0,40 ***	12,68±0,48 ***	14,13±0,58 ***	15,41±0,76 ***
	♂	5,65±0,09 ###	6,38±0,16 ###	7,46±0,15 ###	8,50±0,20 ###	9,81±0,27 ###	11,02±0,33 ###	12,20±0,46 ###	13,55±0,51 ###	14,63±0,66 ###
		P10	P11	P12	P13	P14	P15	P30	P45	
SH	♀	21,93±0,82	22,12±0,73	25,06±1,04	26,35±1,07	28,23±1,20	29,91±1,17	89,75±1,84	153,61±2,48	
	♂	21,76±0,78	24,58±0,61	25,36±0,75	26,74±0,68	28,99±0,65	30,86±0,71	97,01±2,88	186,14±3,95	†
HI	♀	16,72±0,90 ***	17,84±1,10 **	19,17±1,18 **	20,45±1,27 **	22,2±1,26 **	23,74±1,23 **	73,95±3,28 **	165,62±10,04	
	♂	15,60±0,65 ###	17,17±0,82 ###	18,41±0,85 ###	20,01±0,91 ###	21,51±0,91 ###	23,07±0,85 ###	77,85±2,49 ###	186,06±7,90	

Nota: O grupo HI apresentou massa significativamente reduzida em relação ao grupo SH, tanto para fêmeas (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) quanto machos (### $p < 0,001$) até P30. Em P45 não foram notadas diferenças entre os grupos. Fêmeas e machos SH tiveram massas semelhantes até P30, porém em P45, machos apresentaram massa superior à das fêmeas († $p < 0,05$). Machos HI e fêmeas HI tiveram massas similares em todas as idades avaliadas. Os valores representam média \pm EPM, em gramas, $n = 9$ ninhadas (72 animais) por grupo.

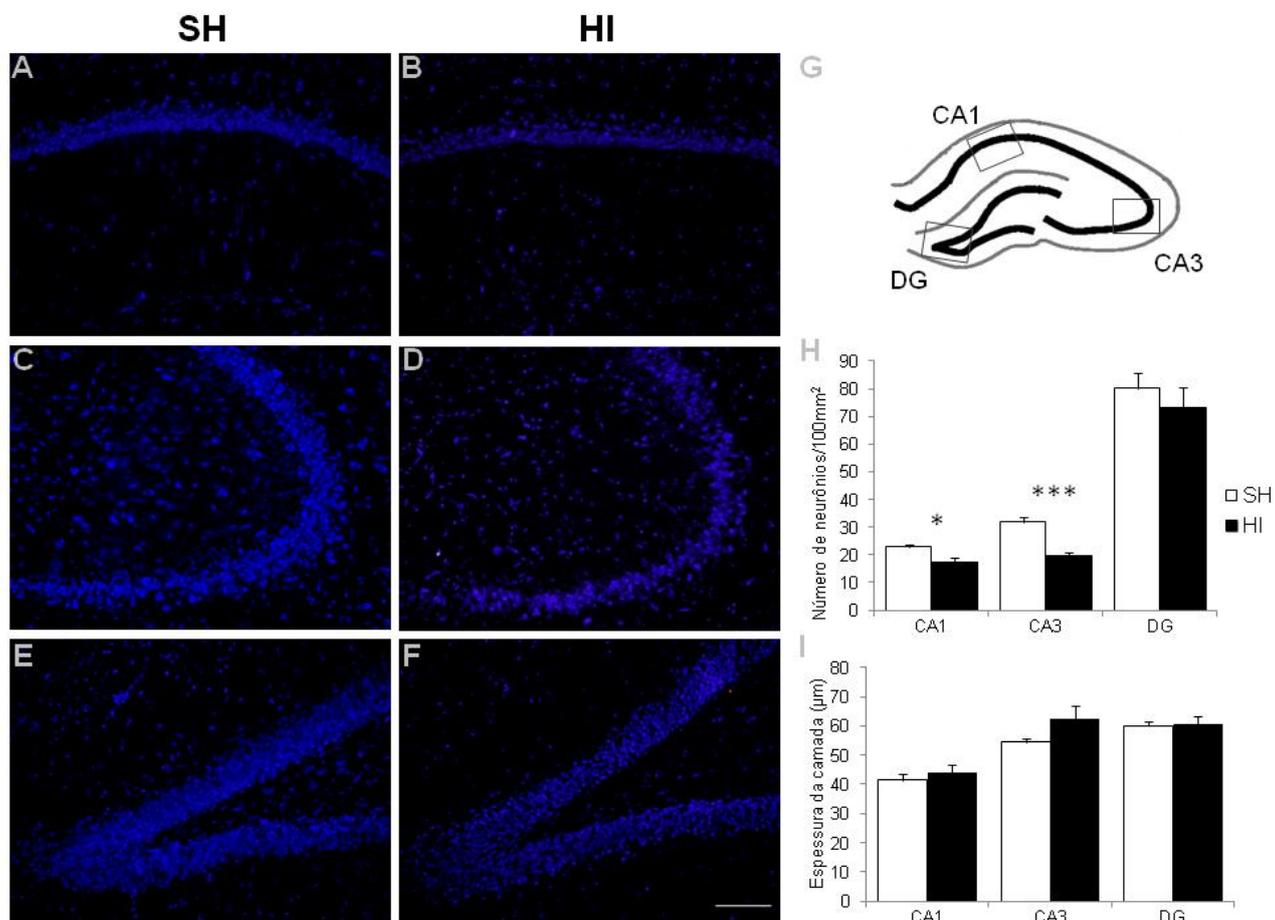
Fonte: A autora, 2018.

4.2 População neuronal no hipocampo

Através da marcação fluorescente dos corpúsculos de Nissl, foi possível analisar a distribuição de corpos celulares neuronais nas três principais regiões do complexo hipocampal: CA1, CA3 e DG (Figura 7G). A análise qualitativa das imagens não revelou alterações grosseiras quanto à morfologia dos corpos celulares marcados ou quanto à organização das camadas (Figura 7A-F). Além disso, realizamos a análise quantitativa, baseada na contagem do número de células na camada granular do DG e no *stratum pyramidale* do CA (Figura 7H), bem como na medição da espessura destas camadas (Figura 7I). O grupo HI apresentou densidade neuronal significativamente reduzida nas regiões CA1 (SH: $22,90 \pm 0,87$; HI: $15,69 \pm 1,67$; $p=0,017$) e CA3 (SH: $31,84 \pm 1,76$; HI: $18,75 \pm 0,84$; $p=0,0007$), enquanto no DG não foram encontradas alterações significativas entre os grupos (SH: $80,07 \pm 5,65$; HI: $57,87 \pm 7,89$).

A espessura das camadas analisadas não foi alterada em decorrência do insulto (CA1 – SH: $41,40 \pm 2,18$; HI: $44,04 \pm 2,57$; $p>0,05$ / CA3 – SH: $54,55 \pm 1,36$; HI: $62,35 \pm 4,58$ / DG – SH: $60,12 \pm 1,52$; HI: $60,74 \pm 2,50$). Uma vez que a gênese dos neurônios piramidais do hipocampo ocorre entre E17 e E19 em ratos (SLOMIANKA et al., 2011), a redução da densidade neuronal no *stratum pyramidale* do CA pode indicar o efeito da lesão hipóxico-isquêmica sobre os precursores neuronais, células altamente suscetíveis.

Figura 7 - Avaliação da população neuronal no hipocampo SH e HI em P45



Legenda: A, C e E referem-se ao grupo SH e B, D e F correspondem ao grupo HI. Em A e B estão representadas a região CA1, em C e D a região CA3 e em E e F a região do DG.

Nota: Foi observada a redução significativa da densidade neuronal (H) no CA1 e no CA3, sem alterações no DG. A medição da espessura do *stratum pyramidale* do CA e da camada granular do DG (I) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Barra de calibração: 100 μm . Dados expressos através de média \pm EPM; * $p<0,05$; *** $p<0,001$; $n=5$ por grupo.

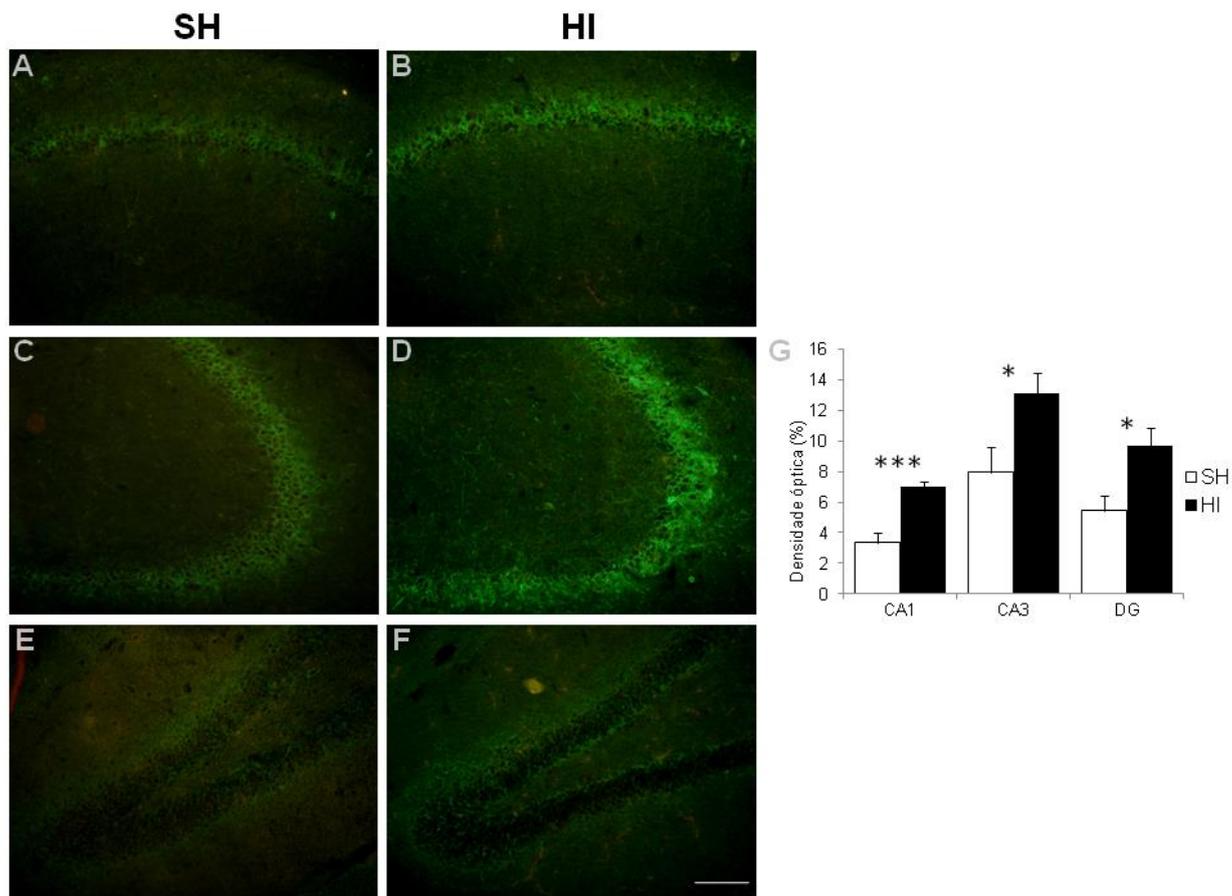
Fonte: A autora, 2018.

4.3 Distribuição de parvalbumina

A parvalbumina é uma proteína ligadora de cálcio e pode ser expressa por diferentes neurônios GABAérgicos, tais como células em cesto, células biestratificadas e as células *oriens-lacunosum* moleculares. A partir da imunoidentificação da parvalbumina nos cortes de hipocampo dos animais SH e HI em P45 (Figura 8A-F), foi possível observar sua marcação em corpos celulares circundados por uma rede local de prolongamentos, presentes tanto na camada granular do DG quanto no *stratum pyramidale* do CA. Nas demais camadas das regiões DG e CA, foram identificados apenas prolongamentos escassos, como aqueles presentes nos *strata radiatum oriens*. Não visualizamos alterações grosseiras quanto à morfologia das células marcadas nos grupos estudados.

O grupo HI apresentou uma intensa imunomarcação de parvalbumina, que foi significativamente superior quando comparada ao grupo SH considerando as três regiões analisadas: CA1 (SH: $3,37 \pm 0,66$; HI: $7,03 \pm 0,29$; $p=0,001$), CA3 (SH: $7,94 \pm 1,62$; HI: $13,11 \pm 1,32$; $p=0,039$) e DG (SH: $5,45 \pm 0,96$; HI: $9,69 \pm 1,15$; $p=0,029$) (Figura 8G).

Figura 8 - Identificação da distribuição de parvalbumina no hipocampo de animais SH e HI em P45



Legenda: A, C e E referem-se ao grupo SH e B, D e F correspondem ao grupo HI. Em A e B estão representadas a região CA1, em C e D a região CA3 e em E e F a região do DG.

Nota: A quantificação da imunorreatividade à parvalbumina (G) revelou um aumento significativo no grupo HI nas três regiões avaliadas. Barra de calibração: 100µm. Dados expressos através de média±EPM; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 5$ por grupo.

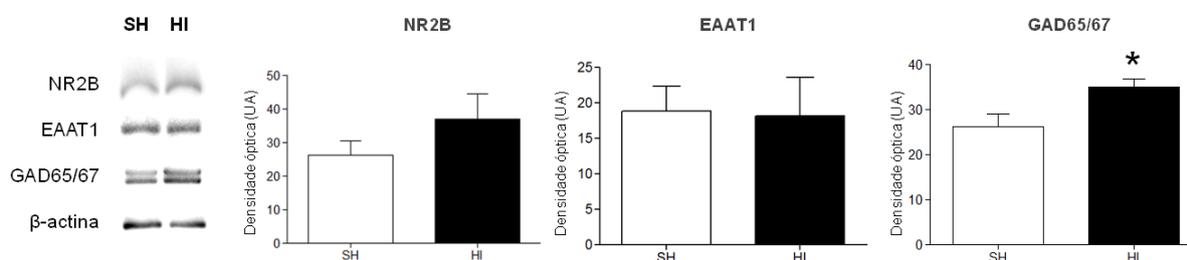
Fonte: A autora, 2018.

4.4 Receptor e transportador de glutamato e glutamato descarboxilase

Buscamos avaliar os níveis dos receptores e transportadores de glutamato e da enzima responsável pela conversão de glutamato a GABA no hipocampo em P45 (Figura 9). A partir da análise quantitativa de NR2B, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos SH e HI (SH: $26,28 \pm 4,18$; HI: $37,01 \pm 7,62$). Foi quantificado também o conteúdo do transportador EAAT1, que se revelou semelhante entre os grupos analisados (SH: $18,78 \pm 3,54$; HI: $18,14 \pm 5,41$).

Contudo, os níveis da enzima GAD mostraram-se significativamente aumentados no grupo HI quando comparado ao grupo SH (SH: $26,25 \pm 2,84$; HI: $35,06 \pm 1,69$; $p=0,036$). O aumento dos níveis de GAD se reflete no aumento da produção de GABA, o que provavelmente causa uma perturbação no equilíbrio entre estímulos excitatórios e inibitórios, um dos fatores fundamentais para a cognição.

Figura 9 - Análise dos níveis de NR2B, EAAT1 e GAD65/67 no hipocampo de animais SH e HI em P45



Nota: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo de NR2B e de EAAT1. Por outro lado, o insulto afetou os níveis das subunidades de 65 e 67 kDa da enzima GAD. Dados expressos como média \pm EPM, em unidades arbitrárias (UA); * $p < 0,05$; $n=4$ por grupo. Fonte: A autora, 2018.

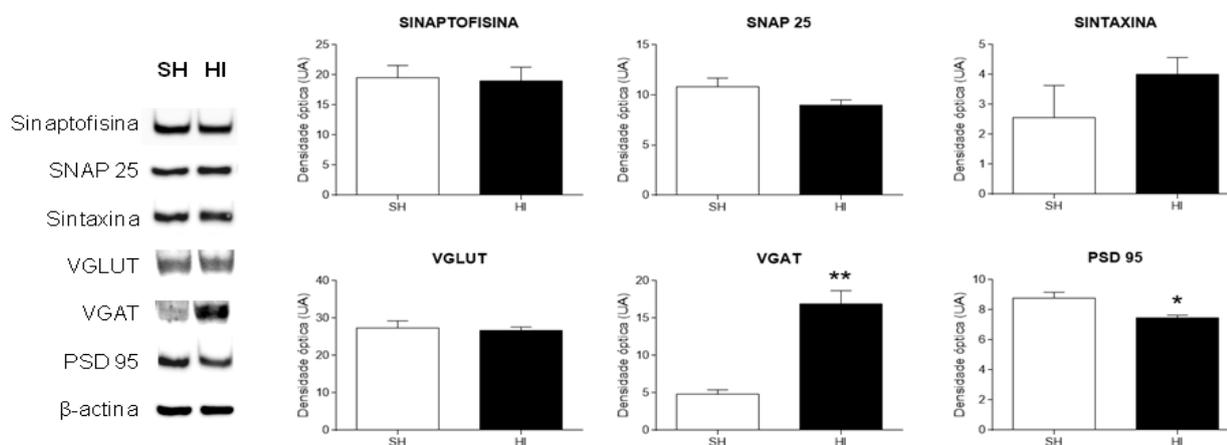
4.5 Marcadores sinápticos

Com o objetivo de se agregar dados acerca da função sináptica dos animais que passaram pelo insulto, utilizamos sinaptossomas de hipocampo de animais SH e HI para avaliar uma série de proteínas associadas a vesículas sinápticas, nomeadamente: sinaptofisina, SNAP 25, syntaxina, VGLUT1, VGAT além da PSD 95, proteína da densidade pós-sináptica (Figura 10).

Não foram observadas diferenças entre os grupos SH e HI quanto ao conteúdo de sinaptofisina (SH: $19,54 \pm 2,03$; HI: $19,01 \pm 2,29$; $p > 0,05$), SNAP 25 (SH: $10,83 \pm 0,86$; HI: $8,99 \pm 0,51$; $p > 0,05$), syntaxina (SH: $2,56 \pm 1,07$; HI: $4,00 \pm 0,57$; $p > 0,05$) e VGLUT1 (SH: $27,39 \pm 1,94$; HI: $26,72 \pm 0,88$; $p > 0,05$).

Contudo, o grupo HI apresentou níveis significativamente superiores de VGAT em relação ao grupo SH (SH: $4,85 \pm 0,55$; HI: $16,91 \pm 1,78$; $p = 0,003$). Nos sinaptossomas do grupo HI também foi encontrada uma redução do conteúdo de PSD 95, comparando-o aos respectivos níveis do grupo SH (SH: $8,78 \pm 0,39$; HI: $7,47 \pm 0,17$; $p = 0,02$).

Figura 10 - Análise dos níveis de sinaptofisina, SNAP 25, sintaxina, VGLUT, VGAT e PSD 95 em sinaptossomas de hipocampo de animais SH e HI em P45



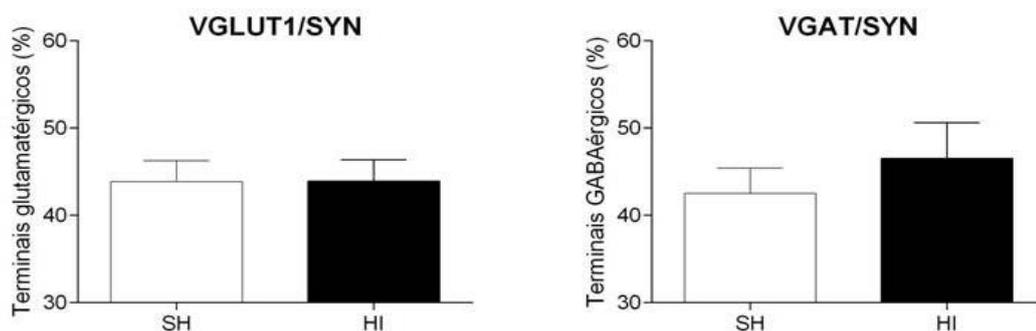
Nota: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo de sinaptofisina, SNAP 25, sintaxina e de VGLUT. O insulto afetou os níveis de VGAT, que estão aumentados no grupo HI e de PSD 95, reduzida no grupo HI. Dados expressos como média \pm EPM, em unidades arbitrárias (UA); *p<0,05; **p<0,01; n=3-5 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

4.6 Terminais glutamatérgicos e GABAérgicos

A fim de refinar os achados a respeito dos marcadores sinápticos avaliados, foi realizada a imunomarcagem de preparações de sinaptossomas previamente aderidas a lamínulas de vidro. Foram mensuradas a densidade de terminais glutamatérgicos, através da marcação de VGLUT1, e de terminais GABAérgicos, por meio da marcação de VGAT (Figura 11). O anticorpo anti-sinaptofisina foi empregado em conjunto como um marcador de terminais sinápticos, uma vez que estas preparações podem conter um grau significativo de contaminação glial.

Figura 11 – Quantificação da porcentagem de terminais sinápticos glutamatérgicos e GABAérgicos



Nota: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à porcentagem de marcações de VGLUT1 ou VGAT que eram acompanhadas pela marcação de sinaptofisina. Dados expressos como média±EPM; n=4 por grupo.

Fonte: A autora, 2018.

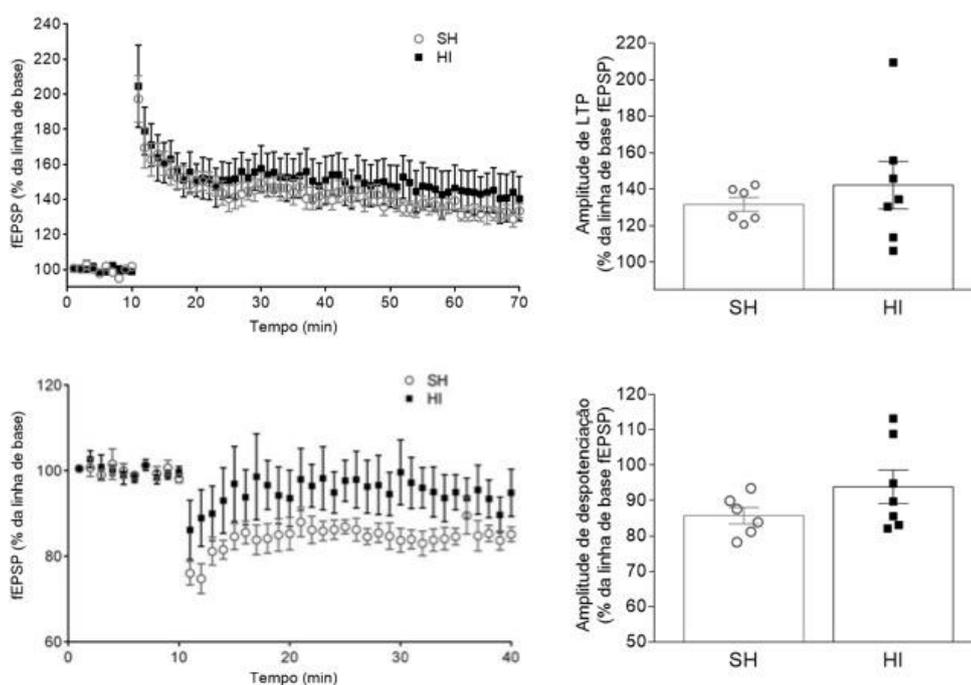
4.7 Plasticidade sináptica

Após caracterizar os efeitos da HI pré-natal transitória sobre aspectos morfológicos e neuroquímicos relativos aos neurotransmissores glutamato e GABA, buscou-se determinar se a lesão afetaria a plasticidade sináptica hipocampal, testada no nível da via colateral de Schaffer.

Foram representadas as curvas temporais dos protocolos de LTP (Figura 12A) e despotenciação (Figura 12B) aplicados em fatias hipocampais de animais SH e HI, isto é, a variação dos fEPSP no decorrer do tempo após indução de estímulos de alta e de baixa frequências (LTP e despotenciação, respectivamente).

As amplitudes médias de LTP (SH: $131,7 \pm 3,85$; HI: $142,2 \pm 12,93$) e de despotenciação (SH: $85,70 \pm 2,32$; HI: $93,89 \pm 4,72$) foram similares entre os grupos SH e HI (figuras 12C e D, respectivamente).

Figura 12 – Efeitos da HI pré-natal sobre registros eletrofisiológicos extracelulares na via colateral de Schaffer após indução de LTP e despotenciação



Nota: Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à amplitude média de LTP e despotenciação. Dados expressos como média \pm EPM, n=6(grupo SH) ou 7 (grupo HI).
Fonte: A autora, 2018.

4.8 Atividade locomotora de machos em campo aberto

Foram avaliadas variáveis relativas à ambulação de machos P45 dos grupos SH e HI na arena de campo aberto em três condições: durante o início da fase escura do biotério em uma sala iluminada por lâmpada branca (1); no início da fase clara em sala iluminada por lâmpada branca (2); ao longo da fase clara em sala iluminada apenas por lâmpada vermelha (3).

4.8.1 Período noturno, iluminação branca

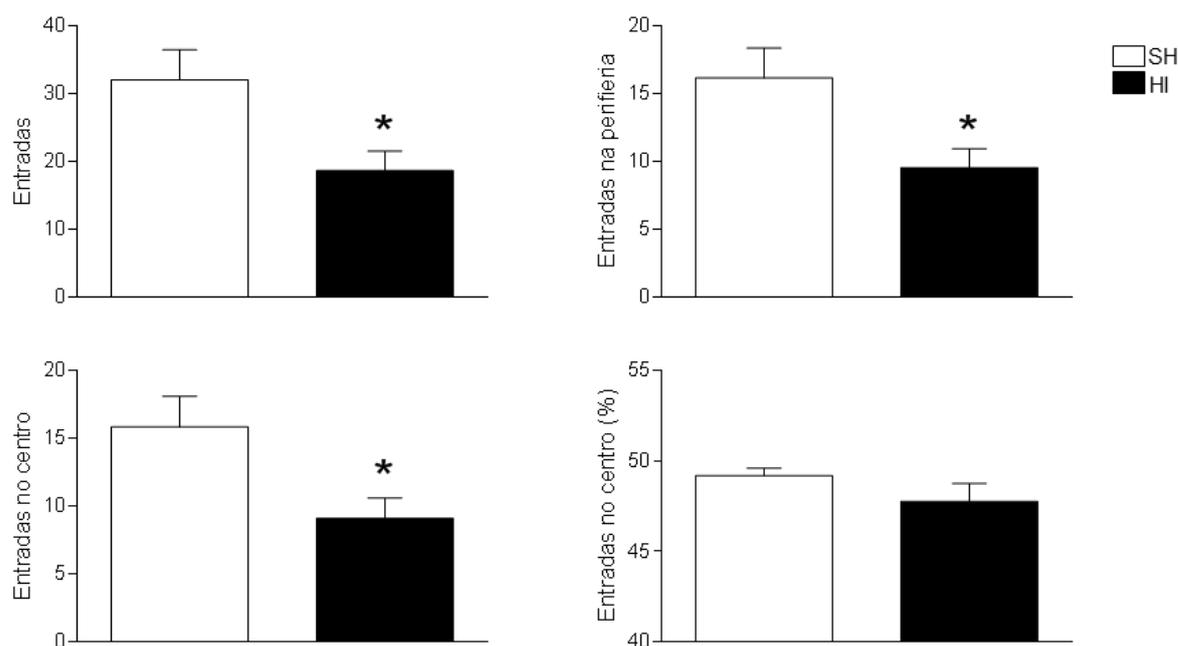
A comparação do número total de entradas nas regiões da arena (Figura 13A), ou seja, da alternância entre as regiões revelou redução significativa no grupo HI (SH: $32,00 \pm 4,44$; HI: $18,64 \pm 2,89$; $p = 0,022$). Da mesma forma, o número de entradas na periferia (SH: $16,17 \pm 1,52$; HI: $9,55 \pm 1,73$; $p = 0,020$) (Figura 13B) e no centro (SH: $15,83 \pm 2,25$; HI: $9,09 \pm 1,50$; $p = 0,023$) (Figura 13C) também foram reduzidos no grupo HI em relação ao grupo SH. A porcentagem de entradas no centro (SH: $48,92 \pm 0,47$; HI: $47,45 \pm 1,00$; $p > 0,05$), entretanto, não foi alterada no grupo HI (Figura 13D).

Também foram observadas diferenças significativas quanto ao tempo em que os animais testados se localizaram em cada uma das regiões da arena. O grupo HI exibiu uma preferência por permanecer na região periférica, o que é demonstrado pelo aumento significativo do tempo na periferia (SH: $268,08 \pm 2,37$; HI: $284,18 \pm 2,79$; $p = 0,025$) (Figura 14A) e pela redução do tempo (SH: $30,92 \pm 5,86$; HI: $14,82 \pm 2,69$; $p = 0,025$) (Figura 14B) e do percentual (SH: $9,92 \pm 1,94$; HI: $4,64 \pm 0,90$; $p = 0,026$) (Figura 14C) de permanência no centro em comparação com o grupo SH.

A locomoção dos animais que foram submetidos a este teste, representada pela distância total percorrida na arena não mostrou diferenças significativas entre os grupos (SH: $27,00 \pm 4,63$; HI: $25,47 \pm 2,44$; $p > 0,05$) (Figura 15A). Também não houve diferença quanto à distância percorrida especificamente na periferia do campo aberto (SH: $22,49 \pm 1,90$; HI: $23,12 \pm 4,18$; $p > 0,05$) (Figura 15B). Por outro lado, o grupo HI apresentou redução da atividade locomotora na região central, o que é observado através dos dados da distância percorrida no centro (SH: $4,50 \pm 7,49$; HI: $2,35 \pm 0,43$;

$p=0,023$) (Figura 15C) e da respectiva porcentagem da distância no centro (SH: $16,75\pm 1,37$; HI: $9,09\pm 1,74$; $p= 0,002$) (Figura 15D).

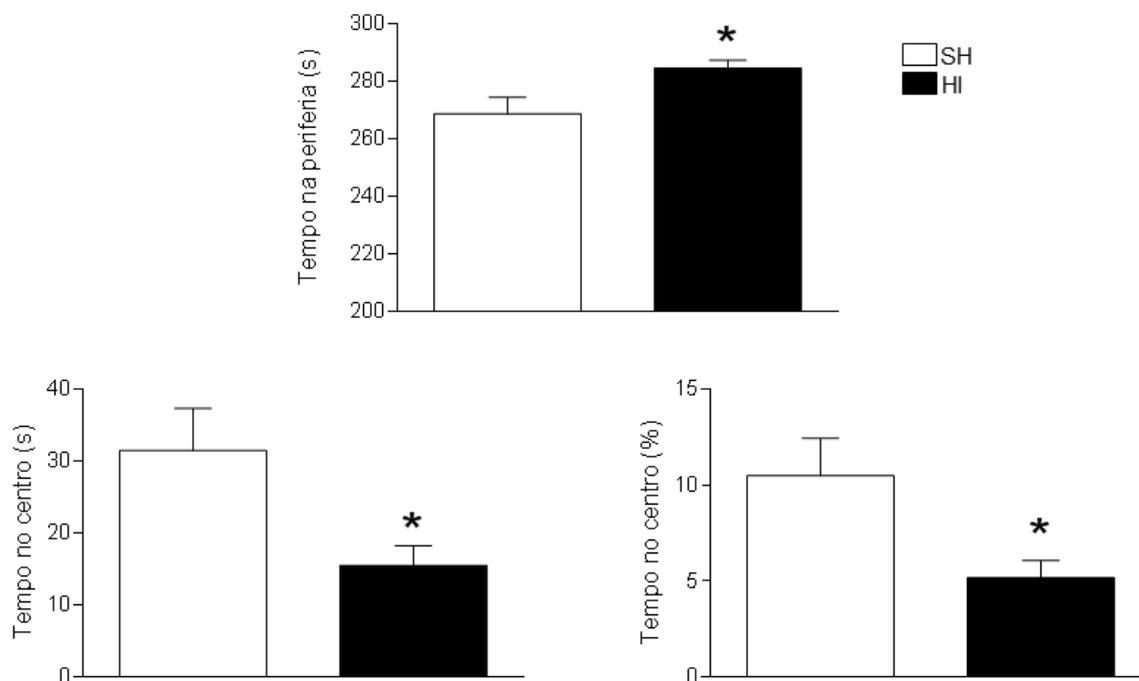
Figura 13– Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: número de entradas



Nota: Animais do grupo HI apresentaram redução significativa do número total de entradas, assim como das entradas na região da periferia e no centro. A análise da porcentagem de entradas no centro em relação ao número total de entradas não demonstrou alterações entre os grupos. Dados expressos como média±EPM; * $p<0,05$; $n=12$ animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

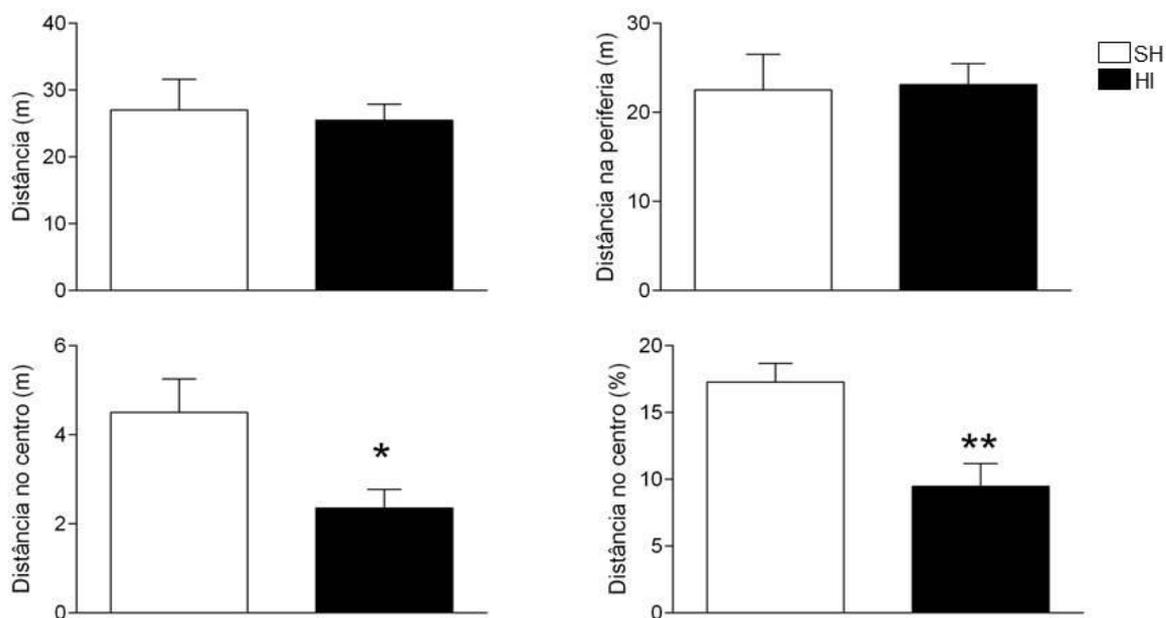
Figura 14 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: tempo de permanência



Nota: O tempo de permanência em cada região variou entre os grupos. Animais HI permaneceram por tempo significativamente superior na região da periferia em comparação com SH. Quanto à região central, o grupo HI apresentou redução do tempo de permanência e do percentual relativo ao tempo no centro. Dados representados como média±EPM; * $p < 0,05$; $n = 12$ animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 15 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: distância percorrida



Nota: O insulto HI não foi responsável por alterar a atividade exploratória espontânea, representada pela medição da distância total percorrida pelos animais estudados e pela distância percorrida na periferia. Entretanto, a distância percorrida pelos animais HI na região central da arena diferiu significativamente em relação ao grupo SH, assim como o percentual da distância percorrida no centro. Dados representados como média±EPM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 12$ animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

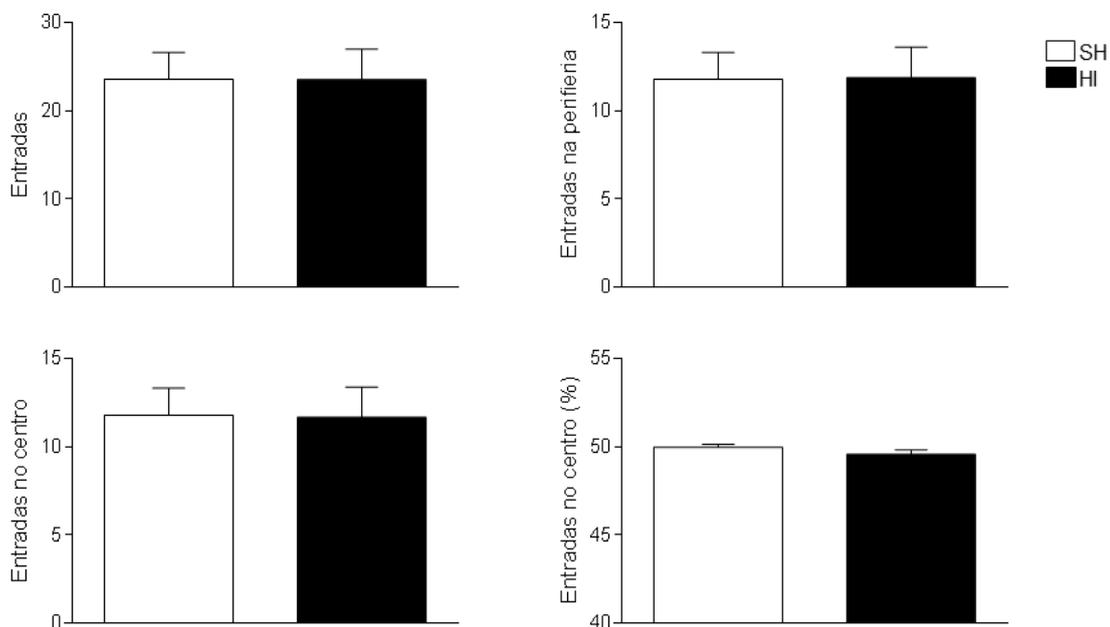
4.8.2 Período diurno, iluminação branca

Os animais dos grupos SH e HI submetidos ao teste do campo aberto durante o período diurno, com iluminação através de lâmpada branca, não apresentaram comportamentos quantitativamente diferentes quanto ao número total de entradas (SH: $23,57 \pm 3,05$; HI: $23,53 \pm 3,44$; $p > 0,05$)(Figura 16A), entradas na periferia (SH: $11,79 \pm 1,52$; HI: $11,87 \pm 1,73$; $p > 0,05$)(Figura 16B), entradas no centro (SH: $11,79 \pm 1,53$; HI: $11,67 \pm 1,71$; $p > 0,05$)(Figura 16C) ou ainda acerca do percentual de entradas no centro (SH: $49,93 \pm 0,16$; HI: $49,47 \pm 0,31$; $p > 0,05$)(Figura 16D).

De modo similar, não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à duração de tempo em que os animais permaneceram na periferia (SH: $283,71 \pm 2,37$; HI: $283,87 \pm 2,79$; $p > 0,05$) (Figura 17A) ou no centro (SH: $15,43 \pm 2,34$; HI: $15,20 \pm 2,81$; $p > 0,05$)(Figura 17B), assim como no percentual de tempo no centro (SH: $4,79 \pm 0,75$; HI: $4,73 \pm 0,94$; $p > 0,05$)(Figura 17C).

Também não houve alterações relativas às distâncias percorridas por animais dos grupos SH e HI, seja em seus valores totais (SH: $26,60 \pm 1,97$; HI: $31,48 \pm 4,76$; $p > 0,05$)(Figura 18A), na distância percorrida na periferia (SH: $24,59 \pm 1,90$; HI: $27,15 \pm 4,18$; $p > 0,05$)(Figura 18B), na distância percorrida no centro (SH: $2,55 \pm 0,61$; HI: $3,17 \pm 0,58$; $p > 0,05$) (Figura 18C) ou na porcentagem de distância percorrida no centro (SH: $7,21 \pm 1,13$; HI: $10,14 \pm 1,76$; $p > 0,05$)(Figura 18D).

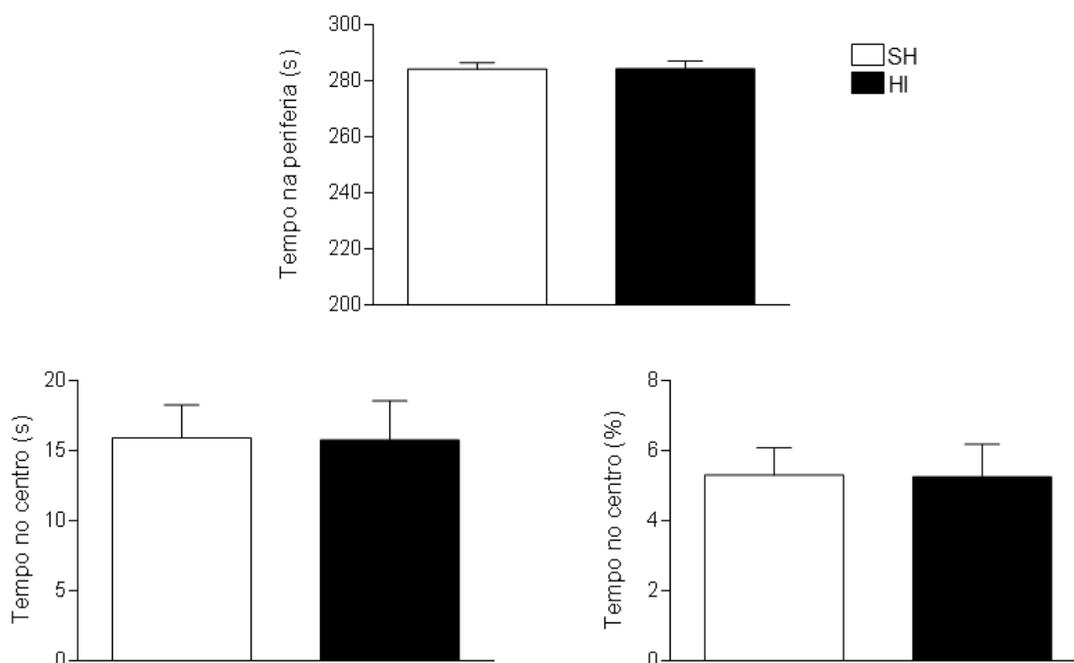
Figura 16 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: número de entradas



Nota: Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto às variáveis relacionadas ao número de entradas nas regiões da arena: entradas totais, na periferia, no centro, bem como no cálculo do percentual de entradas no centro. Dados representados como média±EPM; n= 14 (grupo SH) ou 15 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

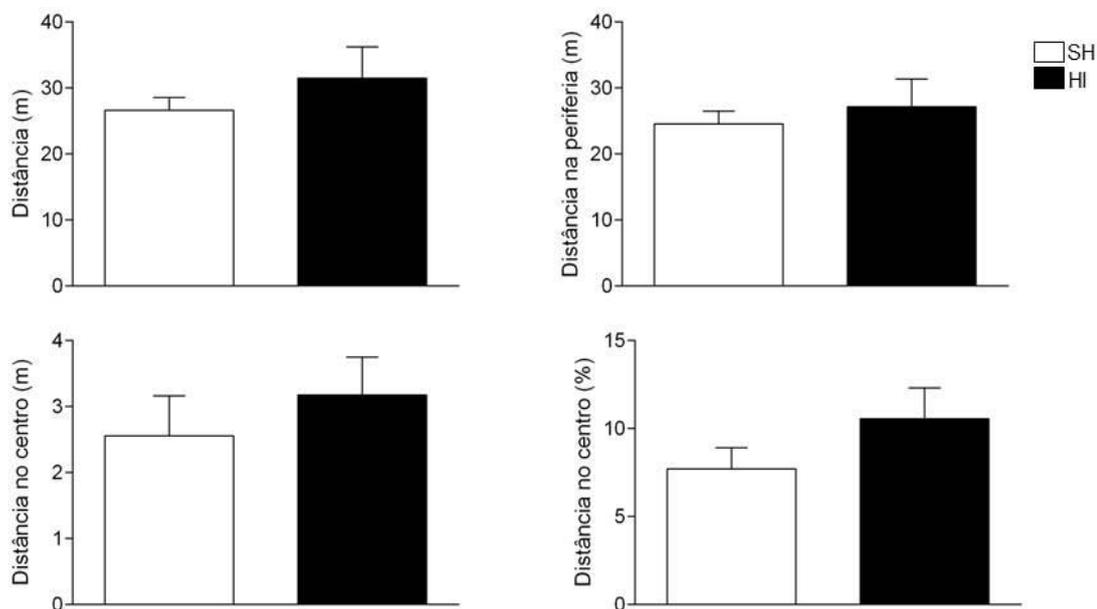
Figura 17 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: tempo de permanência



Nota: Animais dos grupos SH e HI não diferiram quanto ao tempo em que permanecem nas zonas da arena. Não há alterações relativas ao tempo na periferia, tempo no centro e em relação à porcentagem de tempo no centro da arena. Dados representados como média±EPM; n= 14 (grupo SH) ou 15 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

Figura 18 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação branca: distância percorrida



Nota: A lesão HI não afetou a distância de ambulação dos animais no teste de campo aberto. Não se observou diferença significativa quanto à distância total percorrida e quanto à distância percorrida em cada uma das duas zonas: periférica e central. Também não houve diferenças no percentual da distância percorrida no centro. Dados representados como média \pm EPM; n= 14 (grupo SH) ou 15 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

4.8.3 Período diurno, iluminação vermelha

Ao se realizar o teste do campo aberto durante a fase clara, porém em condições de escuridão, através da iluminação exclusiva através de lâmpadas vermelhas, não foi notada nenhuma diferença significativa em qualquer das variáveis analisadas nas condições anteriores.

Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao número de entradas na região central entre os grupos SH e HI (SH: $15,45 \pm 2,08$; HI: $15,58 \pm 1,81$; $p > 0,05$)(Figura 19).

Também foram contabilizados para animais SH e HI valores similares referentes ao tempo de permanência na periferia (SH: $275,18 \pm 4,26$; HI: $273,33 \pm 4,12$; $p > 0,05$)(Figura 20A), ao tempo de permanência no centro (SH: $23,91 \pm 4,24$; HI: $25,92 \pm 4,17$; $p > 0,05$)(Figura 20B), assim como ao percentual de tempo no centro (SH: $7,82 \pm 1,39$; HI: $8,25 \pm 1,39$; $p > 0,05$)(Figura 20C).

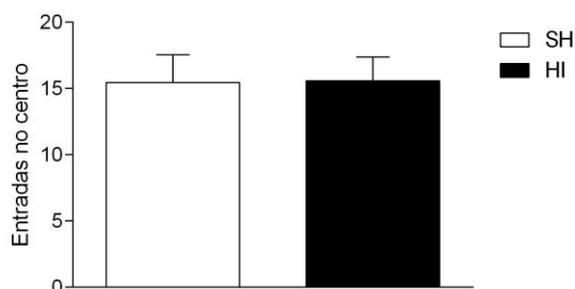
Nos parâmetros relacionados à distância percorrida pelos animais, também não foram observadas diferenças estatísticas, como na distância total percorrida pelos animais (SH: $15,73 \pm 0,73$; HI: $17,58 \pm 1,16$; $p > 0,05$)(Figura 21A), a distância percorrida na região da periferia (SH: $13,91 \pm 0,58$; HI: $15,33 \pm 1,03$; $p > 0,05$)(Figura 21B), além da distância percorrida no centro (SH: $1,45 \pm 0,28$; HI: $1,58 \pm 0,31$; $p > 0,05$) (Figura 21C) e do seu percentual (SH: $10,91 \pm 1,45$; HI: $11,67 \pm 1,43$; $p > 0,05$)(Figura 21D).

Parâmetros adicionais também puderam ser analisados nesta condição do teste, com o auxílio do software *AnyMaze*, tais como o número de rotações que o animal realiza em torno do próprio eixo e o número de episódios e o tempo de imobilidade.

Animais do grupo HI apresentaram aumento significativo do número de rotações em comparação ao grupo SH (SH: $12,00 \pm 0,65$; HI: $14,25 \pm 0,63$; $p = 0,021$)(Figura 22A). Não foram observadas diferenças, entretanto, quanto ao sentido da rotação, seja horário (SH: $5,82 \pm 0,70$; HI: $7,00 \pm 0,66$; $p > 0,05$) (Figura 22B) ou anti-horário (SH: $6,18 \pm 0,82$; HI: $7,25 \pm 0,99$; $p > 0,05$)(Figura 22C).

A análise da imobilidade não revelou diferenças entre SH e HI quanto ao número de episódios (SH: $19,18 \pm 1,96$; HI: $21,00 \pm 1,77$; $p > 0,05$) (Figura 23A) ou quanto à duração total (SH: $66,73 \pm 5,86$; HI: $78,50 \pm 6,76$; $p > 0,05$)(Figura 23B).

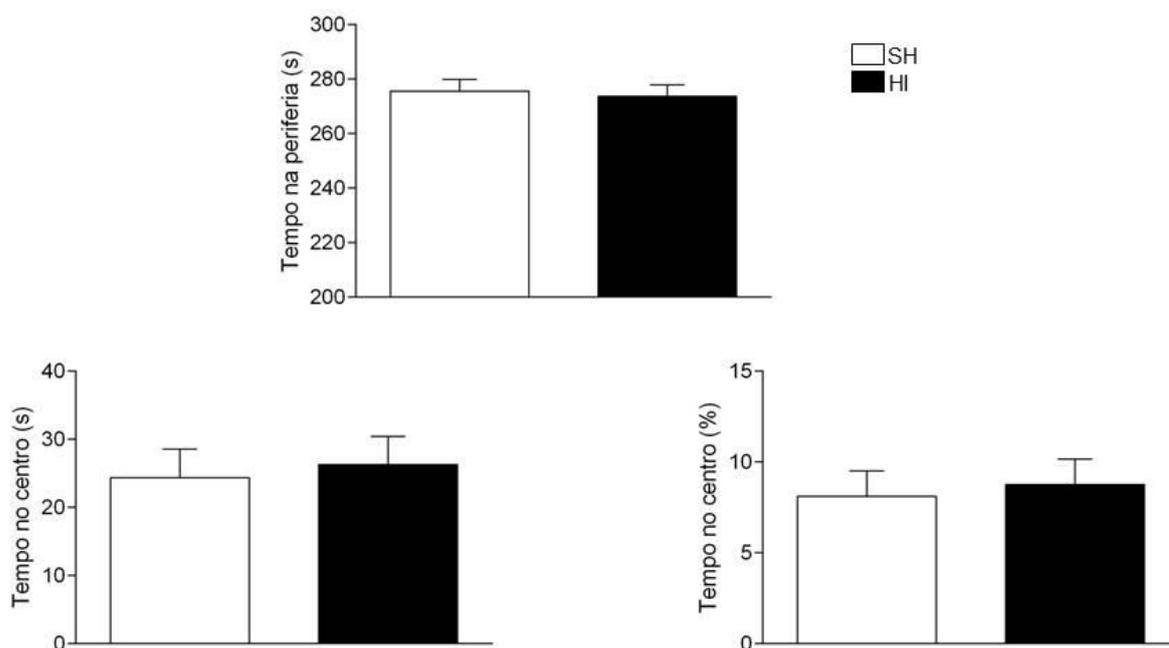
Figura 19 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: entradas no centro



Nota: Não foram observadas diferenças estatísticas entre SH e HI quanto ao número de entradas no centro. Dados representados como média ± EPM; n= 11 (grupo SH) ou 12 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

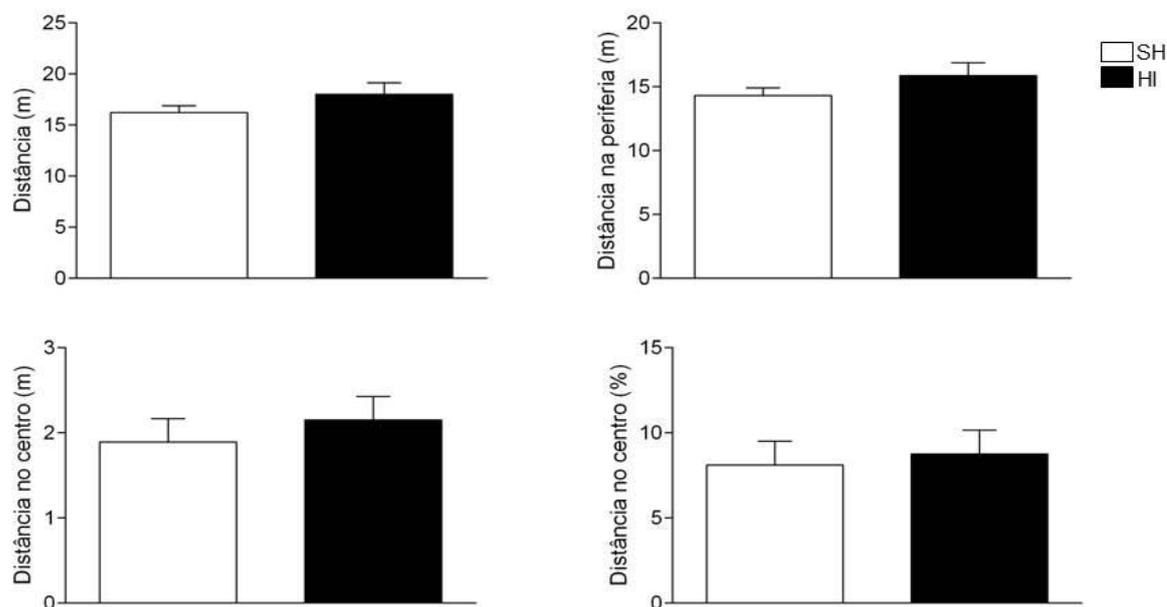
Figura 20 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: tempo de permanência



Nota: A HI pré-natal não afetou a atividade dos animais quanto à sua localização nas regiões da arena. Não foram observadas diferenças estatísticas entre SH e HI nas análises da duração de tempo em que o animal permaneceu na periferia, no centro ou na porcentagem de permanência no centro. Dados representados como média ± EPM; n= 11 (grupo SH) ou 12 (grupo HI).

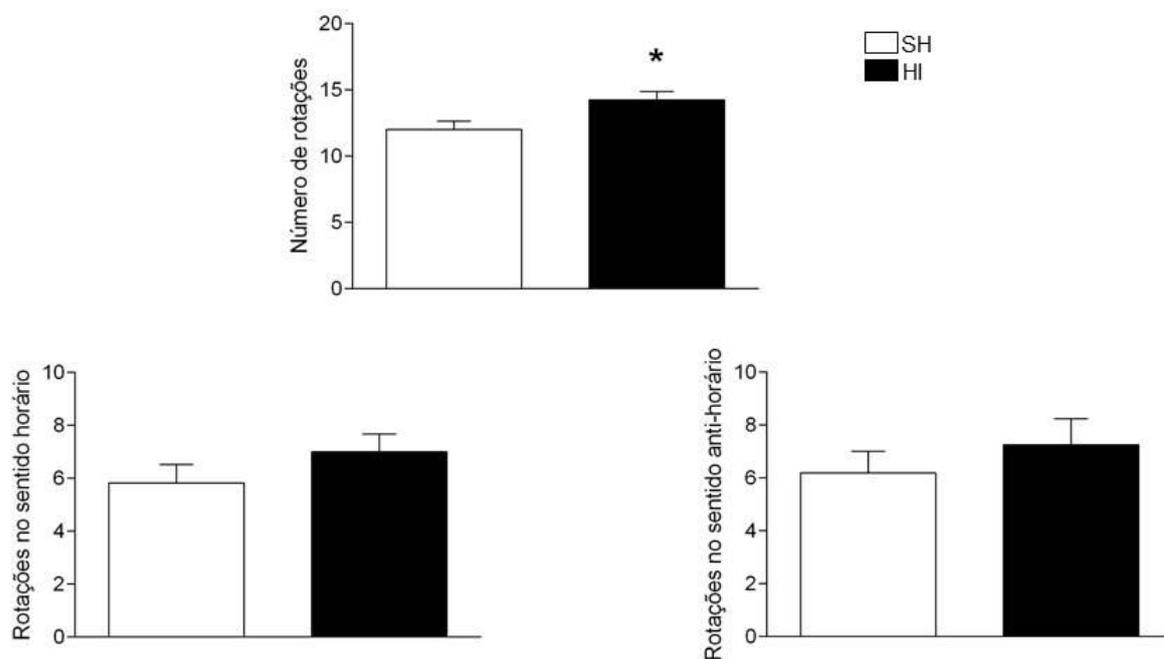
Fonte: A autora, 2018.

Figura 21 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: distância percorrida



Nota: A distância percorrida por animais SH e HI não apresentou diferenças significativas. Foram avaliadas a distância total, a distância percorrida na periferia, além da distância no centro e do seu percentual. Dados representados como média±EPM; n= 11 (grupo SH) ou 12 (grupo HI).
Fonte: A autora, 2018.

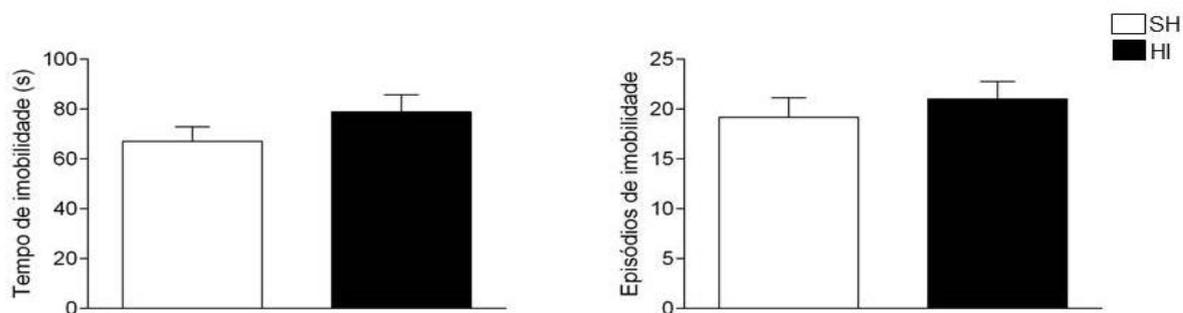
Figura 22 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: número de rotações



Nota: Foi observado um aumento significativo com relação ao número de rotações efetuadas por animais do grupo HI. Não há diferenças entre as rotações no sentido horário ou anti-horário. Dados representados como média±EPM; * $p < 0,05$; $n = 11$ (grupo SH) ou 12 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

Figura 23 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de machos em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: episódios de imobilidade



Nota: Animais SH e HI apresentaram número de episódios de imobilidade semelhantes e tempos de imobilidade estatisticamente similares. Dados representados como média±EPM; n= 11 (grupo SH) ou 12 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

4.9 Atividade locomotora de fêmeas em campo aberto

A avaliação da atividade exploratória em campo aberto de fêmeas dos grupos SH e HI em P45 deu-se em duas condições: durante o início da fase escura do biotério em uma sala iluminada por lâmpada branca (1); ao longo da fase clara em sala iluminada apenas por lâmpada vermelha (2).

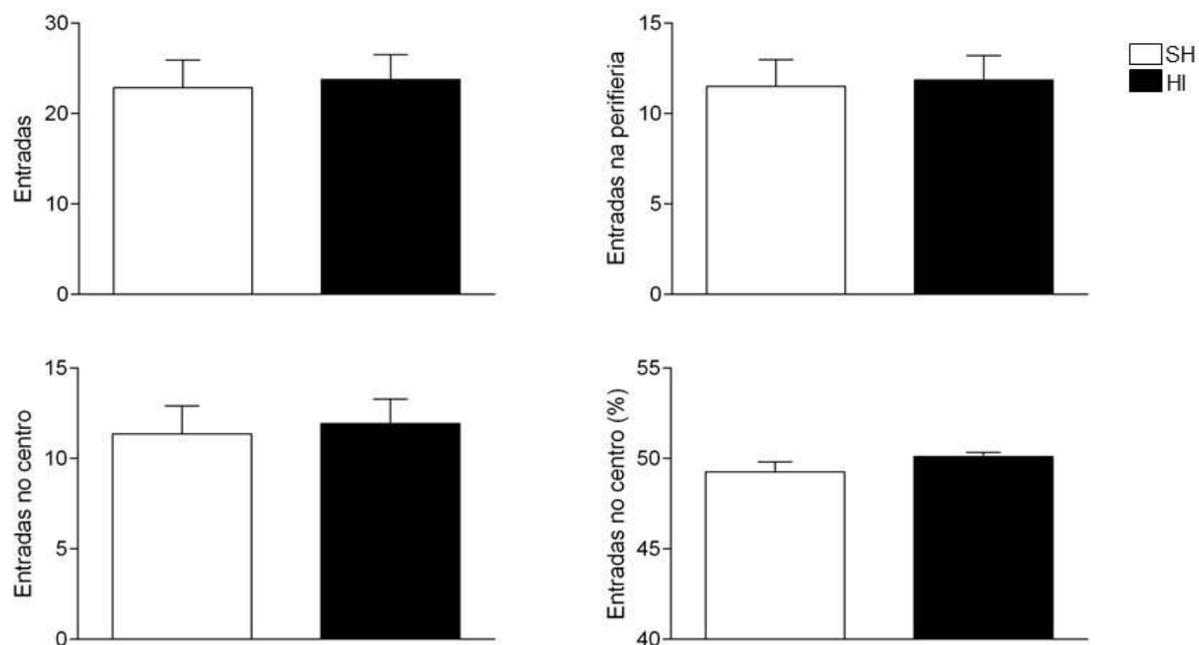
4.9.1 Período noturno, iluminação branca

Nesta condição de teste, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número total de entradas em qualquer das zonas da arena (SH: $22,86 \pm 3,05$; HI: $23,79 \pm 2,72$; $p > 0,05$)(Figura 24A). Também não houve diferença quanto ao número de entradas na periferia (SH: $11,50 \pm 1,50$; HI: $11,86 \pm 1,35$; $p > 0,05$)(Figura 24B) e no centro (SH: $11,36 \pm 1,56$; HI: $11,93 \pm 1,37$; $p > 0,05$)(Figura 24C). Igualmente, a comparação da porcentagem de entradas no centro não revelou diferenças entre SH e HI (SH: $49,07 \pm 0,62$; HI: $50,07 \pm 0,22$; $p > 0,05$)(Figura 24D).

Quanto ao tempo em que os animais de cada grupo permaneceram em cada uma das regiões da arena, também não foram notadas diferenças significativas. Animais SH e HI apresentaram valores semelhantes de tempo de permanência na periferia (SH: $288,71 \pm 1,99$; HI: $284,07 \pm 1,92$; $p > 0,05$)(Figura 25A), no centro (SH: $10,36 \pm 2,03$; HI: $14,93 \pm 1,92$; $p > 0,05$)(Figura 25B), assim como de percentual de tempo no centro (SH: $3,14 \pm 0,65$; HI: $4,64 \pm 0,66$; $p > 0,05$)(Figura 25C).

Por outro lado, através da análise da distância percorrida, foram reveladas alterações no grupo HI. Houve uma redução significativa da distância total percorrida por estes animais (SH: $41,89 \pm 3,97$; HI: $25,91 \pm 1,73$; $p = 0,001$)(Figura 26A) e uma redução também da distância percorrida na periferia ($38,85 \pm 3,78$; HI: $23,59 \pm 1,67$; $p = 0,001$)(Figura 26B). Por outro lado, não apresentaram diferenças entre os grupos a distância percorrida no centro (SH: $3,03 \pm 0,45$; HI: $2,32 \pm 0,22$; $p > 0,05$)(Figura 26C) bem como seu percentual (SH: $7,00 \pm 1,03$; HI: $8,71 \pm 0,88$; $p > 0,05$)(Figura 26D).

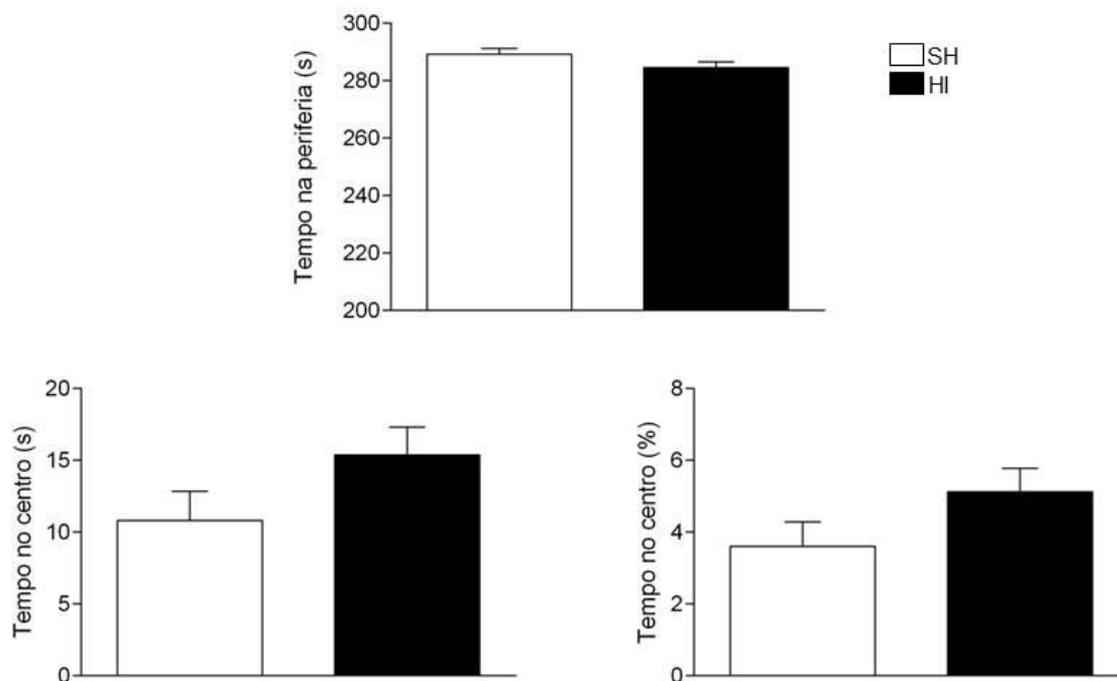
Figura 24 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: número de entradas



Nota: Não foram observadas diferenças significativas quanto ao número total de entradas, número de entradas na periferia, no centro e quanto ao percentual de entradas no centro. Dados representados como média \pm EPM; n= 14 animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

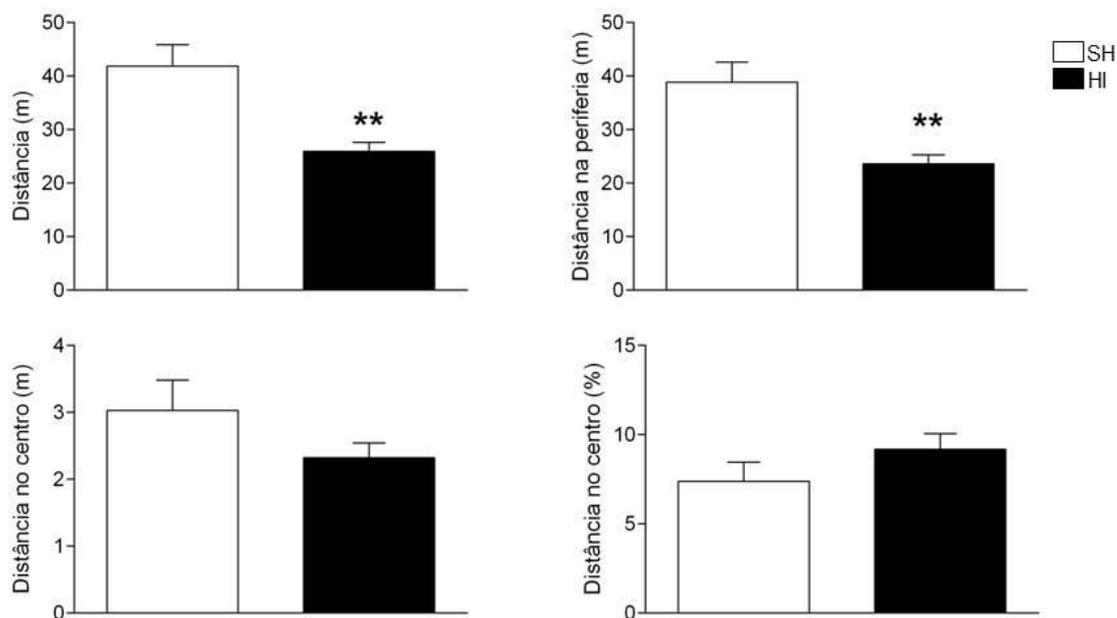
Figura 25 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: tempo de permanência



Nota: Animais SH e HI apresentaram tempos de permanência similares na região da periferia da arena e no centro, assim como percentuais semelhantes de tempo no centro. Dados representados como média±EPM; n= 14 animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

Figura 26 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período noturno, com iluminação branca: distância percorrida



Nota: A lesão HI foi responsável pela redução da distância total percorrida em campo aberto e da distância percorrida na periferia. Não houve diferenças significativas quanto à distância percorrida no centro e quanto ao seu respectivo percentual. Dados representados como média±EPM; **p<0,01; n= 14 animais/grupo.

Fonte: A autora, 2018.

4.9.2 Período diurno, iluminação vermelha

As fêmeas P45 dos grupos SH e HI testadas nesta condição não apresentaram diferenças estatísticas em qualquer das comparações entre as variáveis analisadas.

Assim, foram observados entre os grupos números semelhantes de entradas no centro (SH: $15,57 \pm 2,88$; HI: $11,00 \pm 1,22$; $p > 0,05$)(Figura 27).

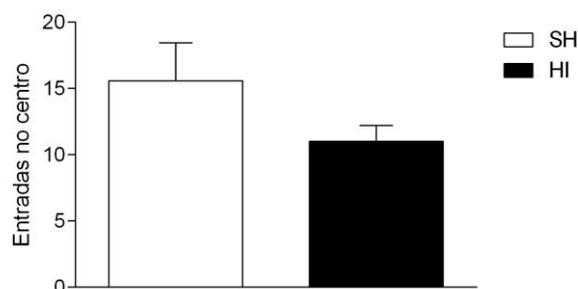
Também não foram percebidas diferenças quanto ao tempo de permanência na periferia (SH: $276,00 \pm 5,11$; HI: $283,00 \pm 3,67$; $p > 0,05$)(Figura 28A), no centro (SH: $23,14 \pm 5,13$; HI: $16,00 \pm 3,67$; $p > 0,05$)(Figura 28B) ou quanto ao percentual de permanência no centro (SH: $7,57 \pm 1,71$; HI: $5,00 \pm 1,22$; $p > 0,05$)(Figura 28C).

Nas variáveis associadas à distância percorrida, não houve diferenças entre SH e HI em relação à distância total (SH: $17,71 \pm 1,37$; HI: $18,25 \pm 0,48$; $p > 0,05$)(Figura 29A), à distância percorrida na periferia (SH: $15,57 \pm 1,44$; HI: $17,00 \pm 0,71$; $p > 0,05$)(Figura 29B), no centro (SH: $1,43 \pm 0,48$; HI: $0,75 \pm 0,25$; $p > 0,05$)(Figura 29C) ou ainda no percentual de distância percorrida no centro (SH: $10,43 \pm 2,51$; HI: $6,50 \pm 1,19$; $p > 0,05$)(Figura 29D).

A comparação do número total de rotações efetuadas pelos animais de cada grupo não mostrou diferenças significativas (SH: $13,00 \pm 0,90$; HI: $12,50 \pm 0,64$; $p > 0,05$)(Figura 30A). O número de rotações no sentido horário (SH: $6,86 \pm 0,88$; HI: $4,75 \pm 1,30$; $p > 0,05$)(Figura 30B) e anti-horário (SH: $6,14 \pm 1,28$; HI: $7,75 \pm 0,85$; $p > 0,05$)(Figura 30C) também não diferiu entre os grupos SH e HI.

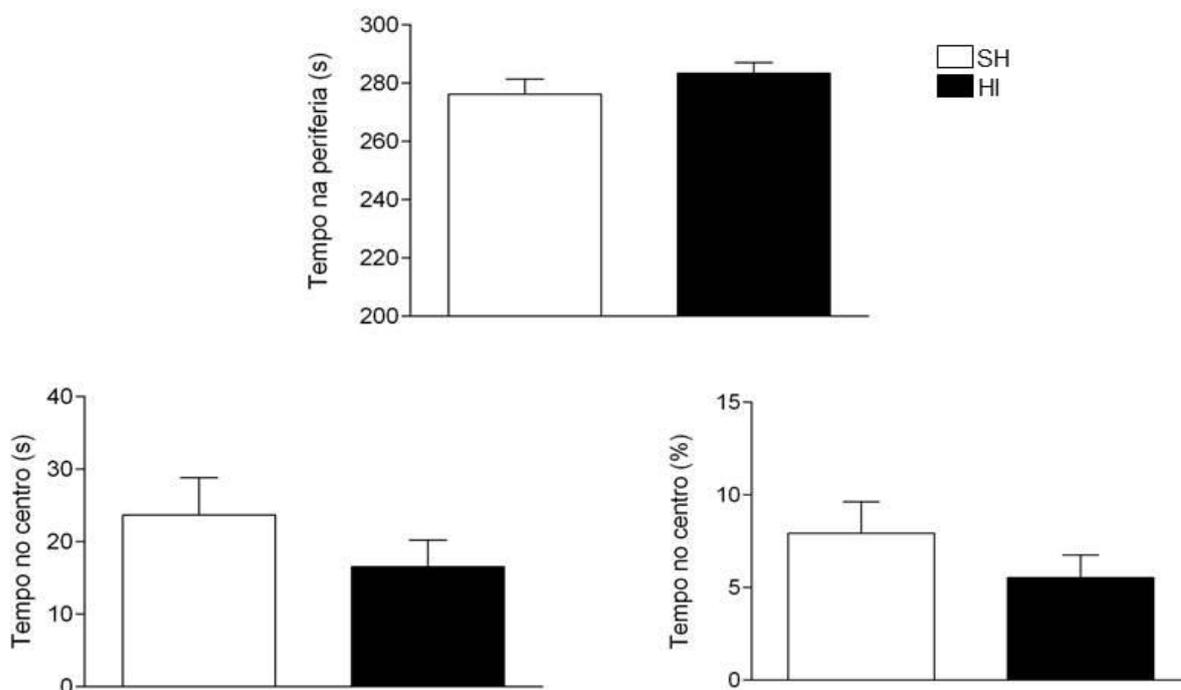
Animais SH e HI apresentaram número de episódios de imobilidade similares (SH: $17,86 \pm 1,87$; HI: $21,50 \pm 1,55$; $p > 0,05$)(Figura 31A), assim como duração total de imobilidade semelhante (SH: $76,14 \pm 11,42$; HI: $85,25 \pm 11,02$; $p > 0,05$)(Figura 31B).

Figura 27 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: entradas no centro



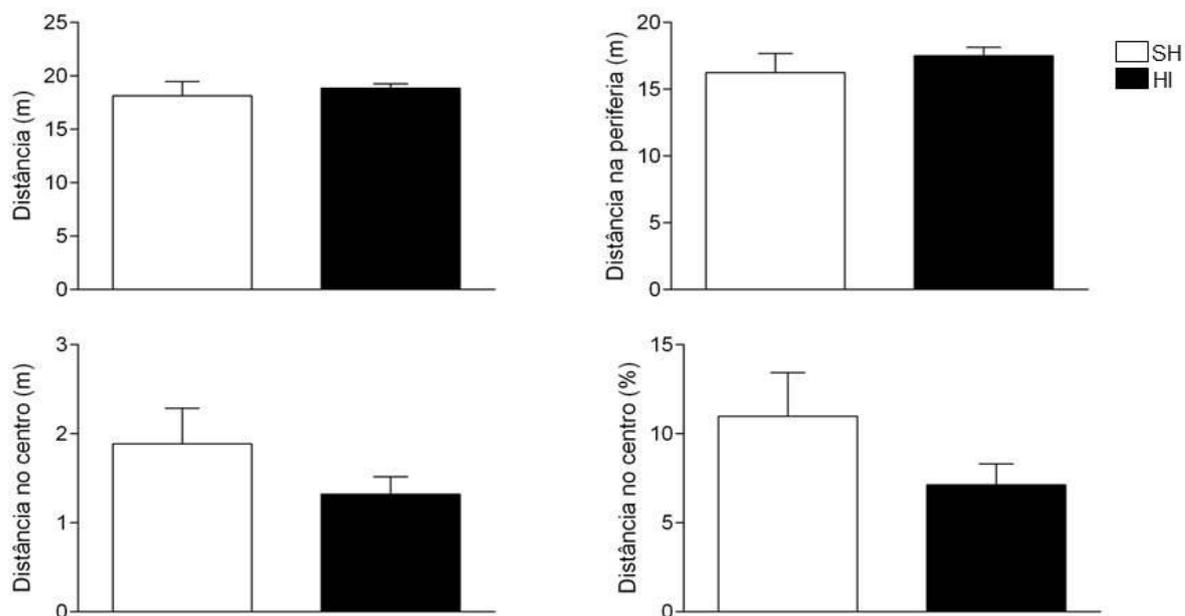
Nota: Animais do grupo HI apresentaram número de entradas na região central da arena semelhante ao grupo SH. Dados representados como média±EPM; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).
Fonte: A autora, 2018.

Figura 28 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: tempo de permanência



Nota: Não houve diferenças significativas entre SH e HI quanto ao tempo de permanência na periferia ou no centro. O percentual de permanência no centro também não diferiu. Dados representados como média±EPM; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).
Fonte: A autora, 2018.

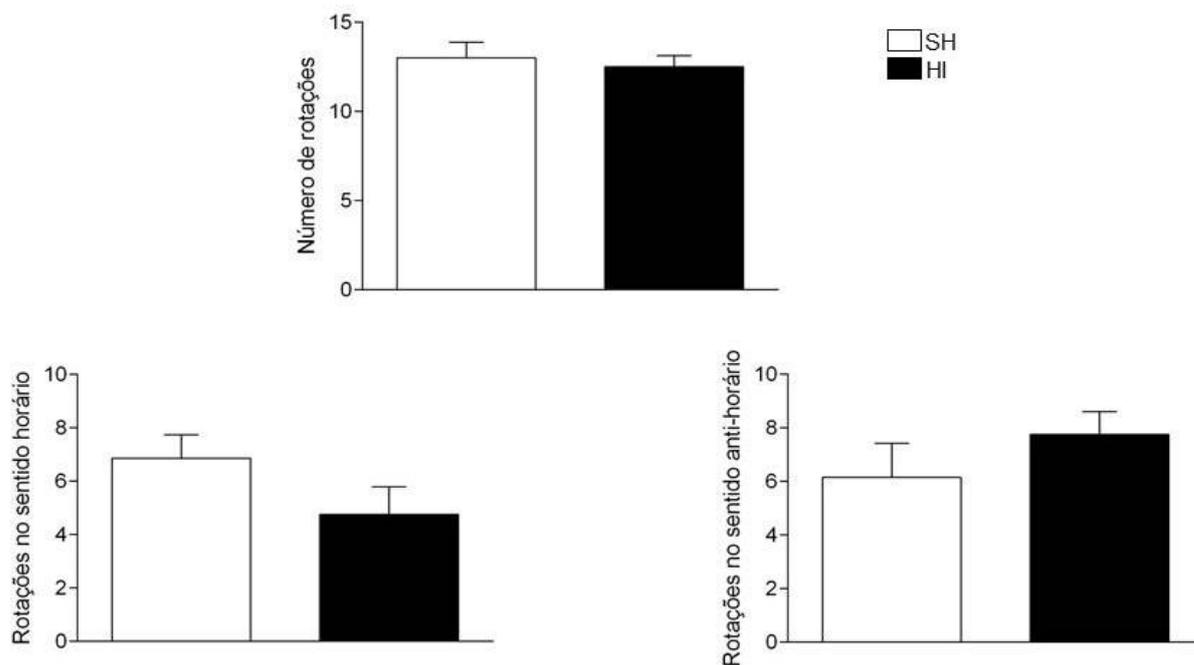
Figura 29 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: distância percorrida



Nota: A atividade exploratória não foi afetada pelo insulto HI, uma vez que a distância total percorrida não foi alterada assim como a distância percorrida na periferia e no centro. Não houve diferenças também no percentual de distância percorrida no centro. Dados representados como média±EPM; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

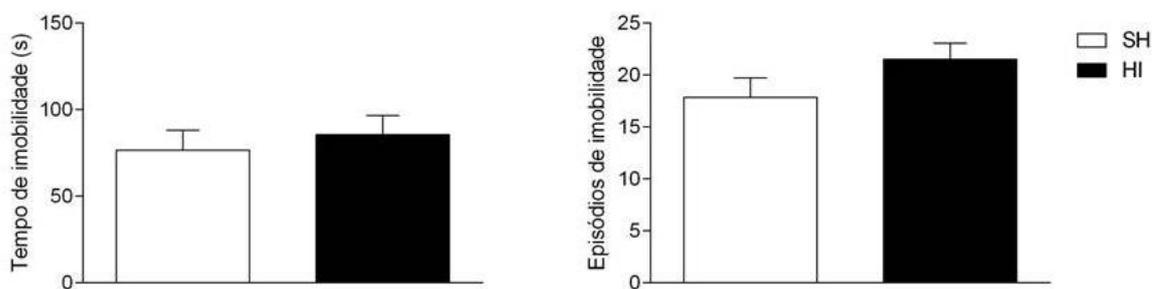
Figura 30 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: número de rotações



Nota: O comportamento de rotação não foi afetado pela lesão HI. Não houve diferenças quanto ao número total de rotações, sejam elas no sentido horário ou anti-horário. Dados representados como média±EPM; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

Figura 31 - Avaliação da atividade exploratória espontânea de fêmeas em campo aberto durante o período diurno, com iluminação vermelha: episódios de imobilidade



Nota: Não foram observadas diferenças relativas ao tempo de imobilidade ou quanto ao número de episódios de imobilidade. Dados representados como média±EPM; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

4.10 Reconhecimento de objeto novo

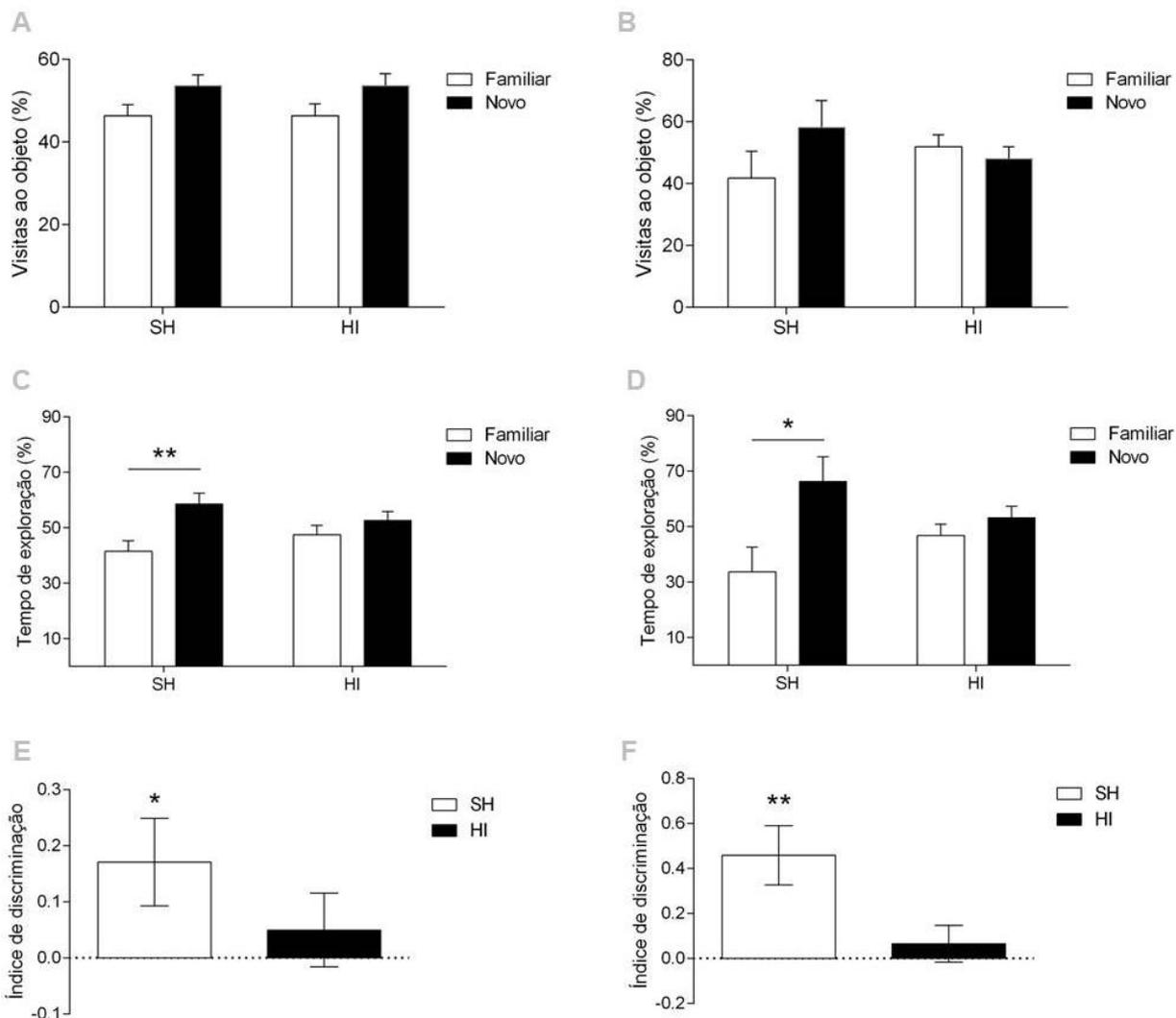
Realizamos o teste de reconhecimento de objetos utilizando ratos em P45. Este teste baseia-se na neofilia, um comportamento inato bastante pronunciado em roedores, com o objetivo de avaliar os processos de aprendizado e memória. Uma vez que o animal se depare com um objeto familiar, isto é, ao qual ele já havia sido exposto anteriormente, simultaneamente com um objeto nunca antes explorado, existe a tendência de que ele opte por investigar mais o novo objeto.

A análise dos percentuais de visitas a cada um dos objetos não evidenciou diferenças dentro dos grupos nos intervalos de 5 minutos (SH - Familiar: $46,38 \pm 2,68$; Novo: $53,62 \pm 2,68$; $p > 0,05$ / HI - Familiar: $46,32 \pm 2,89$; Novo: $53,68 \pm 2,89$; $p > 0,05$) (Figura 32A) e de 8 horas (SH - Familiar: $41,77 \pm 8,64$; Novo: $58,23 \pm 8,64$; $p > 0,05$; HI - Familiar: $51,93 \pm 3,90$; Novo: $48,07 \pm 3,90$; $p > 0,05$) (Figura 32B).

A tendência esperada para animais com memória preservada foi observada quanto aos animais SH analisados neste trabalho, os quais apresentaram porcentagem de exploração do objeto novo significativamente superior à do objeto familiar tanto no intervalo de 5 minutos (Familiar: $41,44 \pm 3,87$; Novo: $58,55 \pm 3,87$; $p = 0,007$) (Figura 32C) quanto no de 8 horas (Familiar: $33,70 \pm 8,90$; Novo: $66,29 \pm 8,90$; $p = 0,010$) (Figura 32D). Entretanto, observamos que os animais do grupo HI dividem igualmente a porcentagem de exploração entre os dois objetos após 5 min (Familiar: $47,49 \pm 3,29$; Novo: $52,50 \pm 3,29$) (Figura 32C) e 8 horas (Familiar: $46,78 \pm 4,09$; Novo: $53,22 \pm 4,09$) (Figura 32D).

A comparação entre os índices de discriminação também fornece um indício de danos cognitivos decorrentes de HI. Enquanto animais do grupo SH possuem seu índice de discriminação estatisticamente diferente de 0 (5 min: $0,17 \pm 0,049$; $p = 0,046$ / 8h: $0,45 \pm 0,131$; $p = 0,007$) (Figura 32E-F), esta significância não é atingida pelo grupo HI (5 min: $0,08 \pm 0,065$; $p = 0,444$ / 8h: $0,06 \pm 0,081$) (Figura 32E-F). Isto confirmaria a ocorrência de déficits de memória de reconhecimento no grupo HI.

Figura 32 - Avaliação dos efeitos de HI sobre as funções de aprendizado e memória através do teste de reconhecimento de objeto novo



Legenda: A, C e E referem-se ao intervalo de 5 minutos enquanto B, D e F correspondem ao intervalo de 8h.

Nota: Não foram observadas diferenças quanto ao percentual de visitas aos objetos (A e B). Animais SH foram capazes de diferenciar o novo objeto em relação ao familiar em ambos os intervalos na análise do percentual de tempo de exploração. O grupo HI, entretanto, apresentou percentuais similares de exploração dos objetos (C e D). O índice de discriminação calculado para o grupo SH foi significativamente superior a zero enquanto o índice do grupo HI igualou-se estatisticamente a zero nos dois intervalos (E e F). Dados expressos como média±EPM; *p<0,05; **p<0,01; (5 min: n=16 animais/grupo; 8h: n=11 (grupo SH) ou 12 (grupo HI)).

Fonte: A autora, 2018.

4.11 Reconhecimento de objeto deslocado

O teste de reconhecimento de objeto deslocado também consiste em um método reconhecidamente utilizado para avaliar funções de aprendizado e memória, com foco na memória espacial, uma modalidade altamente dependente da formação hipocampal. Ao se deslocar um dos objetos para uma nova localização, é esperado que o animal com memória preservada tenha um maior interesse em explorar o objeto que se encontra na nova posição.

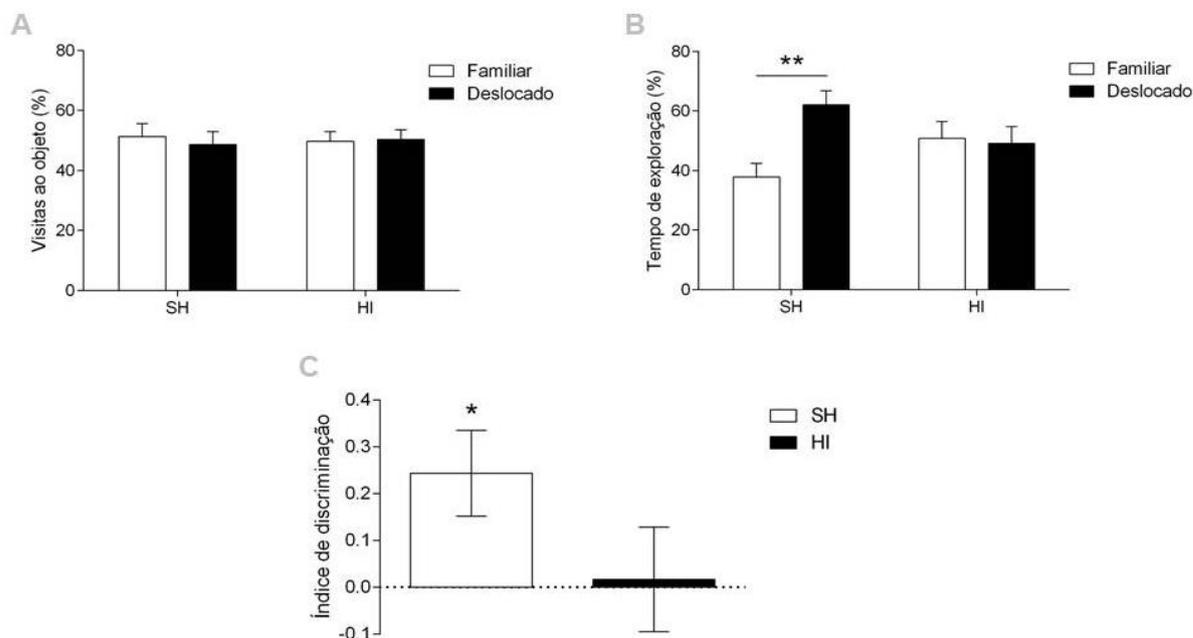
4.11.1 Machos

Ao comparar a porcentagem do número de idas a cada um dos objetos (Figura 33A), não foram encontradas diferenças significativas no grupo SH (Familiar: $48,97 \pm 4,27$; Deslocado: $51,33 \pm 4,27$; $p > 0,05$) nem no grupo HI (Familiar: $50,29 \pm 3,24$; Deslocado: $49,71 \pm 3,24$; $p > 0,05$).

Entretanto, os animais SH submetidos ao teste de deslocamento de objeto exibiram percentual de tempo de exploração do objeto deslocado significativamente superior quando comparado ao percentual referente ao objeto que permaneceu na posição inicial (Familiar: $37,84 \pm 4,59$; Deslocado: $62,16 \pm 4,59$; $p = 0,003$)(Figura 33B). Por outro lado, os animais do grupo HI exploraram de maneira similar os dois objetos (Familiar: $49,16 \pm 5,58$; Deslocado: $50,84 \pm 5,58$; $p > 0,05$)(Figura 33B).

A preferência dos animais do grupo SH pelo objeto deslocado foi evidenciada também na comparação do índice de discriminação, que foi significativamente superior a zero ($0,24 \pm 0,09$; $p = 0,038$). O índice do grupo HI, por sua vez, não diferiu de zero ($0,017 \pm 0,11$; $p > 0,05$)(Figura 33C).

Figura 33 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial de machos através do teste de reconhecimento de objeto deslocado



Nota: Não houve diferenças entre os grupos quanto ao percentual do número de explorações de cada um dos objetos. Entretanto, a análise da porcentagem do tempo de exploração revelou que animais SH foram capazes de diferenciar o objeto deslocado em relação ao familiar enquanto o grupo HI apresentou percentuais similares de exploração dos objetos. O índice de discriminação do grupo SH foi diferente de zero enquanto o do grupo HI assemelhou-se estatisticamente a zero. Dados expressos como média±EPM; * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$; $n = 7$ (grupo SH) ou 11 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

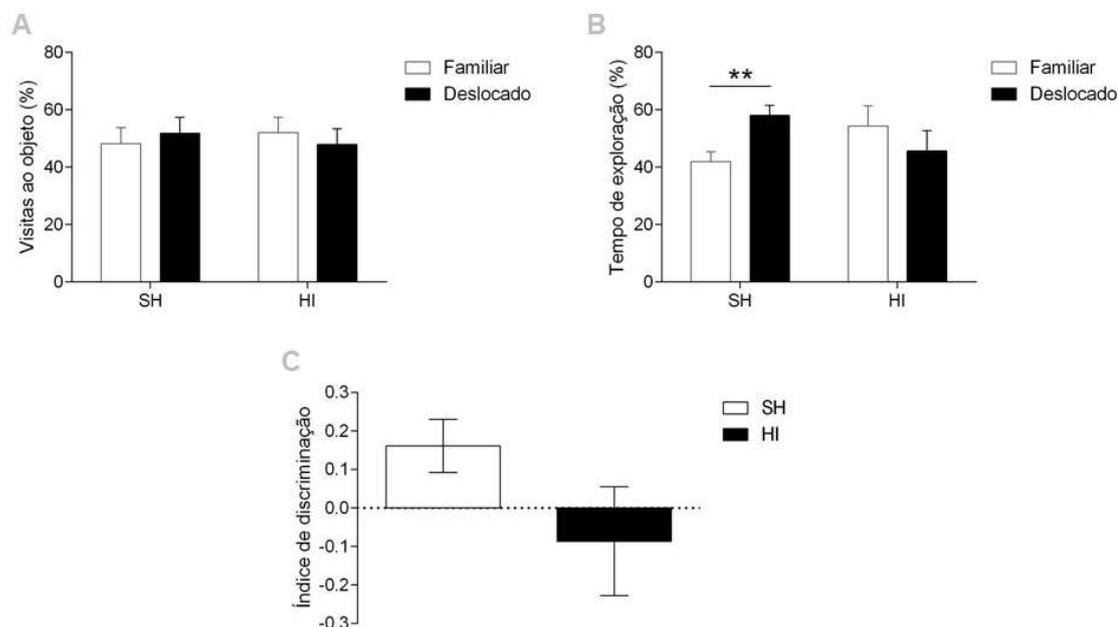
4.11.2 Fêmeas

De forma semelhante ao percentual do número de idas dos machos a cada um dos objetos, também não foram observadas diferenças significativas em relação às fêmeas do grupo SH (Familiar: $48,23 \pm 5,58$; Deslocado: $51,76 \pm 5,58$; $p > 0,05$) e do grupo HI (Familiar: $52,03 \pm 5,41$; Deslocado: $47,97 \pm 5,41$; $p > 0,05$)(Figura 34A).

Já relativamente à análise do tempo de exploração de cada um dos objetos, foi possível descrever que as fêmeas do grupo SH demonstraram capacidade de discriminar os objetos (Familiar: $41,94 \pm 3,45$; Deslocado: $58,05 \pm 3,45$; $p = 0,006$) enquanto esta tendência não foi acompanhada pelas fêmeas HI (Familiar: $54,34 \pm 7,07$; Deslocado: $45,66 \pm 7,07$; $p > 0,05$)(Figura 34B).

A comparação dos índices de discriminação com o valor *zero* não revelou diferenças significativas relativas às fêmeas do grupo SH ($0,16 \pm 0,69$; $p = 0,058$) e àquelas do grupo HI ($-0,087 \pm 0,14$; $p > 0,05$)(Figura 34C).

Figura 34 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial de fêmeas através do teste reconhecimento de objeto deslocado



Nota: Não houve diferenças entre os grupos quanto ao percentual de explorações de cada um dos objetos. Contudo, a análise da porcentagem do tempo de exploração revelou que fêmeas SH foram capazes de diferenciar o objeto deslocado em relação ao familiar enquanto o grupo HI apresentou percentuais similares de exploração dos objetos. Não foram percebidas diferenças relativas ao índice de discriminação em nenhum dos dois grupos. Dados expressos como média±EPM; **p<0,001; n= 7 (grupo SH) ou 4 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

4.12 Memória espacial em labirinto em Y modificado

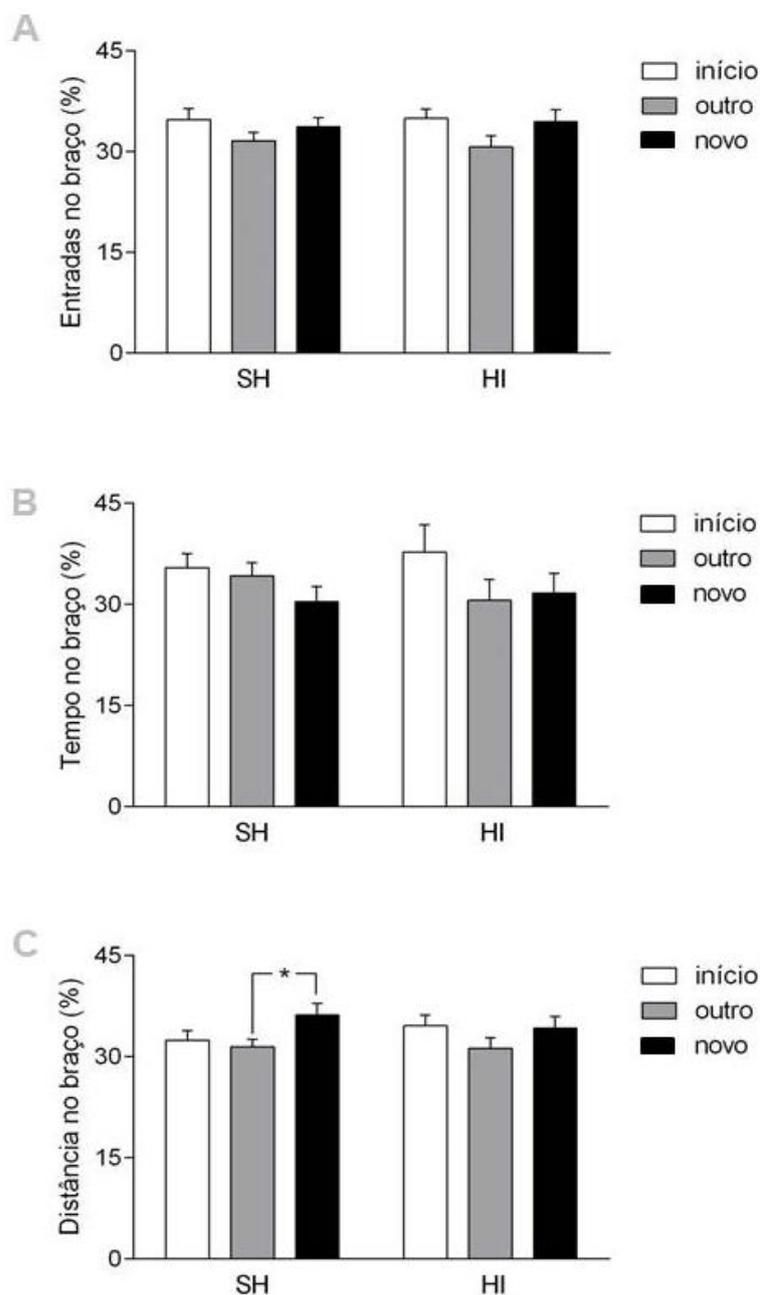
Os efeitos de HI sobre a memória espacial também foram avaliados através do teste do labirinto em Y modificado, sendo contabilizados o número de entradas, o tempo e a distância relativa à atividade de cada animal em cada um dos braços do labirinto (*início*, *outro* e *novo*).

4.12.1 Machos

Não foram detectadas diferenças entre os grupos SH e HI quanto ao percentual de entradas nos braços (SH – *início*: $34,76 \pm 1,65$; *outro*: $31,59 \pm 1,29$; *novo*: $33,65 \pm 1,38$; $p > 0,05$ / HI – *início*: $34,91 \pm 1,37$; *outro*: $30,65 \pm 1,65$; *novo*: $34,44 \pm 1,78$; $p > 0,05$)(Figura 35A). Também não encontramos alterações significativas com relação ao percentual de tempo de permanência em cada braço (SH – *início*: $35,42 \pm 2,04$; *outro*: $34,20 \pm 1,94$; *novo*: $30,38 \pm 2,25$; $p > 0,05$ / HI – *início*: $37,74 \pm 4,01$; *outro*: $30,57 \pm 3,11$; *novo*: $31,68 \pm 2,90$; $p > 0,05$)(Figura 35B).

Contudo, ao se analisar a distância percorrida pelos animais em cada um dos braços, obteve-se um indício de déficit de memória espacial no grupo HI. Enquanto, no grupo SH, os ratos percorriam distâncias superiores no braço *novo* quando comparados ao *outro* (*início*: $32,43 \pm 1,39$; *outro*: $31,43 \pm 1,09$; *novo*: $36,13 \pm 1,74$; $p = 0,027$), no grupo HI os percentuais de exploração relativos a cada um dos dois braços, avaliados com base na distância, foram semelhantes entre si (*início*: $34,58 \pm 1,56$; *outro*: $31,23 \pm 1,52$; *novo*: $34,19 \pm 1,72$; $p > 0,05$)(Figura 35C).

Figura 35 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial através do teste do labirinto em Y modificado realizado por machos



Nota: Não foram observadas diferenças significativas nos grupos SH e HI na comparação entre as porcentagens de entrada em cada braço. Também não houve diferenças quanto ao percentual de tempo em que o animal permaneceu em cada um dos braços. Contudo, a análise da distância percorrida nos braços do labirinto revelou diferença significativa no grupo SH entre as porcentagens relativas à distância percorrida no braço *novo* em comparação ao *outro*. O grupo HI, por outro lado, não exibiu tal diferença. Dados expressos como média±EPM; *p<0,05; n= 13 (grupo SH) ou 14 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

4.12.2 Fêmeas

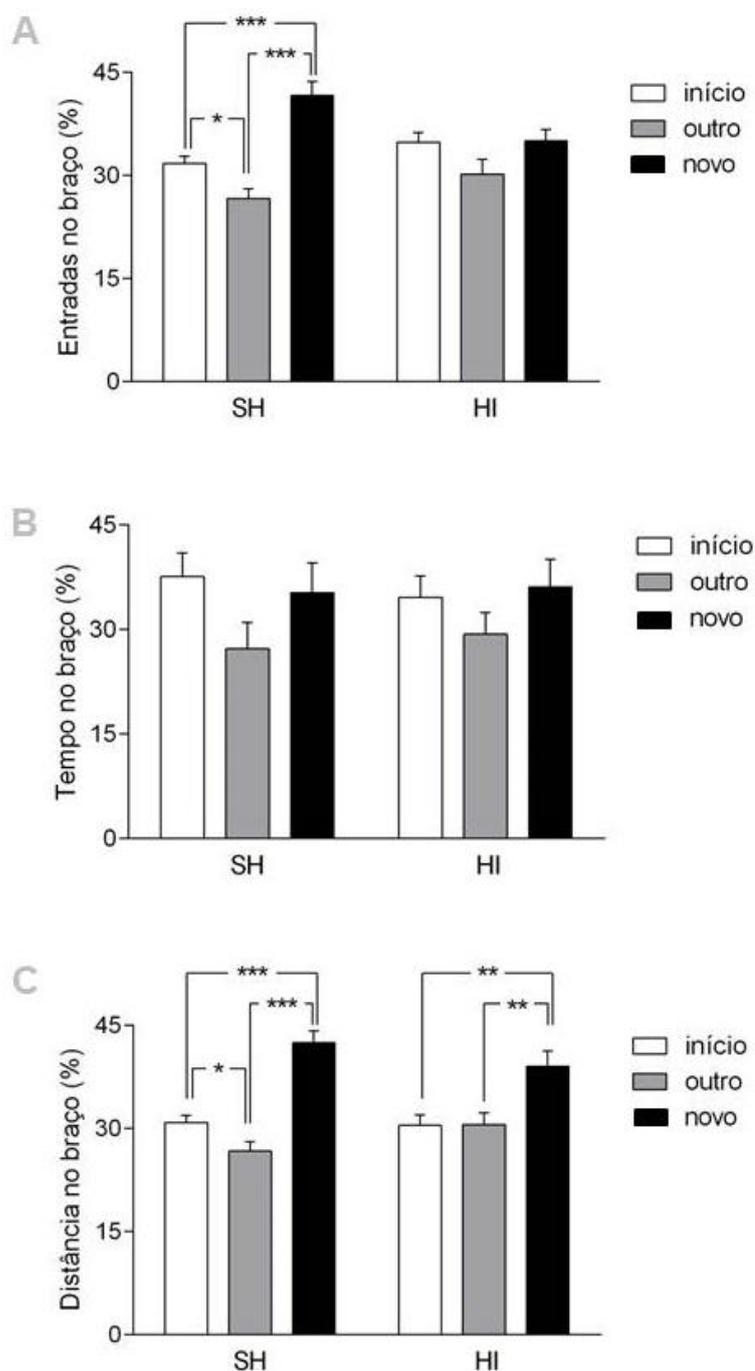
Os achados relativos às diferentes variáveis analisadas através do teste do labirinto em Y modificado realizado por fêmeas foram conflitantes entre si.

A comparação entre o percentual de entradas em cada braço do labirinto mostrou diferenças significativas apenas no grupo SH (*início*: 31,73±1,07; *outro*: 26,64±1,41; *novo*: 41,63±2,04) enquanto que, no grupo HI, não foi visualizada qualquer diferença significativa (*início*: 34,83±1,38; *outro*: 30,17±2,16; *novo*: 35,00±1,70; $p>0,05$). Os animais SH exibiram preferência pelo braço *novo*, no qual a porcentagem de entradas foi significativamente superior às entradas no braço de *início* ($p<0,001$) ou no *outro* ($p<0,001$). Também houve diferença entre o percentual de entradas no braço de *início* e no *outro* ($p=0,028$) (Figura 36A).

Tal tendência, entretanto, não foi verificada na análise do tempo de permanência nas regiões do aparelho. Animais dos grupos SH e HI destinaram percentuais de tempo semelhantes a permanecerem em cada um dos braços do labirinto em Y, não exibindo preferência por qualquer deles (SH – *início*: 37,57±3,35; *outro*: 27,19±3,82; *novo*: 35,28±4,27/ HI – *início*: 34,61±3,01; *outro*: 29,31±3,11; *novo*: 36,09±3,96/ $p>0,05$) (Figura 36B).

Por outro lado, a preferência pelo braço *novo* foi visualizada através da avaliação do percentual de exploração das regiões (SH – *início*: 30,86±1,05; *outro*: 26,69±1,33; *novo*: 42,45±1,75/ HI – *início*: 30,43±1,51; *outro*: 30,54±1,70; *novo*: 39,03±2,19). O aumento da distância percorrida no braço *novo* em comparação com o braço de *início* foi percebido tanto no grupo SH ($p<0,001$) quanto no grupo HI ($p=0,003$). As fêmeas dos grupos SH e HI percorreram distâncias superiores também no braço *novo* em comparação ao *outro* braço (SH: $p<0,001$ / HI: $p=0,003$). O grupo SH apresentou ainda percentual de distância percorrida no braço de *início* superior àquele referente ao *outro* braço ($p=0,039$) (Figura 36C).

Figura 36 - Avaliação dos efeitos de HI sobre a memória espacial através do teste do labirinto em Y modificado realizado por fêmeas



Nota: Fêmeas do grupo SH apresentaram diferenças entre as porcentagens de entradas em cada um dos três braços do labirinto enquanto tal diferença não foi exibida pelas fêmeas do grupo HI. Quanto ao tempo de permanência, nenhum grupo mostrou preferência por qualquer um dos braços. A análise do percentual de distância percorrida, entretanto, revelou a preferência tanto de SH quanto de HI pelo braço novo do labirinto. Dados expressos como média±EPM; *p<0,05; p<0,01; p<0,001; n= 13 (grupo SH) ou 14 (grupo HI).

Fonte: A autora, 2018.

Quadro 8 - Resumo de resultados

	EFEITOS DA HI PRÉ-NATAL			TÉCNICA
Densidade neuronal	↓CA1	↓CA3	- DG	Fluorescência
Parvalbumina	↑CA1	↑CA3	↑DG	Imunofluorescência
NR2B		-		<i>Western blotting</i> (fração total)
EAAT1		-		
GAD _{65/67}		↑		
Sinaptofisina		-		<i>Western blotting</i> (sinaptossomas)
Sintaxina		-		
SNAP 25		-		
VGLUT1		-		
VGAT		↑		
PSD-95		↓		
VGLUT1/SYN		-		Imunofluorescência (sinaptossomas)
VGAT/SYN		-		
LTP e despotenciação		-		Eletrofisiologia (registro extracelular)
Memória de reconhecimento	↓ machos		? fêmeas	Reconhecimento de objeto novo
Memória espacial	↓ machos		↓ ou - fêmeas	Reconhecimento de objeto deslocado Labirinto em Y

Fonte: A autora, 2018.

5 DISCUSSÃO

O hipocampo é parte do sistema límbico e uma estrutura central envolvida no processamento cognitivo. Devido ao padrão de atividade de sua população neuronal, é bem conhecido que um desequilíbrio entre excitação e inibição nessa região desempenhe um papel crítico em uma variedade de condições patológicas (GAO; PENZES, 2015; GATTO; BROADIE, 2010). Lesões pré-natais podem impactar a morfogênese do hipocampo e os resultados podem ser verificados ao longo do desenvolvimento pós-natal, persistir na adolescência e até na idade adulta. Neste trabalho, nós mostramos que ratos adolescentes que foram submetidos à HI pré-natal apresentam perda neuronal no hipocampo, sem alterações nos níveis de componentes associados a sinapses glutamatérgicas. Por outro lado, existe um possível aumento de síntese e liberação de GABA, o que favoreceria mecanismos inibitórios. Também demonstramos deficits cognitivos de longo prazo derivados da HI pré-natal, tanto na memória de reconhecimento quanto na memória espacial.

Condições adversas no período perinatal consistem em uma proeminente causa de atraso no desenvolvimento da estrutura corporal. Os animais do grupo HI investigados apresentaram média de massa corporal reduzida em comparação ao grupo SH desde o dia de nascimento e ao longo do primeiro mês de vida pós-natal. Em humanos, a restrição do crescimento fetal é apontada como um fator preditor de risco para psicopatologias posteriores, como o TDAH, deficits de atenção e de memória de trabalho, transtorno de ansiedade e esquizofrenia, além de estar associada a uma maior predisposição ao abuso de drogas (O'DONNEL; MEANEY, 2017). Em modelos animais, outros autores já caracterizam a ligação permanente das artérias uterinas como um fator responsável pela redução do peso corporal de machos e fêmeas até a idade de desmame (ENGELBREGT et al., 2004) ou de machos até as 7 semanas (NUSKEN et al., 2008).

Também mostramos que, de forma esperada, machos e fêmeas do grupo SH apresentam pesos corporais semelhantes entre si no primeiro mês pós-natal. O início do período da adolescência, entretanto, marca uma fase de intenso desenvolvimento corporal para os machos, que podem atingir massa 22% superior à das fêmeas durante a sexta semana e a diferença pode chegar a 30% na décima semana, já na idade adulta (SANTIAGO et al., 2015). No grupo HI, contudo, tal disparidade entre

machos e fêmeas não foi observada, o que pode representar um indício de efeitos tardios da HI pré-natal sobre a maturação de indivíduos do gênero masculino.

No SNC, a redução do aporte de nutrientes e de oxigênio pode impactar uma variedade de processos fundamentais para a homeostasia neural, tais como crescimento, diferenciação e sinaptogênese, além da própria atividade sináptica (NAVARRO et al., 1988; GOLAN et al., 2009; MCCLENDON et al., 2017). Através da contagem de neurônios nas regiões do hipocampo, evidenciou-se perda neuronal relativa ao grupo HI no CA1 e no CA3. A redução do número de neurônios observada neste período de desenvolvimento pode ter sido derivada tanto do processo de morte celular quanto da diminuição das taxas de proliferação e/ou diferenciação.

Pinto (2015), utilizando o mesmo modelo de HI, já havia investigado os efeitos desta lesão sobre o número de neurônios hipocâmpais. Foi apontada a redução significativa em P10, tanto no CA3 quanto no DG. Interessantemente, enquanto o processo de formação de neurônios no CA é demarcado por períodos críticos estabelecidos durante a vida intrauterina, o DG apresenta sua camada subgranular como um conhecido nicho neurogênico, capaz de gerar novos neurônios até mesmo na idade adulta do rato. É provável que a lesão provocada tenha atrasado a diferenciação neuronal no DG, que, posteriormente, foi compensada. Ainda, é possível hipotetizar que o reduzido número de neurônios relatado no DG no início do desenvolvimento dos animais HI tenha sua origem na perda de progenitores subsequente ao insulto e que a compensação tenha sido derivada de um aumento tardio da auto-renovação do *pool* de células-tronco presente no DG. Outros autores já relataram o aumento da proliferação celular na camada subgranular do DG após isquemia ou outros tipos de insultos (KLEINDIENST et al., 2005; MARTINEZ-MORENO et al., 2016).

Em geral, em se tratando de maturação neuronal, acredita-se que as células-tronco neurais, as células progenitoras e os progenitores restritos à linhagem neuronal sejam mais vulneráveis a perturbações da homeostase do que neurônios já diferenciados uma vez que o momento da replicação de DNA é marcado por uma grande probabilidade de defeitos genéticos (DUBROVSKAYA; ZHURAVIN, 2009). No hipocampo dos ratos, a gênese de neurônios inibitórios ocorre aproximadamente em E14 enquanto os neurônios excitatórios iniciam sua diferenciação três dias depois, em E17 (SLOMIANKA et al., 2011). Como o modelo usado neste trabalho induz HI em E18, é possível sugerir que os interneurônios inibitórios neste estágio estariam mais

diferenciados e, portanto, mais protegidos de danos decorrentes da lesão. Os progenitores que viriam a gerar os neurônios excitatórios, por outro lado, seriam altamente suscetíveis a distúrbios que provoquem morte celular ou que alterem sua diferenciação.

Um dos mecanismos através dos quais a HI pode vir a afetar as células nervosas é a excitotoxicidade glutamatérgica. Apesar de diversos receptores apresentarem relação com danos excitotóxicos, devido ao influxo de íons e água para dentro das células, causando turgência e morte celular, a ativação dos receptores de glutamato parece ser a mais crítica. Em situações de estresse, há um incremento da síntese e da liberação de neurotransmissores, principalmente do glutamato. Embora ainda não existam descrições sobre os níveis de VGLUT em modelos de HI pré-natal, seria coerente supor que estes estariam aumentados durante um período próximo à indução da lesão. Já, na fase de adolescência do animal, como foi testado neste estudo, a expressão de VGLUT1, a isoforma predominante no hipocampo, estaria estabilizada. Adrover e colaboradores (2015), utilizando um modelo de estresse pré-natal em ratos através da imobilização materna e analisando a prole em P60, não descreveram alterações na imunomarcagem de VGLUT1 no hipocampo nem na liberação de glutamato.

Da mesma forma, não observamos aqui diferenças em relação a níveis de proteínas associadas a vesículas sinápticas, como a sinaptofisina, a syntaxina e a SNAP-25. Tais informações nos permitem inferir que possivelmente não existem modificações quanto à liberação de neurotransmissores por neurônios, de maneira geral, no grupo HI, tendo em conta a idade estudada.

Além dos aspectos de liberação de neurotransmissores, é importante destacar a ação dos neurônios pós-sinápticos no contexto de lesão hipóxico-isquêmica. A neurotoxicidade oriunda da superativação dos NMDAr já foi documentada tanto no encéfalo adulto (JAVITT, 2004; WU et al., 2004, HASHIMOTO et al., 1993) quanto durante o desenvolvimento (QU et al., 2003; ARMAGAN et al., 2015). Em especial, já se provou através de experimentos *in vitro*, que a vulnerabilidade das células-tronco neurais a danos excitotóxicos pode ser reduzida através do tratamento com um antagonista seletivo dos NMDAr, o MK-801, o que corrobora a importância destes receptores. Não se pode descartar, ainda, a participação adicional do *stress* oxidativo e a disfunção mitocondrial como mediadores da morte de células-tronco neurais (ARMAGAN et al., 2015).

Com relação aos níveis de NMDAr no hipocampo, neste trabalho, avaliamos a subunidade NR2B, predominante no período pré-natal e no início do período pós-natal e importante para a função de aprendizado e memória (HUO et al, 2014). Não houve alteração do conteúdo total de NR2B no hipocampo dos animais HI em comparação com o grupo SH. De modo similar, Jantzie e colaboradores (2014), usando 60 minutos de oclusão da artéria uterina, não identificaram diferenças nos níveis das subunidades NR1 e NR2A no CA3 de ratos HI. Por outro lado, já havia sido referida a redução do número de neurônios NR2B+ no DG, CA1 e CA3 de animais P10 previamente submetidos à HI pré-natal (Pinto, 2015). Uma vez que a redução do número de neurônios relatada no presente estudo é restrita às regiões do CA1 e CA3 e não inclui o DG, o ideal seria identificar a distribuição destes receptores nas regiões do hipocampo antes de formular conclusões mais profundas a esse respeito. Até o momento, pode-se afirmar apenas que há indícios da ausência de diferenças relativas ao *input* glutamatérgico na formação hipocampal como um todo.

Apesar da ausência de alteração quanto ao NR2B, encontramos redução dos níveis de PSD 95 nos sinaptossomas de hipocampo de ratos HI. Em outro modelo de isquemia, já foi apresentada redução de PSD 95 no hipocampo, levando a déficits na plasticidade pós-sináptica (YAN et al., 2013). Além disso, foi reportada uma importante relação entre esta proteína e o estabelecimento de sinapses excitatórias e inibitórias. A inibição da PSD 95 mostrou-se responsável por reduzir a razão excitação/inibição (PRANGE et al., 2004).

A atuação da glia pode modular a resposta neuronal frente à excitotoxicidade. Astrócitos são conhecidos por produzirem a cicatriz glial como um mecanismo de defesa contra lesões focais no encéfalo. Na isquemia global, a atuação principal dessas células consiste na remoção de glutamato da fenda sináptica, tendo o papel de manter o conteúdo de glutamato extracelular abaixo de níveis neurotóxicos (ZERANGUE; KAVANAUGH, 1996; ROBINSON; JACKSON, 2016). Devido à ampla variedade de modelos e de condições experimentais, há dados conflitantes no que concerne a expressão dos transportadores de glutamato gliais. Geralmente, emprega-se a indução de isquemia pós-natal através do clampeamento das artérias carótidas, avaliando o desfecho ao longo do tempo, desde horas até semanas após a lesão. De uma maneira geral, a duração dos efeitos da isquemia parece ser mais prolongada no córtex, que pode manter os níveis de EAAT2 elevados por até 2 semanas (YATOMI et al., 2013) e um aumento de EAAT1 limitado ao prazo de 3 dias (YATOMI et al.,

2013) enquanto no hipocampo foi descrita a redução de EAAT2 restrita ao período entre 6 e 24h (YEH et al., 2005). Também já foi reportado que a isquemia global transitória não afeta os níveis de EAAT1 no CA1 (YEH et al., 2005; CHEN et al., 2002). Neste trabalho, analisamos o hipocampo cerca de 7 semanas após HI e observamos que os níveis EAAT1 permaneceram igualmente inalterados.

Em suma, o estudo dos componentes das sinapses glutamatérgicas não revelou sequelas permanentes derivadas da HI pré-natal. Nuñez e colaboradores (2003b) já destacaram que ratos neonatos podem ser relativamente menos suscetíveis a danos decorrentes do glutamato devido à imaturidade do sistema glutamatérgico (HOLMES et al., 2002). Em oposição, observamos importantes alterações quanto aos marcadores relacionados ao GABA. O aumento dos níveis tanto da enzima responsável pela sua síntese, a GAD, quanto do transportador vesicular deste neurotransmissor, o VGAT, no grupo HI podem refletir um incremento à produção e liberação de GABA.

A regulação precisa dos níveis de GABA é fundamental para o pleno desenvolvimento do SNC. Assim como o que ocorre na excitotoxicidade glutamatérgica decorrente de evento isquêmico, é observado um aumento da liberação de GABA, que pode chegar até 250 vezes no hipocampo (ANDINE et al., 1991). No período neonatal, o excesso de ativação do GABA_A é capaz de induzir o influxo de íons cálcio, podendo ser neurotóxico em altos níveis. Já se documentou que o tratamento com muscimol, um agonista do receptor GABA nos primeiros dias da vida pós-natal é responsável pela redução do número de neurônios nas diferentes regiões do hipocampo (CA1, CA2/3 e DG), o que foi verificado em P21 e particularmente mais prejudicial para ratos machos (NUÑEZ et al., 2003a).

As células mais importantes e mais investigadas do sistema GABAérgico são os neurônios que expressam parvalbumina. Estes consistem em interneurônios de disparo rápido, incluindo neurônios axo-axônicos, células em candelabro (do inglês, *chandelier cells*) e um subgrupo das células em cesto. Suas sinapses concentram-se no corpo celular e nos segmentos iniciais das células principais (CPs), sendo capazes de controlar as taxas de disparo de potencial de ação das CPs no CA1 distal e no subículo (AMILHON et al., 2015). A ação inibitória dos interneurônios parvalbumina-positivos é exclusivamente mediada por GABA, enquanto outros interneurônios que expressam calretinina e calbindina podem ser também não-GABAérgicos (DEL TONGO et al., 2009). Além disso, a parvalbumina por si só desempenha um papel

direto na proteção de neurônios contra os efeitos tóxicos de níveis intracelulares exacerbados de Ca^{2+} uma vez que é capaz de realizar ligação com estes íons e, assim, ter uma função de tamponamento de Ca^{2+} (HIPÓLITO-REIS et al., 2013). Neste caso, a descrição do aumento da imunomarcção de parvalbumina poderia ser justificada como uma resposta compensatória à excitotoxicidade mediada pelos íons cálcio (DEL TONGO et al., 2009).

Astrócitos podem interferir no equilíbrio excitação/inibição dos sistemas de neurotransmissores. Já foi demonstrada, por exemplo, a imunomarcção de GABA em uma grande proporção de astrócitos das regiões CA1, CA3 e DG (LE MEUR et al., 2012) e sugere-se o GABA como um gliotransmissor diretamente correlacionado com condições patológicas (YOON; LEE, 2014). A origem do GABA astrocitário pode ser derivada de dois mecanismos: a captação deste neurotransmissor através do transportador e a síntese a partir da própria astrogliã.

A produção do GABA astrocitário pode ser devida à ação de duas enzimas independentes: a monoamino oxidase B (MAO-B) e a GAD. Em modelos animais da doença de Alzheimer, o GABA sintetizado pela MAO-B astrocítica e liberado de astrócitos reativos ao redor das placas amiloides no DG causa o aumento da inibição tônica das células granulares (WU et al., 2014) e reduz a memória (JO et al., 2014). Análises *postmortem* também já revelaram altos níveis de GABA e MAO-B astrocíticos nos encéfalos de pacientes de Alzheimer (JO et al., 2014). Assim, a modulação da inibição mediada por GABA pode representar um alvo terapêutico para esta e, possivelmente, para outras condições que envolvam déficits de memória.

Quanto à enzima que também é responsável pela síntese de GABA neuronal, a GAD, destaca-se que a expressão desta em astrócitos é proeminente em neonatos e atenua-se ao longo do desenvolvimento (OCHI et al., 1993; YOON; LEE, 2014). Interessantemente, também já se relatou que astrócitos que contêm GAD são mais resistentes, exibindo aumento de sobrevivência em situações de privação de glicose na presença de glutamato (BELLIER et al., 2000). No nosso estudo, nós descrevemos aspectos que iriam ao encontro da hipótese de aumento da produção e liberação de GABA. A análise da colocalização entre VGAT e sinaptofisina, que confirmaria o aumento da ocorrência deste neurotransmissor nos neurônios pré-sinápticos, entretanto, não mostrou diferenças entre SH e HI. Uma suposição que pode ser levantada a partir desses dados refere-se a um possível aumento da síntese de GABA

astrocitário. Em concordância, já mostramos a presença de astrogliose no hipocampo de ratos P45 submetidos à HI pré-natal (PINTO, 2015).

Um aspecto relevante a ser considerado no estudo de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos consiste nas suas propriedades sinápticas. Um trabalho prévio com foco no CA3 de animais HI (P10-P11) descreveu uma redução de 60% na frequência média de correntes inibitórias pós-sinápticas em relação ao grupo SH (JANTZIE et al., 2015). Neste estudo, não encontramos alterações utilizando ratos adolescentes, porém avaliamos apenas aspectos eletrofisiológicos na via dos colaterais de Schaffer. Faz-se necessária uma investigação mais completa para afirmar claramente se os mecanismos inibitórios se sobrepõem à sinalização excitatória nas demais vias hipocampais que podem impactar as funções de aprendizado e memória.

No nosso modelo de HI pré-natal, verificamos déficits relacionados à memória de reconhecimento de objetos e à memória espacial. Estes resultados podem representar um importante correlato funcional para as alterações inibitórias sugeridas por nossos achados neuroquímicos e morfológicos. Esta hipótese está de acordo com os dados descritos por Tretter e colaboradores (2009), que mostraram que o aumento da sinalização GABAérgica, através da elevação do número de GABA_A nos neurônios piramidais do CA3 correlaciona-se a déficits de memória espacial (TRETTER et al., 2009).

Além disso, o aumento da inibição neuronal no DG é uma característica presente em um modelo animal da síndrome de Down (camundongos Ts65Dn), o que contribui para o comprometimento do processamento mnemônico similar ao que é observado em crianças e jovens adultos afetados pela síndrome (NADEL, 2003). Nestes camundongos, o tratamento crônico com antagonistas GABA_A é capaz de reverter os déficits cognitivos (FERNANDEZ et al., 2007). Ainda, Begenisic e colaboradores (2014) demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina normaliza a liberação de GABA nos camundongos Ts65Dn, promovendo recuperação da capacidade mnemônica e da plasticidade sináptica hipocampal.

A importância do hipocampo para o desempenho cognitivo animal foi confirmada por diversos investigadores utilizando diferentes desenhos experimentais. Clark e colaboradores (2000) testaram os efeitos de lesões citotóxicas induzidas por radio-frequência e ibotenato na memória de reconhecimento usando intervalos distintos: 10 segundos, 1 minuto e 10 minutos. Apesar de ratos lesionados exibirem

memória intacta após intervalos menores (10 segundos e 1 minuto), eles apresentaram déficits significativos após 10 minutos. Utilizando injeções intrahipocâmpais de NMDA, Mumby e colaboradores (2002) mostraram que lesões excitotóxicas no hipocampo levam a déficits significativos no NORT ao empregar um intervalo de 5 minutos entre a familiarização e a fase de teste.

Modelos de HI neonatal também têm mostrado déficits de memória espacial (DE PAULA et al., 2009; ARTENI et al., 2003; PEREIRA et al., 2007) e redução da memória aversiva (ARTENI et al., 2003) associados à atrofia hipocâmpal (DE PAULA et al., 2009; JANSEN; LOW, 1996) e redução da densidade de espinhas dendríticas nas células piramidais do CA1 (ROJAS et al., 2013). Apesar de estes trabalhos terem sido tradicionalmente relevantes para a compreensão da fisiopatologia da HI, eles não mimetizam as complicações que ocorrem durante a gestação humana e levam à HIE. Em se tratando de estudos de HI perinatal, é importante destacar alguns fatores determinantes que podem afetar os resultados: o estágio de desenvolvimento quando o insulto é causado; se a oclusão é transitória ou permanente, parcial ou completa; e se o modelo considera as trocas entre a mãe e o feto.

Utilizando modelos de HI induzidos no dia do parto, alguns investigadores já descreveram a ausência de prejuízo cognitivo em ratos que passaram pela oclusão da artéria uterina (BINIENDA et al., 1996) e, especificamente, nenhuma alteração no NORT ao avaliar ratos adolescentes nascidos por cesareana seguida imediatamente por imersão em água (VENEROSI et al., 2004).

Por outro lado, evidências apontam para efeitos opostos quando a lesão é causada alguns dias antes do nascimento. Cai e colaboradores (1995), empregando a oclusão completa da vasculatura uterina em E17 reportaram déficits cognitivos em P28, medidos através do teste de esQUIVA passiva e do labirinto aquático de Morris. Delcour e colaboradores (2012) realizaram a ligação unilateral da artéria uterina em E17 e encontraram hiperatividade espontânea e déficits de memória no NORT usando um intervalo de um minuto, mas nenhuma alteração no intervalo de uma semana.

Descrevemos que ratos HI apresentaram um maior número de rotações durante o teste de campo aberto. Tal comportamento é considerado uma estereotipia, assim como uma série de movimentos repetitivos (KELLEY, 2001). Estudos de lesões intrauterinas também relataram o aumento de estereotipias na prole, utilizando modelos de estresse materno (WILSON, 2013) e exposição pré-natal ao ácido valproico (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). A ocorrência de movimentos

estereotipados já foi explorada por uma série de estudos clássicos que provaram ser este um dos efeitos de injeções de dopamina, anfetamina e apomorfina no estriado (COOLS; VAN ROSSUM, 1970; FOG; PAKKENBERG, 1971; FUXE; UNGERSTEDT, 1970). De forma coerente, observamos o aumento dos níveis de tirosina hidroxilase no estriado de animais HI em P45 (dados não publicados).

Também relatamos aqui que as condições às quais os animais foram expostos durante a realização do teste de campo aberto foram determinantes para os desfechos observados. Ao se realizar o teste durante o dia, tanto na presença da luz branca quanto da luz vermelha, não foram observadas diferenças quando a parâmetros relacionados à ansiedade entre os animais dos grupos SH e HI, sendo machos ou fêmeas. Por outro lado, a prática do teste noturno, utilizando iluminação branca, revelou-se mais ansiogênica para os machos do grupo HI. Já foi mostrado o aumento dos níveis de ansiedade na idade adulta através do estudo de animais que passaram por asfixia perinatal (WEITZDOERFER et al., 2004) e por hipóxia pré-natal transitória, sendo os machos caracterizados como mais sensíveis aos danos decorrentes da hipóxia (TROFINMOVA et al., 2010).

Nosso protocolo de teste comportamental noturno acabou por induzir uma alteração transitória no ciclo claro-escuro ao qual o animal está habituado, o que é reconhecidamente uma forma de estresse. Neste contexto, podemos considerar que os machos do grupo HI foram especialmente sensíveis a esse fator estressor. Perturbações durante a gestação já se mostraram responsáveis por induzir uma maior suscetibilidade a estímulos estressantes pós-natais (FRIDE et al., 1986). Esta tendência estaria relacionada à regulação neuroendócrina, especialmente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Diversos autores já relataram que diferentes tipos de estresse durante a última semana de gestação de ratos induzem o aumento dos níveis circulantes de cortisol e catecolaminas no feto (WARD; WEISZ, 1984; TAKAHASHI et al., 1998; WEINSTOCK et al., 1988; ROHDE et al., 1983). Além disso, acredita-se que os animais impactados pelos altos níveis destes hormônios durante a vida intrauterina passem por uma espécie de programação, o que os faz liberar níveis mais elevados de cortisol e por um tempo mais prolongado frente a um estresse ambiental (HENRY et al., 1994; RICHARDSON et al., 2006; SMITH et al., 2004; VALLEE et al., 1999).

O aumento dos níveis circulantes de hormônios como cortisol e adrenalina/noradrenalina causado pela exposição ao estresse pode, não só alterar a

regulação do eixo, mas comprovadamente afetar o desenvolvimento de estruturas cerebrais, como o hipocampo (SAPOLSKY et al., 1984; UNO et al., 1990). Um trabalho anterior do nosso laboratório, com o objetivo de investigar os efeitos de um estresse pós-natal, a privação de sono paradoxal (PSP), no modelo de HI pré-natal, reportou que a PSP, apesar de não interferir nos níveis de receptores de glicocorticoides no hipocampo de animais SH, foi responsável por induzir o aumento destes níveis no grupo HI (ARAUJO, 2016). Este dado representa mais um indício que aponta para a maior sensibilidade do grupo HI frente a um segundo fator de estresse subjacente a uma possível modificação permanente do eixo HPA.

Embora não exibam traços evidentes de ansiedade, as fêmeas do grupo HI mostraram-se hipoativas no teste do campo aberto, na condição noturna. O uso de diferentes protocolos de lesões pré-natais e de diferentes desenhos experimentais conduz a discrepâncias na literatura relativa à atividade motora de animais que passaram por HI. A hiperatividade mensurada através da distância percorrida no teste de campo aberto já foi provada como consequência de HI por Delcour e colaboradores (2011), utilizando a oclusão unilateral permanente dos cornos uterinos. Cai e colaboradores (1999), por sua vez, ao empregarem a oclusão bilateral em E17 por 30 min, reportaram aumento da atividade motora durante a segunda semana de vida pós-natal (P13 – P15) e a ausência de diferenças em P20 e P30. Black e colaboradores (2015) descreveram hipoatividade de animais em P21 como efeito decorrente da ligação bilateral em E20. Analisando ratos na idade adulta, Robinson e colaboradores (2005) investigaram um modelo de HI pré-natal transitória similar ao utilizado neste trabalho e também verificaram redução da atividade locomotora. Apesar de estes últimos autores atribuírem este comportamento a um atraso no desenvolvimento motor de animais HI, uma série de testes realizados em nosso laboratório contradizem esta suposição (SAVIGNON, 2013 e dados não publicados).

Geralmente, ao se investigar uma lesão durante o desenvolvimento do SNC, é importante avaliar a duração da persistência do dano. Em muitos casos, devido à plasticidade cerebral e, especialmente, porque regiões como o hipocampo continuam a se desenvolver durante a vida pós-natal (BAYER, 1980), é difícil encontrar danos funcionais persistentes. O uso de um modelo de HI pré-natal em E18 confirma-se como um método eficiente de gerar alterações em longo prazo. E18 é um período caracterizado pelos processos de maturação e diferenciação e constitui-se como uma importante fase para a função cognitiva (DUBROVSKAYA; ZHURAVIN, 2009).

Apesar de outros trabalhos terem investigado as consequências de HI sobre neurotransmissores, especialmente o glutamato, este é o primeiro a utilizar o modelo de HI proposto por Savignon e colaboradores (2012) para elucidar o papel do GABA e da parvalbumina nos efeitos funcionais relacionados ao aprendizado e memória em um período crítico do desenvolvimento como a adolescência no contexto de lesão hipóxico-isquêmica pré-natal.

Nossos resultados indicam que a HI sistêmica pode ser responsável por alterações que caracterizam o desbalanço excitação/inibição observado em um período tardio do desenvolvimento. Nossos achados sobre os prejuízos cognitivos enfatizam a importância de uma modulação adequada de neurotransmissores durante o desenvolvimento hipocampal. Outros estudos são necessários para confirmar os efeitos da HI na função sináptica. A possibilidade de melhorar a cognição por meio da alteração do balanço entre a neurotransmissão excitatória e inibitória é uma hipótese que deve ser melhor investigada quanto ao seu potencial terapêutico.

CONCLUSÕES

A partir da interpretação dos dados apresentados neste trabalho, concluiu-se que:

- a) A lesão hipóxico-isquêmica pré-natal foi capaz de promover redução do número de neurônios nas diferentes regiões do hipocampo, sendo esta redução provavelmente relacionada à morte de progenitores derivada de danos excitotóxicos;
- b) Considerando o papel do balanço excitatório/inibitório no hipocampo, o presente estudo mostrou que componentes associados às sinapses GABAérgicas e, portanto, à inibição podem estar favorecidos na HI pré-natal;
- c) Não foi observada alteração referente à plasticidade sináptica, LTP e despotenciação, avaliada na via colateral de Schaffer de animais HI.
- d) Os animais HI demonstraram comportamentos associados à ansiedade apenas na condição de teste noturno, com iluminação branca, o que nos permite sugerir uma maior vulnerabilidade destes animais ao estresse pós-natal;
- e) Foram percebidos déficits de aprendizado e memória em machos e fêmeas através do emprego de testes comportamentais baseados na memória de reconhecimento de objetos e na memória espacial, utilizando diferentes intervalos.

REFERÊNCIAS

- ADROVER, E. et al. Glutamate neurotransmission is affected in prenatally stressed offspring. *Neurochem Int.*, v. 88, p. 73-87, 2015.
- AINGE, J.A. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. *Behav Brain Res*, v. 167, n. 1, p. 183-195, 2006.
- AIRAKSINEN, E.; LARSSON, M.; FORSELL, Y. Neuropsychological functions in anxiety disorders in population-based samples: evidence of episodic memory dysfunction. *J Psychol Res.* v. 39, p. 207–214, 2005.
- ALLEN, N.J.; ATTWELL, D. The effect of simulated ischaemia on spontaneous GABA release in area CA1 of the juvenile rat hippocampus. *J Physiol*, v. 561, n. 2, p. 485–498, 2004.
- ALLEN, N.J.; ROSSI, D.J.; ATTWELL, D. Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slices. *J Neurosci*, v. 24, p. 3837–3849, 2004.
- ALTMAN, D.; YOUNG, R.; YAGEL, S. Effects of dexamethasone in hypoxic ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol. Neonate.*, v. 46, p. 149–156, 1984.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci*, v. 31, p. 571-591, 1989.
- AMILHON, B. et al. Parvalbumin Interneurons of Hippocampus Tune Population Activity at Theta Frequency. *Neuron*, v. 3, n. 86, p. 1277-1289, 2015.
- ANDERSEN, P.; BLISS, T.V.; SKREDE, K.K. Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp. Brain Res.*, v. 13, p. 222–238, 1971.
- ANDERSON, EB.; GROSSRUBATSCHER, I.; FRANK, L. Dynamic Hippocampal Circuits Support Learning- and Memory-Guided Behaviors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, v. 79, p. 51-58, 2014.
- ANDERSON, G.W.; SCHOONOVER, C.M.; JONES, S.A. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid*, v. 13, n. 11, p. 1039-1056, 2003.
- ANDERSSON, K. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport*, v. 6, n.2, p. 375-378, 1995.
- ANDINE, P. et al. Changes in extracellular amino acids and spontaneous neuronal activity during ischemia and extended reflow in the CA1 of the rat hippocampus. *J. Neurochem.*, v. 57, p. 222–229, 1991.

ARAUJO, P.C. *Efeitos da privação de sono paradoxal na expressão de receptores para corticosteróides no hipocampo, de moléculas envolvidas na modulação do sono e no aprendizado e memória de ratos submetidos a modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. 109 p. Tese (Doutorado em Biociências), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

ARMAGAN, G. et al. Tideglusib protects neural stem cells against NMDA receptor overactivation. *Pharmacol Rep.*, v. 67, n. 5, p. 823-831, 2015.

ARRIGO, A. et al. Constrained spherical deconvolution analysis of the limbic network in human, with emphasis on a direct cerebello-limbic pathway. *Front Hum Neurosci*, v. 8, p. 8:987, 2014.

ARRIZA, J.L. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 94, p. 4155–4160, 1997.

ARTENI, N.S. et al. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.*, v. 973, n.2, p.171-178, 2003.

ASHERY, U. et al. The Molecular Mechanisms Underlying Synaptic Transmission: A View of the Presynaptic Terminal. *The Synapse Structure and Function*, p. 21–109, 2014.

AYLWARD, G.P. Cognitive and neuropsychological outcomes: more than IQ scores. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, v. 8, n.4, p. 234-240, 2002.

BACK, S. 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.

BARRADAS, P.C. et al. Prenatal Systemic Hypoxia-Ischemia and Oligodendroglia Loss in Cerebellum. *Adv Exp Med Biol.*, v. 949, p. 333-345, 2016.

BARKS, J.; POST, M.; TUOR, U. Dexamethasone prevents hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Pediatr Res.*, v. 29, p. 558–563, 1991.

BAUD, O. et al. 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. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol*, v. 190, n. 1, p. 115-34, 1980.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. *Neuroscience: Exploring the Brain Fourth, International Edition*. Lippincott Williams & Wilkins; Fourth, International. 2015. 878p.

- BEGENISIC, T. et al. Fluoxetine in adulthood normalizes GABA release and rescues hippocampal synaptic plasticity and spatial memory in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis.*, v. 63, p. 12-19, 2014.
- BELLIER, J.P. et al. Glutamic acid decarboxylase-expressing astrocytes exhibit enhanced energetic metabolism and increase PC12 cell survival under glucose deprivation. *J Neurochem.*, v. 75, n. 1, p. 56-64, 2000.
- BELLOCCHIO, E.E. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, v. 289, p. 957–960, 2000.
- BINIENDA, Z. et al. Effects of ischemia-hypoxia induced by interruption of uterine blood flow on fetal rat liver and brain enzyme activities and offspring behavior. *Int J Dev Neurosci.*, v. 14, n. 4, p. 399-408, 1996.
- BJELKE, B. et al. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantianigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res.*, v. 543, n.1, p. 1-9, 1991.
- BLACK, A.M. et al. Broccoli sprout supplementation during pregnancy prevents brain injury in the newborn rat following placental insufficiency. *Behav Brain Res.*, v. 291, p. 289-298, 2015.
- BLISS, T.V.; Lømo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, v. 232, p. 331–356, 1973.
- BOUE-GRABOT, E. et al. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem.*, v. 70, n. 3, p. 899-907, 1998.
- BOULLAND, J.L. et al. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J Comp Neurol.*, v. 480, p. 264–280, 2004.
- BRÖER, S.; BROOKES, N. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem.*, v. 77, n. 3, p. 705-719, 2001.
- BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, v. 12, p. 287–295, 2007.
- BURGULA, S. et al. Downregulation of PEBP1 in rat brain cortex in hypoxia. *J Mol Neurosci.*, v. 42, n. 1, p. 36-47, 2010.
- BURKE, R.E. et al. 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, p.171-179, 1991.
- CAI, Z. et al. Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits. *Brain Res Bull.*, v. 49, n. 5, p. 359-365, 1999.

- CAI, Z. et al. Intrauterine hypoxia-ischemia increases N-methyl-D-aspartate-induced cGMP formation and glutamate accumulation in cultured rat cerebellar granule cells. *Pediatr Res.*, v. 38, n.1, p. 107-112, 1995.
- CHEN, W.Z. et al. Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT-1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 2142–2152, 2002.
- CHEN, Y.Y. et al. Perinatal outcome of recurrent pre-eclampsia versus pre-eclampsia in nulliparas. *J Obstet Gynaecol Res.*, v. 35, n. 6, p. 1042-1046, 2009.
- CLARK, R.E. et al. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci.*, v. 20, n. 23, p. 8853-8860, 2000.
- CLAYTON, N.S.; BUSSEY, T.J.; DICKINSON, A. Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci.* v. 4, n. 8, p. 685-691, 2003.
- COHEN, N.J.; SQUIRE, L.R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, v. 210, n. 4466, p. 207-210, 1980.
- COLEY, A.A.; GAO, W.J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. S0278-5846, n. 17, p. 30658-30659, 2017.
- COOLS, A.R.; VAN ROSSUM, J.M. Caudate dopamine and stereotyped behaviour of cats. *Archiv. Int. Pharmacodyn.*, v. 187, p. 163-173, 1970.
- COSTA, E. L. N. *Avaliação morfofuncional do complexo hipocampal em ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014
- COSTA, R.M.; COHEN, D.; NICOLELIS, M.A. Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* v. 14, n. 13, p. 1124-1134, 2004.
- CURTIS, N.R. et al. Novel N1-(benzyl)Cinnamamide Derived NR2B Subtype-Selective NMDA Receptor Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 13, n. 4, p. 693-696, 2003.
- DALLAS, M. et al. Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci.*, v. 27, p. 3946-3955, 2007.
- DAMMANN, O.; LEVITON, A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr. Res.*, v. 42, n. 1, p. 1– 8, 1997.
- de HAAN, M. et al. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci.*, v. 9, n. 4, p. 350-358, 2006.

De HAAN, M. *Memory development following early medial temporal lobe injury*. In: Ghetti S, Bauer PJ, editors. *Origins and development of recollection*. New York: Oxford University Press; pp. 265–285, 2012.

DE PAULA, S. et al. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res.*, v. 65, n. 6, p. 631-635, 2009.

DEHNES, Y. et al. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci*, v. 18, p. 3606–3619, 1998.

DEL TONGO, C. et al. Parvalbumin-positive GABAergic interneurons are increased in the dorsal hippocampus of the dystrophic mdx mouse. *Acta Neuropathol.*, v.118, n. 6, p. 803-812, 2009.

DELCOUR, M. Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in adult rats with white matter injury following prenatal ischemia. *Brain Pathol.*, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2011.

DELCOUR, M. et al. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behav Brain Res.*, v. 15, n. 232(1), p. 233-44, 2012.

DERRICK, M. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci.*, v. 24, p. 24–34, 2004.

DESHMUKH, S.S.; KNIERIM, J.J. *Hippocampus*. Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci., v. 3, n. 2, p. 231-251, 2012.

DOETSCH, F.; GARCIA-VERDUGO J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and threedimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.*, v. 17, p. 5046–5061, 1997.

du PLESSIS, A.J.; JOHNSTON, M.V. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol.*, v. 24, n. 3, p.:627-654, 1997.

DUBROVSKAYA, N.M.; ZHURAVIN, I.A. Ontogenetic characteristics of behavior in rats subjected to hypoxia on day 14 or day 18 of embryogenesis. *Neurosci Behav Physiol.*, v. 40, n. 2, p. 231-8, 2009.

ELIASOF, S. et al. Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J Neurosci.* v.18, n. 2, p. 698-712, 1998.

ENGELBREGT, M.J. et al. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: comparison with puberty. *Bone*, v. 34, n. 1, p. 180-6, 2004.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, A. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats: Behavioral data. *J Behav Brain Res.* v. 31, n. 1, p.47-59, 1988.

FAIRMAN, W.A. et al. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, v. 375, p. 599–603, 1995.

FERNANDEZ, F. et al. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci.*, v. 10, n. 4, p 411-413, 2007.

FERRIERO, D.M. et al. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res.*, v. 38, n.6, p. 912-918, 1995.

FERRIERO, D.M. et al. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.*, v. 24, p.670–676, 1988.

FERRIERO, D.M. Neonatal brain injury. *N Engl J Med*, v. 351, n. 19, p. 1985-1895, 2004.

FILLOUX, F.; 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.

FOG, R.; PAKKENBERG, H. Behavioral effects of dopamine and p hydroxyamphetamine injected into corpus striatum of rats. *Exp. Neurol.*, v. 31, p. 75-86, 1971.

FREMEAU, R.T. Jr. et al. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 14488–14493, 2002.

FREMEAU, R.T. Jr. et al. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.*, v. 27, p. 98–103, 2004.

FRENCH, S.J.; HAILSTONE, J.C.; TOTTERDELL, S. Basolateral amygdala efferents to the ventral subiculum preferentially innervate pyramidal cell dendritic spines. *Brain Res* v. 981, n. 1-2, p. 160-167, 2003.

FRIDE, E. et al. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav.*, v. 37, n. 5, p.681-687, 1986.

FRISCH, C. et al. Stimulus complexity dependent memory impairment and changes in motor performance after deletion of the neuronal gap junction protein connexin36 in mice. *Behav. Brain Res.*, v. 157, p. 117– 185, 2005.

- FUNKE, L.; DAKOJI, S.; BRETT, D.S. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem.*, v. 74, p. 219-245, 2005.
- FURUKAWA, H. et al. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, v. 438, p. 185-192, 2005.
- FURUTA, A. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience*, v. 81, p. 1031–1042, 1997.
- FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. *Histochemical, biochemical and functional studies on central monoamine neurons after acute and chronic amphetamine administration*. In *Amphetamines and Related Compounds*. pp. 257-288, 1970.
- GADIAN, D.G. et al. Developmental amnesia associated with early hypoxic ischaemic injury. *Brain*, v.123, n. 3, p. 499-507, 2000.
- GAO, R.; PENZES, P. Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr Mol Med.*, v. 15, n. 2, p. 146-167, 2015.
- GASPARINI, C.F.; GRIFFITHS, L.R. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *Int J Biomed Sci.*, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2013.
- GATTO, C.L.; BROADIE, K. Genetic controls balancing excitatory and inhibitory synaptogenesis in neurodevelopmental disorder models. *Front Synaptic Neurosci.*, v. 2, p. 4, 2010.
- GILBERT, P.E.; KESNER, R.P. Memory for objects and their locations: the role of the hippocampus in retention of object– place associations. *Neurobiol. Learn. Mem* v. 81, p. 39– 45, 2004.
- GILMAN, S. et al. Rare De Novo Variants Associated with Autism Implicate a Large Functional Network of Genes Involved in Formation and Function of Synapses. *Neuron*, v. 70, p. 898-907, 2011.
- GLUCK, M.A.; MERCADO, E.; MYERS, C.E. *Learning and Memory From Brain to Behavior*. Worth Publishers New York, 642p., 2008.
- GOLAN, M.H. et al. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. *Neuropharmacology*, v. 57, n. 5-6, p. 511-522, 2009.
- GOLAN, H.; HULEIHEL, M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci.*, v. 9, n. 4, p. 338-349, 2006.
- GORDON, K.E. et al. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke*, v. 22, p.928–932, 1991.

- GOULD, E.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S. The hippocampal formation: Morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroend.*, v. 16, p. 67–84, 1991.
- GRAS, C. et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonin-ergic neurons. *J Neurosci.*, v. 22, p. 5442–5451, 2002.
- GREENGARD, P. et al. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science*, v. 259, p. 780 – 784, 1993.
- GROSS, J. et al. 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, p.275-281, 2005.
- GUNN, A. et al. The neuroprotective actions of a calcium channel antagonist, flunarizine, in the infant rat. *Pediatr Res*, v. 25, p. 573–576, 1989.
- GUNN, A.J.; BENNET, L. Fetal hypoxia insults and patterns of brain injury: insights from animal models. *ClinPerinatol.*, v. 36, n. 3, p. 579-593, 2009.
- GUTIÉRREZ, R. The dual glutamatergic-GABAergic phenotype of hippocampal granule cells. *Trends Neurosci.*, v. 28, n. 6, p. 297-303, 2005.
- HAGBERG, H. et al. Hypoxia/ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol Neonate*, v. 66, p. 205–213, 1994.
- HAMPTON, R.R.; SCHWARTZ, B.L. Episodic memory in nonhumans: what, and where, is when? *Curr. Opin. Neurobiol.* v. 14, p. 192– 197, 2004.
- HANTEN, G. et al. Childhood head injury and metacognitive processes in language and memory. *Dev Neuropsychol.* v. 25, p. 85–106, 2004.
- HARTLEY, I. et al. Long-lasting changes in DNA methylation following short-term hypoxic exposure in primary hippocampal neuronal cultures. *PLoS One*, v. 8, n. 10, 2013.
- HASHIMOTO, A. et al. Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem*, v. 60, n. 2, p. 783–786, 1993.
- HAWKINS, R. A. The blood-brain barrier and glutamate. *Am J Clin Nutr*, v. 90, n. 3, p. 867-874, 2009.
- HAYASHI, M. et al. Differentiation- associated Na-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J Biol Chem.*, v. 276, p. 43400–43406, 2001.
- HEBB, D.O. *The Organization of Behavior*. John Wiley & Sons: New York, 1949.

- HEDTJARN, M.; MALLARD, C.; HAGBERG, H. Inflammatory gene profiling in the developing mouse brain after hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*, v.24, p. 1333–1351, 2004.
- HENRY, C. et al. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol*, v. 6, p. 341–345, 1994.
- HERZOG, E. et al. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci.*, v. 21, p. 181, 2001.
- HIGGINS, R. D. et al. Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: an executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop. *J Pediatr.*, v. 159, n. 5, p. 851-858, 2011.
- HIPÓLITO-REIS, J. et al. Prolonged protein deprivation differentially affects calretinin- and parvalbumin-containing interneurons in the hippocampal dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett.*, v. 555, p. 154-158, 2013.
- HOLMES, G.L.; KHAZIPOV, R.; BEN-ARI, Y. New concepts in neonatal seizures. *Neuroreport*, v. 13, p. A3–A8, 2002.
- HUO, X. L. et al. Efficacy of lovastatin on learning and memory deficits caused by chronic intermittent hypoxia-hypercapnia: through regulation of NR2B-containing NMDA receptor-ERK pathway. *PloS one*, v. 9, n. 4, 2014.
- IINO, M. et al. Glia-synapse interaction through Ca²⁺-permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*, v. 292, p. 926–929, 2001.
- ISAACSON, J.S.; SCANZIANI, M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, v. 72, n. 2, p. 231-243, 2011.
- ISHIKAWA, A.; NAKAMURA, S.J. Ventral hippocampal neurons project axons simultaneously to the medial prefrontal cortex and amygdala in the rat. *Neurophysiol*, v. 96, n. 4, p. 2134-2138, 2006.
- ITOH, T. et al. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem.*, v. 81, p. 390–402, 2002.
- JANSEN, E.M.; LOW, W.C. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res.*, v. 78, n. 2, p. 189-194, 1996.
- JANTZIE, L.L. et al. Erythropoietin attenuates loss of potassium chloride co-transporters following prenatal brain injury. *Mol Cell Neurosci.*, v. 61, p. 152-162, 2014.
- JANTZIE, L.L. et al. Prenatal Hypoxia-Ischemia Induces Abnormalities in CA3 Microstructure, Potassium Chloride Co-Transporter 2 Expression and Inhibitory Tone. *Front Cell Neurosci.*, v.9, p. 347, 2015.

JAVITT, D.C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*, v. 9, n. 11, p. 984–997, 2004.

JENSEN, A.B.; RAFF, M.C. Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture. *Dev Biol.* v. 188, p. 267–279, 1997.

JO, S. et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med.*, v. 20, n. 8, p. 886-996, 2014.

JOGI, A. et al. Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 99, n.10, p. 7021-7026, 2002.

JOHNSTON M.V. et al. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.*, v. 10, n. 4, p. 372-382, 2011.

JOHNSTON, M.V. et al. Plasticity and injury in the developing brain. *Brain Dev.*, v. 31, p.1–10, 2009.

KAHN, I.; SHOHAMY, D. Intrinsic connectivity between the hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in humans. *Hippocampus* v. 23, n. 3, p. 187-192, 2013.

KANAI, Y.; HEDIER, M.A. Primary structure and functional characterization of a high affinity glutamate transporter. *Nature*, v. 360, p. 467–471, 1992.

KARLSSON, M.P.; FRANK, L.M. Network Dynamics Underlying the Formation of Sparse, Informative Representations in the Hippocampus. *J Neurosci*, v. 28, p. 14271–14281, 2008.

KAVANAUGH, B. et al. 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.

KELLEY, A.E. *Measurement of rodent stereotyped behavior*. Curr Protoc Neurosci., Chapter 8, Unit 8.8, 2001.

KINNEY, H.C.; BACK, S.A. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin. Pediatr. Neurol.*, v. 5, n.3, p.180-189, 1998.

KLEINDIENST, A. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, v. 22, p. 645–655, 2005.

KNIGHT, R. T.; NAKADA, T. Cortico-limbic circuits and novelty: a review of EEG and blood flow data. *Reviews in the Neuroscience*, v. 9 , p. 57-70, 1998.

KNIGHT, R.T. Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature*, v. 383, p. 256-259, 1996.

- KOIBUCHI, N.; CHIN, W.W. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab.*, v. 11, n. 4, p.123-128, 2000.
- KUBAN, K.; LEVITON, A. Cerebral palsy. *N Engl J Med.* v. 20, n. 330. p.188-195, 1994.
- LAI, M.C.; YANG, S.N. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol.*, v. n. p. 2011.
- LARKIN et al. Hippocampal output area CA1 broadcasts a generalized novelty signal during an object-place recognition task. *Hippocampus*, v. 24, n. 7, p. 773-783, 2014.
- LEE, P. et al. Excessive production of nitric oxide induces the neuronal cell death in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice culture. *Neurosci Lett.*, v. 25, n. 1, p. 33-36, 2003.
- LEHRE K. P. et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, v. 15, p.1835–1853, 1995.
- LE MEUR, K. et al. GABA release by hippocampal astrocytes. *Front Comput Neurosci.*, v. 6, n. 59, p. 1-10, 2012
- LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.*, v. 36, p. 1-17, 1960.
- LIMA, F.F. et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone projections to the septo-hippocampal complex in the rat. *J Chem Neuroanat* v. 47, p.1-14, 2013.
- LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med.*, v. 330, p. 613-622, 1994.
- LISMAN, J.E.; OTMAKHOVA, N.A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus*, v.11, n. 5, p. 551-568, 2001.
- LIU, F.; McCULLOUGH, L. D. Inflammatory responses in hypoxic ischemic Encephalopathy. *ActaPharmacologicaSinica*, v. 34, p. 1121–1130, 2013.
- LLINAS, R. R. et al. Regulation by synapsin I and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II of transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol.*, v. 436, p. 257 - 282, 1991.
- MAÑERU, C. et al. J. Neuropsychological longterm sequelae of perinatal asphyxia. *Brain Inj.*, v.15, n. 12, p.1029-1039, 2001.
- 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. 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.

MARK, K.S. et al. Nitric oxide mediates hypoxia-induced changes in paracellular permeability of cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 286, n. 1, p. 174-180, 2004.

MARTINEZ-BIARGE, M. et al. Perinatal morbidity and risk of hypoxic-ischemic encephalopathy associated with intrapartum sentinel events. *Am J. Obstet Gynecol.*, v.206e, p.141–147, 2012.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K.P.; NOREMBERG, M.D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*, v. 195, n. 4248, p. 1356-1358, 1977.

MARTÍNEZ-MORENO M. et al. Diazoxide enhances excitotoxicity-induced neurogenesis and attenuates neurodegeneration in the rat non-neurogenic hippocampus. *Neuroscience*, v. 333, p. 229-243, 2016.

MCDONALD, J. W.; JOHNSTON, M. V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev.*, v. 15, p, 41-70, 1990.

MCINTYRE, S. et al. Antecedents of cerebral palsy and perinatal death in term and late preterm singletons. *Obstet Gynecol.*, v. 122, n. 4, p. 869-877, 2013.

MCKENNA, M.C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res.*, v. 85, n. 15, p. 3347-3358, 2007.

MCCLENDON, E. et al. Transient Hypoxemia Chronically Disrupts Maturation of Preterm Fetal Ovine Subplate Neuron Arborization and Activity. *J Neurosci.*, v. 37, n. 49, p. 11912-11929, 2017.

MILNER, B.; CORKIN, S.; TEUBER, HL. Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14 year follow-up study of H.M. *Neuropsychologia*, v. 6, p. 215–234, 1968.

MIYAZAKI, T. et al. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.*, v. 17, p. 2563-2572, 2003.

MORADI, A.R. et al. Specificity of episodic and semantic aspects of autobiographical memory in relation to symptoms of posttraumatic stress disorder (PTSD) *Acta Psychol*, v. 127, p. 645–653, 2008.

MORIYAMA, Y.; YAMAMOTO, A. Glutamatergic Chemical Transmission: Look! Here, There, and Anywhere. *The Journal of Biochemistry*, v. 135, n. 2, p. 155–163, 2004.

MUMBY, D.G. et al. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. *Learn Mem.*, v. 9, n. 2, p. 49-57, 2002.

NADEL, L. Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav.*, v. 2, n. 3, p. 156-166, 2003.

NAKAJIMA, W. et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.*, v. 20, n. 21, p.7994-8004, 2000.

NANDURI, J. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 109, n. 7, p. 2515-2520, 2012.

NAVARRO, H.A. et al. Prenatal exposure to nicotine via maternal infusions: effects on development of catecholamine systems. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 244, n. 3, p. 940-944, 1988.

NELSON, K. et al. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr. Res.*, v. 53, n.4, p. 600–607, 2003.

NIKAM, S.S.; MELTZER, L.T. NR2B Selective NMDA Receptor Antagonists. *Curr. Pharm. Design*, v. 8, n. 10, p. 845-855, 2002.

NOSARTI, C.; FROUDIST-WALSH, S. Alterations in development of hippocampal and cortical memory mechanisms following very preterm birth. *Dev Med Child Neurol* v. 58, n. Suppl 4, p. 35-45, 2016.

NUÑEZ, J.L.; ALT, J.J.; MCCARTHY, MM A new model for prenatal brain damage. I. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol.*, v. 181, n. 2, p. 258-269, 2003a.

NUÑEZ, J.L.; ALT, J.J.; MCCARTHY, MM. A novel model for prenatal brain damage. II. Long-term deficits in hippocampal cell number and hippocampal-dependent behavior following neonatal GABAA receptor activation. *Exp Neurol.*, v. 181, n. 2, p. 270-280, 2003b.

NÜSKEN, K.D. et al. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology*, v. 149, n. 3, p. 1056-1063, 2007.

OCHI, S. et al. Transient presence of GABA in astrocytes of the developing optic nerve. *Glia*, v. 9, n. 3, p. 188-198, 1993.

O'DONNELL, K.J.; MEANEY, M.J. Fetal Origins of Mental Health: The Developmental Origins of Health and Disease Hypothesis. *Am J Psychiatry.*, v. 174, n. 4, p. 319-328, 2017.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*, Oxford University Press, 1978.

- ORELLANA, J. A. et al. Modulation of brain hemichannels and gap junction channels by pro-inflammatory agents and their possible role in neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 11, p. 369–399, 2009.
- 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.
- PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: Function and pharmacology. *Curr. Opinion Pharm.*, v. 7, n. 1, p. 39-47, 2007.
- PAOLO, T. The high-risk newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, v. 25, v. S1, p. 6-7, 2012.
- PAPPAS, A. Hypothermia Extended Follow-up Subcommittee of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network. Cognitive outcomes after neonatal encephalopathy. *Pediatrics.*, v. 135, n. 3, p. 624-634, 2015.
- PARDO, B. et al. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *J Cereb Blood Flow Metab.*, v. 31, n. 1, p. 90-101, 2011.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; BENNETT, M.V.; ZUKIN, R.S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 88, n. 10, p. 4157-4161, 1991.
- PEREIRA, L.O. et al. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem.*, v. 87, n. 1, p.101-108, 2007.
- PERLMAN, J.M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clin Ther.*, v. 28, n. 9, p. 1353-1365, 2006.
- PINAL, C.S.; TOBIN, A.J. Uniqueness and redundancy in GABA production. *Perspect Dev Neurobiol*, v. 5, n. 2-3, p.109-118, 1998.
- PINES, G. et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, v. 360, p. 464–467, 1992.
- PINTO, C.R.A. *Avaliação da distribuição de receptores NMDA-2B e da astrogliã no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. 74 f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.
- PRANGE, O. A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 38, p. 13915-13920, 2004.
- PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem.*, v. 279, n. 11, p. 9673-9676, 2004.

PUNDIK, S. et al. Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient hypoxia/ischemia. *Metabolic Brain Dis.*, v. 21, n. 4, p. 309-317, 2006.

PURVES, D. et al. *Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

QU, Y. et al. Neurons derived from embryonic stem (ES) cells resemble normal neurons in their vulnerability to excitotoxic death. *Exp Neurol.*, v. 184, n. 1, p. 326–336, 2003.

RAGEL, B. T. et al. Identification of hypoxia-induced genes in a malignant glioma cell line (U-251) by cDNA microarray analysis. *Neurosurg Rev.*, v. 30, n. 3, p. 181-187, 2007.

RAGLAND, J.D. et al. Levels-of-processing effect on word recognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, v. 54, p. 1154–1161, 2003.

RAMON Y CAJAL, S. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. 1ª ed. Imprenta y Librería de Nicolás Moya, 884 p., 1899.

RAUEN, T.; WIESSNER, M. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem Int.*, v. 37, n. 2-3, p. 179-189, 2000.

REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J DevNeurosci.*, v. 29, n. 6, p. 551-563, 2011.

RICCERI, L.; MOLES, A.; CRAWLEY, J. Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: relevant social behavior patterns across the life span. *Behav Brain Res*, v.176, n. 1, p. 40-52, 2007.

RICE, D.; BARONE, S. Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect*, v.108, n. Suppl 3, p. 511-533, 2000.

RICE, J.E. 3rd; VANNUCCI, R.C.; BRIERLEY, J.B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.*, v. 9, n.2, p.131-141, 1981.

RICHARDSON, H.N. et al. Exposure to repetitive versus varied stress during prenatal development generates two distinct anxiogenic and neuroendocrine profiles in adulthood. *Endocrinology*, v. 147, p. 2506–2517, 2006.

ROBERTSON, C.M. e PERLMAN, M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Paediatr Child Health*, v. 11, n. 5, p. 278–282, 2006.

ROBINSON, M.B.; JACKSON, J.G. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int.*, v. 98, p. 56-71, 2016.

ROBINSON, S. et al. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol Dis.*, v. 18, n.3, p. 568-581, 2005.

ROHDE, W. et al. Acute effects of maternal stress on fetal blood catecholamines and hypothalamic LH-RH content. *Exp Clin Endocrinol.*, v. 82, p. 268–274, 1983.

ROJAS, J.J. et al. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Exp Neurol.*, v. 241, p. 25-33, 2013.

ROMIJN, H.J. et al. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. The proportion of GABA immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res.*, v. 592, n.17, 1992.

ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, v. 403, n. 6767, p. 316-321, 2000.

ROTHSTEIN, J.D. et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*, v. 13, p. 713–725, 1994.

SANTIAGO, H.A. et al. Allometric relationships among body mass, MUZZLE-tail length, and tibia length during the growth of Wistar rats. *Acta Cir Bras.*, v. 30, n. 11, p. 743-748. 2015.

SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C.; MCEWEN, B.S. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci USA.*, v. 81, n. 19, p. 6174-6177, 1984.

SAVIGNON T. et al. Prenatal hypoxic-ischemic insult changes the distribution and number of NADPH-diaphorase cells in the cerebellum. *PLoSOne*, v. 7, n. 4, 2012.

SAVIGNON, T. *Inibição do receptor NMDA em um modelo de hipóxia-isquemia sistêmica perinatal: avaliação morfofuncional do cerebelo*. 2013. 87p. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 1, p. 80-89, 2005.

SCHOUSBOE, A.; BAK, L.K.; WAAGEPETERSEN, H.S. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front. Endocrinol.*, 2013.

SCHULTZ, C.; ENGELHARDT, M. Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci.*, v. 34, p. 6-17, 2014.

SCOVILLE, W.B. e MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.*, v. 20, p. 11–21, 1957.

SHALAK, L.; PERLMAN, J.M. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev.*, v. 80, p.125–141, 2004.

SILVERSTEIN, F.S.; JOHNSTON, M.V. Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol.*, v.15, p.342–347, 1984.

SILVERSTEIN, F.S.; 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.

SIMBRUNER, G. et al. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo.neuro.network RCT. *Pediatrics.*, v. 126, n. 4, p. e771-778, 2010.

SKUTELLA, T.; NITSCH, R. New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci.*, v. 24, n. 2, p. 107-113, 2001.

SLOMIANKA, L. et al. Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination. *Brain Struct Funct*, v. 216, n. 4, p. 301–317, 2011.

SMITH, J.W. et al. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, p. 227–244, 2004.

SOGHOMONIAN, J.J.; MARTIN, D.L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *TIPS*, v. 19, 1998.

SOLLNER, T. et al. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell*, v. 75, p. 409-418, 1993.

SOUSSI, R. et al. Reorganization of supramammillary-hippocampal pathways in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: evidence for axon terminal sprouting. *Brain Struct Funct*, v. 220, n. 4, p. 2449-2468, 2015.

SPINILLO, A.; et al. Obstetric risk factors for periventricular leukomalacia among preterm infants. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, v. 105, p. 865–871, 1998.

STORCK, T. et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 89, p. 10955–10959, 1992.

SUSZKIW, J.B. *Synaptic Transmission*. Cell Physiology Source Book Fourth Edition, p. 563–578, 2012.

SZABADICS, J. et al. Granule cells in the CA3 area. *J Neurosci.*, v. 16, n. 30, p. 8296-8307, 2010.

TAKAHASHI, L.K.; TURNER, J.G.; KALIN, N.H. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology*, v. 23, p. 571–581, 1998.

TAKAMORI, S. et al. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J Neurosci* p. 21, v. 182, 2001.

TAKESIAN, A.E.; HENSCH, T.K. Balancing plasticity/stability across brain development. *Prog Brain Res.*, v. 207, p. 3-34, 2013.

TAN, S. et al. Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J NeuropatholExp Neurol.*, v. 57, n. 6, p. 544-553, 1998.

TANAKA, M. et al. Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport.*, v. 5, n. 16, p. 2049-2052, 1994.

TEKKOK, S.; 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.

TERZIDOU, V.; BENNETT, P.; Maternal risk factors for fetal and neonatal brain damage. *Biol. Neonate*, v. 79, p. 157–162, 2001.

TORGNER, I.; KVAMME, E. Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol.*, v. 12, n. 1, p. 11-17, 1990.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *PharmacolVer.*,v. 62, p. 405–496, 2010.

TRETTNER, V. et al. Deficits in spatial memory correlate with modified {gamma}-aminobutyric acid type A receptor tyrosine phosphorylation in the hippocampus. *Proc Natl AcadSci USA.*, v. 106, n. 47, p. 20039-20044, 2009.

TROFINMOVA, L.K. et al. Postnatal behavioral consequences of antenatal intermittent hypoxia experienced during early organogenesis in mature rats. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, v. 1, p.54-59, 2010.

UNO, H. et al. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.*, v. 53, n. 2, p. 157-167, 1990.

VALLEE, M. et al. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur J Neurosci.*, v. 11, p. 2906–2916, 1999.

VAN HANDEL, M. et al. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *Eur J Pediatr.*, v. 166, n. 7, p. 645-654, 2007.

VANNUCCI, R.C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol.*, v. 17, n. 3, p. 113-120, 2000.

VASTERLING, J.J.; VERFAELLIE, M.; SULLIVAN, K.D. Mild traumatic brain injury and posttraumatic stress disorder in returning veterans: Perspectives from cognitive neuroscience. *Clin Psychol Rev.* v. 29, p. 674–864, 2009.

VENEROSI, A. et al. Acute global anoxia during C-section birth affects dopamine-mediated behavioural responses and reactivity to stress. *Behav Brain Res.*, v. 154, n. 1, p. 155-164, 2004.

VENEROSI, A. et al. C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats. *Behav Brain Res.*, v. 168, n. 1, p. 56-63, 2006.

VERTES, R.P. Major diencephalic inputs to the hippocampus: supramammillary nucleus and nucleus reuniens. Circuitry and function. *Prog Brain Res*, v. 219, p.121-144, 2015.

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

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

VOLPE, J. *Neurology of the Newborn*. 5. Philadelphia: Saunders; 2008.

VOLPE, J.J. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.*, v. 72, n. 2, p. 156-166, 2012.

WAAGEPETERSEN, H.S.; SONNEWALD, U.; SCHOUSBOE, A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *J Neurochem.*, v.73, n. 4, p.1335-1342, 1999.

WAITES, C.; ANN, M.C.; CRAIG, C.G. Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 28, p. 251–274, 2005.

WALLS, A.B. et al. The Glutamine–Glutamate/GABA Cycle: Function, Regional Differences in Glutamate and GABA Production and Effects of Interference with GABA Metabolism. *Neurochem Res*, v. 40, n. 2, p.402-409, 2015.

WARD, I.L.; WEISZ, J. Differential effects of maternal stress on circulating levels of corticosterone, progesterone, and testosterone in male and female rat fetuses and their mothers. *Endocrinology*, v. 114, p. 1635–1644, 1984.

WEINSTOCK, M.; FRIDE, E.; HERTZBERG, R. Prenatal stress effects on functional development of the offspring. *Prog Brain Res.*, v. 73, p. 319–331, 1988.

WEITZDOERFER, R.; POLLAK, A.; LUBEC, B. Perinatal asphyxia in the rat has lifelong effects on morphology, cognitive functions, and behavior. *Semin Perinatol.*, v. 28, n. 4, p. 249-256, 2004

WHALLEY, M.G. et al. Incidental retrieval of emotional contexts in post-traumatic stress disorder and depression: an fMRI study. *Brain Cogn.* v. 69, p.98–107, 2009.

WILSON, C.A.; VAZDARJANOVA, A.; TERRY, A.V. Jr. Exposure to variable prenatal stress in rats: effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction. *Behav Brain Res.*, v. 238, p. 279-288, 2013.

WITTER, M.P.; AMARAL, D.G. *Hippocampal Formation*. The Rat Nervous System 3ed, p. 635–704, 2004.

WU Z. et al. Tonic inhibition in dentate gyrus impairs long-term potentiation and memory in an Alzheimer's [corrected] disease model. *Nat Commun.*, v. 5, p. 4159, 2014.

WU, S.Z. et al. Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta-peptide. *J Neuroinflammation*, v. 1, n. 1, p. 508, 2004.

WU, Y.W.; COLFORD, J.M. Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA*, v. 284, n.11, p.1417-1424, 2000.

YAN, B.C. et al. Postsynaptic density protein (PSD)-95 expression is markedly decreased in the hippocampal CA1 region after experimental ischemia-reperfusion injury. *J Neurol Sci.* v. 330, p.1-2, 2013.

YATOMI, Y. et al. Chronic brain ischemia induces the expression of glial glutamate transporter EAAT2 in subcortical white matter. *Neuroscience*, v. 244, p. 113-121, 2013.

YEH, T.H. et al. Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiol Dis.*, v. 18, n. 3, p. 476-483, 2005.

YOON, B.E.; LEE, C.J. GABA as a rising gliotransmitter. *Front Neural Circuits*, v. 8, p. 141, 2014.

YU, W.; KROOK-MAGNUSON, E. Cognitive Collaborations: Bidirectional Functional Connectivity Between the Cerebellum and the Hippocampus. *Front Syst Neurosci.*, v.22, p. 9-177, 2015.

ZERANGUE, N.; KAVANAUGH, M.P. Interaction of L-cysteine with a human excitatory amino acid transporter. *J Physiol.*, v. 493, n. 2, p. 419-423, 1996.

ZHOU, D. et al. Gene expression in mouse brain following chronic hypoxia: role of sarcospan in glial cell death. *Physiol Genomics*, v. 32, p. 370-379, 2008.

ANEXO – Artigo científico aceito para publicação

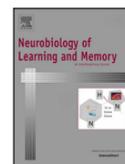
Neurobiology of Learning and Memory xxx (2018) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: www.elsevier.com



GABA function may be related to the impairment of learning and memory caused by systemic prenatal hypoxia-ischemia

Marta Cristina Cunha-Rodrigues, Cassiana Thayara do Nascimento Balduci, Frank Tenório, Penha Cristina Barradas*

Depto. Farmacologia e Psicobiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Prenatal insult
Rats
Hippocampus
NORT
GAD
Development

ABSTRACT

Intrauterine adverse conditions may be responsible for long-lasting damages which impact health even during adult phase. Hypoxic-ischemic (HI) events are a relevant cause of newborn mortality and the principal factor leading to permanent brain lesions. Using a model in which the ovarian and uterine flux of a pregnant rat is obstructed for 45 min we have described oligodendrocyte death, astrogliosis and neuronal loss. In this work we investigated hippocampal neuronal population and performed a functional evaluation of memory and learning of young rats that had been affected by prenatal HI. Anesthetized Wistar rats on the 18th gestation day had the uterine horns exposed and the ovarian and uterine arteries clamped for 45 min (HI group). Sham-operated rats (SH group) had the horns exposed but no arteries were clamped. We measured the levels of different proteins related to excitatory/inhibitory transmission in the hippocampi of young pups (P45). Histological evaluation was also performed in order to characterize hippocampal neuronal population. Rats from both groups were tested through Novel Object Recognition Test (NORT) using two inter-trial intervals: 5 min and 8 h. Here we show a loss in the total number of hippocampal neurons although the immunostaining of parvalbumin and levels of GAD enzyme were increased in HI group. Functional assessment indicated a marked difference concerning HI learning and memory abilities. Our results reflect permanent damages concerning GABA function which may disturb neurotransmitter homeostasis leading to the observed deficits in learning and memory.

1. Introduction

CNS development comprises a set of coordinated events that lead to normal function during adult life. Pre- or perinatal insults may disturb this process and are proven to be responsible for a series of diseases in adult life, such as endocrine and metabolic abnormalities, type 2 diabetes mellitus, hypertension and ischemic heart disease (Chen & Zhang, 2011; Marín-Padilla, 1997, 1999).

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) affects 1–3 per 1000 full term newborns (Lai & Yang, 2011), of which 15–20% will die in post-natal life characterizing HIE as one of the most important causes of neonatal mortality (Gonzalez & Miller, 2006; Li, Gonzalez, & Zhang, 2012). In addition, 25% of the survivors develop permanent neurophysiological sequelae, such as cognitive delay, motor deficits, hyperactivity, epilepsy and cerebral palsy (Chen, Wu, Kao, Su, Chen, 2009; Vannucci, 2000). Cognitive impairments, although strongly associated with neuromotor deficits, may be verified in early infants who had suffered HIE, with or without motor disabilities (van Handel, Swaab, de Vries, & Jongmans, 2007). The deficits continue at school age, as these chil-

dren present subnormal IQ (Pappas et al., 2015) and learning delays (Robertson & Perlman, 2006). Furthermore, it persists along adolescence, with severe impairments of episodic memory (Gadian et al., 2000) and poor performance in verbal and visual memory and executive functions (Mañeru, Junqué, Botet, Tallada, & Guardia, 2001).

A way by which hypoxia-ischemia (HI) affects memory and learning process may be directly mediated by an imbalance of excitatory-inhibitory function in the hippocampus, one of the brain regions responsible for memory consolidation and associated with high levels of plasticity since early life until adulthood (Gu, Janoschka, & Ge, 2013; Murty, Calabro, & Luna, 2016). Hippocampal neural networks are able to regulate their activity by modulating neurotransmitter release, post-synaptic strength and membrane intrinsic excitability (BateupDeneffrio, Johnson, Saulnier, & Sabatini, 2013). Disrupted homeostasis elicited by HI or other insults may therefore contribute to cognitive disorders (Ramocki & Zoghbi, 2008; Rubenstein & Merzenic, 2003).

There are several models of HIE (Golan & Huleiel, 2006) designed to parallel human developmental stage when HI occurs with that of animal models.

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CA, Ammon's horn; DG, dentate gyrus; EAAT, excitatory amino acid transporter; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD, glutamic acid decarboxylase; HI, hypoxia-ischemia; HIE, hypoxic-ischemic encephalopathy; HRP, horseradish peroxidase; IPSC, inhibitory postsynaptic current; MAO-B, monoamine oxidase-B; NADPH-d, NADPH-diaphorase; NMDA, N-methyl-D-aspartic acid; NORT, novel object recognition test; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PCs, principal cells; PFA, paraformaldehyde; TBS, tris-buffered saline.

* Corresponding author at: Depto. Farmacologia e Psicobiologia, Instituto de Biologia – UERJ, Av. 28 de setembro, 87 fds 5º andar, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Email address: penhabarradas@gmail.com (P.C. Barradas)

<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.004>