



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

Gustavo Diniz de Mesquita Taveira

**Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da
retina de ratos: alterações morfológicas e funcionais**

Rio de Janeiro
2018

Gustavo Diniz de Mesquita Taveira

**Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da retina de ratos:
alterações morfológicas e funcionais**



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

Orientador: Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe

Coorientadora: Prof^a Dr^a Penha Cristina Barradas Daltro Santos

Rio de Janeiro

2018

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

T232 Taveira, Gustavo de Mesquita Diniz.
Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da retina de ratos: alterações morfológicas e funcionais / Gustavo de Mesquita Diniz Taveira. – 2018.
81 f.
Orientador: Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe
Coorientadora: Prof^a Dr^a Penha Cristina Barradas Daltro Santos
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.
1. Sangue – Circulação - Teses. 2. Distúrbios de desenvolvimento neurológico – Teses. 3. Retina – Teses. 4. Hipóxia fetal. 5. Células ganglionares da retina. I. Krahe, Thomas Eichenberg. II. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB7/5302

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

Assinatura

Data

Gustavo Diniz de Mesquita Taveira

**Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da retina de ratos:
alterações morfológicas e funcionais**

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

Apresentada em 28 de fevereiro de 2018.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Coorientadora: Prof.^a. Dr.^a. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Adriana da Cunha Faria Melibeu

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Giestal de Araujo

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dr.^a Yael de Abreu Villaça

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Prof. Frank Tenorio, que, mesmo de supetão, idealizou, confiou e abriu as portas para eu poder realizar esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha mãe, meu exemplo, que, mesmo não sendo o seu sonho, torce de longe e vibra intimamente com minhas vitórias.

À minha avó, Maria Izabel Lessa, por sempre acompanhar meus passos, apesar de não entender nada do que faço no laboratório. Te amo muito!

À minha família, em especial as minhas primas, Raiza e Daniela Diniz. Que fazem os papéis de irmã e mãe, respectivamente. Vocês são tudo pra mim!

Ao professor Frank Tenorio, meu eterno “desorientador”.

Ao meu orientador, Thomas Krahe, por trilhar esse caminho junto a mim, confiando e me ensinando sempre. Juntamente, à minha co-orientadora, Penha Barradas. Apesar de sempre ter sido seu “meio aluno”, espero sempre tê-la completamente ao meu lado.

À Lara Fonseca. O que seriam dos meus experimentos sem você? Sua vontade de aprender e persistência vão te levar a lugares altos. Obrigado por me ensinar a confiar em mim! Novas viagens virão!

À grande amiga Dryelle Rodrigues, que luta até o fim para conquistar seus sonhos. Obrigado por me apoiar sempre. Nossas conversas calorosas ainda vingam.

Aos Neurolindos, que são (somos) o futuro da Ciência no Brasil!

À Equipe de Anos Finais na Secretaria Municipal de Educação de Mangaratiba, vocês foram minha bússola no universo da Educação. Aprendo cada dia mais e mais.

Aos amigos, Letícia Nunes, Juliano Xavier e, apesar de não morar mais com a gente, Leidiane Cavalcante, por abrirem espaço pra eu entrar na casa e no coração.

A toda e qualquer pessoa que acredite e confie em mim, seja como professor, pesquisador ou amigo.

Se podes olhar, vê. Se podes ver, repara.

Livro dos Conselhos (in: Ensaio Sobre a Cegueira -
José Saramago)

RESUMO

TAVEIRA, Gustavo de Mesquita Diniz. *Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da retina de ratos: alterações morfológicas e funcionais*. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A hipóxia-isquemia (HI) pré-natal é uma das principais causas de comprometimento do desenvolvimento neurológico no recém-nascido e está associada à paralisia cerebral, problemas de atenção, hiperatividade, epilepsia e alterações sensoriais, incluindo problemas no processamento visual. Assim, a investigação dos efeitos da HI pré-natal no desenvolvimento da retina oferece um grande potencial para elucidar mecanismos relacionados aos efeitos da HI durante a gravidez. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da HI sistêmica pré-natal nas células ganglionares da retina (CGRs) e na função visual de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal. Especificamente, avaliamos o impacto da HI pré-natal no número de CGRs e nas propriedades funcionais das vias formadoras e não-formadoras de imagem. Ao décimo oitavo dia de gestação (E18), ratas grávidas tiveram seus cornos uterinos expostos e durante 45 minutos o fluxo sanguíneo uterino e ovariano obstruídos pelo clampeamento das artérias (grupo HI). Os animais do grupo controle foram obtidos a partir de fêmeas grávidas submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto o clampeamento das artérias (grupo SH). O processamento histológico (hematoxilina e eosina, HE) e imunohistoquímico (Brn3a) das retinas dos animais HI e SH foi feito no segundo, nono, vigésimo terceiro e trigésimo dias pós-natais. Já a avaliação das propriedades funcionais da visão foi feita apenas no trigésimo dia pós-natal através da análise do reflexo pupilar (via não-formadora de imagem) e do teste de aversão ao precipício (via formadora de imagem). Por fim, foi feita uma comparação qualitativa das projeções das CGRs entre animais HI e SH através de marcação axonal anterógrada com fluorescência. Os animais do grupo HI apresentaram uma menor evolução no ganho de massa corporal comparados aos animais do grupo SH e, curiosamente, a abertura dos olhos da maioria dos animais HI foi precoce em relação aos SH. Com relação à avaliação do número de CGRs, embora não tenha sido observada diferença no número de células na camada ganglionar entre os grupos HI e SH para retinas coradas com HE, a quantificação do número de CGRs marcadas por Brn3a evidenciou uma redução significativa no número de CGRs dos animais HI na maioria das idades analisadas. Esse último resultado pode explicar a redução da espessura do nervo óptico e a menor densidade do número de projeções retinianas no núcleo geniculado dorsal do animal HI em relação ao animal SH observada no trigésimo dia pós-natal. A avaliação do reflexo pupilar revelou que os animais HI não conseguiram sustentar a constrição pupilar sob iluminação contínua. Ademais, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais com relação à constrição do músculo ciliar induzida farmacologicamente. No teste de aversão ao precipício os ratos HI demonstraram preferência para o lado fundo (déficit de percepção de profundidade), contrário ao SH, que desceu, em sua maioria, para o lado raso (percepção de profundidade normal). Em conjunto, os nossos resultados demonstram que a HI transitória pré-natal provoca perda no número de CGRs e sugerem que tal perda pode estar relacionada a alterações na função visual dos animais.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia transitória pré-natal. Retina. Células ganglionares da retina. Sistema visual não-formador de imagem. Sistema visual formador de imagem.

ABSTRACT

TAVEIRA, Gustavo de Mesquita Diniz. Prenatal transient hypoxia-ischemia and rats retina development: morphological and functional alterations. 2018. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Prenatal hypoxia-ischemia (HI) is one of the main causes of neurodevelopmental impairment in the newborn and is associated with cerebral palsy, attention problems, hyperactivity, epilepsy and sensory alterations, including visual processing problems. Thus, the investigation of the effects of prenatal HI on retinal development offers great potential to elucidate mechanisms related to the effects of HI during pregnancy. The objective of this study was to evaluate the effects of prenatal systemic HI on retinal ganglion cells (RGCs) and visual function of Wistar rats during postnatal development. Specifically, we evaluated the impact of prenatal HI on the number of RGCs and on the functional properties of the imaging and non-forming pathways. At the eighteenth day of gestation (E18), pregnant rats had their uterine horns exposed and during 45 minutes and the uterine and ovarian blood flow obstructed by artery clamping (HI group). The animals of the control group were obtained from pregnant females submitted to the same surgical procedure, except for the clamping of the arteries (SH group). The histological (hematoxylin and eosin, HE) and immunohistochemical (Brn3a) processing of HI and SH animal retinas were done on the second, ninth, twenty-third and thirtieth postnatal days. The evaluation of the functional properties of vision was made only on the 30th postnatal day through analysis of the pupillary reflex (non-image forming path) and the visual cliff (image forming pathway) test. Finally, a qualitative comparison of the RGCs projections between HI and SH animals was made by anterograde axonal fluorescence marking. The animals of the HI group presented a lower evolution in the gain of body mass compared to the animals of the SH group and, interestingly, the eye opening of the majority of the HI animals was precocious in relation to the SH. Regarding the evaluation of the number of RGCs, although no difference was observed in the number of cells in this layer between the HI and SH groups for HE stained retinas, quantification of the number of RGCs by Brn3a-labeled evidenced a significant reduction in the number of RGCs from HI animals at most of the ages analyzed. This result may explain the reduction of the optic nerve thickness and the lower density of the number of retinal projections in the dorsal geniculate nucleus of the HI animals in relation to the SH animals observed on the 30th postnatal day. The evaluation of the pupillary reflex revealed that the HI animals could not sustain the pupillary constriction under continuous illumination. In addition, no differences were observed between the experimental groups regarding pharmacologically induced ciliary muscle constriction. In the visual cliff test HI rats showed a preference for the deep side (depth perception deficit), contrary to SH, which descended mostly to the shallow side (perception of normal depth). Taken together, our results demonstrate that prenatal transient HI causes loss in the number of CGRs and suggest that such loss may be related to changes in the visual function of the animals.

Keywords: Prenatal Transient Hypoxia-Ischemia. Retina. Retinal ganglion cells. Non-imaging visual system. Image-forming visual system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema comparativo da anatomia do olho humano com o de ratos.....	17
Figura 2 -	Desenho esquemático dos componentes celulares da retina: glia e neurônios.....	18
Figura 3 -	Curvas de desenvolvimento das células da retina.....	22
Figura 4 -	Esquema da retina de rato neonato, entre P0 e P2.....	23
Figura 5 -	Projeções retinianas	25
Figura 6 -	Esquema do modelo de HI proposto por Savignon, 2008.....	30
Figura 7 -	Esquema do aparato utilizado para realização do teste de reflexo pupilar.....	37
Figura 8 -	Esquema do aparato utilizado para a realização do teste de aversão ao precipício.....	39
Figura 9 -	Esquema das injeções realizadas para marcação das projeções retinianas.....	40
Figura 10 -	Seções transversais de retina de animais SH e HI coradas com hematoxilina e eosina.....	45
Figura 11 -	Imunomarcção para Brn3a nas retinas de ratos em diferentes idades pós-natal.....	47
Figura 12 -	Marcação com CTB do nervo óptico e do NGLd de animais SH e HI em P30.....	49
Figura 13 -	Reflexo pupilar à luz (RPL), de intensidade 40 lux, de animais HI e SH em P30.....	51
Figura 14 -	Constricção pupilar induzida por carbacol.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Evolução da massa corporal (em gramas) para ratos HI e SH desde o dia pós-natal P2 até P30.....	42
Gráfico 2 -	Tempo para a abertura de olhos dos animais SH e HI.....	43
Gráfico 3 -	Número de células na CCG de animais HI e SH em diferentes idades pós-natal.....	46
Gráfico 4 -	Número de células ganglionares da retina para grupos HI e SH em diferentes idades pós-natal.....	48
Gráfico 5 -	RPL com luz de intensidade 200 lux, de animais HI e SH em P30.....	52
Gráfico 6 -	Preferência dos animais P30, de ambos os grupos, no teste de aversão ao precipício.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	do inglês, <i>Basic fibroblast growth factor</i>
CCG	Camada de células ganglionares
CF	Camada dos fotorreceptores
CFO	Camada de fibras ópticas
CGR	Células ganglionar da retina
CNE	Camada nuclear externa
CNI	Camada nuclear interna
CPE	Camada plexiforme externa
CPI	Camada plexiforme interna
CS	Colículo superior
CTB	do inglês, <i>cholera toxin B subunit</i>
E18	Décimo oitavo dias gestacional
E22	Vigésimo segundo dia gestacional
eNOS	em inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
EP	Epitélio pigmentar
HE	Hematoxilina e eosina
HI	Hipóxia-isquemia
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelulares
IfCGR	Célula ganglionar da retina intrinsecamente fotossensível
IML	Núcleo intermediário
iNOS	em inglês, <i>inducible nitric oxide synthase</i>
NGL	Núcleo geniculado lateral
NGLd	Núcleo geniculado lateral dorsal
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	em inglês, <i>Neuronal nitric oxide synthase</i>
NOS	em inglês, <i>nitric oxide synthase</i>
NPO	Núcleo pré-tectal olivar
NSQ	Núcleo supraquiasmático
ON	Óxido nítrico
P	Glândula pineal
PVN	Núcleo paraventricular
ROS	Radicais livres derivados de oxigênio

RPL	Reflexo pupilar à luz
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade
VEGF	em inglês, <i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	Retina.....	16
1.1.1	<u>Estrutura morfofuncional da retina.....</u>	18
1.1.2	<u>Desenvolvimento embrionário da retina.....</u>	22
1.2	Sistema visual.....	25
1.3	Hipóxia-isquemia.....	28
1.3.1	<u>Modelos experimentais de hipóxia-isquemia.....</u>	29
1.3.2	<u>Efeitos da hipóxia-isquemia no sistema visual.....</u>	31
2	OBJETIVOS.....	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivo específico.....	33
3	METODOLOGIA.....	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Procedimento cirúrgico.....	34
3.3	Processamento histológico.....	35
3.4	Coloração com hematoxilina e eosina.....	35
3.5	Imunohistoquímica para Brn3A.....	36
3.6	Contagem de células.....	37
3.7	Reflexo pupilar à luz.....	37
3.8	Teste de aversão ao precipício.....	39
3.9	Marcação anterógrada das projeções retinogenuculares e do nervo óptico ...	40
3.10	Análise estatística.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	HI apresenta perda de massa corporal.....	43
4.2	Animais HI apresentam abertura de olhos antecipada.....	44
4.3	HI apresenta redução no número de células na CCG.....	45
4.4	Os animais HI tem redução de CGRs.....	47
4.5	HI causa alteração no nervo óptico e no NGLd.....	49
4.6	HI pré-natal causa alteração no reflexo pupilar.....	51
4.7	Animais HI apresentam alteração no teste de aversão ao precipício	55

5	DISCUSSÃO	56
	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64

INTRODUÇÃO

Integrada ao sistema nervoso central (SNC) (MEY; THANOS, 2000), a retina possui como função a conversão do estímulo luminoso em sinais elétricos, que são conduzidos pelo nervo óptico às estruturas encefálicas superiores, permitindo, assim, a percepção visual (THOMAS, 1986). Se comparada a outras regiões do encéfalo, possui uma citoarquitetura neural simples, de aspecto laminar, dividida em camadas e composta de apenas alguns tipos celulares com características morfofuncionais bem definidas (KLEIN, 2014; MEY; THANOS, 2000). Ademais, possui fácil obtenção e manipulação. Sendo assim, fica evidente que a utilização da retina para estudos relacionados ao SNC se mostra vantajosa.

Assim como o cérebro, a retina possui intensa atividade metabólica (COHEN; NOELL, 1960), logo, uma interrupção transitória do fluxo sanguíneo pode ter consequências deletérias (JANÁKY *et al.*, 2007). Como exemplo dessa interrupção sanguínea transitória, podemos citar a hipóxia-isquemia (HI) pré-natal, que ocorre devido a diversos fatores, como parto prematuro, insuficiência placentária, disfunção pulmonar ou cardíaca, entre outros (PROCIANOY; SILVEIRAL, 2001). Apesar de ser a principal causa de paralisia cerebral em crianças, há evidências crescentes que HI pré-natal provoca déficit sensorial não motor, envolvendo principalmente visão, associada a essa condição (VAN HOF-VAN DUIN; MOHN, 1984; ROLAND *et al.*, 1986; GROENENDAAL *et al.*, 1989; GUZZETTA *et al.*, 2001). Mais da metade das crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal apresentam algum tipo de deficiência visual, incluindo estrabismo, ambliopia, nistagmo, neuropatia óptica, campo visual reduzido, visão de cor defeituosa e baixa acuidade visual. (GOOD; HARDY, 2001; GUZZETTA *et al.*, 2001).

Na retina, o dano relativo à HI tem sido caracterizado pela ativação das células de Müller, alterações no epitélio pigmentar e, em particular, nas células ganglionares da retina (CGRs), cujas projeções chegam ao tálamo visual (KERGOAT *et al.*, 2006). Essas células medeiam o processo de formação da imagem e participam de funções não-formadoras de imagem, como o reflexo pupilar à luz e o ciclo circadiano (SEABROOKET *et al.*, 2017; KAUR *et al.*, 2009). Já é descrito que as CGRs são altamente vulneráveis a insultos isquêmicos (KERGOAT *et al.*, 2006). No entanto, o impacto da morte de CGRs após a lesão pré-natal de HI permanece mal compreendido.

Nosso grupo utiliza um modelo de HI, que consiste na obstrução do fluxo sanguíneo uterino e ovariano por clampeamento das artérias de ratas grávidas no décimo oitavo dia de

gestação (SAVIGNON *et al.*, 2008). Resultados anteriores mostram que a HI pré-natal provoca alterações na morfologia e no perfil neuroquímico do cerebelo (SAVIGNON *et al.*, 2012; BARRADAS *et al.*, 2016) e no hipocampo (CUNHA-RODRIGUES *et al.*, 2018) de ratos. Além disso, Fonseca, em 2016, demonstrou perda de neurônios na camada ganglionar da retina em ratos submetidos a esse modelo. Conforme exposto acima, é possível supor que HI pré-natal causa alterações no sistema visual de ratos. Logo, o presente trabalho possui como objetivo avaliar os efeitos de HI transitória pré-natal no desenvolvimento da retina e em propriedades funcionais das vias formadora e não-formadora de imagem

1 REVISÃO DA LITERATURA

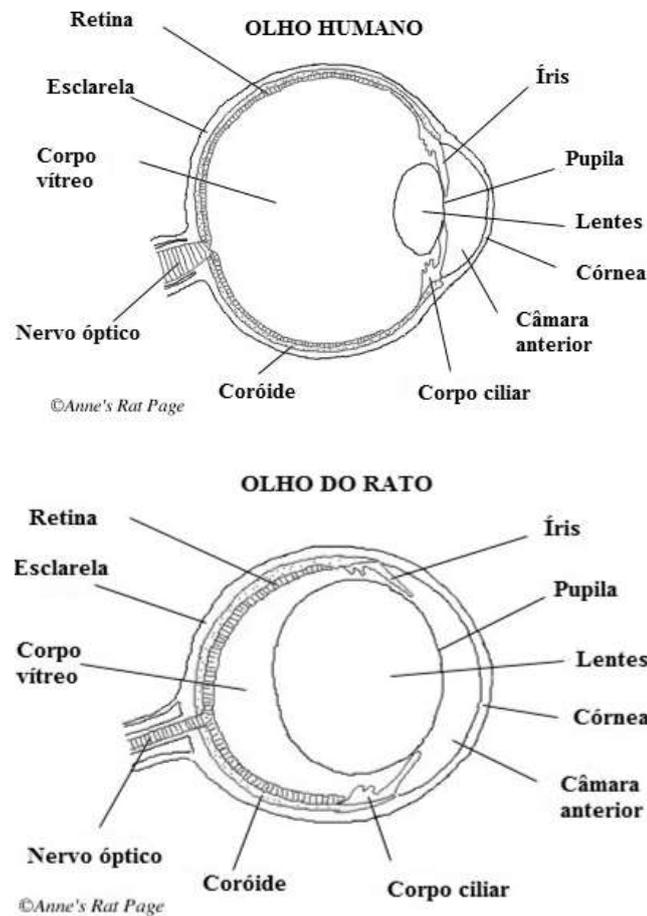
1.1 Retina

A retina nos mamíferos é localizada ao fundo do globo ocular, limitada anteriormente pelo humor vítreo, e, posteriormente, pelo epitélio pigmentado. As células deste epitélio simples fazem contato com o segmento externo dos fotorreceptores, participando da reciclagem de suas membranas (YOUNG; BOK, 1969) e da troca de metabólitos com a retina como um todo (KUBRUSLY *et al.*, 2003).

O globo ocular (Figura 1) é um órgão que possui grande grau evolutivo e possibilita uma análise detalhada da forma, cor e intensidade de luz refletida de um objeto. Possui três túnicas concêntricas dispostas: camada externa, composta pela esclera e córnea; camada média ou túnica vascular, composta pela coroide, corpo ciliar e íris; e camada interna ou retina, que projeta seus axônios ao cérebro através do nervo óptico (NILSSON, 1989).

De forma semelhante a que ocorre nos seres humanos, nos olhos de roedores (Figura 1), a luz atravessa a córnea e o cristalino e incide sobre a retina (HEMMINGSSEN; DOUGLAS, 1970). Uma vez que chega à retina, a luz será captada pelos fotorreceptores, do tipo cone e bastonete. Apesar disso, algumas diferenças merecem ser destacadas. Diferente dos seres humanos e de grande parte dos primatas, roedores possuem somente dois tipos de cones, ao invés de três, com fotopigmentos sensíveis às faixas de comprimento de onda verde e azul (JACOBS *et al.*, 1991). Ademais, a retina de ratos possui apenas 1% de cones, em contrapartida, a retina humana possui 5% (LAVAIL, 1976). Isso explica o hábito notívago dos roedores, por exemplo, diferente dos humanos, que são diurnos (ANDRADE *et al.*, 2002).

Figura 1: Esquema comparativo da anatomia do olho humano com a de ratos.



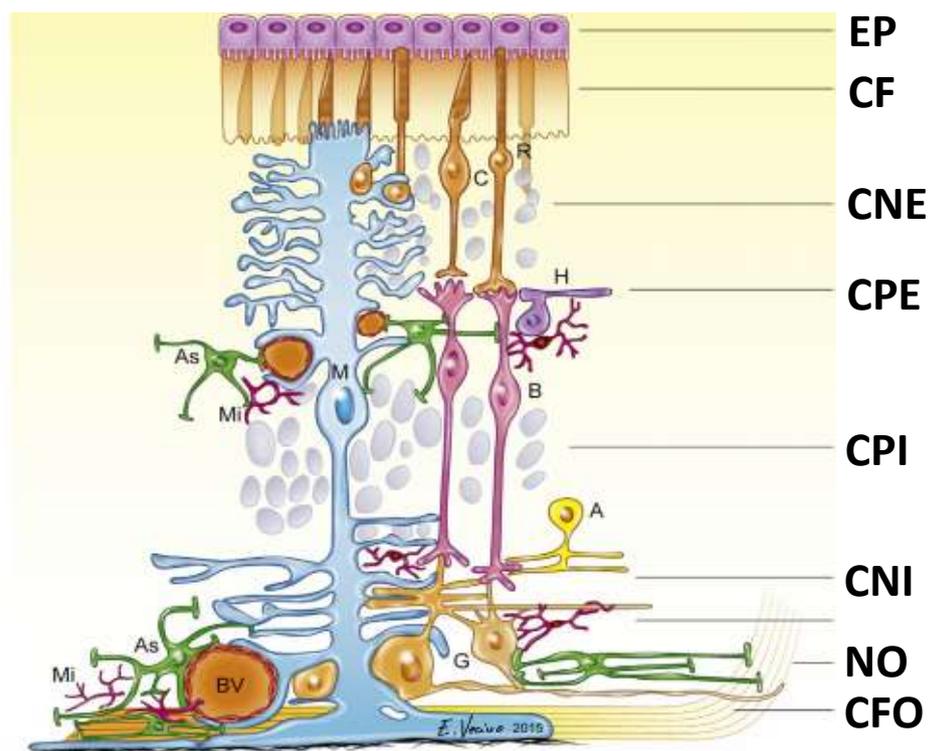
Fonte: The Rat's Eyes. Disponível em: < <http://www.ratbehavior.org/Eyes.htm> >. Acesso em: 13 dez. 2017.

1.1.1 Estrutura morfofuncional da retina

A retina possui aspecto laminar e com citoarquitetura bem definida (Figura 2). Possui cinco tipos de células neuronais (LIVESEY; CEPKO, 2001), os fotorreceptores, as células amácrinas, horizontais, bipolares e ganglionares. Essas células estão dispostas em camadas (Figura 2), ora constituídas de corpos celulares, ora por seus respectivos processos (WÄSSLE; BOYCOTT, 1991). As camadas são denominadas: epitélio pigmentar (EP), componente não neuronal; camada dos fotorreceptores (CF), os cones e bastonetes; camada

nuclear externa (CNE), composta por corpos celulares dos fotorreceptores; camada plexiforme externa (CPE), onde se localizam os terminais axonais dos fotorreceptores e dos dendritos das células horizontais e bipolares; camada nuclear interna (CNI) onde estão os corpos das células bipolares, horizontais e amácrinas; camada plexiforme interna (CPI), que contém os terminais axonais das células amácrinas e bipolares e os dendritos das células ganglionares; camada de células ganglionares (CCG) da retina constituída pelos corpos das CGRs e amácrinas deslocadas; por fim, a camada de fibras ópticas (CFO), formada por axônios das CGRs, que juntos formam o nervo óptico, por onde passam os impulsos nervosos, que serão conduzidos até o tálamo visual e colículo superior (MARQUARDT; GRUSS, 2002; WÄSSLE, 2004).

Figura 2: Desenho esquemático dos componentes celulares da retina: glia e neurônios.



Legenda: Aspecto laminar da retina madura de um mamífero. Observar a localização das diferentes camadas da retina (das camadas mais internas para as externas): nervo óptico (NO), camada de fibras ópticas (CFO), camada de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear externa (CNE), camada de fotorreceptores (CF) e epitélio pigmentar (EP). Células amácrinas (A), astrócitos em verde (As), células bipolares (B), cones (C), bastonetes (R), células ganglionares (G), células horizontais (H), células Müller (M) e microglia (Mi).

Fonte: adaptada de VENICO *et al.*, 2016.

Cada tipo celular da retina possui características próprias. Os fotorreceptores, cones e bastonetes, são células com morfologia alongada que contém fotopigmentos compostos de uma opsina acoplada a uma molécula cromófora que absorve luz. Cones estão relacionados com a visão fotópica, que permite a distinção de cores por meio de um sistema de comparação de sinais entre os subtipos de cones. Já os bastonetes possuem um fotopigmento muito mais sensível à luz, capazes de captarem apenas um fóton (RODRIGUES, 2010), entretanto, não discriminam cores. Os fotorreceptores são os primeiros neurônios responsáveis pela transdução do estímulo visual e realizam sinapse com células bipolares, que por fim, irão transmitir o impulso nervoso às células ganglionares (BICAS, 1997). Estes impulsos serão transmitidos, via nervo óptico, até os núcleos visuais. Há, aproximadamente, seis milhões de cones em uma retina humana e aproximadamente 120 milhões de bastonetes (BICAS, 1997). Geralmente, por serem mais sensíveis à luz, 15 a 30 bastonetes convergem para uma única célula bipolar. Diferente dos cones, que, em determinadas regiões da retina, podem realizar sinapse com apenas uma célula bipolar. Vale ressaltar que a retina de humanos e de primatas possui uma região mais central chamada mácula, onde se encontra a fóvea. Nesta região que a visão alcança seu maior grau de nitidez e precisão, sendo formada exclusivamente por fotorreceptores do tipo cone (GUYTON; HALL, 2006).

Na CNI estão presentes as células bipolares, que transmitem a informação dos fotorreceptores para as células ganglionares. Estas podem possuir dois tipos de morfologia diferentes: difusas, que realizam comunicação com dois ou mais fotorreceptores e monossinápticas, que estabelecem conexão com um cone e uma célula ganglionar. Além de células bipolares, esta camada contém as células horizontais e as células amácrinas. Esses dois tipos de células possuem seus prolongamentos posicionados horizontalmente e realizam conexão com os fotorreceptores e células ganglionares, respectivamente. Juntas, estas células formam a comunicação horizontal da retina (STRETTOI; MASLAND, 1995; JEON *et al.*, 1998).

A retina de vertebrados contém quatro tipos de glia, células de Müller, astrócitos, oligodendrócitos e microglia, As células de Müller são as predominantes, representando 90% do total das células da glia na retina (LIU *et al.*, 2014). Estendem-se por quase todas as camadas da retina e são capazes de sustentar e nutrir os neurônios da retina, funções equivalentes as da neuroglia/astroglia encefálica. Além disso, as células de Müller são capazes de modular a comunicação entre as camadas plexiforme externa e plexiforme interna (CORMACK, 2008). Além da glia de Muller, podemos citar os astrócitos, que são quase exclusivamente confinados às camadas retinianas mais internas (STONE; DREHER, 1987;

TURNER; CEPKO, 1987; WATANABE; RAFF, 1988). Alguns dos papéis benéficos cumpridos pelos astrócitos incluem suporte neurotrófico e a manutenção da barreira hematorretiniana. Já em resposta a lesão ou doença, os astrócitos expressam proteínas que comprometem a integridade da barreira hematorretiniana, regulando a expressão de vários genes que codificam citocinas e quimiocinas, promovendo degeneração da retina (KIM; DUSTIN, 2006). O terceiro tipo glial, o oligodendrócito, é visto apenas ocasionalmente na retina, associado com axônios de células ganglionares mielinizadas em algumas espécies como o Coelho (VECINO *et al.*, 2016). Já o quarto, a microglia, em condições saudáveis, expressa fatores neuroprotetores e antiinflamatórios (STREIT, 2002). Em contrapartida, em condições patológicas, a ativação da microglia promove ações benéficas, como remoção de resíduos e células degeneradas e secreção de fatores de sobrevivência neuronal para limitar lesões adicionais (STREIT, 2002; RIVEST, 2009). Por outro lado, a ação da microglia também pode se tornar prejudicial, visto que pode desencadear ciclo de ativação persistente e recrutamento de células de inflamação adicionais (RIVEST, 2009).

Por fim, as células ganglionares, neurônios de terceira ordem, que possuem núcleo grande localizados na CCG (WÄSSLE, 2004). Há espécies em que, nesta camada se encontram também células amácrinas e horizontais deslocadas. As CGRs captam o estímulo das células bipolares e o transmitem, pelos seus axônios, para o encéfalo. Este é o último ponto de saída da informação visual na retina (ATHANASSIOUS *et al.*, 1984).

Primeiramente descritas por Ramón e Cajal (1893), por meio da técnica de Golgi em retina de vertebrados, as CGRs foram classificadas quanto a sua diversidade morfológica e extensão da árvore dendrítica, tamanho do corpo celular e tamanho, e número de sublâminas da CPI que suas ramificações ocupam.

Atualmente, estima-se que existam aproximadamente 20 subtipos de CGRs que cada um deles é responsável pela codificação de diferentes aspectos das cenas visuais (MASLAND, 2012). Resumidamente, dentre os diferentes tipos de CGRs, podemos citar as que dão origem a duas vias visuais, denominadas, magno e parvocelular (TOOTEL *et al.*, 1988). As células da via magnocelular são grandes e se ligam a várias células bipolares, possuindo um campo receptivo maior, associadas, então, à baixa resolução. Logo, atuam na sensibilidade ao contraste da luminância em baixas frequências espaciais e na visão noturna. Possuem uma maior condutividade e sensibilidade a movimentos rápidos, além de uma alta resolução temporal. Em contrapartida, células ganglionares da via parvocelular possuem menor tamanho e ligam-se apenas a uma única célula bipolar. Apesar de possuírem um campo

receptivo pequeno e condutividade lenta, isso lhes confere alta capacidade de resolução espacial e sensibilidade a movimentos lentos (KAPLAN; SHAPLEY, 1986).

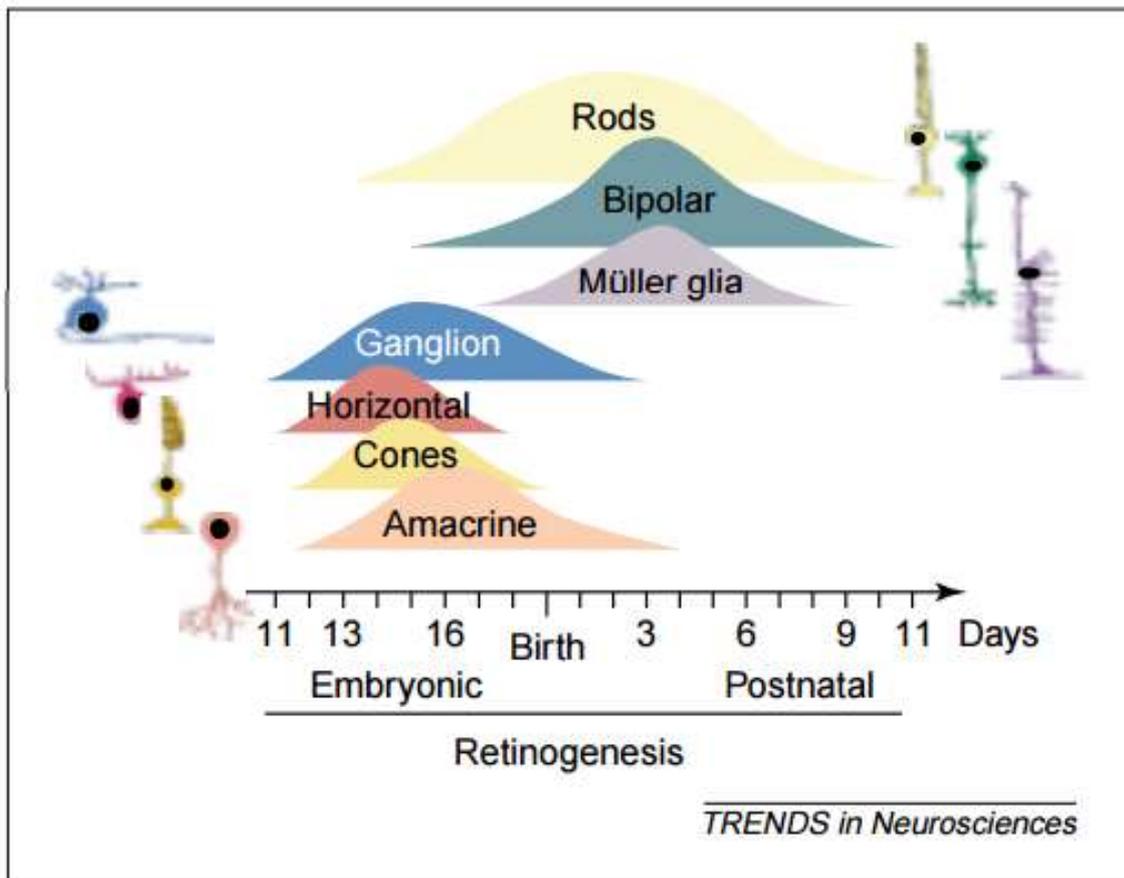
Recentemente foi descrito um novo subtipo de CGRs, as intrinsecamente fotossensíveis (ifCGRs). Estas células possuem uma grande árvore dendrítica e sensibilidade à luz. Essa sensibilidade é decorrente de uma opsina chamada melanopsina expressa por esse subtipo celular. A melanopsina, quando expressada, ativa uma cascata de sinalização que abre canais de cálcio na membrana, e quando muito estimulada pela luz, provoca uma resposta que demora vários segundos (HATTAR *et al.*, 2002; PANDA *et al.*, 2002; QIU *et al.*, 2005; DO; YAU, 2013). As projeções das ifCGRs se destinam para a área pré-tectal e ao núcleo supraquiasmático, desempenhando papel no ciclo circadiano e no reflexo pupilar à luz (HATTAR *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2011; MÜNCH; KAWASAKI, 2013; LUCAS *et al.*, 2001; GOOLEY *et al.*, 2001) . Ao longo dos últimos anos, foram encontrados mais quatro tipos de CGRs que expressam melanopsina e, por isso, se mostram fotossensíveis (ESTEVEZ *et al.*; 2012; HU *et al.*, 2013). Essas descobertas aumentaram as chances dessas células desempenharem outras funções (SCHMIDT *et al.*, 2011; ALLEN *et al.*, 2014).

1.1.2 Desenvolvimento embrionário da retina

Assim como as outras estruturas do SNC, a retina se origina de uma porção do ectoderma que forma o tubo neural (MEY; THANOS, 2000). Ela surge a partir de uma invaginação do diencéfalo, através de diversas mudanças morfológicas e genéticas (NELSON *et al.*, 2007). Formam-se as vesículas ópticas, precursoras do globo ocular, que, inicialmente, possui duas camadas celulares, a externa formará o epitélio pigmentado e a mais interna formará o epitélio pseudo-estratificado. Este último é formado por células-tronco que dão origem a qualquer tipo neuronal ou à glia de Müller (TURNER; CEPKO, 1987; ADLER, 1999).

Para formar a citoarquitetura retiniana são necessários processos de divisão migração e diferenciação celular. Tanto no período embrionário, quanto no pós-natal, todos esses processos ocorrem de maneira sobreposta e possuem uma cronologia bem definida (CEPKO *et al.*, 1996; YANG, 2004), como mostrado na Figura 3. É consensual que, em diversas espécies, as primeiras células a saírem do ciclo celular são as células ganglionares (PRADA *et al.*, 1991), seguida pelos demais neurônios, e, por fim, as células de Müller.

Figura 3: Curvas de desenvolvimento das células da retina.

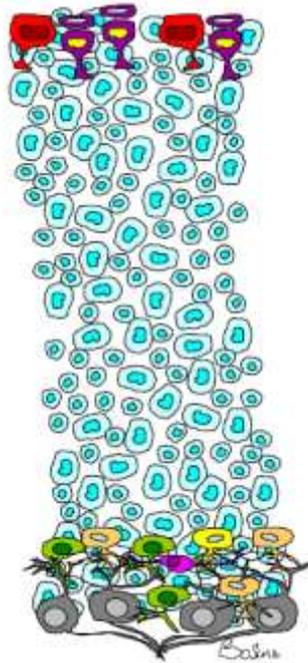


Legenda: Os processos de diferenciação celular das células da retina ocorrem sobrepostos uns aos outros e de maneira organizada. As curvas não refletem valores absolutos, porém a proporção relativa de células diferenciadas para cada tipo celular. Os números fazem alusão aos dias embrionários e dias pós-natal do desenvolvimento murino - pequenos roedores.

Fonte: MARQUARDT; GRUSS, 2002.

Tratando especificamente de ratos em seu primeiro dia pós-natal (P0), a retina destes animais ainda não possui uma estrutura laminar definida. Apresenta-se em duas camadas somente, camada ganglionar e neuroblástica (Figura 4). Esta última contendo precursores celulares que ainda não saíram do ciclo celular. A retina de mamíferos, incluindo humanos, ratos e camundongos, não tem nichos neurogênicos persistentes significativos, sendo que em ratos, a neurogênese é completada dentro dos primeiros 10 dias pós-natal (MOSHIRI *et al.*, 2004).

Figura 4: Esquema da retina de rato neonato, entre P0 e P2.



Legenda: Observe a camada ganglionar (cinza), as células amácrinas (verde e amarelo), os fotorreceptores (roxo e vermelho) e a extensa camada de neuroblastos (azul).
 Fonte: CUNHA , 2006.

Vários fatores estão implicados na orientação da diferenciação das células progenitoras da retina. Shh, uma conhecida proteína da família de sinalizadores *hedgehog*, parece conduzir a progressão da onda de diferenciação do primeiro tipo celular, as células ganglionares, que por sua vez, começam a secretar Shh (ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, fatores de crescimento transformante e epidérmico podem estimular a produção de tipos particulares de células, e, ao mesmo tempo, suprimir outros (LILLIEN, 1998). Estudos observaram aumento nos níveis de expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico em embriões que possuíam atraso no desenvolvimento retiniano, sugerindo, então, que esse fator é responsável por processos relacionados ao desenvolvimento (LILLIEN, 1995; LILLIEN; WANCIO, 1998).

1.2 Sistema visual

O sentido da visão é proporcionado aos animais pela interação da luz com os receptores especializados que se encontram na retina (GIBSON; MACLEAN, 1979). A imagem projetada na retina provoca uma reação de transdução fotoneural nos receptores, gerando um potencial receptor que, por sua vez, provoca nas células seguintes da retina outros potenciais bioelétricos (CHALUPA; WILLIAMS, 1984). Todos esses sinais percorrem pelo nervo óptico em direção às regiões visuais do encéfalo, situadas no mesencéfalo, no diencéfalo e em diversas áreas do córtex cerebral (Figura 5) (OSTERHOUT *et al.*, 2015).

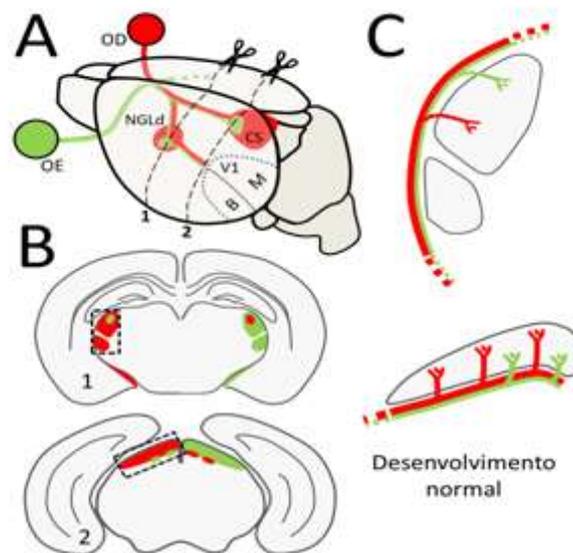
Os axônios das células ganglionares da retina formam eferências retinianas para vários núcleos que compõem o sistema visual. Suas projeções formam o nervo óptico e posteriormente o quiasma e o trato óptico (CHALUPA; WILLIAMS, 1984). O nervo óptico é o segundo par craniano, que reúne o conjunto das fibras das células ganglionares retinianas e pode ser visto claramente na base do cérebro (ABRAHAMSON; MOORE, 2001). Em mamíferos, a maioria desses axônios se projeta para núcleos retinorreipientes contralaterais. A porcentagem de fibras que se direcionam ipsolateralmente varia consideravelmente de acordo com a espécie e está ligada com o posicionamento dos olhos no crânio. Em espécies com olhos posicionados lateralmente, as projeções ipsolaterais tendem a ser menores. Em ratos, de 3 a 5% das projeções retinianas são ipsolaterais (JEFFERY *et al.*, 1984). Em contrapartida, em gatos as projeções ipsolaterais totalizam de 25 a 30% das fibras e, em macacos, este número pode chegar a 40% (TASSINARI *et al.*, 1997; CHALUPA; LIA, 1991).

Entre os núcleos retinorreipientes podemos citar o colículo superior (CS), o núcleo geniculado lateral (NGL), o núcleo supraquiasmático (NSQ), além dos núcleos pré-tectais. Do quiasma emergem os tratos ópticos, que depois se fundem com o encéfalo formando um verdadeiro feixe de fibras. No encéfalo, as fibras retinofugais começam a divergir, aproximando-se de diferentes alvos sinápticos situados no diencéfalo e no mesencéfalo (ABRAHAMSON; MOORE, 2001).

No diencéfalo está o alvo mais relevante para a percepção visual (via formadora de imagem) - o NGL -, que recebe fibras provenientes das células ganglionares retinianas de ambos os olhos e envia axônios diretamente ao córtex visual primário do mesmo lado. Na junção diencéfalo-mesencefalo ficam os núcleos pré-tectais, que formam sinapses com fibras retinianas de ambos os olhos. Os neurônios pré-tectais emitem axônios para núcleos

dos nervos cranianos que participam dos mecanismos de acomodação e outros reflexos oculomotores destinados a estabilizar a imagem projetada sobre a retina. (MCHANFFIE; STEIN, 1982; OKADA *et al.*, 1992). Finalmente, no mesencéfalo se situa o CS, importante alvo retiniano que participa dos reflexos de orientação dos olhos, da cabeça e do corpo em relação aos estímulos visuais. Como se esperaria dessa função visuomotora, os neurônios do CS projetam axônios para diversos núcleos motores do tronco encefálico e também para a medula espinhal (GOODALE *et al.*, 1978; KING, 1999).

Figura 5: Projeções retinianas.



Legenda: (A) Esquema das projeções retinianas contra- (vermelho) e ipsolaterais (verde) para o núcleo geniculado lateral dorsal (NGLd) e o colículo superior (CS). OE, olho esquerdo; OD olho direito; V1 córtex visual primário; B, zona binocular; M, zona monocular. (B) Representação das projeções retinianas no NGLd (imagem superior) e CS (imagem inferior) no plano de corte coronal indicado em A (linhas pontilhadas 1 e 2). (C) Magnificação das regiões indicadas em B (retângulos) ilustrando o padrão de inervação das projeções retinianas no NGLd e CS de camundongos normais.

Fonte: KRAHE, T. E. 2016.

Além da via formadora de imagem, que processa sinais de fótons relacionados à cor, contraste e movimento, existe a via não-formadora de imagem, envolvida principalmente na detecção de níveis de luz do ambiente. As respostas da via não-formadora de imagem incluem a regulação do ciclo circadiano, a regulação do tamanho da pupila e a secreção de melatonina pineal (KLEIN *et al.*, 1991; LUCAS *et al.*, 2001; MROSOVSKY *et al.*, 1999; BADIA, 1991). Fazem parte dessa via as CGRs intrinsecamente fotossensíveis, que projetam seus axônios

para núcleos de processamento visual não ligados à formação da imagem (PROVENCIO, 2000), como o NSQ ou os núcleos pré-tectais implicados em ritmos circadianos ou reflexos pupilares, respectivamente. O NSQ está inteiramente inervado por fibras retinianas apenas após o 10º dia pós-natal (MCNEILL *et al.*, 2011) e foi proposto que o preenchimento do NSQ ipsolateral por projeções bilaterais de ifCGRs ocorre mais tarde no desenvolvimento (BERSON, 2002; HATTAR, 2002). Os mecanismos de orientação que controlam a arborização de ifCGRs para o NSQ não foram elucidados.

Todos os organismos vivos possuem um sistema de sincronização circadiana interno que ajusta muitas variáveis fisiológicas aos ciclos diários de luz e escuridão (PANDA *et al.*, 2002, TAKAHASHI, 2004). Este processo é conduzido por um estímulo visual bastante distinto do transmitido pelas vias visuais convencionais, na medida em que é relativamente insensível à estimulação de luz breve ou a baixos níveis de luz (NELSON; TAKAHASHI, 1991).

Outra resposta visual da via não-formadora de imagem bem estabelecida é o reflexo pupilar à luz (RPL), que regula a quantidade de luz que atinge a retina através de diferentes níveis de iluminação ambiental. O RPL é a constrição dos músculos do esfíncter pupilar da íris em resposta a um aumento de luz no ambiente. Essa resposta leve envolve uma projeção bilateral da retina para o núcleo pré-tectal, que, por sua vez, envia fibras para o núcleo de Edinger-Westphal. O núcleo de Edinger-Westphal contém os neurônios autônomos que controlam o tamanho da pupila (XUE *et al.*, 2011).

Contudo, para que haja o funcionamento adequado de toda essa circuitaria é preciso que as conexões nervosas sejam estabelecidas de forma exata durante o desenvolvimento do sistema visual. Essa exatidão se dá através de mecanismos específicos de atividade neuronal (YUSTE, 1997; FELLER, 1999; BEN-ARI, 2001; CHIU; WELIKY, 2002). Já foi descrito que, durante o desenvolvimento do sistema visual, o padrão de atividade neuronal das CGRs tem papel fundamental no refinamento da topografia de suas projeções (WELIKY; KATZ, 1999; WONG, 1999; EGLIN *et al.*, 2003; TORBORG; FELLER, 2005). CGRs e células amácrinas geram “ondas”, de maneira rítmica e espontânea (GALLI; MAFFEI, 1988; MEISTER *et al.*, 1991; WONG *et al.*, 1993; TORBORG; FELLER, 2005), que atravessam a superfície da retina (WONG, 1999; EGLIN *et al.*, 2003; TORBORG; FELLER, 2005) e são responsáveis por gerar ativação pós-sináptica nas regiões que recebem inervação das CGRs. Estudos mostraram que modulações nas “ondas” retinianas durante a primeira semana pós-natal resultaram em alterações na topografia do sistema visual (SHATZ; STRYKER, 1988; PENN *et al.*, 1998;

MUIR-ROBINSON *et al.*, 2002; STELLWAGEN; SHATZ, 2002; GRUBB *et al.*, 2003; MCLAUGHLIN *et al.*, 2003; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2005; MRSIC-FLOGEL *et al.*, 2005).

1.3 Hipóxia-Isquemia

Insultos sistêmicos pré-natais podem alterar o desenvolvimento do SNC, levando a déficits motores, cognitivos e comportamentais (TYSON; SAIGAL, 2005). Um estudo da Organização Mundial da Saúde, com dados de 48 países, estima que o número de neonatos mortos por eventos intraparto é de aproximadamente 900 mil por ano, de um total de quatro milhões de mortes de crianças até cinco anos de vida (VOLLMAN *et al.*, 2005). Parâmetros como o tipo de lesão, o período do desenvolvimento, a intensidade e a área afetada pelo insulto podem definir a gravidade das consequências (NELSON *et al.*, 2003).

Um dos tipos de lesões que afeta o desenvolvimento pré- e pós-natal é a hipóxia-isquemia (HI), que se caracteriza pela interrupção transitória ou permanente do fluxo sanguíneo e do aporte nutricional ao feto. A insuficiência sistêmica de oxigênio e sangue pode provocar déficits neurológicos e, dependendo da severidade, causar a morte do feto (JOHNSTON *et al.*, 2011; VOLPE, 2012). Eventos de HI podem levar a atrasos e comprometimento cognitivo, problemas no desenvolvimento motor, hiperatividade, dificuldade de concentração (DU PLESSIS; JOHNSTON, 1997; FILLOUX *et al.*, 1996), e, em casos mais graves, a epilepsia e paralisia cerebral em crianças (NELSON *et al.*, 2003). Esta última é uma desordem debilitante, não progressiva, que afeta principalmente o sistema motor e está associada com injúrias cerebrais perinatais (KUBAN; LEVITON, 1994).

Muitas são as causas da HI sistêmica pré-natal. Podem ser listados, processos mecânicos, como trabalho de parto prolongado, insuficiência placentária, dobras no cordão umbilical; ou, simplesmente, pela incapacidade do neonato começar a respirar (DE HAAN *et al.*, 2012). Além disso, fatores como anemia, hipotensão arterial, nascimentos múltiplos, tabagismo materno e uso de outras drogas (PUNDIK *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços nos cuidados pré- e perinatais, a hipóxia pré-natal continua a ser um problema de saúde significativo e uma causa importante de déficits neurológicos e cognitivos de longo prazo em recém-nascidos (FATEMI; HALT, 2001; NELSON *et al.*, 2003; BOKSA, 2004; ROBINSON *et al.*, 2005; RENNIE *et al.*, 2007; VOLPE, 2009;

MARTINEZ-BIARGE *et al.*, 2012; LAPTOOK, 2016). Fica evidente, portanto, a importância da compreensão dos eventos de lesões de HI no desenvolvimento do SNC, assim como as estruturas que podem ser afetadas e suas consequências. Estudos como esse podem auxiliar na busca de novas terapêuticas futuras.

1.3.1 Modelos experimentais de hipóxia-isquemia

Com o objetivo de mimetizar os diferentes tipos de lesões hipóxico-isquêmicas que acometem os humanos, diversos modelos *in vitro* e *in vivo* foram criados. Um dos primeiros modelos de HI foi proposto por Levine, em 1960. Baseado na oclusão unilateral, momentânea ou permanente, da artéria carótida de ratos. Os animais apresentaram necrose aguda em grande parte do hemisfério direito. Os déficits encontrados ocorrem no córtex cerebral, substância branca periventricular, estriado e hipocampo (RICE *et al.*, 1981). Diversos grupos de pesquisa utilizaram este modelo para verificar as consequências das lesões na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (SILVERSTEIN; JOHNSTON, 1984; ROMIJIN *et al.*, 1992) e na neurotoxicidade glutamatérgica (SILVERSTEIN *et al.*, 1991). Em contrapartida, apesar dos inúmeros achados utilizando esse modelo, ele não mimetiza uma lesão sistêmica, a qual ocorre frequentemente em humanos.

Em 1981, Rice e colaboradores modificaram o modelo de Levine, realizando a oclusão da artéria seguida de hipóxia (8% de oxigênio) em ratos com sete dias pós-natal. O insulto ocasionou danos no hemisfério ipsilateral, com o hemisfério contralateral servindo de controle experimental. Apesar de muitas descobertas terem sido feitas com esse modelo, ele não possui características de uma lesão sistêmica, além de excluir as intercorrências entre mãe e feto, que normalmente ocorrem em humanos.

Em 1991, Bjelke e colaboradores cria o modelo em que os cornos uterinos são retirados da fêmea e imersos em água a 37°C, ente 15 a 21 minutos, no vigésimo segundo dia gestacional (E22). Depois da asfixia os filhotes são retirados dos cornos e ressuscitados. Este modelo possuía como objetivo principal a similaridade a uma situação clínica. Os resultados mostraram uma ligeira redução no ganho de massa corporal dos filhotes que passaram pela asfixia. Esse modelo mostrou aumento no número de corpos celulares imunorreativos para tirosina hidroxilase na zona compacta da substância negra. O aumento do número de neurônios dopaminérgicos marcados foi associado ao aumento da expressão do gene do fator

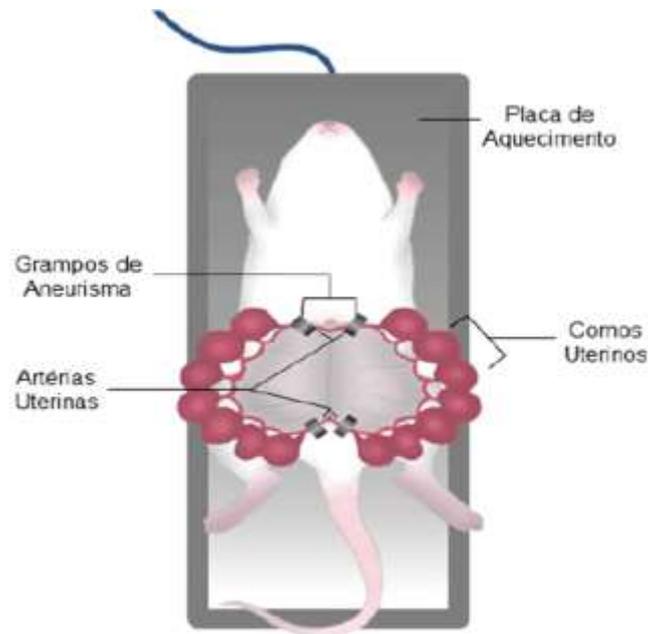
básico de crescimento de fibroblasto (em inglês, *Basic fibroblast growth factor*, bFGF) (ANDERSSON *et al.*, 1995).

Em 2004, Baud desenvolveu um modelo de hipóxia gestacional de longo prazo. Ratas foram colocadas, do quinto ao nono dia de gestação, em uma câmara de gás com 10% de oxigênio. Redução significativa de massa corporal até o décimo quarto dia pós-natal foi observado.

Robinson e colaboradores, em 2005, propuseram um modelo de HI pré-natal transitório, onde ratas grávidas tinham seus cornos uterinos expostos e o fluxo sanguíneo das artérias uterinas era obstruído por 15, 30 e 45 minutos. Resultados semelhantes ao de Baud, 2004, foram encontrados. Neste modelo foram observadas astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos e lesão axonal, tanto na substância branca, como no córtex cerebral, ainda mais nos animais submetidos à HI por 45 minutos (ROBINSON *et al.*, 2005). Essas alterações são semelhantes às observadas em humanos que passaram por eventos hipóxico-isquêmicos (MARIN-PADILLA, 1997, 1999).

O modelo realizado em nosso laboratório, proposto por Savignon, em 2008, é semelhante ao descrito por Robinson e colaboradores (2005). O fluxo sanguíneo uterino e ovariano é obstruído, aos 18 dias de gestação (E18), por 45 minutos, fazendo com que a circulação sanguínea para o feto seja interrompida (Figura 6). Foram observadas alterações morfológicas na substância branca e cinzenta do cerebelo, astrogliose e aumento nos níveis de óxido nítrico sintase induzível (SAVIGNON *et al.*, 2012; BARRADAS *et al.*, 2016). Com os resultados que vem sendo demonstrados utilizando esse modelo, que preserva as possíveis trocas materno-fetais no ultimo terço da gestação, sugere-se que este modelo mimetiza melhor o que ocorre em eventos hipóxico-isquêmicos pré-natais ocorridas em humanos.

Figura 6: Esquema do modelo de HI proposto por Savignon, 2008.



Fonte: PINTO, 2016

1.3.2 Efeitos da hipóxia-isquemia no sistema visual

Enquanto a paralisia cerebral é a incapacidade mais comum que afeta as crianças que sofreram HI pré-natal, associada a essa condição, há evidências crescentes de déficit sensorial não motor, envolvendo principalmente a visão (VAN HOF-VAN DUIN; MOHN, 1984; ROLAND *et al.*, 1986; GROENENDAAL *et al.*, 1989; GUZZETTA *et al.*, 2001). O insulto perinatal HI à retina desempenha um papel significativo na deficiência visual de longo prazo (BLENCOWE *et al.*, 2013). Com relação aos problemas visuais, de 66% a 94% das crianças que sofreram HI apresentam algum tipo de comprometimento visual (HUANG *et al.*, 2012). Mais de metade das crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal apresentam algum tipo de deficiência visual, incluindo estrabismo, ambliopia, nistagmo, neuropatia óptica, campo visual reduzido, visão de cor defeituosa e baixa acuidade visual. (GOOD; HARDY, 2001; GUZZETTA *et al.*, 2001).

A retina, como o SNC, possui intensa atividade metabólica (COHEN; NOELL, 1960) e a interrupção transitória do fluxo sanguíneo da retina tem consequências devastadoras

(CAPRARA; GRIMM, 2012; RIVERA *et al.*, 2011; HELLSTROM *et al.*, 2013; JANÁKY *et al.*, 2007). Apesar de inicialmente terem sido desenvolvidos para estudar lesões no encéfalo, vários estudos avaliaram os efeitos de modelos de HI sistêmico na morfologia e função da retina (KISS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2012; JUNG *et al.*, 2016 ; JUNG *et al.*, 2015).

Além disso, a isquemia da retina é uma condição clínica comum em adultos, ocorrendo em uma variedade de patologias oculares, incluindo neuropatia óptica isquêmica, oclusão do vaso retiniano, retinopatia diabética e glaucoma (OSBORNE *et al.*, 2004). Por exemplo, utilizando o modelo de oclusão da carótida comum em ratos adultos, observaram degeneração e comprometimento funcional da retina e do nervo óptico (BLOCK *et al.*, 1992; BARNETT; OSBORNE, 1995; DAVIDSON *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2000; LAVINSKY *et al.*, 2006; STEVENS *et al.*, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2006). De forma semelhante, quando realizaram a oclusão da artéria carótida média, demonstraram degeneração celular na camada ganglionar da retina, além de provocar a ativação das células de Müller (BLOCK *et al.*, 1997; KAJA *et al.*, 2003).

As CGRs se mostram particularmente sensíveis a estresses hipóxicos sistêmicos agudos, transitórios e leves (KERGOAT *et al.*, 2006). Perda de CGRs ocorrem em muitas condições oftálmicas, como o glaucoma e diabetes (SUCHER *et al.*, 1997; ABU-EL-ASRAR *et al.*, 2004) e a hipóxia vem sendo responsabilizada por tal perda (WAX; TEZEL, 2002; CHEN *et al.*, 2009).

Os danos causados por HI, tanto local, quanto sistêmica, no sistema visual, vêm sendo relatados. Em 2016, por exemplo, Fonseca demonstrou perda neuronal na CCG de ratos submetidos ao modelo de Savignon, 2012. Porém, os efeitos causados nas células ganglionares por esse modelo ainda não foram descritos, e, principalmente, os déficits funcionais que podem ser gerados. Logo, caracterizar as alterações celulares e as consequências funcionais dessas alterações é de grande importância para o desenvolvimento de terapêuticas futuras e de estratégias de prevenção.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do insulto hipóxico-isquêmico transitório pré-natal sobre o desenvolvimento retiniano e na funcionalidade da via formadora e da não-formadora de imagem.

2.1 Objetivos Específicos

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

- o número de células ganglionares da retina até o 30º dia pós-natal;
- a topografia das projeções retinofugais no núcleo geniculado lateral e a espessura do nervo óptico.
- o reflexo pupilar à luz no 30º dia pós-natal;
- a capacidade visual dos animais aos 30 dias pós-natal, usando o teste de aversão ao precipício.

3 METODOLOGIA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, Protocolo nº CEUA/006/2016) e estão de acordo com a declaração de Helsinque e com o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório adotado e promulgado pelo *National Institute of Health*.

3.1 Animais

Neste projeto foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), gerados e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia (UERJ), com temperatura controlada (21°C), ciclo de luz (6h-18h) e escuridão (18h-6h) e acesso a água e alimento *ad libitum*.

Para a realização do acasalamento foram utilizados animais adultos ($\geq P90$), sendo, as fêmeas, nulíparas e com massa corporal acima de 200g. Antes do acasalamento as massas das ratas foram registradas para comparação *a posteriori*. Os animais são postos para acasalar normalmente na configuração de 2 machos e 3 fêmeas, e ocorre sempre no começo da fase escura e separados 14h depois. Após 17 dias, novamente é feito o aferimento das massas corporais das fêmeas a fim de confirmar a gravidez.

3.2 Procedimento cirúrgico

Como anteriormente descrito por Savignon *et al.* (2008), no décimo oitavo dia de gestação as ratas grávidas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Avertin® (tribromoetanol + 2-metil- 2-butanol + água destilada), na dose de 1,25mg/kg, preparado um dia antes da administração e aplicado em doses fracionadas. Durante todo o procedimento cirúrgico o nível de anestesia foi verificado por avaliação periódica do reflexo de retirada das patas traseiras. Doses suplementares de anestésico foram administradas caso necessário. Após assepsia local com álcool iodado foi feita a laparotomia, os cornos uterinos foram expostos e

o fluxo uterino e ovariano foi obstruído com cliques de aneurisma por 45 minutos (grupo hipóxia-isquemia, HI). Após este período, os cliques foram removidos, os cornos uterinos foram recolocados na cavidade abdominal e a incisão foi suturada. Durante todo o procedimento e posterior recuperação da anestesia, o animal foi aquecido com uma lâmpada incandescente (vermelha com 15W, 127V e 1208AU). Posteriormente, foi realizada a inspeção diária das fêmeas operadas para verificar possíveis sinais de infecção ou abertura das suturas. Algumas fêmeas grávidas foram submetidas a todos os procedimentos cirúrgicos descritos acima exceto a oclusão das artérias uterinas (grupo simulado, em inglês, *sham group*, SH). Nenhuma intervenção por parte do pesquisador acontece antes ou durante o parto. Os filhotes são alimentados pela própria mãe até os 21 dias de vida, quando são desmamados e passam a comer ração comercial. Foram utilizados apenas os animais nascidos a termo (i.e. 21 a 22 dias de gestação).

3.3 Processamento histológico

Animais de ambos os grupos em P2, P9, P23 e P30 são anestesiados e perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9%, seguido de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (PF 4%) pH 7,4 e, em seguida, por PF 4% + 10% de sacarose. Ainda durante a passagem da salina, as retinas foram dissecadas, fixadas durante uma hora em PF 4%, depois transferidas para o mesmo fixador + 10% de sacarose, por 30 minutos. Por fim, imersos em tampão fosfato + 20% de sacarose *overnight* a 4°C e emblocados em OCT (Sakura). Os blocos são rapidamente congelados através de imersão em nitrogênio líquido e cortes coronais de 15µm são obtidos em criótomo (Leica Biosystems) a -20°C, sendo recolhidos em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%.

3.4 Coloração com hematoxilina e eosina

A coloração por hematoxilina e eosina (HE) foi utilizada com o objetivo de avaliar a citoarquitetura da retina, incluindo a quantificação do número de células na camada ganglionar. Por meio desta técnica podemos diferenciar componentes celulares basófilos (pela

hematoxilina) e acidófilos (pela eosina). A hematoxilina é um corante básico que reage com componentes aniônicos das células e tecidos, entre os quais podemos citar o nucléolo e RNA ribossômico. A hematoxilina cora geralmente as estruturas em azul. Já a eosina é um corante ácido, que reage com componentes catiônicos das células, tais como os filamentos citoplasmáticos e as fibras extracelulares. A eosina geralmente cora as estruturas em vermelho ou rosa.

O protocolo para a coloração de HE das lâminas com os cortes das retinas dos grupos HI e SH seguiu a seguinte sequência: lavagem com água destilada para a retirada do excesso de OCT; imersão em hematoxilina por dois minutos; imersão em eosina por um minuto; rápida imersão em água acética 1%. Após esses procedimentos as lâminas passaram por uma sequência de imersão em álcool em diferentes concentrações, 70%, 90% e 100%. Para finalizar, foram imersas em Xilol. A montagem das lâminas foi feita utilizando bálsamo do Canadá.

3.5 Imunohistoquímica para Brn3A

Para a identificação das CGRs foi utilizado o anticorpo anti-Brn3A. O Brn3A pertence à família de fatores de transcrição de domínio POU, classe 4, altamente expresso no desenvolvimento do sistema nervoso periférico (gânglios da raiz dorsal, gânglio trigeminal e gânglios sensoriais cervicais), certas regiões do sistema nervoso central, células ganglionares da retina e nas células das linhagens linfocíticas B e T (XIANG *et al.*, 1995). Essa família demonstrou desempenhar papéis importantes na diferenciação, sobrevivência e alongamento axonal durante o desenvolvimento de CGRs. O anticorpo anti-Brn3A tem sido amplamente usado para identificar CGRs em ratos (BUCKINGHAM *et al.*, 2008; BERNSTEIN *et al.*, 2006; NADAL-NICOLÁS *et al.*, 2009).

Os cortes foram lavados seis vezes, cinco minutos cada, com tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 + 0,3% Triton X-100 com o objetivo de permeabilizar o tecido, em temperatura ambiente. A fim de bloquear ligações inespecíficas, as seções foram mantidas por uma hora em albumina de soro bovina (em inglês, *Bovine Serum Albumin*, BSA) a 5%. Em seguida, foram incubados com 15 µL de anticorpo primário produzido em camundongo anti-Brn3A (1:100, monoclonal, IgG, Santa Cruz) diluído em PBS *overnight* em uma câmara úmida a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas seis vezes com PBS, cinco minutos cada. Para

a revelação foi usado o anticorpo secundário produzido em cabra anti-camundongo (1:400) conjugado com o fluóforo Alexa 555, durante 1 hora, à temperatura ambiente. As lâminas foram posteriormente montadas em galato de n-propila. As seções de ambos os grupos experimentais foram imunomarcadas simultaneamente para reduzir a variabilidade.

3.6 Contagem de células

A contagem de células foi feita a partir de áreas semelhantes de cortes longitudinais obtidos a partir da metade superior e inferior da retina. Pelo menos quatro seções foram analisadas por retina. Os cortes imunomarcados com anticorpo anti-Brn3A foram fotografados utilizando um microscópio de imunofluorescência (Olympus BX40) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP71). A quantificação do número de células Brn3A+ dentro da CCG foi feita a partir de imagens de retina digitalizadas (30-bit) tomadas a uma ampliação de 400×. Somente aquelas células com uma membrana contínua bem delineada dentro de um determinado plano focal foram incluídas na análise. O número de células dentro de três quadrados de 1360 pixel × 1024 pixel na retina de animais HI e SH foi contado por um investigador cego à condição experimental. As células cujas somas cruzaram uma borda do quadrado também foram incluídas na análise. O número de células contadas em uma retina particular foi calculado para fornecer um valor único. Os dados são apresentados com média ± SEM da contagem celular média de pelo menos quatro retinas.

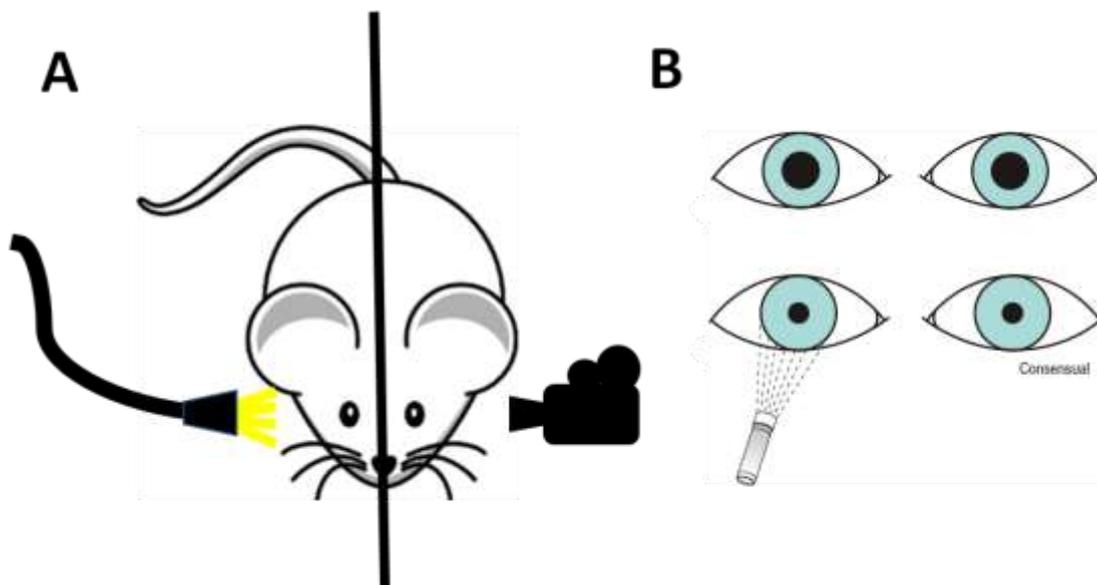
3.7 Reflexo pupilar à luz

Antes da realização do teste os animais foram adaptados ao escuro durante uma hora. Além disso, a execução do experimento foi restrita a aproximadamente 6h antes das luzes do biotério serem apagadas. Foi feita sedação com Avertin® (tribromoetanol, 0,3 mg/Kg i.p.). Um olho de cada animal foi gravado com câmera Sony HDR-XR200V CCD de visão noturna, equipada com uma lente de 30mm em um plano paralelo à córnea (Figura 7). Estímulos de luz (40 ou 200 lux) foram aplicados no olho oposto durante um minuto por uma fonte de luz de quartzo-halogênio e transmitidos ao longo de uma fibra óptica de quartzo. Um cone de

plástico preto foi fixado ao fim da fibra óptica para evitar que a luz atingisse o olho oposto (gravado). O comprimento de onda e a intensidade da luz foram controlados com filtros de densidade neutra e monocromáticos. Para todos os testes, foram coletados vídeos de 90 segundos de duração, com 15 segundos de linha de base antes da estimulação, seguidos de 60 segundos de estímulo de luz contínua e 15 segundos de escuridão. A área da pupila foi medida a intervalos de 5s por um observador cego à condição experimental dos animais usando o software Image J. Para corrigir as variações individuais na área da pupila adaptada ao escuro, os dados foram normalizados para a área da pupila antes do início da incidência da luz.

Para verificar a viabilidade muscular ciliar um grupo separado de ratos HI e SH, recebeu o agonista colinérgico carbacol para induzir a máxima contração pupilar. Animais adaptados ao escuro por uma hora receberam a aplicação tópica de carbacol (0,1M em 100 μ L de PBS) no olho esquerdo. Após cinco minutos ambos os olhos foram gravados por um minuto.

Figura 7: Esquema do aparato utilizado para realização do teste de reflexo pupilar.



Legenda: (A) Os olhos do animal são isolados com auxílio de um tecido fosco (barra preta). A luz foi direcionada para apenas um dos olhos, enquanto o outro era gravado com uma câmera no modo noturno. (B) Quando a luz incide em um dos olhos do animal, a pupila contrai. Como o reflexo pupilar é um processo fisiológico consensual, a pupila do outro olho também contrairá. Após a luz ser apagada, o diâmetro pupilar volta a aumentar.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

3.8 Teste de Aversão ao Precipício

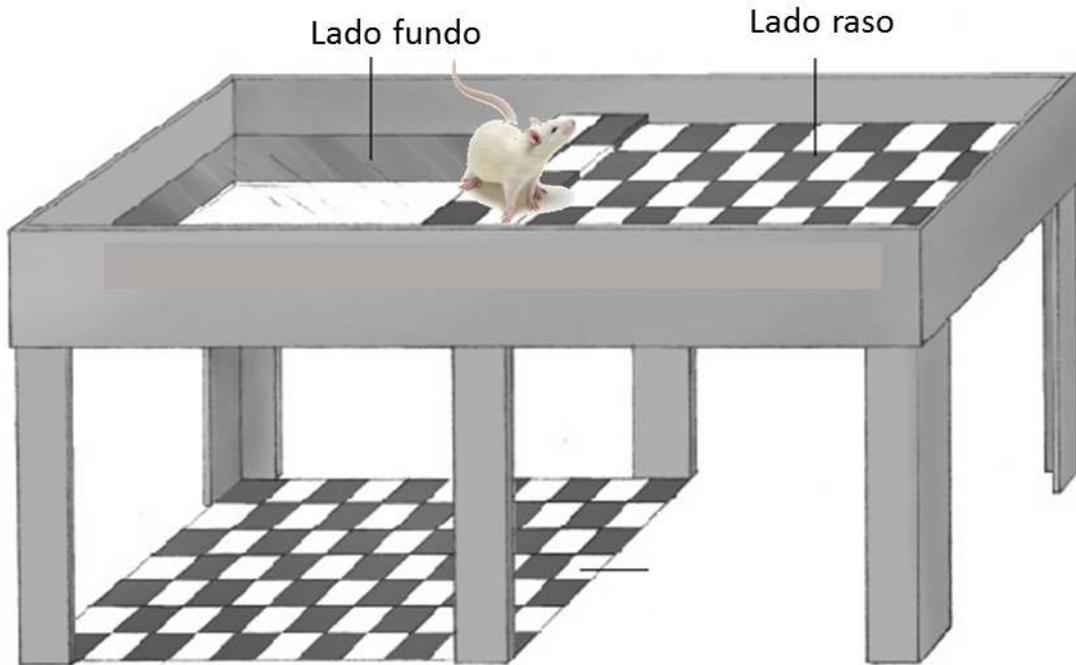
Para avaliar a capacidade visual dos animais submetidos à hipóxia-isquemia pré-natal, utilizamos o teste de percepção de profundidade chamado “Aversão ao Precipício” (em inglês, *Visual Cliff*). O experimento, elaborado por E.J. Gibson e R.D. Walk em 1960, embora originalmente desenvolvido para avaliar a capacidade de percepção de profundidade de bebês, foi posteriormente adaptado para testar a capacidade visual de várias espécies, inclusive roedores (ISLAM, 1975; TEES, 1976; BAUER, 1973; ALI *et al.*, 1986).

Resumidamente, o teste foi realizado em uma caixa de madeira com as proporções 86cm altura X 63,8cm de largura X 115,2cm de comprimento, tendo uma plataforma interna de 54cm de altura X 63,5 de largura X 57,6cm de comprimento, e comportando um acrílico com as dimensões de 63,5cm de largura X 115cm de comprimento (Figura 8). Todo o fundo da caixa, incluindo a plataforma, era coberta por um papel adesivo quadriculado, preto e branco. Além disso, no meio da caixa, sobre a plataforma de acrílico, havia um platô de madeira onde o animal era apoiado. O platô estava entre a plataforma interna (considerado o lado raso, onde o quadriculado se encontrava próximo do animal) e o lado onde só havia o acrílico (lado fundo, onde o quadriculado se encontrava distante).

Durante três dias consecutivos antes do teste, os animais tinham suas vibrissas cortadas e eram ambientados à sala de experimentação durante 30 minutos. A caixa e o platô onde eram colocados os animais foram higienizadas com álcool 20% antes do teste de cada animal. No dia do experimento os animais foram ambientados por 20 minutos antes do seu início. Cabe ressaltar que os animais foram retirados do biotério, sempre, 30 minutos após o apagar das luzes. O animal era colocado no platô e o tempo de espera para escolha dos lados era de até três minutos. Caso o rato não descesse do platô, era retirado do aparato.

Foi utilizada uma lâmpada direcionada para o teto da sala para prover iluminação homogênea e difusa com o intuito de evitar reflexos no acrílico. A câmera Sony HDR-CX190 foi utilizada para filmagem, sustentada em um tripé para uma visualização da superfície da caixa por completo.

Figura 8: Esquema do aparato utilizado para a realização do teste de aversão ao precipício.



Legenda: O animal em uma haste no centro do aparato. Um lado é revestido com um papel quadriculado (lado raso), do outro, pelo acrílico (lado fundo).

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

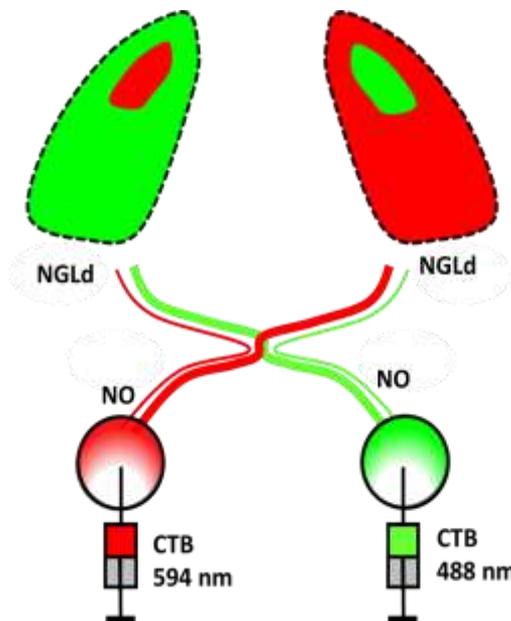
3.9 Marcação anterógrada das projeções retinogênicas e do nervo óptico

Injeções intraoculares da subunidade B da toxina da cólera (em inglês, *cholera toxin B subunit*, CTB) conjugada a fluoróforos Alexa Fluor foram feitas para visualizar as projeções das células ganglionares da retina no nervo óptico e no núcleo geniculado lateral dorsal.

Em P30, após anestesia por inalação de isoflurano, a esclera e a córnea dos olhos dos ratos foram perfuradas com uma pipeta de vidro para a drenagem de uma porção do humor vítreo. Injeções intraoculares de uma solução aquosa de CTB (1%) conjugadas a fluoróforos “Alexa Flúor” de comprimento de onda 488 nm (verde) ou 594 nm (vermelho) foram feitas utilizando uma segunda pipeta conectada a um sistema de injeção por pressão (KRAHE; GUIDO, 2011). Para visualização das projeções retinianas de cada olho no mesmo hemisfério cerebral, os animais receberam injeções de CTB conjugada ao Alexa Fluor 488 em um olho e Alexa Fluor 594 no outro (Figura 9). Quatro dias após as injeções, os animais foram

anestesiados e perfundidos com solução salina seguida de paraformaldeído (4%) por via intracardíaca. Os encéfalos foram dissecados e, após 24h de pós-fixação, criopreservados e seccionados (20 μm) com auxílio de um criótomo. Os cortes foram fotografados utilizando um microscópio de imunofluorescência (Olympus BX40) acoplado a uma câmera digital (Olympus DP71).

Figura 9: Esquema das injeções realizadas para marcação das projeções retinianas.



Legenda: Esquema da topografia das projeções retinianas em regiões alvo através de injeções intraoculares do marcador anterógrado CTB conjugado a Alexa Fluor 488 nm (verde, olho direito) ou 594 nm (vermelho, olho esquerdo). (NGLd) núcleo geniculado lateral dorsal e (NO) nervo óptico.

Fonte: KRAHE, T.E., 2016.

3.10 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As comparações foram realizadas utilizando análises de variância univariadas ou repetidas de variância (uANOVA ou rANOVA, respectivamente) quando apropriado. Grupo (HI ou SH) e sexo foram considerados como fatores entre indivíduos. Quando os efeitos significativos do grupo e do sexo, ou as interações entre estes foram detectados em rANOVA, foram realizadas ANOVA adequadas de menor ordem, seguidas do teste de comparação múltipla de Bonferroni. As diferenças entre os grupos

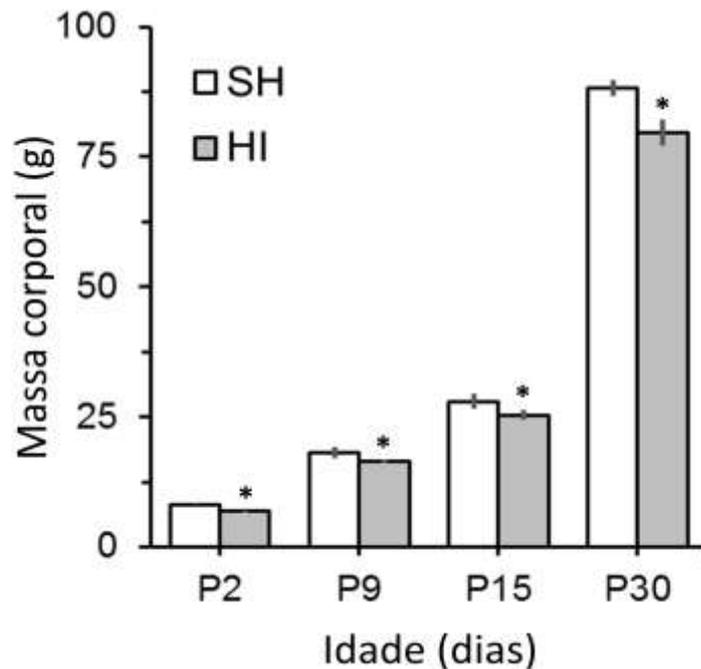
experimentais também foram determinadas usando Wilcoxon Mann-Whitney U e testes exatos de Fisher. A significância foi assumida no nível de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 HI apresenta perda de massa corporal

Após o nascimento, os filhotes foram pesados em P2, P9, P15 e P30. Foi observada uma diferença significativa entre a massa corporal dos animais SH e HI, tendo o grupo HI apresentado uma menor massa corporal em relação ao grupo SH em todas as idades estudadas (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Evolução da massa corporal (em gramas) para ratos HI e SH desde o dia pós-natal P2 até P30.



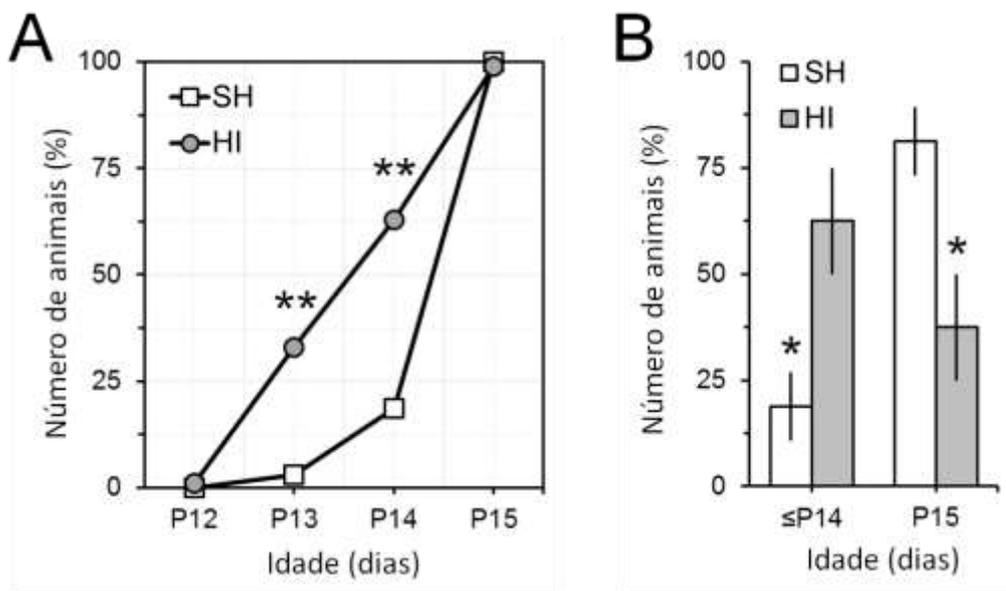
Legenda: Nota-se que a HI pré-natal resultou em uma redução significativa do peso corporal em todas as idades. HI, n = 4 camadas de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas por ninhada); SH, n = 4 camadas de 7-8 animais (4 machos e 3-4 fêmeas por ninhada). ANOVA, * p <0,05.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

4.2 Animais HI apresentam abertura de olhos antecipada

A abertura de olhos é considerada um marco no desenvolvimento (HUBMACHER, 2014; INAGAKI, 2014), provocando mudanças morfológicas na retina, incluindo a camada ganglionar e nervo óptico de ratos (VROLYK, 2017). Os animais que sofreram HI pré-natal abriram os olhos antes dos animais do grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 2: Tempo para a abertura de olhos dos animais SH e HI.



Legenda: (A) Porcentagem de animais com ambos os olhos abertos em diferentes idades pós-natal. (B) Porcentagem de animais com os dois olhos abertos antes e após P15. HI, n = 4 camadas de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas por ninhada); SH, n = 4 camadas de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas por ninhada). ANOVA. * p < 0,05; ** p < 0,01.

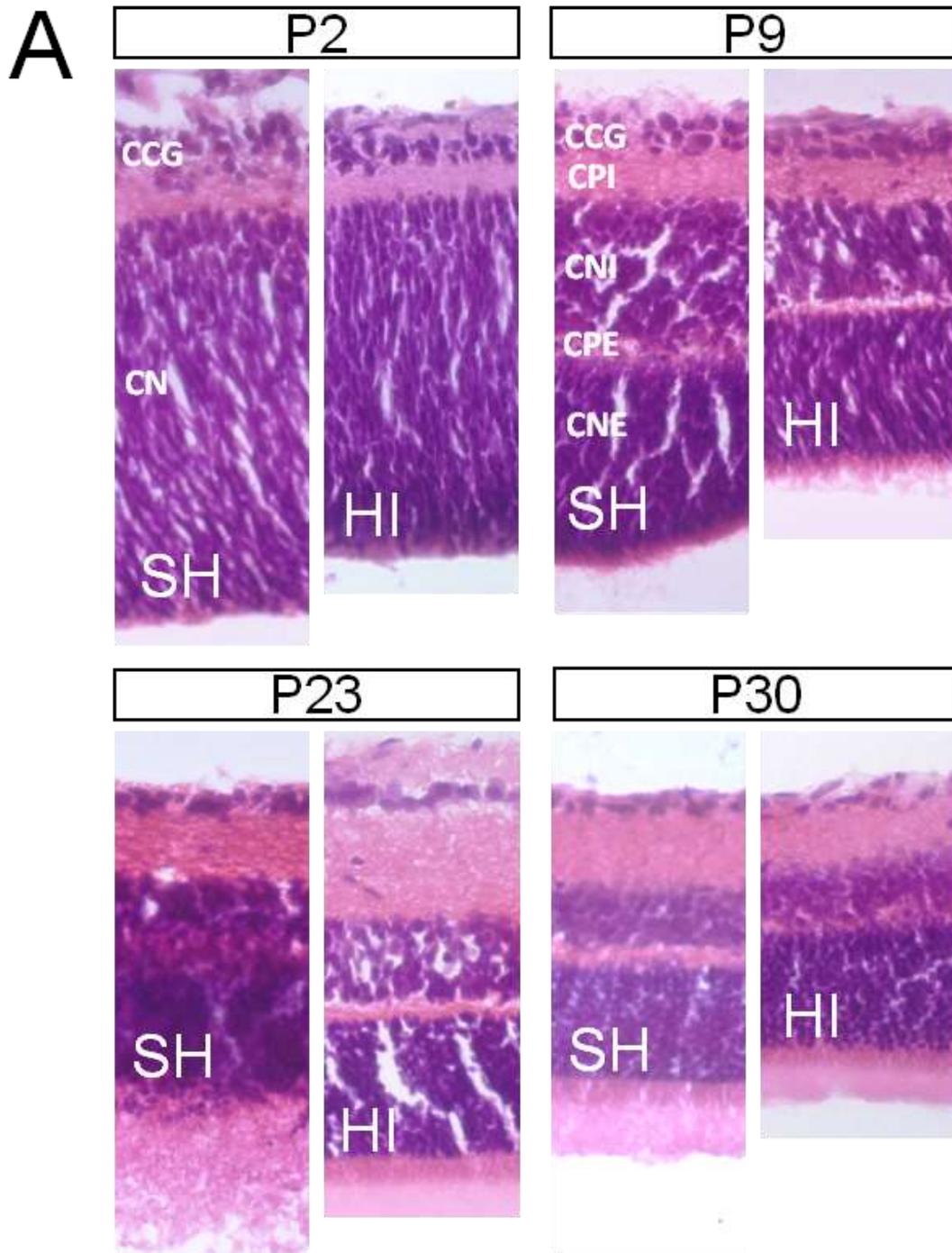
Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

4.3 HI apresenta redução no número de células na CCG

Avaliamos o efeito de HI pré-natal no número de células da CCG por meio da coloração de HE nas idades P2, P9, P23 e P30. Não foram observadas diferenças grosseiras na citoarquitetura e nem no padrão laminar da retina dos animais HI em relação ao grupo SH. Em ambos os grupos existe diferença no número de camadas nas diferentes idades. Tendo P2 apenas duas, CCG e camada neuroblástica, e P30, cinco camadas, CCG, CPI, CNI, CPE e CNE (Figura 10).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos no número de células na CCG em nenhuma idade, como mostra o gráfico 3. Mas é importante notar que, tanto em SH, quanto em HI, observou-se um decréscimo natural no número de células nessa camada, em ambos os grupos, durante o desenvolvimento.

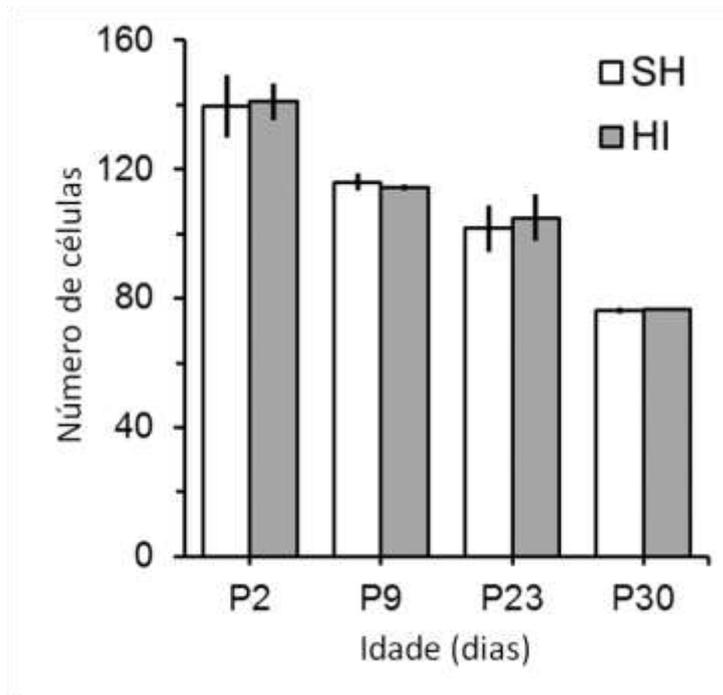
Figura 10: Seções transversais de retina de animais SH e HI coradas com hematoxilina e eosina.



Legenda: Fotomicrografias representativas de seções transversais marcadas com HE da retina de ratos HI e SH em diferentes idades pós-natal (P). Camada de células ganglionares (CCG); camada neuroblástica (CN); camada plexiforme interna (CPI); camada nuclear interna (CNI); camada plexiforme externa (CPE); camada nuclear externa (CNE). HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade (para ambos os grupos, média de 4 seções por animal. Barra de calibração: 20µm.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

Gráfico 3: Número de células na CCG de animais HI e SH em diferentes idades pós-natal.



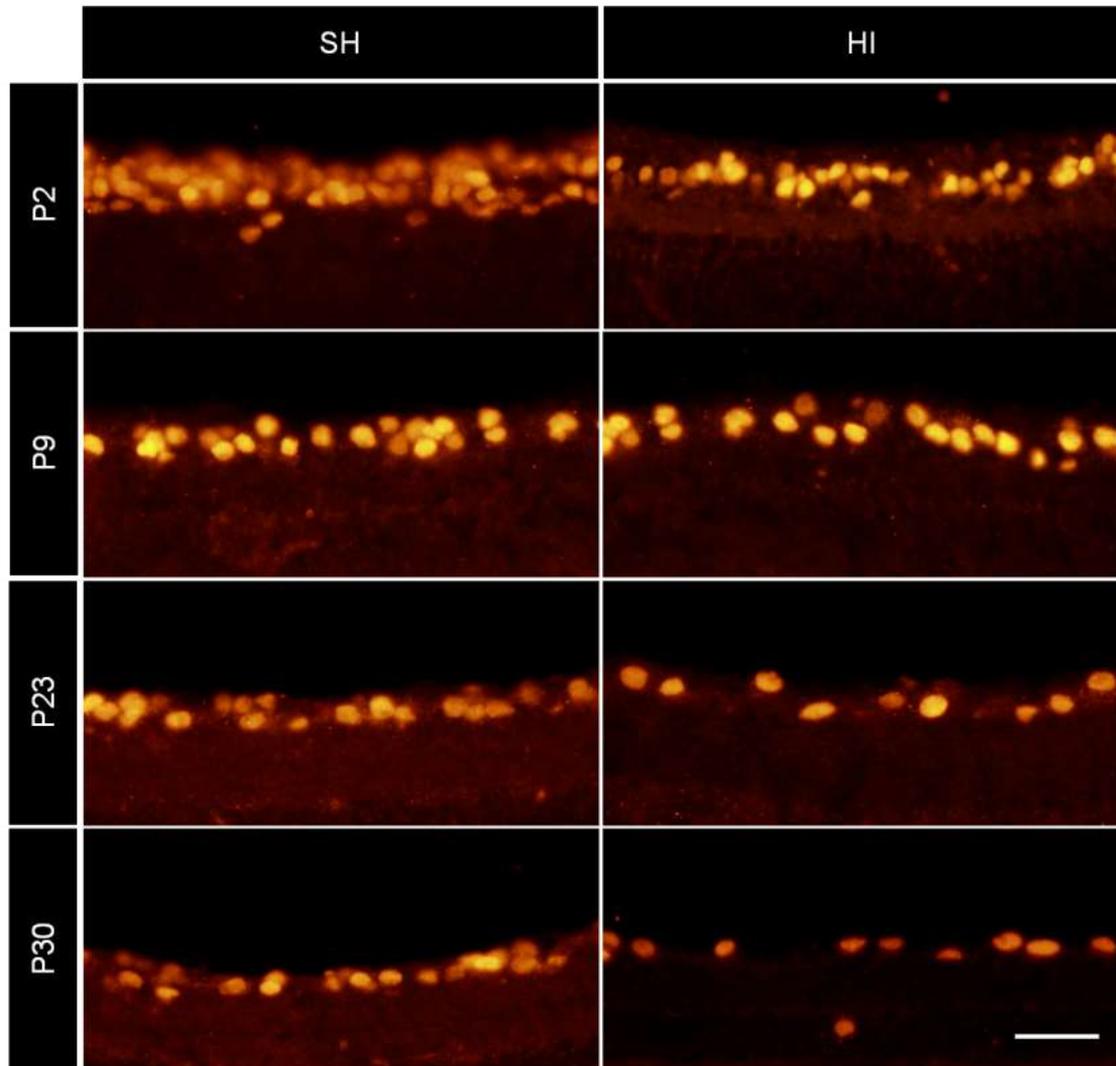
Legenda: Não foi observada diferença no número de células na CCG em ambos os grupos. Porém, como pode ser visto, tanto SH, quanto HI apresentaram uma diminuição no número de células nessa camada ao longo do desenvolvimento. HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade (para ambos os grupos, média de 4 seções por animal). Dados apresentados como média \pm EPM.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

4.4 Os animais HI tem redução no número de CGRs

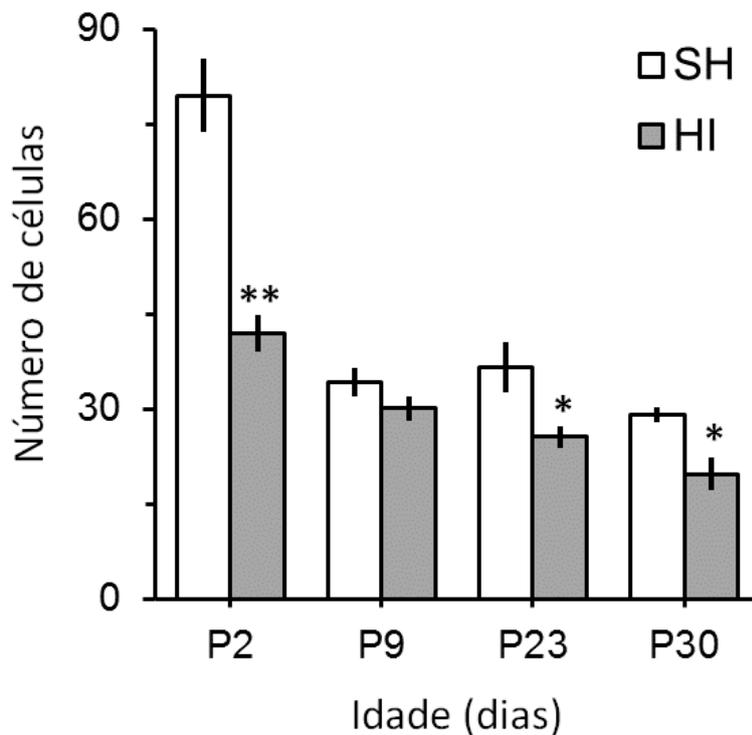
Apesar de não ter sido observada diferença no número de células na CCG de ambos os grupos experimentais (contagem feita nas retinas coradas pelo método de HE, Gráfico 3), quando realizamos a imunomarcagem com o anticorpo Brn3A (Figura 11), marcador de células ganglionares, observamos menor número de células marcadas nas retinas do grupo HI, nas idades P2, P23 e P30, quando comparadas ao grupo SH (Gráfico 4). Logo, animais submetidos à HI pré-natal apresentaram menor número de CGRs em relação ao grupo controle.

Figura 11: Imunomarcacão para Brn3A nas retinas de ratos em diferentes idades pós-natal.



Legenda: Fotomicrografias representativas de seções transversais da retina mostrando CGRs, imunomarcadas com Brn3A, de ratos HI e SH em diferentes idades pós-natal (P). HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade (para ambos os grupos, média de 4 seções por animal). Barra de calibração, 20 μ m.
Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

Gráfico 4: Número de CGRs para grupos HI e SH em diferentes idades pós-natal.



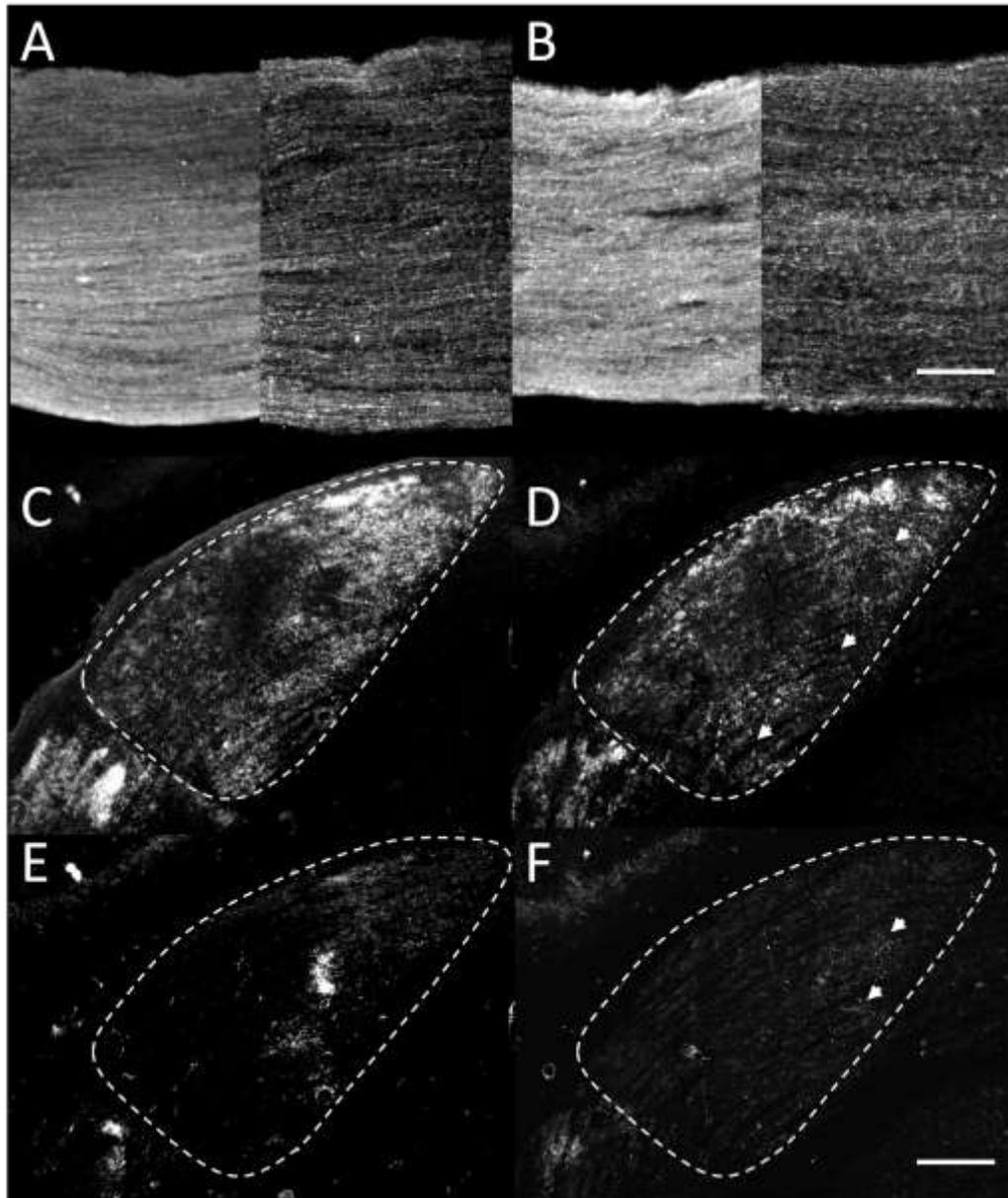
Legenda: P2, P23 e P30 apresentaram diminuição no número de células ganglionares da retina. HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade (para ambos os grupos, média de 4 seções por animal). Dados apresentados com média \pm EPM. Teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

4.5 HI causa alteração no nervo óptico e no NGLd

Com o intuito de avaliarmos as alterações causadas pela HI pré-natal no nervo óptico e na topografia das projeções retinianas no NGLd, foram realizadas injeções intravítreo de CTB em três animais de cada grupo, no trigésimo dia pós-natal. A figura 13 (A-B) mostra que ambos os nervos ópticos de animais HI sofreram redução na espessura em relação ao grupo controle. Além disso, também é observado na Figura 13 (C-F) que o NGLd – um dos maiores alvos das projeções axonais das CGRs (BULFONE *et al.*, 1998) – de animais HI apresenta redução das projeções retinianas quando comparado ao animal SH. Essa diferença foi observada tanto nas projeções ipsolaterais (Figura 12 (C-D)), como nas contralaterais (Figura 12 (E-F)).

Figura 12: Marcação com CTB do nervo óptico e do NGLd de animais SH e HI em P30.



Legenda: Fotomicrografias representativas das seções, marcadas com CTB, do nervo óptico e da NGLd de animais SH e HI, em P30. (A, B), seções longitudinais do nervo óptico de ratos SH (A) e HI (B) em P30. Observe que o nervo óptico do animal HI é mais fino (B) do que o controle (A). (C-F) - Seções coronais do NGLd (delineado) mostrando a marcação das projeções contralaterais (C e D) e ipsolaterais (E e F) de ratos SH (C e E) e HI (D e F). Observe que a marcação de fluorescência é menos intensa para HI (D e F, cabeças de seta) do que para o controle (C e E). Imagens em (C-F) são dos mesmos animais retratados em (A e B). Barra de calibração: 20 μ m.

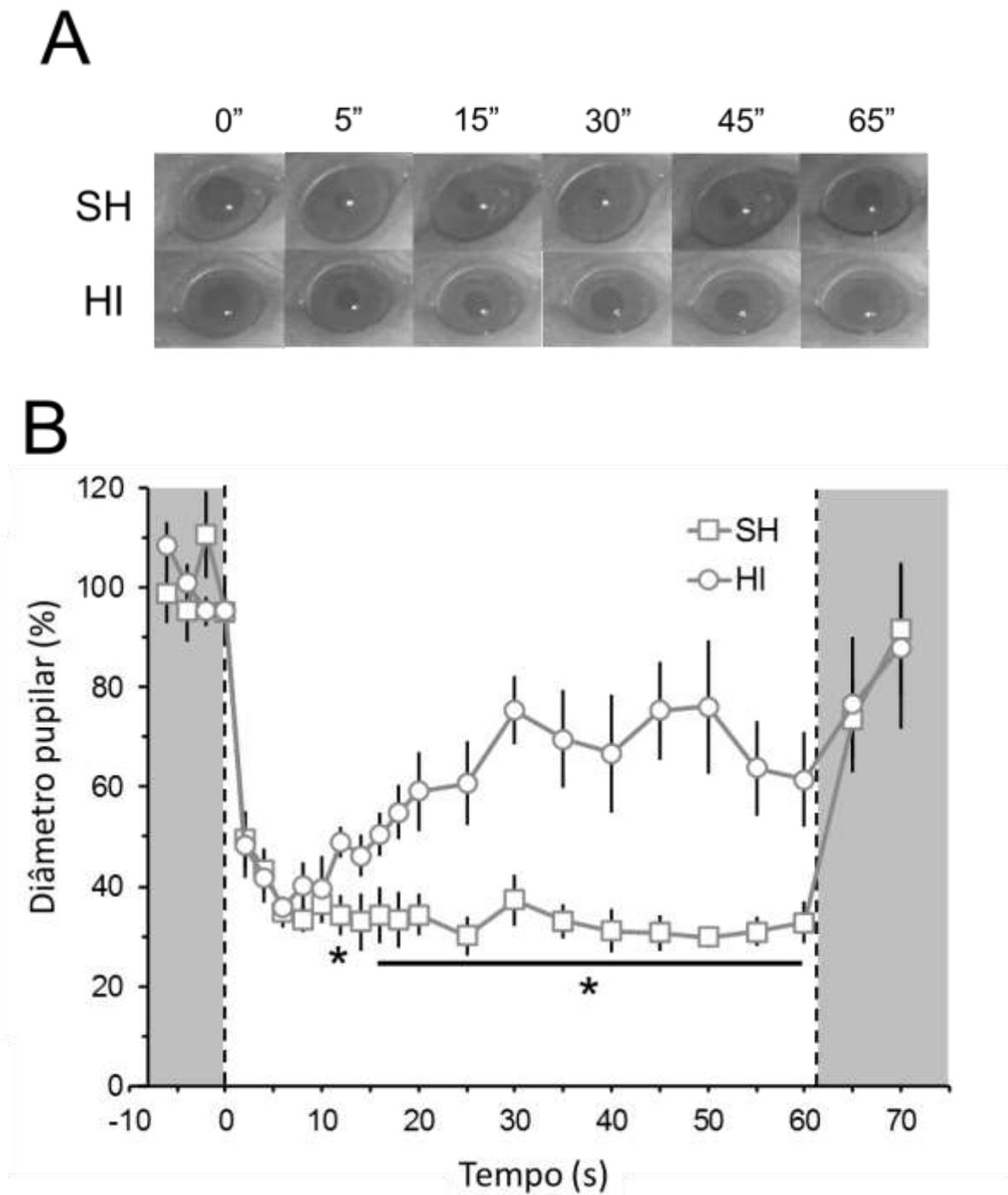
Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

4.6 HI pré-natal causa alteração no reflexo pupilar

Como podemos ver na Figura 14, imediatamente após o início do estímulo luminoso (intensidade luminosa de 40 lux), as pupilas dos animais HI tiveram constrição semelhante àquela observada nos animais controle. Entretanto, logo em seguida foi constatado que, ao contrário dos animais do grupo SH, os animais HI foram incapazes de sustentar a contração pupilar com a continuação do estímulo luminoso. Note que após a interrupção do estímulo, as pupilas dos animais de ambos os grupos apresentaram diâmetro semelhante. Em contrapartida, quando o teste do RPL foi realizado com intensidade luminosa de 200 lux, não observamos diferença entre os grupos animais (Gráfico 5).

Realizamos também a avaliação da constrição pupilar utilizando o agonista colinérgico carbacol. Essa substância atua no músculo ciliar fazendo com que a pupila contraia ao máximo. Esse teste é importante, pois conseguimos perceber se o efeito de HI está relacionado com o sistema visual ou com a musculatura ciliar. A Figura 15 mostra que não existe diferença significativa entre os grupos no reflexo pupilar após o uso tópico de carbacol. Além disso, podemos perceber que, em ambos os grupos, a pupila se contrai ao máximo.

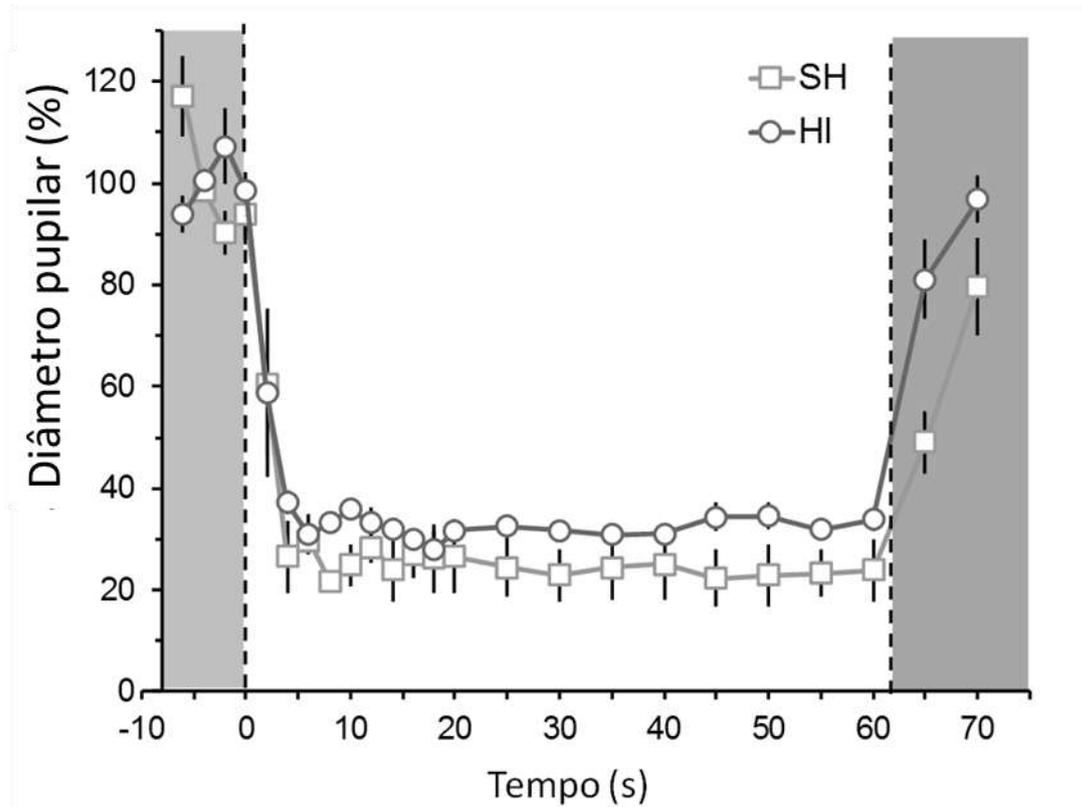
Figura 13: Reflexo pupilar à luz (RPL), de intensidade 40 lux, de animais HI e SH em P30.



Legenda: (A) Imagens representativas da constrição pupilar e sustentabilidade do RPL, na intensidade de 40 lux, ao longo do tempo para ratos HI e SH. (B) Porcentagem média da constrição consensual da pupila ao longo do tempo para ratos HI e SH. As áreas sombreadas representam períodos em que os animais estavam na escuridão e as linhas tracejadas indicam quando o estímulo da luz foi ligado (esquerda) e desligado (direita). HI, n = 7 animais; SH, n = 8 animais. ANOVA, * p < 0,05 para todas as comparações.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

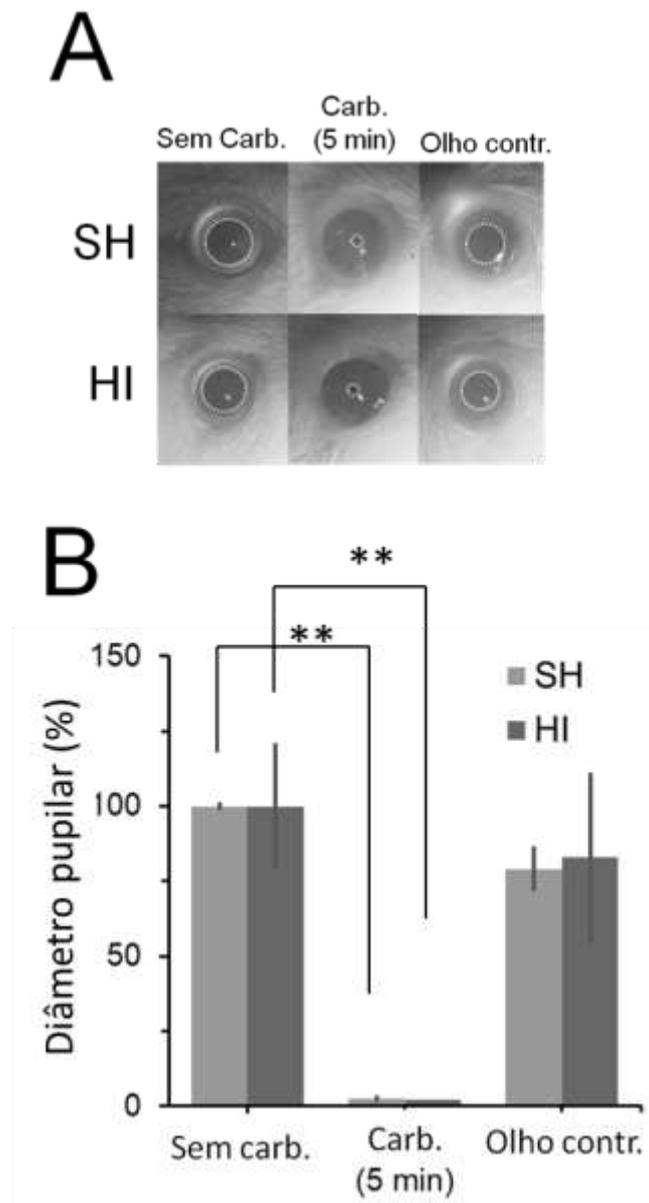
Gráfico 5: RPL com luz de intensidade 200 lux, de animais HI e SH em P30.



Legenda: Porcentagem média da constrição consensual da pupila ao longo do tempo para ratos HI e SH. As áreas sombreadas representam períodos em que os animais estavam na escuridão e as linhas tracejadas indicam quando o estímulo da luz foi ligado (esquerda) e desligado (direita). HI, n = 4 animais; SH, n = 4 animais. ANOVA, * p < 0,05 para todas as comparações.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

Figura 14: Constrição pupilar induzida por carbacol.



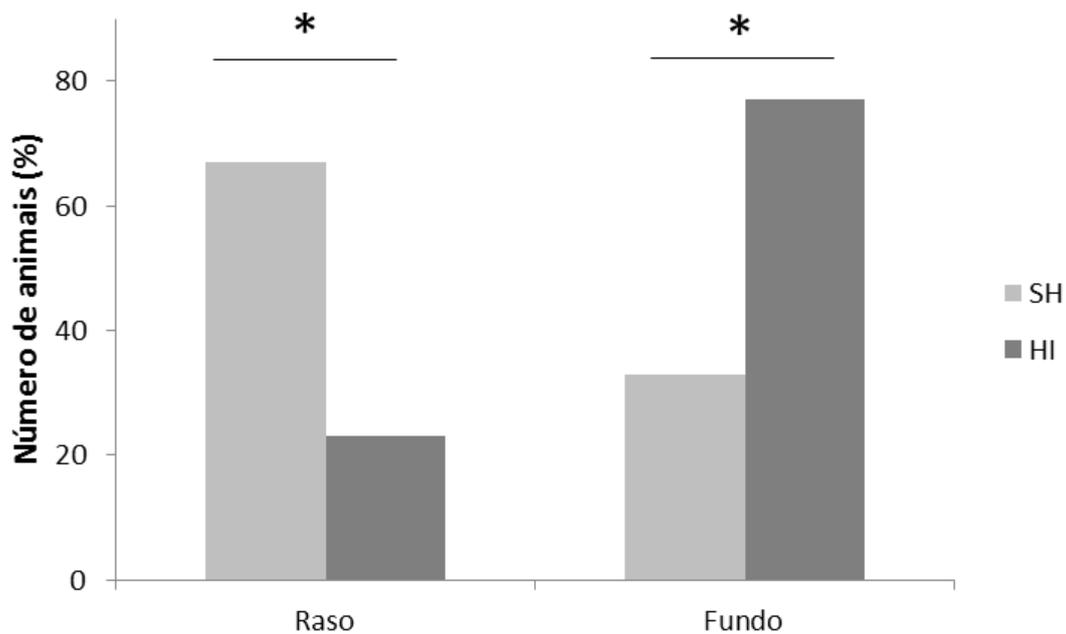
Legenda: Contração da pupila após a aplicação de carbacol no olho direito do animal. (A) Imagens representativas da contração pupilar dos olhos que receberam o carbacol. Além disso, imagens dos olhos controle, onde não foi aplicada a substância. O experimento foi realizado em animais de ambos os grupos, em P30. Note que cinco minutos após a aplicação do carbacol a pupila contraiu totalmente. Diferente do olho esquerdo, que não recebeu a substância, cuja pupila não sofreu contração. ANOVA, * * $p < 0,001$ para todas as comparações.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018

4.7 Animais HI apresentam alterações no teste de aversão ao precipício

Como parâmetro de avaliação da via formadora de imagem, submetemos os ratos ao teste de aversão à profundidade, que é utilizado como teste de capacidade visual em diversas espécies de mamíferos, inclusive em humanos. Conforme esperado, os animais SH desceram, em sua maioria, para o lado raso. Em contrapartida, os animais HI tiveram preferência pelo lado profundo.

Gráfico 6: Preferência dos animais P30, de ambos os grupos, no teste de aversão a profundidade.



Legenda: O gráfico representa a preferência dos ratos SH e HI pelo lado raso ou profundo da arena do teste de aversão ao precipício. Note que os animais SH tiveram maior preferência pelo lado raso, enquanto os animais HI tiveram maior preferência pelo lado fundo. SH, n = 16 animais; HI, n = 29 animais. Teste exato de Fisher, * p<0,01.

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que ratos submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal sofrem alterações em marcos do desenvolvimento, como redução de crescimento e abertura de olhos antecipada. Quanto à menor massa corporal, nossos resultados são corroborados por estudos anteriores usando modelos de HI, tanto pré- quanto perinatal (GLEED; MORTOLA, 1991; MARKUSSEN; ORIRSTLAND, 1986). Esse dado também se confirma entre os humanos. Se tratando de crianças, dos casos de hipóxia-isquemia perinatal, mais de 60% nascem prematuras ou com baixo peso (VANNUCCI *et al.*, 2000; ZANELLI *et al.*, 2008). Além disso, Mortola e Naso, em 1995, descreveram que animais HI (em um modelo de câmara hipobárica realizado nos últimos dias de gestação) possuem menor quantidade de tecido adiposo marrom. Uma das explicações estaria relacionada a alterações no comportamento materno. Porém, vale lembrar que, no estudo de Mortola e Naso (1995) a mãe também passa por hipóxia.

Em contrapartida, a abertura de olhos antecipada em animais HI é contraditória em relação à literatura. Em um modelo de hipóxia por oclusão bilateral da carótida, Fan, em 2005, demonstrou efeitos de HI no desenvolvimento físico de ratos, incluindo abertura de olhos tardia e massa corporal inferior em relação ao SH. Porém, em 1976, McCullough, mostraram que ratos submetidos a um modelo de HI pré-natal (grávidas expostas a 13% de oxigênio) abriam os olhos antes que os animais controle. Entretanto, neste trabalho nenhuma hipótese foi levantada a respeito desse resultado.

Atualmente, é conhecido o papel do fator de crescimento epidermal (em inglês, *epidermal growth factor*, EGF) na divisão e diferenciação celular durante o desenvolvimento animal (RONGO, 2011). Moore, em 1986, mostrou que ratos injetados com EGF apresentavam antecipação de alguns processos físicos de desenvolvimento, citando, inclusive, a abertura de olhos e o apontamento dos dentes. Isso se deve, provavelmente, aos efeitos tróficos de EGF em vários tecidos em desenvolvimento (DYMSZA, 1964; MALO; MÉNARD, 1982), já descritos em rato e coelho (CATTERTON *et al.*, 1979). Estudos também sugerem que o EGF atua principalmente em células-tronco promovendo proliferação e diferenciação terminal (BEAULIEU, 1981). Tanaka, em 1999, demonstrou que, ratos submetidos à injúria hipóxico-isquêmica apresentam aumento do receptor de EGF. Portanto, uma possibilidade seria que os animais HI no nosso trabalho apresentem aumento da expressão do EGF. Estudos posteriores são necessários para confirmar essa hipótese.

Neste trabalho mostramos que a retina de ratos submetidos ao insulto de hipóxia-isquemia pré-natal não apresenta diferença significativa na quantidade de corpos celulares, na CCG, corados com HE. Entretanto, nossos resultados revelaram uma diminuição no número de CGRs nesta camada nas idades analisadas. Em conjunto, estes resultados sugerem um efeito compensatório no número de células por outro tipo celular nesta camada. Os astrócitos seriam uma possibilidade. Nos ratos e na maioria dos mamíferos, os astrócitos retinianos estão localizados principalmente na camada de fibras nervosas e na CCG (RAMIREZ *et al.*, 1994; GALLEGO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011). Essas células são responsáveis por manter a homeostase do tecido nervoso e por controlar, proteger e apoiar a função neuronal (PEKONY *et al.*, 2014). Insultos como trauma, dano isquêmico, neuroinflamação ou neurodegeneração podem gerar respostas astrocitárias, que possuem como objetivo a neuroproteção da retina (PENG *et al.*, 2014; LEWIS; FISHER, 2003). Porém, a astrogliose também pode contribuir para um ambiente patogênico (PEKONY; PEKNA, 2014). As características da astrogliose reativa são uma explosão no número de astrócitos, aumento do número e do comprimento dos processos astrogliais, hipertrofia, migração e aumento da expressão de componentes do citoesqueleto, tais como a proteína glial fibrilar ácida (em inglês, glial fibrillary acidic protein, GFAP), vimentina, e nestina (RAMIREZ *et al.*, 2001; PENG *et al.*, 2014; CAHOY *et al.*, 2008). Trabalhos anteriores demonstraram um aumento da resposta astrogliose e expressão de GFAP em ratos que sofreram hipóxia-isquemia perinatal em modelos semelhantes de HI (ROBINSON *et al.*, 2005) ou no mesmo modelo usado nesse trabalho (SAVIGNON *et al.*, 2012). De modo semelhante, esse fenômeno também foi observado em outras patologias, tais como, a retinopatia diabética, glaucoma e durante processos inflamatórios (AMIN *et al.*, 1997; HAMMES *et al.*, 1995; HIRATA *et al.*, 1997; PANNICKE *et al.*, 2005; RUNGGER-BRÄNDLE *et al.*, 2000; FRANCKE *et al.*, 1997; TEZEL *et al.*, 2003).

Vale mencionar a perda de células na CCG no decorrer das idades pós-natal, em ambos os grupos, que nossos dados mostram. A perda natural de células durante o desenvolvimento é uma característica comum em diversas regiões do SNC, incluindo a retina (NISHI; BERG, 1979). Na retina de ratos, normalmente começa a ocorrer por volta do oitavo dia pós-natal (MARQUARDT; GRUSS, 2002).

Ressalta-se a perda de células ganglionares na retina hipóxico-isquêmica em nossos resultados. Outros trabalhos relacionados ao dano hipóxico na retina durante o desenvolvimento mostram que estas células são sensíveis a injúrias hipóxicas (KAUR *et al.*, 2009). Associado a essa perda, observamos uma menor espessura do nervo óptico em animais

HI. O nervo óptico é formado pelos axônios das CGR. O principal alvo das projeções retinianas é o NGLd, que, sob uma análise qualitativa, se mostra, no grupo HI, com menor número de projeções.

Vários fatores são sugeridos como explicação para a perda de CGR, dentre eles a citotoxicidade causada pelo aumento do fator de crescimento endotelial vascular (em inglês, VEGF), do óxido nítrico (ON), de citocinas inflamatórias, de glutamato e, também, pelo estresse oxidativo, todos esses já descritos como alterados após eventos de hipóxia afetando a função e a estrutura da retina. VEGF, também conhecido como fator de permeabilidade vascular (SENGER *et al.*, 1983), é considerado peça chave na angiogênese, tanto em momentos de homeostasia, quanto em situações de injúrias (FERRARA, 2001). Esta molécula se liga a dois receptores de tirosina quinase, tirosina tipo VEGFR-1 e VEGFR-2 para exercer suas ações (DE VRIES *et al.*, 1992). O VEGF já foi relatado como um possível candidato para o desenvolvimento de edema vasogênico cerebral durante eventos de hipóxia, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (SCHOCH *et al.*, 2002). Tendo sua expressão gênica aumentada em 3-12 vezes durante injúria hipóxica no cérebro (STEIN *et al.*, 1995). Acredita-se que os astrócitos expressem VEGF (KAUR *et al.*, 2006), e que estes interagem com os receptores de VEGF nos vasos sanguíneos e contribuam para a ruptura da barreira hematoencefálica (ZHANG *et al.*, 2002). Semelhante ao cérebro, aumento da produção de VEGF e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade na barreira hematorretiniana foi relatada, e tiveram seus danos revertidos com administração de melatonina (KAUR *et al.*, 2006). Além do seu papel no aumento da permeabilidade vascular, o VEGF também foi descrito como um mediador inflamatório observado na isquemia cerebral (CROLL *et al.*, 2004). Com a barreira hemoencefálica mais permeável, o status imunoprivilegiado do cérebro é alterado (PROESCHOLDT *et al.*, 1999). VEGF aumenta a adesão de leucócitos nas paredes vasculares por meio da maior circulação de moléculas de adesão intercelulares (ICAM-1), tanto no cérebro, quanto na retina (MELDER *et al.*, 1996). Já foi relatado por Joussem e colaboradores, em 2002, a supressão da inflamação na retina após a inibição do VEGF.

Outra possibilidade de explicação para os danos retinianos e a perda de células ganglionares é o aumento na expressão e circulação de óxido nítrico. O óxido nítrico (ON) é conhecido pelo seu papel importante na patogênese de lesão neuronal durante hipoxia-isquemia. ON é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) da L-arginina. Existem três isoformas de NOS: neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são constitutivamente expressos, e induzíveis (iNOS). As atividades de nNOS e eNOS são estimuladas por aumentos de cálcio intracelular enquanto iNOS é independente do cálcio, e o ON gerado a

partir desta isoforma é conhecido por mediar funções imunológicas. A expressão de todas as isoformas já foi relatada na retina como resposta à hipóxia (KAUR *et al.*, 2006). Apesar do ON ter sido descrito pelo seu papel neuroprotetor (IADECOLA, 1997), como é o caso da eNOS, que mantém a perfusão retiniana em condições hipóxico-isquêmicas (TODA *et al.*, 2007), por aumentar a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo (BOLAÑOS; ALMEIDA, 1999). Existem também efeitos maléficos, como o envolvimento da eNOS com a indução de VEGF (FUKUMURA *et al.*, 2001). Além disso, as células da glia são sugeridas como as principais produtoras das três isoformas (KOBAYASHI *et al.*, 2000, KASHIWAGI *et al.*, 2003) e as próprias células ganglionares da retina já foram relatadas como produtoras de iNOS e nNOS na retina hipóxica (KAUR *et al.*, 2006). A produção de ON por nNOS e iNOS contribui para a citotoxicidade, resultando em morte celular e dano axonal. De fato, dados recentes do nosso laboratório (BARRADAS *et al.*, 2016) revelaram um aumento significativo da expressão de iNOS no cerebelo de ratos P0 submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia utilizado no presente trabalho.

A inflamação também tem sido sugerida como um dos principais fatores envolvidos na patogênese da retinopatia induzida por hipóxia, tendo a microglia amebóide um papel fundamental no processo (SIVAKUMAR *et al.*, 2011). Já foi relatada uma apoptose aumentada de células ganglionares na retina neonatal após uma exposição hipóxica (KAUR *et al.*, 2009; SIVAKUMAR *et al.*, 2010) e o envolvimento da microglia na morte de células ganglionares foi evidenciado pela expressão aumentada e excesso de liberação de TNF- α e IL-1 β por estas células em condições hipóxicas (SIVAKUMAR *et al.*, 2011). Sugeriu-se que a hipóxia pode iniciar a inflamação por ativação direta de microglia e, portanto, pode desempenhar um papel fundamental no mecanismo fisiopatológico do dano hipóxico às células ganglionares na retina neonatal através do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. O aumento da produção de TNF- α e IL-1 β pela microglia ativada foi acompanhado por uma expressão regulada de TNF-R1 e IL-R1 nas células ganglionares, sugerindo que a ligação das citocinas aos seus respectivos receptores seria um dos principais fatores envolvidos na morte de células ganglionares. Demonstrou-se ainda que o nível de MCP-1, conhecido por regular a migração de microglia, macrófagos e monócitos para os sítios hipóxicos e inflamatórios no SNC, está aumentando na hipóxia e a microglia é a sua principal fonte na retina (SIVAKUMAR *et al.*, 2010). Sugeriu-se ainda que o aumento da expressão de MCP-1 na retina hipóxica neonatal tinha uma função semelhante, isto é, para atrair macrófagos e induzir a migração de microglia para a vizinhança de células ganglionares, aumentando assim a resposta inflamatória.

Outra proposta de explicação é a excitotoxicidade glutamatérgica. Foi demonstrado que durante eventos isquêmicos ocorre aumento dos níveis de glutamato extracelular e conseqüentemente há uma hiperestimulação de receptores glutamatérgicos que, por sua vez, levam a morte neuronal (BENVENISTE *et al.*, 1984; OSBORNE *et al.*, 2004). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório na retina, sendo liberado por diversos tipos neuronais, inclusive na transferência sináptica dos sinais visuais da retina para o cérebro (MASSEY, 1990). O aumento da expressão de glutamato mostrou afetar a camada de células ganglionares e também causar necrose das células em camadas mais internas da retina. A exposição de CGRs derivadas de ratos recém nascidos para glutamato resultou na indução de neurotoxicidade (YONEDA, 2003). O excesso de liberação extracelular de glutamato é conhecido por matar neurônios por mecanismos excitotóxicos através da ativação dos receptores NMDA e AMPA. A excitotoxicidade tem sido sugerida como um mecanismo principal subjacente à morte de células ganglionares em muitas patologias oculares, incluindo retinopatia diabética e glaucoma (OSBORNE, 1999; KHODOROV, 2004). A morte neuronal excitotóxica envolve influxo de cálcio nas células, (ORRENIUS, 2003) que foi relatado como um componente essencial da neurotoxicidade por glutamato (CHOI, 1995). A estimulação de receptores de glutamato em células ganglionares de pinto *in vitro* causou influxo de cálcio através de canais associados ao NMDA e, posteriormente, sua morte. Aumento do influxo de cálcio nos neurônios provoca disfunção mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio resultando em morte celular neuronal (KHODOROV, 2004; NICHOLLS, 2004).

Por fim, a geração de radicais livres derivados de oxigênio (ROS) também é citada como uma causa importante na perda de células ganglionares na retina. Os ROS são equilibrados na saúde, pois qualquer excesso é eliminado por antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione e outros. O estresse oxidativo ocorre em condições patológicas quando o equilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade de antioxidantes endógenos para eliminá-los é perturbado. O distúrbio neste equilíbrio danifica os lipídios, proteínas e DNA, resultando em sua oxidação e causando morte celular por necrose ou apoptose. Está bem documentado que a hipóxia induz o estresse oxidativo que desempenha um papel fundamental em danificar os neurônios no adulto e nos tecidos neurais em desenvolvimento (COYLE, 1993). ROS foi relatado como envolvido na sinalização da morte de células ganglionares, atuando como um segundo mensageiro e/ou função de proteína moduladora em condições como glaucoma (IZZOTTI, 2006; TEZEL, 2006) e lesões isquêmicas da retina (TULSAWANI, 2010; ARDEN, 2011), resultando em morte por células ganglionares (HA, 2012). O estresse oxidativo induz anormalidades

estruturais, bioquímicas e funcionais das mitocôndrias, como a transição da permeabilidade mitocondrial, a abertura dos poros e o vazamento do citocromo C das mitocôndrias no citosol em condições hipóxicas (KAUR, 2011, 2012) contribuindo com lesão ou apoptose e morte celular necrótica (DI LISA *et al.*, 1998; LEMASTERS, 1998).

Com relação aos resultados relativos aos déficits de função das vias formadora e da não-formadora de imagem observados nos animais HI, cabe ressaltar que embora não possamos atribuir exclusiva e diretamente esses efeitos à morte de CGRs, pois o modelo de HI utilizado é sistêmico, acreditamos que a perda das CGRs desempenhe um papel importante nesse processo. Nossos dados relativos ao reflexo pupilar (função característica da via não-formadora de imagem) demonstraram que os animais submetidos à HI pré-natal não conseguem sustentar a constrição pupilar quando o reflexo foi induzido com uma iluminação de baixa intensidade (40 lux). Uma das possíveis explicações para essa alteração é que a HI pré-natal estaria causando a perda das ifCGRs (CGRs fotossensíveis). Interessantemente, McNeill, em 2011 e colaboradores realizaram um estudo sobre o desenvolvimento dessas células na retina de camundongos e mostraram que, apesar da maior parte da diferenciação das CGRs acontecer entre E11 e E15, uma grande quantidade de ifCGRs se diferenciava em E18, justamente no dia embrionário que foi feita a HI dos animais utilizados no presente trabalho. Ademais, Wang e Kefalov, em 2011, revelaram que a melanopsina auxilia não só no início do processo de contração, mas também na capacidade de sustentação da constrição pupilar. Contudo essa hipótese não consegue conciliar o fato do mecanismo de ativação do reflexo pupilar via ifCGRs estar associado a estimulação luminosa de maior intensidade (GROZDANIC *et al.*, 2007). De fato, quando o reflexo pupilar foi induzido com um estímulo de luminosidade maior (200 lux), não foram observadas diferenças entre os animais HI e SH. Uma outra possibilidade para tentar explicar os nossos resultados seria que o déficit observado estaria ligado à perda de CGRs que não possuem melanopsina mas que participam da indução do reflexo pupilar via a ativação de bastonetes (LUCAS, 2003). Em 2003, Lucas e colaboradores mostraram que camundongos cujo gene de melanopsina tinha sido deletado ainda apresentavam reflexo pupilar à luz. Logo, estes autores sugeriram que, associado ao sistema de reflexo pupilar induzido pela ativação da melanopsina em ifCGRs, existe outro envolvendo a ativação de CGRs via o sistema de cones e bastonetes. Interessantemente, quando o estímulo luminoso é de baixa intensidade, os bastonetes estão predominantemente envolvidos no processo consensual de contração pupilar (GROZDANIC *et al.*, 2007; LUCAS *et al.*, 2003).

Paralelamente aos dados da via não formadora de imagem, a capacidade visual dos animais HI também se mostrou alterada. A hipótese inicial era que os ratos submetidos à HI não teriam preferência populacional clara para descer para o lado raso ou profundo da arena devido a algum tipo de comprometimento visual induzido pela HI pré-natal. Já os animais do grupo SH apresentariam uma preferência populacional clara para descer para o lado raso da arena, pois teriam capacidade de percepção de profundidade normal. Embora os animais do grupo SH tenham se comportado dentro do esperado os animais do grupo HI apresentaram uma curiosa preferência populacional para descer para o lado profundo da plataforma. Curiosamente, Gibson e Walk, em 1960, além de propor o uso do teste de aversão ao precipício como um teste para avaliar a percepção de profundidade de crianças e outros animais, eles também sugeriram a capacidade do teste de avaliar o medo de altura. De fato, quando uma criança não atravessava para o lado fundo da arena, inferia-se que ela possuía percepção de profundidade e aversão à altura. Desta forma, poderíamos supor que a HI pré-natal estaria provocando alterações nas vias ligadas ao processamento emocional. Embora de difícil comprovação, esta é uma hipótese que não pode ser descartada. Silverstein e Ingvar, em 2015, escreveram sobre as cinco diferentes vias do medo, sendo quatro delas interligas ao sistema visual. Duas dessas vias foram vistas em ratos (RUDRAUF et al., 2008; GARRIDO et al., 2012; GARVERT et al., 2014). O estímulo visual se propaga do NGLd até o córtex visual e se ramifica para o córtex temporal inferior, onde esse dirige diretamente para a amígdala (WEBSTER et al., 1991; BAIZER et al., 1993; GHASHGHAEI; BARBAS, 2002; STEFANACCI; AMARAL, 2002; FREESE; AMARAL, 2005). O córtex temporal inferior também projeta ramificações para o córtex orbitofrontal, córtex parietal (WEBSTER et al., 1994). Assim, o fato do nosso modelo de HI pré-natal ser sistêmico afeta diversos sistemas, além do visual, e poderia estar afetando o desenvolvimento das vias citadas acima e tornando os animais propensos a descerem para o lado profundo da arena. Corroborando com essa hipótese, testes comportamentais e motores realizados em nosso laboratório demonstraram que animais que sofreram HI pré-natal apresentaram tendências relacionadas à hiperatividade e falta de medo.

Por fim, cabem ser feitas algumas considerações metodológicas a respeito dos nossos resultados no teste de aversão ao precipício. Primeiro esse tipo de análise comportamental necessita de uma amostra grande de animais para que possamos ter confiança plena nos resultados obtidos. Por exemplo, no estudo original de Schiffman e colaboradores, em 1970, foram utilizados um total de 75 ratos. Além disso, não podemos descartar a

possibilidade de algum fator ou fatores ligados a maneira como o teste foi conduzido tenha(m) levado os animais HI a apresentarem uma preferência pelo lado profundo da arena.

CONCLUSÕES

- A HI transitória pré-natal causa perda de CGRs durante o desenvolvimento até o trigésimo dia pós-natal;
- Sugerimos que por conta do menor número de CGRs, ratos HI apresentam redução na espessura do nervo óptico e nas projeções retinianas no NGLd;
- Animais HI não conseguem sustentar a constrição pupilar durante incidência luminosa constante o que pode estar relacionado à redução no número de CGRs;
- Animais HI apresentam resposta diferente dos animais SH no teste de aversão ao precipício. Não está claro se essa resposta alterada é decorrente de uma alteração na capacidade visual ou se pode ser relacionada a alterações na circuitaria relacionada ao medo.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSON, E. E.; MOORE, R. Y. *Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections*. Brain Research, 2001.
- ABU-EL-ASRAR, A. M.; DRALANDS, L.; MISSOTTEN, L.; AL-JADAAN, I. A.; GEBOES, K. *Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2004.
- ADLER R.; CURCIO C.; HICKS D.; PRICE D.; WONG F. *Cell death in age-related macular degeneration*. Mol Vis., 1999.
- ALI M. M.; MURTHY R. C.; CHANDRA S. V. *Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in-utero cadmium exposure in rats*. Neurobehav Toxicol Teratol., 1986.
- ALLEN A. E.; STORCHI R.; MARTIAL F. P.; PETERSEN R. S.; MONTEMURRO M. A.; BROWN T. M.; LUCAS R. J. *Melanopsin-driven light adaptation in mouse vision*. Curr Biol., 2014.
- AMIN, R.H.; FRANK, R.N.; KENNEDY, A.; ELIOTT, D.; PUKLIN, J.E.; ABRAMS, G.W. *Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1997.
- ANDERSSON K.; BLUM M.; CHEN Y.; ENEROTH P.; GROSS J.; HERRERA-MARSCHITZ M.; BJELKE B.; BOLME P.; DIAZ R.; JAMISON L. *Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats*. Neuroreport., 1995.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Editora FIOCRUZ, 2002.
- ARDEN, G. B.; SIVAPRASAD, S. *Hypoxia and Oxidative Stress in the Causation of Diabetic Retinopath*. Current Diabetes Reviews, 2011.
- ATHANASSIOUS R.; KLYNE M. A.; ALI M. A. *Regulation of cyclic nucleotides in retinal photoreceptors. An ultracytochemical approach on the role of cyclases*. Cell Tissue Res., 1984.
- BADIA, P.; MYERS, B.; BOECKER, M.; CULPEPPER, J.; HARSH, J. R. *Bright light effects on body temperature, alertness, EEG and behavior*. Physiol Behav., 1991.
- BAIZER, J. S.; DESIMONE, R.; UNGERLEIDER, L. G. *Comparison of subcortical connections of inferior temporal and posterior parietal cortex in monkeys*. Vis Neurosci., 1993.

- BARNETT, N. L.; OSBORNE, N. N. *Prolonged bilateral carotid artery occlusion induces electrophysiological and immunohistochemical changes to the rat retina without causing histological damage.* Exp Eye Res., 1995.
- BARRADAS, P. C.; SAVIGNON, T.; MANHÃES, A. C.; TENÓRIO, F.; DA COSTA, A. P.; CUNHA-RODRIGUES, M.C.; VAILLANT, J. *Prenatal Systemic Hypoxia-Ischemia and Oligodendroglia Loss in Cerebellum.* Adv Exp Med Biol., 2016.
- BAUD, O.; DAIRE, J. L.; DALMAZ, Y.; FONTAINE, R. H.; KRUEGER, R. C.; SEBAG, G.; EVRARD, P.; GRESSENS, P.; VERNEY, C. *Gestational hypoxia induces white matter damage in neonatal rats: a new model of periventricular leukomalacia.* Brain Pathol., 2004.
- BAUER, J. H. *Development of visual cliff discrimination by infant hooded rats.* J Comp Physiol Psychol., 1973.
- BEAULIEU, J. F.; CALVERT, R. *The effect of epidermal growth factor (EGF) on the differentiation of the rough endoplasmic reticulum in fetal mouse small intestine in organ culture.* J Histochem Cytochem., 1981.
- BEN-ARI, Y. *Cell death and synaptic reorganizations produced by seizures.* Epilepsia, 2001.
- BENVENISTE, H.; DREJER, J.; SCHOUSBOE, A.; DIEMER, N. H. *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis.* J Neurochem., 1984.
- BERNSTEIN, S. L.; KOO, J. H.; SLATER, B. J.; GUO, Y.; MARGOLIS, F. L. *Analysis of optic nerve stroke by retinal Bex expression.* Mol Vis., 2006.
- BERSON, D. M. *Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors.* Trends Neurosci. 2003.
- BERSON, E.L.; ROSNER, B.; WEIGEL-DIFRANCO, C.; DRYJA, T.P.; SANDBERG, M. *Disease progression in patients with dominant retinitis pigmentosa and rhodopsin mutations.* Invest Ophthalmol Vis Sci., 2002.
- BICAS, H. E. A. *Morfologia do sistema visual. Medicina.* Ribeirão Preto, Simpósio: Oftalmologia para o clínico, 1997.
- BJELKE, B.; ANDERSSON, K.; OGREN, S. O.; BOLME, P. *Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission.* Brain Res., 1991.
- BJELKE, B.; ANDERSSON, K.; OGREN, S.O.; BOLME, P. *Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission.* Brain Res., 1991.
- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; CHOU, D.; OESTERGAARD, M.; SAY, L.; MOLLER, A. B.; KINNEY, M.; LAWN, J. *Born Too Soon Preterm Birth Action Group. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births.* Reprod Health, 2013.
- BLOCK, F., GROMMES, C., KOSINSKI, C., SCHMIDT, W., SCHWARZ, M. *Retinal ischemia induced by the intraluminal suture method in rats.* Neurosci. Lett., 1997.

- BLOCK, F.; SCHWARZ, M.; SONTAG, K. H. *Retinal ischemia induced by occlusion of both common carotid arteries in rats as demonstrated by electroretinography*. *Neurosci Lett.*, 1992.
- BOKSA, P. *Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia*. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004.
- BOLAÑOS, J. P.; ALMEIDA, A. *Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia*. *Biochim Biophys Acta.*, 1999.
- BUCKINGHAM, B. P.; INMAN, D. M.; LAMBERT, W.; OGLESBY, E.; CALKINS, D. J.; STEELE, M. R.; VETTER, M. L.; MARSH-ARMSTRONG, N.; HORNER, P. J. *Progressive ganglion cell degeneration precedes neuronal loss in a mouse model of glaucoma*. *J Neurosci.*, 2008.
- BULFONE, A.; WANG, F.; HEVNER, R.; ANDERSON, S.; CUTFORTH, T.; CHEN, S.; MENESES, J.; PEDERSEN, R.; AXEL, R.; RUBENSTEIN, J. L. *An olfactory sensory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons*. *Neuron*, 1998.
- CAHOY, J. D.; EMERY, B.; KAUSHAL, A.; FOO, L. C.; ZAMANIAN, J. L.; CHRISTOPHERSON, K. S.; XING, Y.; LUBISCHER, J. L.; KRIEG, P. A.; KRUPENKO, S. A.; THOMPSON, W. J.; BARRES B. A. *A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function*. *J Neurosci.*, 2008.
- CAPRARA, C.; GRIMM, C. *From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease*. *Prog Retin Eye Res.*, 2012.
- CATTERTON, W. Z.; ESCOBEDO, M. B.; SEXSON, W. R.; GRAY, M. E.; SUNDELL, H. W.; STAHLMAN, M.T. *Effect of epidermal growth factor on lung maturation in fetal rabbits*. *Pediatr Res.*, 1979.
- CEPKO, C. L.; AUSTIN, C. P.; YANG, X.; ALEXIADES, M.; EZZEDDINE, D. *Cell fate determination in the vertebrate retina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996.
- CHALUPA, L. M.; LIA, B. *The nasotemporal division of retinal ganglion cells with crossed and uncrossed projections in the fetal rhesus monkey*. *J Neurosci.*, 1991.
- CHALUPA, L. M.; WILLIAMS, R.W. *Organization of the cat's lateral geniculate nucleus following interruption of prenatal binocular competition*. *Hum Neurobiol.*, 1984.
- CHANDRASEKARAN, A. R.; PLAS, D. T.; GONZALEZ, E.; CRAIR, M. C. *Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the superior colliculus of the mouse*. *J Neurosci.*, 2005.
- CHEN, Y. F.; WANG, T. H.; LIN, L. L.; HUNG, P. T. *Influence of axial length on visual field defects in primary open-angle glaucoma*. *J Formos Med Assoc.*, 1997.
- CHEN, Y. Y. WU, M. L.; KAO, M. H.; SU, T. H.; CHEN, C. P. *Perinatal outcome of recurrent pre-eclampsia versus pre-eclampsia in nulliparas*. *J ObstetGynaecol Res.*, 2009.

- CHIU, C.; WELIKY, M. *Relationship of correlated spontaneous activity to functional ocular dominance columns in the developing visual cortex*. Neuron, 2002.
- CHOI, K. T.; CHUNG, J. K.; KWAK, C. S.; KIM, H. K. *Effect of hypocapnia on extracellular glutamate and glycine concentrations during the periischemic period in rabbit hippocampus*. Ann N Y Acad Sci., 1995.
- COHEN, L.H; NOELL, W.K. *Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function*. J Neurochem., 1960.
- CORMACK D, H. *Fundamentos de Histologia*. 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
- COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. Science, 1993.
- CROLL, S. D.; RANSOHOFF, R. M.; CAI, N.; ZHANG, Q.; MARTIN, F. J.; WEI, T.; KASSELMAN, L. J.; KINTNER, J.; MURPHY, A. J.; YANCOPOULOS, G. D.; WIEGAND, S. J. *VEGF-mediated inflammation precedes angiogenesis in adult brain*. Exp. Neurol., 2004.
- CUNHA, K. *Sobrevida das células ganglionares da retina induzida pelo PMA: envolvimento da PKC δ e JNK*. Mestre em Neuroimunologia – UFF, 2006.
- CUNHA-RODRIGUES, M. C.; BALDUCI, C. T.; TENORIO, F.; BARRADAS, P.C. *GABA function may be related to the impairment of learning and memory caused by systemic prenatal hypoxia-ischemia*. Neurobiology of Learning and Memory, 2018.
- DAVIDSON, C. M.; PAPPAS, B. A.; STEVENS, W. D.; FORTIN, T.; BENNETT, S. A. *Chronic cerebral hypoperfusion: loss of pupillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration*. Brain Res., 2000.
- DE HAAN, T. R.; BIJLEVELD, Y. A.; VAN DER LEE, J. H.; GROENENDAAL, F.; VAN DEN BROEK, M. P.; RADEMAKER, C. M.; VAN STRAATEN, H. L.; VAN WEISSENBRUCH, M. M.; VERMEULEN, J. R.; DIJK, P. H.; DUDINK, J.; RIJKEN, M.; VAN HEIJST, A. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of medication in asphyxiated newborns during controlled hypothermia*. BMC Pediatr., 2012.
- DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992.
- DI LISA, F.; MENABÒ, R.; CANTON, M.; PETRONILLI, V. *The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium*. Biochim Biophys Acta, 1998.
- DO, M. T.; YAU, K. W. *Adaptation to steady light by intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*. Proc Natl Acad Sci USA, 2013.
- DUPLESSIS, A. J.; JOHNSTON, M. V. *Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection*. Clin Perinatol., 1997.

DYMSZA, H. A.; CZAJKA, D. M.; MILLER, S. A. *Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat.* J Nutr., 1964.

EGLIN, S. J.; RAVEN, M. A.; TAMRAZIAN, E.; REESE, B. E. *Dopaminergic amacrine cells in the inner nuclear layer and ganglion cell layer comprise a single functional retinal mosaic.* J Comp Neurol., 2003.

ESTEVEZ, M. E.; FOGERSON, P. M.; ILARDI, M. C.; BORGHUIS, B. G.; CHAN, E.; WENG, S.; AUFERKORTE, O. N.; DEMB, J. B.; BERSON, D. M. *Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision.* J Neurosci., 2012.

FAN, L. W.; LIN, S.; PANG, Y.; LEI, M.; ZHANG, F.; RHODES, P. G.; CAI, Z. *Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat.* Behav Brain Res., 2005.

FATEMI, S. H.; HALT, A. R. *Altered levels of Bcl2 and p53 proteins in parietal cortex reflect deranged apoptotic regulation in autism.* Synapse, 2001.

FELLER, M. B. *Spontaneous correlated activity in developing neural circuits.* Neuron, 1999.

FERRARA, N. *Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis.* Am J Physiol Cell Physiol., 2001.

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., 1996.

FONSECA, L. S. *Perda de neurônios na camada ganglionar da retina de ratos submetidos à hipóxia-isquemia sistêmica pré-natal.* Trabalho de Conclusão de Curso. Tecnologia em Biotecnologia, UEZO-RJ, 2016.

FRANCKE, M.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FAUDE, F.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; REICHEL, W. *Loss of inwardly rectifying potassium currents by human retinal glial cells in diseases of the eye.* Glia, 1997.

FREESE, J. L.; AMARAL, D. G. *The organization of projections from the amygdala to visual cortical areas TE and VI in the macaque monkey.* J Comp Neurol., 2005.

FUKUMURA, D.; XU, L.; CHEN, Y.; GOHONGI, T.; SEED, B.; JAIN, R. K. *Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo.* Cancer Res., 2001.

GALLEGO, B. I.; SALAZAR, J. J.; DE HOZ, R.; ROJAS, B.; RAMÍREZ, A. I.; SALINAS-NAVARRO, M.; ORTÍN-MARTÍNEZ, A.; VALIENTE-SORIANO, F. J.; AVILÉS-TRIGUEROS, M.; VILLEGAS-PEREZ, M. P.; VIDAL-SANZ, M.; TRIVIÑO, A.; RAMÍREZ, J. M. *IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma.* J Neuroinflammation, 2012.

GALLI, L.; MAFFEI L. *Spontaneous impulse activity of rat retinal ganglion cells in prenatal life.* Science, 1988.

- GARRIDO, M. I. *Brain connectivity: the feel of blindsight*. Curr Biol., 2012.
- GARVERT, M. M.; FRISTON, K. J.; DOLAN, R. J.; GARRIDO, M. I. *Subcortical amygdala pathways enable rapid face processing*. Neuroimage, 2014.
- GHASHGHAEI, H. T.; BARBAS, H. *Pathways for emotion: interactions of prefrontal and anterior temporal pathways in the amygdala of the rhesus monkey*. Neuroscience, 2002.
- GIBSON, D. M.; MACLEAN, S. J. *Ef2: a new LY-3-linked light-chain marker expressed in normal mouse serum immunoglobulin*. J Exp Med., 1979.
- GIBSON, E. J.; WALK, R. D. *The "visual cliff"*. Sci Am., 1960.
- GLEED, R. D.; MORTOLA, J. P. *Ventilation in newborn rats after gestation at simulated high altitude*. J Appl Physiol., 1991.
- GOOD, W.V; HARDY, R.J. *The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP)*. Ophthalmology, 2001.
- GOODALE, M. A.; FOREMAN, N. P.; MILNER, A. D. *Visual orientation in the rat: a dissociation of deficits following cortical and collicular lesions*. Exp Brain Res., 1978.
- GOOLEY, J. J.; LU, J.; CHOU, T. C.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. *Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract*. Nat Neurosci., 2001.
- GROENENDAAL, F; VAN HOF-VAN DUIN, J; BAERTS, W; FETTER, W.P. *Effects of perinatal hypoxia on visual development during the first year of (corrected) age*. Early Hum Dev., 1989.
- GROZDANIC, S. D.; MATIC, M.; SAKAGUCHI, D. S.; KARDON, R. H. *Evaluation of retinal status using chromatic pupil light reflex activity in healthy and diseased canine eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2007.
- GRUBB, M. S.; ROSSI, F. M.; CHANGEUX, J. P.; THOMPSON, I. D. *Abnormal functional organization in the dorsal lateral geniculate nucleus of mice lacking the beta 2 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor*. Neuron, 2003.
- GRUSS, M.; HEMPELMANN. G; SCHOLZ. A. *Trichloroethanol alters action potentials in a subgroup of primary sensory neurones*. Neuroreport., 2002.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- GUZZETTA, A; CIONI, G; COWAN, F; MERCURI, E. *Visual disorders in children with brain lesions: 1. Maturation of visual function in infants with neonatal brain lesions: correlation with neuroimaging*. Eur J Paediatr Neurol., 2001.
- HA, Y.; SAUL, A.; TAWFIK, A.; ZORRILLA, E. P.; GANAPATHY, V.; SMITH, S. B. *Diabetes accelerates retinal ganglion cell dysfunction in mice lacking sigma receptor*. Mol Vis., 2012.

- HAMMES, H.P.; FEDEROFF, H.J.; BROWNLEE, M.. *Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes*. Mol. Med., 1995.
- HATTAR, S.; LIAO, H. W.; TAKAO, M.; BERSON, D. M.; YAU, K. W. *Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity*. Science, 2002.
- HATTAR, S.; LUCAS, R. J.; MROSOVSKY, N.; THOMPSON, S.; DOUGLAS, R. H. HANKINS, M. W.; LEM, J.; BIEL, M.; HOFMANN, F.; FOSTER, R. G.; YAU, K. W. *Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice*. Nature, 2003.
- HELLSTROM, A.; SMITH, L.E.; DAMMANN, O. *Retinopathy of prematurity*. Lancet., 2013.
- HELTON, R.; CUI, J.; SCHEEL, J. R.; ELLISON, J. A.; AMES, C.; GIBSON, C.; BLOUW, B.; OUYANG, L.; DRAGATIS, I.; ZEITLIN, S.; JOHNSON, R. S.; LIPTON, S. A.; BARLOW, C. *Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage*. J Neurosci., 2005.
- HEMMINGSSEN, E. A.; DOUGLAS, E.L. *Ultraviolet radiation thresholds for corneal injury in antarctic and temperate-zone animals*. Comp Biochem Physiol., 1970.
- HIRATA, C.; NAKANO, K.; NAKAMURA, N.; KITAGAWA, Y.; SHIGETA, H.; HASEGAWA, G.; OGATA, M.; IKEDA, T.; SAWA, H.; NAKAMURA, K.; IENAGA, K.; OBAYASHI, H.; KONDO, M. *Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal Muller cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997.
- HU, C.; HILL, D. D.; WONG, K. Y. *Intrinsic physiological properties of the five types of mouse ganglion-cell photoreceptors*. J Neurophysiol., 2013.
- HUANG, H. M.; HUANG, C. C.; HUNG, P. L.; CHANG, Y.C. *Hypoxic-ischemic retinal injury in rat pups*. Pediatr Res., 2012.
- HUBMACHER, D.; REINHARDT, D. P.; PLESEC, T.; SCHENKE-LAYLAND, K.; APTE, S. S. *Human eye development is characterized by coordinated expression of fibrillin isoforms*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2014.
- IADECOLA, C. *Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury*. Trends Neurosci., 1997.
- INAGAKI, K.; KOGA, H.; INOUE, K.; SUZUKI, K.; SUZUKI, H. *Spontaneous intraocular hemorrhage in rats during postnatal ocular development*. Comp Med., 2014.
- ISLAM, S.; BURESOVÁ, O. *The effect of cortical spreading depression on motor performance and depth avoidance in rats*. Act Nerv Super (Praha), 1975.
- IZZOTTI, A.; BAGNIS, A.; SACCÀ, S. C. *The role of oxidative stress in glaucoma*. Mutat Res., 2006.

- JACOBS, G.H.; NEITZ, J.; DEEGAN, J.F. 2nd. *Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light*. Nature, 1991.
- JANÁKY, M; GRÓSZ, A; TÓTH, E; BENEDEK, K; BENEDEK, G. *Hypobaric hypoxia reduces the amplitude of oscillatory potentials in the human ERG*. Doc Ophthalmol., 2007.
- JEFFERY, G.; ARZYMANOW, B. J.; LIEBERMAN, A. R. *Does the early exuberant retinal projection to the superior colliculus in the neonatal rat develop synaptic connections?* Brain Res., 1984.
- JEON, C. J.; PYUN, J. K.; YANG, H. W. *Calretinin and calbindin D28K immunoreactivity in the superficial layers of the rabbit superior colliculus*. Neuroreport., 1998.
- JOHNSTON, M.V.; FATEMI, A.; WILSON, M.A.; NORTHINGTON, F. *Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care*. Lancet Neurol., 2011.
- JOUSSEN, A. M.; POULAKI, V.; QIN, W.; KIRCHHOF, B.; MITSIADES, N.; WIEGAND, S. J.; RUDGE, J.; YANCOPOULOS, G. D. *Adamis AP. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo*. Am J Pathol., 2002.
- JUNG, S.; POLOSA, A.; LACHAPELLE, P.; WINTERMARK, P. *Visual impairments following term neonatal encephalopathy: do retinal impairments also play a role?* Invest Ophthalmol Vis Sci., 2015.
- JUNG, W. B.; IM, G. H.; CHUNG, J. J.; AHN, S.Y.; JEON, T.Y.; CHANG, Y.S.; PARQUE, W. S.; KIM, J. H.; KIM, K. S.; LEE, J. H. *Neuroplasticity for spontaneous functional recovery after neonatal hypoxic ischemic brain injury in rats observed by functional MRI and diffusion tensor imaging*. Neuroimage, 2016.
- KAJA, S.; YANG, S. H.; WEI, J.; FUJITANI, K.; LIU, R.; BRUN-ZINKERNAGEL, A. M.; SIMPKINS, J. W.; INOKUCHI, K.; KOULEN, P. *Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of Ves1-1L/Homer 1c immunoreactive synaptic connections*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2003.
- KAPLAN, E.; SHAPLEY, R. M. *The primate retina contains two types of ganglion cells, with high and low contrast sensitivity*. Proc Natl Acad Sci USA, 1986.
- KASHIWAGI, K.; IIZUKA, Y.; MOCHIZUKI, S.; TSUMAMOTO, Y.; MISHIMA, H.K.; ARAIE, M.; SUZUKI, Y.; TSUKAHARA, S. *Differences in nitric oxide production: a comparison of retinal ganglion cells and retinal glial cells cultured under hypoxic conditions*. Brain Res Mol Brain Res., 2003.
- KAUR, C.; FOULDS, W. S.; LING, E. A. *Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage*. J Neurosci Res., 2011.
- KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; ANG, L. S.; SUNDARESAN, A. *Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity*. J Neurochem., 2006.

KAUR, C.; SIVAKUMAR, V.; FOULDS, W. S.; LUU, C.D.; LING, E.A. *Cellular and vascular changes in the retina of neonatal rats following an acute exposure to hypoxia*. Invest Ophthalmol., 2009.

KAUR, I.; KATYAL, A. *Immunoproteomic identification of biotransformed self-proteins from the livers of female Balb/c mice following chronic ethanol administration*. Proteomics, 2012.

KERGOAT, H; HÉRARD, M.E; LEMAY, M. *RGC sensitivity to mild systemic hypoxia*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2006.

KHODOROV, B. *Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones*. Prog Biophys Mol Biol., 2004.

KIM, J. V.; DUSTIN, M. L. *Innate response to focal necrotic injury inside the blood-brain barrier*. J Immunol., 2006.

KING, A. J. *Sensory experience and the formation of a computational map of auditory space in the brain*. Bioessays, 1999.

KISS, P.; SZOGYI, D.; REGLODI, D.; HORVATH, G.; FARKAS, J.; LUBICS, A.; TAMAS, A.; ATLASZ, T.; SZABADFI, K.; BABAI, N.; GABRIEL, R.; KOPPAN, M. *Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats*. Brain Res., 2009.

KLEIN, B.G. *Cunningham tratado de fisiologia veterinária*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

KLEIN, R. R. *Regulation of light-induced chloroplast transcription and translation in eight-day-old dark-grown barley seedlings*. Plant Physiol., 1991.

KOBAYASHI, M.; KUROIWA, T.; SHIMOKAWA, R.; OKEDA, R.; TOKORO, T. *Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas*. Jpn J Ophthalmol., 2000.

KRAHE, T. E.; GUIDO, W. *Homeostatic plasticity in the visual thalamus by monocular deprivation*. J Neurosci., 2011.

KUBAN, K. C.; LEVITON, A. *Cerebral palsy*. N Engl J Med., 1994.

KUBRUSLY, R. C.; GUIMARÃES, M. Z.; VIEIRA, A. P.; HOKOÇ, J. N.; CASARINI D. E.; DE MELLO, M. C.; DE MELLO, F. G. *L-DOPA supply to the neuro retina activates dopaminergic communication at the early stages of embryonic development*. J Neurochem., 2003.

LAPTOOK, A. R. *Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant*. Clin Perinatol., 2016.

LAVAIL, M. M. *Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting*. Science, 1976.

- LAVINSKY, D.; ARTERNI, N. S.; ACHAVAL, M.; NETTO, C. A. *Chronic bilateral common carotid artery occlusion: a model for ocular ischemic syndrome in the rat*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol., 2006.
- LEMASTERS, J. J. *The mitochondrial permeability transition: from biochemical curiosity to pathophysiological mechanism*. Gastroenterology, 1998.
- LEVINE, S. *Anoxic-ischemic encephalopathy in rats*. Am J Pathol., 1960.
- LEWIS, G. P.; FISHER, S. K. *Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression*. Int Rev Cytol., 2003.
- LILLIEN, L. *Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor*. Nature, 1995.
- LILLIEN, L. *Progenitor cells: what do they know and when do they know it?* Curr Biol., 1998.
- LILLIEN, L.; WANCIO, D. *Changes in epidermal growth factor receptor expression and competence to generate glia regulate timing and choice of differentiation in the retina*. Mol Cell Neurosci., 1998.
- LIU, X.; XIONG, H.; HU, D.; LIMB, G. A.; XIE, T.; PENG, L.; YANG, W.; SUN, Y.; ZHOU, M.; SONG, E.; ZHANG, D. Y. *IL-1 β Upregulates IL-8 Production in Human Müller Cells Through Activation of the p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways*. Inflammation, 2014.
- LIVESEY, F. J.; CEPKO, C. L. *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina*. Nat Rev Neurosci., 2001.
- LUCAS, R. J.; FREEDMAN, M. S.; LUPI, D.; MUNOZ, M.; DAVID-GRAY, Z. K.; FOSTER, R. G. *Identifying the photoreceptive inputs to the mammalian circadian system using transgenic and retinally degenerate mice*. Behav Brain Res., 2001.
- LUCAS, R. J.; HATTAR, S.; TAKAO, M.; BERSON, D. M.; FOSTER, R. G.; YAU, K. W. *Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice*. Science, 2003.
- MALO, C.; MÉNARD, D. *Influence of epidermal growth factor on the development of suckling mouse intestinal mucosa*. Gastroenterology, 1982.
- MARÍN-PADILLA, M. *Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. II: white matter lesions of the neocortex*. J Neuropathol Exp Neurol., 1997.
- MARÍN-PADILLA, M. *Developmental neuropathology and impact of perinatal brain damage. III: gray matter lesions of the neocortex*. J Neuropathol Exp Neurol, 1999.
- MARKUSSEN, N. H.; ORITSLAND, N. A. *Metabolic depression and heat balance in starving Wistar rats*. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol., 1986.

- MARQUARDT, T.; GRUSS, P. *Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all*. Trends Neurosci., 2002.
- MARTINEZ-BIARGE, M.; DIEZ-SEBASTIAN, J.; WUSTHOFF, C. J.; LAWRENCE, S.; ALOYSIUS, A.; RUTHERFORD, M. A.; COWAN, F. M. *Feeding and communication impairments in infants with central grey matter lesions following perinatal hypoxic-ischaemic injury*. Eur J Paediatr Neurol., 2012.
- MASLAND, R. H. *The neuronal organization of the retina*. Neuron, 2012.
- MASSEY, S.C.; MILLER, R.F. *N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina*. J Neurophysiol., 1990.
- MCCULLOUGH, M. L. *The behavioral effects of prenatal hypoxia in the rat*. Dev Psychobiol. 1976.
- MCHAFFIE, J. G.; STEIN, B. E. *Eye movements evoked by electrical stimulation in the superior colliculus of rats and hamsters*. Brain Res., 1982.
- MCLAUGHLIN, T.; TORBORG, C. L.; FELLER, M. B.; O'LEARY, D. D. *Retinotopic map refinement requires spontaneous retinal waves during a brief critical period of development*. Neuron, 2003.
- MCNEILL, D. S.; SHEELY, C. J.; ECKER, J. L.; BADEA, T. C.; MORHARDT, D.; GUIDO, W.; HATTAR, S. *Development of melanopsin-based irradiance detecting circuitry*. Neural Dev., 2011.
- Meister M1, Wong RO, Baylor DA, Shatz CJ. Synchronous bursts of action potentials in ganglion cells of the developing mammalian retina. Science. 1991.
- MELDER, R. J.; KOENIG, G. C.; WITWER, B. P.; SAFABAKHSH, N.; MUNN, L. L.; JAIN, R. K. *During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium*. Nat Med., 1996.
- MEY, J.; THANOS, S. *Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis*. Brain Research Reviews, 2000.
- MOORE, M. C.; GREENE, H. L.; SAID, H. M.; GHISHAN, F. K.; ORTH, D. N. *Effect of epidermal growth factor and artificial feeding in suckling rats*. Pediatr Res., 1986.
- MORTOLA, J. P.; NASO, L. *Thermogenesis in newborn rats after prenatal or postnatal hypoxia*. J Appl Physiol., 1995.
- MOSHIRI, A.; FECHAR, J.; REH, T. A. *Retinal stem cells and regeneration*. Int J Dev Biol., 2004.
- MROSOVSKY, N. *Further experiments on the relationship between the period of circadian rhythms and locomotor activity levels in hamsters*. Physiol Behav., 1999.
- MRSIC-FLOGEL, T. D.; HOFER, S. B.; CREUTZFELDT, C.; CLOËZ-TAYARANI, I.; CHANGEUX, J. P.; BONHOEFFER, T.; HÜBENER, M. *Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves*. J Neuroscience, 2005.

- MUIR-ROBINSON, G.; HWANG, B. J.; FELLER, M. B. *Retinogeniculate axons undergo eye-specific segregation in the absence of eye-specific layers*. J Neuroscience, 2002.
- MÜNCH, M.; KAWASAKI, A. *Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: classification, function and clinical implications*. Curr Opin Neurol., 2013.
- NADAL-NICOLÁS, F. M.; JIMÉNEZ-LÓPEZ, M.; SOBRADO-CALVO, P.; NIETO-LÓPEZ, L.; CÁNOVAS-MARTÍNEZ, I.; SALINAS-NAVARRO, M.; VIDAL-SANZ, M.; AGUDO, M. *Brn3A as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas*. Invest Ophthalmol Vis Sci., 2009.
- NELSON, B. R.; HARTMAN, B. H.; GEORGI, S. A.; LAN, M. S.; REH, T. A. *Transient inactivation of Notch signaling synchronizes differentiation of neural progenitor cells*. Dev Biol., 2007.
- NELSON, D. E.; TAKAHASHI, J. S. *Comparison of visual sensitivity for suppression of pineal melatonin and circadian phase-shifting in the golden hamster*. Brain Res., 1991.
- NELSON, J. S.; STEBBINS, R. C.; STRASSLE, P. D.; MEYER, R. E. *Geographic distribution of live births with tetralogy of Fallot in North Carolina 2003 to 2012*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol., 2016.
- NICHOLLS, D. G.; CHALMERS, S. *The integration of mitochondrial calcium transport and storage*. J Bioenerg Biomembr., 2004.
- NILSSON, DAN-E. *Vision optics and evolution*. BioScience, 1989.
- NISHI R.; BERG D. K. *Survival and development of ciliary ganglion neurones grown alone in cell culture*. Nature, 1979.
- OKADA, M.; OGINO, N.; MATSUMURA, M.; HONDA, Y.; NAGAI, Y. *The process of subretinal strand formation*. Jpn J Ophthalmol., 1992.
- ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. *Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link*. Nat Rev Mol Cell Biol., 2003.
- OSBORNE, N. N.; CASSON, R. J.; WOOD, J. P.; CHIDLOW, G.; GRAHAM, M.; MELENA, J. *Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies*. Prog. Retin. Eye Res., 2004.
- OSBORNE, N. N.; CHIDLOW, G.; NASH, M. S.; WOOD, J. P. *The potential of neuroprotection in glaucoma treatment*. Curr Opin Ophthalmol., 1999.
- OSTERHOUT, J. A.; STAFFORD, B. K.; NGUYEN, P. L.; YOSHIHARA, Y.; HUBERMAN, A. D. *Contactin-4 mediates axon-target specificity and functional development of the accessory optic system*. Neuron, 2015.
- PANDA, S.; SATO, T. K.; CASTRUCCI, A. M.; ROLLAG, M. D.; DEGRIP, W. J.; HOGENESCH, J. B.; PROVENCIO, I.; KAY, S. A. *Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting*. Science, 2002.

PANNICKE, T.; UCKERMANN, O.; IANDIEV, I.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. *Ocular inflammation alters swelling and membrane characteristics of rat Müller glial cells*. J. Neuroimmunol., 2005.

PEKNY, M.; PEKNA, M. *Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits*. Physiol Rev., 2014.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. *The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis*. Neurosci Lett., 2014.

PENG, L.; PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. *Neuroglia as a Central Element of Neurological Diseases: An Underappreciated Target for Therapeutic Intervention*. Curr Neuropharmacol., 2014.

PENN, A. A.; RIQUELME, P. A.; FELLER, M. B.; SHATZ, C. J. *Competition in retinogeniculate patterning driven by spontaneous activity*. Science, 1998.

PINTO, C. *Avaliação da distribuição de receptores NMDA-2B e da astrogliia no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. Trabalho de conclusão de curso. UNIRIO, 2015.

PRADA, C.; PUGA, J.; PÉREZ-MÉNDEZ, L.; LÓPEZ, R.; RAMÍREZ, G. *Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina*. Eur J Neurosci., 1991.

PROCIANOY R. S.; SILVEIRA R. C. *Hypoxic-ischemic syndrome*. J Pediatr (Rio J), 2001.

PROESCHOLDT, M. A.; HEISS, J. D.; WALBRIDGE, S.; MÜHLHAUSER, J.; CAPOGROSSI, M. C.; OLDFIELD, E. H.; MERRILL, M. J. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain*. J Neuropathol Exp Neurol., 1999.

PROVENCIO, I.; RODRIGUEZ, I. R.; JIANG, G.; HAYES, W. P.; MOREIRA, E. F.; ROLLAG, M. D. *A novel human opsin in the inner retina*. J Neurosci., 2000.

PUNDIK, S.; ROBINSON, S.; LUST, W. D.; ZECHEL, J.; BUCZEK, M.; SELMAN, W. R. *Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient hypoxia/ischemia*. Metab Brain Dis., 2006.

QIU, X.; KUMBALASIRI, T.; CARLSON, S. M.; WONG, K. Y.; KRISHNA, V.; PROVENCIO, I.; BERSON, D. M. *Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin*. Nature, 2005.

RAMÍREZ, J. M.; RAMÍREZ, A. I.; SALAZAR, J. J.; DE HOZ, R.; TRIVIÑO, A. *Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration*. Exp Eye Res., 2001.

RAMIREZ, J. M.; TRIVIÑO, A.; RAMIREZ, A. I.; SALAZAR, J. J.; GARCIA-SANCHEZ, J. *Immunohistochemical study of human retinal astroglia*. Vision Res., 1994.

RAMÓN Y CAJAL. *La retina des vertebres*. Cellule 9, 119-255

REDLIN, U. *Neural basis and biological function of masking by light in mammals: suppression of melatonin and locomotor activity*. Chronobiol Int., 2001.

- RENNIE, J. M.; HAGMANN, C. F.; ROBERTSON, N. J. *Outcome after intrapartum hypoxic ischaemia at term*. Semin Fetal Neonatal Med., 2007.
- RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. *The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat*. Ann Neurol., 1981.
- RIVERA, J. C.; SAPIEHA, P.; JOYAL, J. S.; DUHAMEL, F.; SHAO, Z.; SITARAS, N.; PICARD, E.; ZHOU, E.; LACHAPPELLE, P.; CHEMTOB, S. *Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis*. Neonatology, 2011.
- RIVEST, S. *Regulation of innate immune responses in the brain*. Nat Rev Immunol., 2009.
- ROBINSON, S.; PETELENZ, K.; LI, Q.; COHEN, M.L.; DECHANT, A.; TABRIZI, N.; BUCEK, M.; LUST, D.; MILLER, R.H. *Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic ischemic insults in rats*. Neurobiol Dis., 2005.
- RODRIGUES, F. V. *Fisiologia Sensorial*. Revista Da Biologia. São Paulo, 2010.
- ROLAND, E.H; JAN, J.E; HILL, A; WONG, P.K. *Cortical visual impairment following birth asphyxia*. Pediatr Neurol., 1986.
- ROMIJN, H. J.; JANSZEN, A. W.; VAN VOORST, M. J.; BUIJS, R. M.; BALÁZS, R.; SWAAB, D. F. *Perinatal hypoxic ischemic encephalopathy affects the proportion of GABA-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat*. Brain Res., 1992.
- RONGO, C. *Epidermal growth factor and aging: a signaling molecule reveals a new eye opening function*. Aging (Albany NY). 2011.
- ROUTTENBERG, A.; GLICKMAN, S. E. *Visual cliff behavior in albino and hooded rats*. J Comp Physiol Psychol., 1964.
- RUDRAUF, D.; DAVID, O.; LACHAUX, J. P.; KOVACH, C. K.; MARTINERIE, J.; RENAULT, B.; DAMASIO, A. *Rapid interactions between the ventral visual stream and emotion-related structures rely on a two-pathway architecture*. J Neuroscience, 2008.
- RUNGGER-BRÄNDLE, E.; DOSSO, A.A.; LEUENBERGER, P.M.. *Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2000.
- SAVIGNON, T. *Efeitos de lesão por hipóxia-isquemia pré-natal sobre o desenvolvimento do sistema motor: córtex e cerebelo*. 76p. Mestre em Fisiopatologia Clínica e Experimental - UERJ, Rio de Janeiro, 2008.
- SAVIGNON, T.; COSTA, E.; TENORIO, F.; MANHÃES, A.C.; BARRADAS, P.C. *Prenatal hypoxic-ischemic insult changes the distribution and number of NADPH-diaphorase cells in the cerebellum*. PLoS One, 2012.
- SCHMIDT, T. M.; DO M. T.; DACEY, D.; LUCAS, R.; HATTAR, S.; MATYNIA, A. *Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function*. J Neurosci., 2011.
- SCHOCH, H. J.; FISCHER, S.; MARTI, H. H. *Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain*. Brain, 2002.

- SEABROOK, T. A.; BURBRIDGE, T. J.; CRAIR, M. C.; HUBERMAN, A. D. *Architecture, Function, and Assembly of the Mouse Visual System*. Annu Rev Neurosci. 2017.
- SENGER, D. R.; DESTREE, A. T.; HYNES, R. O. *Complex regulation of fibronectin synthesis by cells in culture*. Am J Physiol., 1983.
- SHATZ, C. J.; STRYKER, M. P. *Prenatal tetrodotoxin infusion blocks segregation of retinogeniculate afferents*. Science, 1988.
- SILVERSTEIN, F.; JOHNSTON, M. V. *Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain*. Ann Neurol., 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, 1991.
- SIVAKUMAR, V.; FOULDS, W.S.; LUU, C.D.; LING, E.A.; KAUR, C. *Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived proinflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina*. J Path, 2011.
- SIVAKUMAR, V; RAJAN, M.S. *Antioxidant Effect of Tinospora cordifolia Extract in Alloxan-induced Diabetic Rats*. Indian J Pharm Sci. 2010 Nov;72(6):795-8.
- STEFANACCI, L.; AMARAL, D. G. *Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study*. J Comp Neurol., 2002.
- STEIN, I.; NEEMAN, M.; SHWEIKI, D.; ITIN, A.; KESHET, E. *Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes*. Mol Cell Biol., 1995.
- STELLWAGEN, D.; SHATZ, C. J. *An instructive role for retinal waves in the development of retinogeniculate connectivity*. Neuron, 2002.
- STEVENS, W. D.; FORTIN, T.; PAPPAS, B. A. *Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure*. Stroke, 2002.
- STONE, J; DREHER, Z. *Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina*. J Comp Neurol., 1987.
- STREIT, W. J. *Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS*. Glia, 2002.
- STRETTOI, E.; MASLAND, R. H. *The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina*. J Neurosci., 1995.
- SUCHER, N. J.; LIPTON, S. A.; DREYER, E. B. *Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells*. Vision Res. 1997.
- TAKAHASHI, J. S. *Finding new clock components: past and future*. J Biol Rhythms., 2004.
- TASSINARI, G; BENTIVOGLIO, M; CHEN, S; CAMPARA, D. *Overlapping ipsilateral and contralateral retinal projections to the lateral geniculate nucleus and superior colliculus in the cat: a retrograde triple labelling study*. Brain Res Bull., 1997.

TEES, R. C. *Depth perception after infant and adult visual neocortical lesions in light- and dark-reared rats.* Dev Psychobiol., 1976.

TEZEL, G. *Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences.* Prog Retin Eye Res., 2006.

TEZEL, G.; CHAUHAN, B. C.; LEBLANC, R. P.; WAX, M. B. *Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003.

THOMAS, J. P. *Spatial vision then and now.* Vision Res. 1986.

TODA, N; NAKANISHI-TODA, M. *Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy.* Prog Retin Eye Res., 2007.

TORBORG, C. L.; FELLER M. B. *Spontaneous patterned retinal activity and the refinement of retinal projections.* Prog Neurobiol., 2005.

TULSAWANI, R; KELLY, L. S; FATMA, N; CHHUNCHHA, B; KUBO, E; KUMAR, A; SINGH, D. P. *Neuroprotective effect of peroxiredoxin 6 against hypoxia-induced retinal ganglion cell damage.* BMC Neurosci., 2010.

TURNER, D. L.; CEPKO, C.L. *A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development.* Nature, 1987.

TYSON, J E, SAIGAL, S. *Outcomes for extremely low-birth-weight infants: disappointing news.* JAMA. 2005.

VAN HOF-VAN DUIN, J; MOHN, G. *Visual defects in children after cerebral hypoxia.* Behav Brain Res., 1984.

VANNUCCI, R. C. *Hypoxic-ischemic encephalopathy.* Am J Perinatol., 2000.

VECINO, E.; RODRIGUEZ, F. D.; RUZAFSA, N.; PEREIRO, X.; SHARMA, S. C. *Glia-neuron interactions in the mammalian retina.* Prog Retin Eye Res., 2016.

Vollman D, Khosla K, Shields BJ, Beeghly BC, Bonsu B, Smith GA. *Lawn mower-related injuries to children.* J Trauma. 2005 Sep;59(3):724-8.

VOLPE, J. J. *Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances.* Lancet Neurol., 2009.

VOLPE, J. J. *Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy.* Ann Neurol., 2012.

VROLYK, V.; HARUNA, J.; NOIT-BIANCAMANO, M. O. *Neonatal and Juvenile Ocular Development in Sprague-Dawley Rats: A Histomorphological and Immunohistochemical Study.* Vet Pathol., 2017.

WANG, J. S; KEFALOV, V. J. *The cone-specific visual cycle.* Prog Retin Eye Res., 2011.

- WASSLE, H. *Parallel processing in the mammalian retina*. Nature Review Neuroscience, 2004.
- WÄSSLE, H.; BOYCOTT, B. B. *Functional architecture of the mammalian retina*. Physiol Rev., 1991.
- WATANABE, T.; RAFF, M. C. *Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve*. Nature, 1988.
- WAX M. B.; TEZEL G. *Neurobiology of glaucomatous optic neuropathy: diverse cellular events in neurodegeneration and neuroprotection*. Mol Neurobiol. 2002.
- WEBSTER, M. J.; BACHEVALIER, J.; UNGERLEIDER, L. G. *Connections of inferior temporal areas TEO and TE with parietal and frontal cortex in macaque monkeys*. Cereb Cortex, 1994.
- WEBSTER, M. J.; UNGERLEIDER, L. G.; BACHEVALIER, J. *Lesions of inferior temporal area TE in infant monkeys alter cortico-amygdalar projections*. Neuroreport., 1991.
- WELIKY, M.; KATZ, L. C. *Correlational structure of spontaneous neuronal activity in the developing lateral geniculate nucleus in vivo*. Science, 1999.
- WONG, R. O. *Retinal waves and visual system development*. Annu Rev Neurosci., 1999.
- WONG, R. O.; MEISTER, M.; SHATZ, C. J. *Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina*. Neuron, 1993.
- XIANG, L.; ZHOU, J. P.; MACKE, T.; YOSHIOKA, S. H.; HENDRY, R. L.; EDDY, T. B. *The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons*. Journal of Neuroscience, 1995.
- XUE, T.; DO, M. T.; RICCIO, A.; JIANG, Z.; HSIEH, J.; WANG, H. C.; MERBS, S. L.; WELSBIE, D. S.; YOSHIOKA, T.; WEISSGERBER, P.; STOLZ, S.; FLOCKERZI, V.; FREICHEL, M.; SIMON, M. I.; CLAPHAM, D. E.; YAU, K. W. *Melanopsin signalling in mammalian iris and retina*. Nature, 2011.
- YAMAMOTO, H.; SCHMIDT-KASTNER, R.; HAMASAKI, D. I.; YAMAMOTO, H.; PAREL, J. M. *Complex neurodegeneration in retina following moderate ischemia induced by bilateral common carotid artery occlusion in Wistar rats*. Exp Eye Res. 2006.
- YANG, X. J. *Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis*. Semin Cell Dev Biol., 2004.
- YONEDA, S; TANAKA, E; GOTO, W; OTA, T; HARA, H. *Topiramate reduces excitotoxic and ischemic injury in the rat retina*. Brain Res., 2003.
- YOUNG, R. W.; BOK, D. *Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process*. J Cell Biol., 1969.
- YUSTE, R. *Introduction: spontaneous activity in the developing central nervous system*. Semin Cell Dev Biol., 1997.

ZANELLI, S. A.; NAYLOR, M.; DOBBINS, N. QUIGG, M.; GOODKIN, H. P.; MATSUMOTO, J. A.; FAIRCHILD, K. D. *Implementation of a 'Hypothermia for HIE' program: 2-year experience in a single NICU.* J Perinatol., 2008.

ZHANG, C; ROSENBAUM, D.M; SHAIKH, A.R; LI, Q; ROSENBAUM, P.S; PELHAM, D.J; ROTH, S. *Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002 Sep;43(9):3059-66.

ZHANG, F.; REN, C. C.; LIU, L.; CHEN, Y. N.; YANG, L., ZHANG, X. A.; WANG, X. M.; YU, F. J. *SHH gene silencing suppresses epithelial-mesenchymal transition, proliferation, invasion, and migration of cervical cancer cells by repressing the hedgehog signaling pathway.* J Cell Biochem. 2017.