



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

Lara Silva Fonseca

**Reatividade da astroglia durante o desenvolvimento da retina de
ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal**

Rio de Janeiro

2019

Lara Silva Fonseca

**Reatividade da astroglia durante o desenvolvimento da retina de ratos
submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal**

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

Orientador: Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe

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

Rio de Janeiro

2019

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

F676 Fonseca, Lara Silva.
Reatividade da astrogliá durante o desenvolvimento da retina de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal / Lara Silva Fonseca. – 2019.
91f.

Orientador: Thomas Eichenberg Krahe.
Coorientadora: Penha Cristina Barradas Daltro Santos.

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Isquemia cerebral - Teses. 2. Hipoxia-isquemia encefálica. 3. Astrocitos. 4. Retina - Teses. I. Krahe, Thomas Eichenberg. II. Santos, Penha Cristina Barradas Daltro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.831-005

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

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

Assinatura

Data

Lara Silva Fonseca

**Reatividade da astrogliia durante o desenvolvimento da retina de ratos
submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal**

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

Aprovada em 30 de agosto de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Eichenberg Krahe
Pontificia Universidade Católica

Coorientadora: Prof.^a Dra. Penha Cristina Barradas Daltro Santos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca examinadora: _____
Prof.^a Dra. Yael de Abreu Villaça
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Elizabeth Giestal de Araújo
Universidade Federal Fluminense

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

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eliane Martins da Silva Fonseca e José Eugênio Moraes Fonseca

AGRADECIMENTOS

Esses são os momentos que nos fazem refletir sobre nossa própria capacidade, sobre as verdadeiras e fiéis companhias e recordar os melhores e piores momentos vividos para se chegar até aqui. Antes de tudo e de todos, agradeço aos inocentes que contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus orientadores pela ajuda, dedicação, compreensão e paciência. O meu orientador Prof. Thomas, me ensinou a praticar a auto-avaliação com mais frequência e cuidado, dessa forma, aprendi a dosar o quanto exigir de mim e dos outros. Já a minha co-orientadora Prof.^a Penha foi a responsável por me motivar e ajudar nos momentos mais complicados do laboratório e do mestrado.

Aos meus colegas de bancada que me proporcionaram risadas, motivação e auxílio em cada passo dentro e fora do laboratório.

Aos meus pais que me apoiam diariamente no sonho de ser pesquisadora e pelo colo.

Agradeço a Deus, pela proteção e por conseguir realizar esse sonho. Estando cada vez mais perto, mas ainda com muito caminho a percorrer.

A todos aqueles que, de alguma forma, me deram forças para continuar meu caminho.

A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível.

Cora Coralina

RESUMO

FONSECA, Lara Silva. *Reatividade da astrogliia durante o desenvolvimento da retina de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal*. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O insulto hipóxico-isquêmico (HI) é o responsável por diversos comprometimentos no SNC, durante o seu desenvolvimento ou na fase adulta. Suas consequências podem causar diversos graus de retinopatias e deficiências visuais. Dessa forma, investigar os efeitos desse insulto na retina pode auxiliar a elucidar os mecanismos responsáveis pelas consequências e assim traçar medidas terapêuticas. Esse trabalho buscou mimetizar o evento mais ocorrido em humanos, que ocorre de forma pré-natal e pode ser irreversível. Utilizando um modelo em que o fluxo uterino e ovariano da rata grávida é obstruído por 45 minutos no 18º dia gestacional, já foi relatada diminuição da espessura do nervo óptico e das projeções retinianas no Núcleo Genuculado Lateral dorsal (NGLd), perda de CCG e a não manutenção da constrição pupilar. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a reatividade glial na retina de ratos Wistar durante o desenvolvimento (aos dois, nove, vinte e três e trinta dias pós-natal). Foi realizado o procedimento cirúrgico de indução de HI com a obstrução do fluxo uterino e ovariano (grupo HI) por 45 minutos no décimo oitavo dia da gestação. Animais que passaram por todo procedimento cirúrgico exceto pela obstrução do fluxo sanguíneo constituem o grupo falso operado (SH). Foi realizada a avaliação histológica com o objetivo de avaliar o desenvolvimento e a resposta ao insulto HI nas células da linhagem astrogliial da retina, astrócitos e glia de Muller, utilizando a imunohistoquímica para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e para a vimentina (VIM). Também foi avaliada a imunomarcagem para o transportador de glutamato GLAST. Os resultados obtidos mostraram que o insulto HI promove um aumento da marcação de GFAP e VIM no trigésimo dia pós-natal, bem como altera o padrão de imunomarcagem para o transportador GLAST, antecipando o pico de marcação para a idade de nove dias no grupo HI. Em conjunto, os resultados mostram que também na retina ocorre a gliose já relatada em outras regiões do encéfalo de animais submetidos a esse modelo de HI pré-natal. Somados aos resultados obtidos referentes ao transportador GLAST, reforçamos a hipótese de alterações no transporte de glutamato que podem contribuir para a excitotoxicidade glutamatérgica, um dos eventos responsáveis pela morte neuronal oriunda dessa lesão. O modelo de HI pré-natal desenvolvido nesse trabalho, mais uma vez, se mostra uma ferramenta importante para o estudo das lesões causadas pela HI durante o desenvolvimento, assim como para a avaliação de possíveis estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Hipóxia-isquemia pré-natal. Retina. Desenvolvimento. Gliose. GLAST.

ABSTRACT

FONSECA, Lara Silva. *Astroglial reactivity during retinal development of rats submitted to a prenatal hypoxia-ischemia model*. 2019. 91f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The hypoxic-ischemic insult (HI) is responsible for several CNS compromises during its development or at adulthood. Its consequences can cause varying degrees of retinopathy and visual impairment. Thus, investigating the effects of this insult on the retina may help to elucidate the mechanisms responsible for the consequences and thus outline therapeutical approaches. This work sought to mimic the most common human event, which occurs prenatally and may be irreversible. Using a model in which the uterine and ovarian flow of the pregnant rat is obstructed for 45 minutes on the 18th gestational day, a decrease in the optic nerve thickness and in the retinal projections in the dorsal lateral geniculate nucleus (NGLd), GCL loss and failure to maintain pupillary constriction have been reported. The aim of this study was to evaluate the retinal glial reactivity of Wistar rats during development (at two, nine, twenty three and thirteen postnatal days). The surgery for HI induction was performed with obstruction of uterine and ovarian flow (HI group) for 45 minutes on the eighteenth day of gestation. Animals that underwent all surgical procedure except for obstruction of blood flow constitute the sham-operated group (SH). Histological evaluation was performed to evaluate the development and response to the HI insult in cells of the retinal astroglial lineage, astrocytes and Muller's glia, using immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (VIM). Immunostaining for the GLAST glutamate transporter was also evaluated. The results showed that HI insult promotes an increase in GFAP and VIM labeling on the thirtieth postnatal day, as well as alters the immunostaining pattern for the GLAST transporter by anticipating the peak of labeling to the ninth day in the HI group. Taken together, the results show that, also in the retina, a gliosis occurs, as also described in other brain regions in rats submitted to this prenatal HI model. In addition to the results obtained for the GLAST transporter, we reinforce the hypothesis that glutamate transport alterations may contribute to glutamatergic excitotoxicity, one of the events responsible for neuronal death in this kind of lesion. Once more, we showed that the prenatal HI model used in this study is an important tool to be used in order to understand the mechanisms of the lesions caused by HI during development, as well as for the evaluation of possible therapeutic strategies.

Keywords: Prenatal hypoxia-ischemia. Retina. Development. Gliosis. GLAST.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustrações da anatomia do olho de ratos e de humanos.....	20
Figura 2 - Ilustração das camadas da retina e seus corpos celulares.....	22
Figura 3 - Linha temporal do desenvolvimento das células retinianas em roedores. 28	
Figura 4 - Ilustração da retina de ratos entre o dia do nascimento (P0) e o segundo dia pós-natal (P2).	29
Figura 5 - Cirurgia para indução de HI.	40
Figura 6 - Imunomarcção para GFAP nas retinas de ratos na idade P30.....	44
Figura 7- Imunomarcção para vimentina nas idades P2, P9, P23 e P30, respectivamente nos grupos SH e HI.	48
Figura 8 - Dupla marcação de GFAP e vimentina em P30.....	52
Figura 9 - Imunomarcção para EAAT-1 nas idades P2, P9, P23 e P30 nos grupos	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Evolução da massa corporal (em gramas) dos animais entre o dia pós-natal P2 e P30.	43
Gráfico 2 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI.	45
Gráfico 3 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI na CCG.	46
Gráfico 4 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI nas Camadas Plexiformes.	46
Gráfico 5 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI.	49
Gráfico 6 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI na CCG.	50
Gráfico 7 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI nas Camadas Plexiformes.	50
Gráfico 8 - Distribuição da marcação de EAAT-1 na retina, em intensidade de pixels, dos grupos HI e SH durante o desenvolvimento.	56
Gráfico 9 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI.	57
Gráfico 10 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI na camada CCG.	58
Gráfico 11 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI nas Camadas Plexiformes.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
ANOVA _r	Análise de variância com medidas repetidas
ATP	Trifosfato de Adenosina, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
BRB	Barreira hemato-retiniana, do inglês <i>Blood-Retinal Barriers</i>
Ca ²⁺	Íons cálcio
CCGs	Camada de Células Ganglionares
CGRs	Células ganglionares da retina
CO ₂	Dióxido de carbono
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
CF	Camada dos Fotorreceptores
CFO	Camada de Fibras Ópticas
CNE	Camada Nuclear Externa
CNI	Camada Nuclear Interna
CP	Camada Plexiforme
CPE	Camada Plexiforme Externa
CPI	Camada Plexiforme Interna
CPR	Células progenitoras da retina
EAAC1	Carreador de Aminoácidos Excitatórios do tipo 1
EAAT _n	Transportador de Aminoácidos Excitatórios do tipo <i>n</i>
EAAT1	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 1
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 2
EAAT4	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 4
EAAT5	Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 5
EGF	Fator de Crescimento Epidermal, do inglês <i>Epidermal Growth Factor</i>

EHI	Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
EP	Epitélio Pigmentar
EPM	Erro padrão da média
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
GABA	Ácido gama-aminobutírico, do inglês <i>Gamma-Aminobutyric Acid</i>
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial, do inglês <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
Glu	Glutamato
GLT	Transportadores de glutamato, do inglês <i>Glutamate Transporter</i>
h	Hora (s)
HI	Hipóxia-isquemia
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
LTP	Potenciação a longo prazo
M	Molar
min	Minuto (s)
NMDA	N-metil D-aspartato
nNOS	Óxido-nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido-nítrico sintase
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SH	Controle cirúrgico, do inglês <i>Sham</i>
Shh	Do inglês, <i>Sonic hedgehog</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de necrose tumoral
TLR	Receptor do tipo Toll
UA	Unidades Arbitrárias
µm	Micrômetros

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 Consequências de HI no SNC.....	15
1.2 Olho: diferenças e semelhanças entre o humano e o rato.	19
1.3 Retina: função e morfologia.....	20
1.3.1 <u>Glia de Müller e Astrócitos</u>	23
1.3.2 <u>Desenvolvimento embrionário da retina</u>	27
1.4 Transportador de Glutamato no SNC.....	29
1.5 Hipóxia-Isquemia – Suas consequências em diversos modelos	32
1.6 Justificativa do estudo	34
2 OBJETIVO GERAL	37
2.1 Objetivos específicos	37
3 METODOLOGIA	38
3.1 Animais.....	38
3.2 Procedimento cirúrgico.....	38
3.3 Dissecção e secção das retinas	40
3.4 Imunohistoquímica	41
3.5 Análise das imagens	42
3.6 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Perda de ninhadas após o procedimento cirúrgico.....	43
4.2 HI apresenta menor massa corporal em P9 e P30	43
4.3 Análise Morfológica.....	44
4.3.1 <u>HI apresenta aumento da expressão de GFAP</u>	44
4.3.2 <u>HI altera o fenótipo da Glia de Müller</u>	47
4.3.3 <u>EAAT-1</u>	53
5 DISCUSSÃO	59
CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65

INTRODUÇÃO

Já se sabe pela literatura médica que o ambiente adverso *in utero* pode trazer disfunções fetais e levar a patologias pós-natal a longo prazo devido à adaptação que esse feto pode sofrer, podendo ser irreversível, para sobreviver às alterações do ambiente (CHEN e ZHANG, 2011). Durante os períodos pré- e perinatal o Sistema Nervoso Central (SNC) pode sofrer alterações, mas seus danos dependem das características do tipo de insulto, da intensidade, da área afetada e do período de desenvolvimento desse tecido (MCINTYRE et al., 2013).

A hipóxia-isquemia (HI) é uma das possíveis lesões que podem ocorrer. No período pré-natal a sua ocorrência pode ser por fatores tais como: parto prematuro, insuficiência placentária, trabalho de parto prolongado, dobras no cordão umbilical, disfunção pulmonar ou cardíaca fetal (de HAAN et al., 2006; MARTINEZ-BIARGE et al., 2012; PROCIANOY e SILVEIRAL, 2001). Estudos também acrescentam a esta lista: sangramento materno, eventos de pré-eclâmpsia (PAOLO, 2012) e fatores de risco como: tabagismo, anemia, hipotensão, nascimentos múltiplos e uso de drogas (PUNDIK et al., 2006). Em 2009, a HI foi indicada como a principal causa de mortalidade infantil no Estudo de Carga Global de Doenças (LEITE et al., 2009) e, no Brasil, sua ocorrência foi estimada em 1,93% no ano de 2015 (FRANÇA, et al., 2017). A incidência desse insulto no mundo Ocidental é de 1 – 4/1.000 nascidos-vivos (KURINCZUK et al., 2010), sendo que de 25 a 50% (0,5 – 1/1.000) dos afetados irá desenvolver um estado significativamente alterado de função cerebral (WOOD et al., 2018). Em países de baixa e média renda, as taxas de encefalopatias hipóxico-isquêmico (HIE) são até 10 vezes maiores do que no mundo ocidental e a asfixia perinatal representa 23% das mortes neonatais (ou seja, 8% de todas as mortes durante a infância) em todo o mundo (PAULIAH et al., 2013).

A HI consiste no bloqueio de nutrientes e oxigênio para determinado tecido ou sistema. As alterações no ambiente celular mostram que o insulto desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos, celulares e patológicos que resultam em lesão celular e morte no encéfalo (SHIAN et al., 1994; ZHANG et al., 2013). O encéfalo imaturo e a retina em desenvolvimento são tecidos mais susceptíveis a mudanças nos níveis de oxigênio (REY-FUNES, 2013), fato justificado por suas intensas atividades metabólicas (COHEN e NOELL, 1960). O bloqueio do fluxo sanguíneo no

encéfalo pode causar déficits motores, cognitivos e comportamentais (TYSON e SAIGAL, 2005), além de vários graus de retinopatias que, em alguns casos, pode levar à cegueira (REY-FUNES, 2013). Cerca de mais da metade de neonatos que passaram pela HI apresentam alguma deficiência visual, como por exemplo: campo visual reduzido, estrabismo, baixa acuidade visual, ambliopia, neuropatia óptica, nistagmo e visão de cor defeituosa (GOOD e HARDY, 2001; GUZZETTA et al., 2001). Nos casos mais graves, como indicado anteriormente, pode ocorrer a morte fetal (JOHNSTON et al., 2011; VOLPE, 2012).

Atualmente, apenas a hipotermia é aceita como estratégia terapêutica para neonatos a termo acometidos pelo insulto hipóxico-isquêmico pré-natal. Há resultados que demonstram que a indução de hipotermia moderada pode ser capaz de reduzir a mortalidade e os danos motores, o que resultaria em melhorias significativas para neonatos que sofreram HI moderada. Entretanto, esse efeito benéfico possui uma janela de oportunidade para redução dos danos de até 6 horas após o nascimento, não demonstrando efeitos benéficos em prematuros (HIGGINS et al., 2011), grupo mais acometido pelos eventos de hipóxia-isquemia (FRANÇA et al., 2017).

A inflamação tem sido sugerida como um importante fator envolvido na patogênese das retinopatias induzidas pela HI pré-natal (SIVAKUMAR et al., 2011). O processo inflamatório no SNC pode ser caracterizado pela ativação das células de Müller, alterações no Epitélio Pigmentar (EP) e apoptose das Camada de Células Ganglionares (CCGs) (KERGOAT et al., 2006; SCHMIDT et al., 2018).

O desenvolvimento de estudos em modelos animais tem ajudado na compreensão dos mecanismos celulares/moleculares das lesões causadas pelo evento hipóxico-isquêmico (RICE et al., 1981; SILVERSTEIN e JOHNSTON, 1984; SILVERSTEIN et al., 1991; FERRIERO et al., 1988; FERRIERO et al., 1995; BURKE et al., 1991). Assim, o bloqueio de receptores de glutamato (LEONARDO e PANNYPACKER, 2009), inibição de óxido nítrico sintases (BLOMGREN e HAGBERG, 2006), prevenção de apoptose (NIJBOER et al, 2008; WANG et al 2010) e formação de radicais livres (TAJEDDINE, 2016), a administração de corpos cetônicos (WOOD et al., 2018), bem como a administração de fatores de crescimento e neurotróficos (AUTRY e MONTEGGIA, 2012; CANNON et al., 2008; CASEY et al., 2009; SHOVAL e WEIZMAN et al., 2005) vêm sendo avaliados como potenciais ferramentas terapêuticas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Consequências de HI no SNC

Em decorrência da HI, o encéfalo se adapta ao meio adverso utilizando mecanismos que permitam a sua sobrevivência e homeostase (LI et al., 2017). Ao nível celular, as vias produtoras de energia aumentam a sua produtividade por meio de metabolismo anaeróbico (via glicolítica – produção de ácido láctico), além da redução de consumo energético de processos de maior consumo (CERRETELLI, 1992). Conforme a molécula de ATP (energia) vai se esgotando, há a realocação dessa energia de acordo com uma hierarquia dos processos que consomem ATP durante a hipóxia (CUI et al., 2015; CHANDEL et al., 2000). Também há um déficit nos transportadores de membrana que leva ao acúmulo de sódio e cálcio intracelular, assim despolarizando e liberando níveis excitotóxicos de glutamato (HAGBERG et al., 1993; BLOMGREN e HAGBERG, 2006). Com a ativação dos receptores glutamatérgicos, AMPA e N- metil -D-receptores aspartato (NMDA), mantém-se constante o influxo de cálcio para a célula neuronal, levando ao acúmulo na matriz mitocondrial (THORNTON et al., 2017).

No encéfalo ainda imaturo, o influxo de cálcio leva a um edema mitocondrial (fase primária) logo após 30 minutos do insulto, podendo perpetuar por até 3 horas (PUKA-SUNDEVALL et al., 2000). Outros dados demonstram que neonatos a termo (> 36 semanas) possuem uma grande vulnerabilidade neuronal a lesões e morte (RUTHERFORD et al., 2010). A reperfusão possibilita a ocorrência de uma fase latente, recuperando de forma transitória as reservas de ATP - quase a níveis fisiológicos, um ponto chave para uma janela terapêutica de 1-6 horas após a lesão (THORNTON et al., 2017). Porém, há uma falha de energia posteriormente (fase secundária), que pode durar de horas a dias, onde ocorre a morte celular. Nas horas subsequentes ao insulto, os mecanismos prejudiciais da fase secundária levam à morte das células neuronais. Estes incluem: excitotoxicidade, deterioração da função mitocondrial, inflamação, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação da óxido-nítrico sintase (NOS) e acúmulo de íons de cálcio (Ca^{2+}) intracelular (BLUMBERG et al., 1997; LOREK et al., 1994). Na literatura há estudos

realizados em roedores demonstrando que a prevenção/intervenção nessa fase de morte celular oferece neuroproteção a longo prazo (NIJBOER et al., 2008; WANG et al., 2010). Porém, se não for bem-sucedida, há mais uma fase que pode durar de semanas a anos, o que caracteriza uma inflamação contínua/persistente e modificações epigenéticas (FLEISS e GRESSENS, 2012).

A persistente inflamação desempenha um papel importante no desenvolvimento do tecido nervoso, na lesão cerebral e também nos mecanismos subsequentes de reparo (TEO et al., 2015). O insulto leva à ativação da microglia. Ela exibe função dualista, assim como perfil morfológico distinto. Esses fenótipos são classificados em pró-inflamatório (M1) ou anti-inflamatório (M2), regenerativo (HU et al., 2015), fornecendo reparo tecidual e neuroregeneração após a lesão (HAGBERG et al., 2015). Em seguida, há liberação de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas interleucina (IL) -1 β e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Os níveis de IL-1 β aumentam após a HI (HEDTJÄRN et al., 2002; HAGBERG et al., 1996) e a lesão cerebral excitotóxica pode ser reduzida por um antagonista do receptor de IL-1 β em ratos neonatos (HAGAN et al., 1996). Também foi constatado um aumento de TNF- α em ratos neonatos após o insulto HI (HU et al., 2005). Da mesma forma, a expressão gênica de TNF- α e IL-1 β no encéfalo é aumentada após um insulto excitotóxico central em camundongos neonatos, e esta foi reduzida em camundongos nocautes para TNF- α e pelo bloqueio do TNF- α (ADÉN et al., 2010). Também há a mobilização de macrófagos, infiltração de leucócitos, liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial (BARON e FEUERSTEIN, 1999; DEL ZOPPO et al., 2000), o que também contribui substancialmente para a patogênese da lesão cerebral por HI perinatal (BENJELLOUN et al., 1999). As ações sinérgicas desses processos patológicos exacerbam a lesão, levando à deterioração das funções neurológicas (BARONE e FEUERSTEIN, 1999), sendo a resposta iniciada em um período de 10 minutos após a lesão (SHEN et al., 2011).

A lesão HI neonatal causa a ativação microglial (BENJELLOUN et al., 1999) que ao se infiltrar no local lesionado remove os detritos celulares. Essa ocorrência foi observada em bebês com lesão cerebral por HI (DEL BIGIO e BECKER, 1994). A estimulação dos processos neuro-inflamatórios decorrentes da ativação microglial pode aumentar os danos neurológicos após a lesão HI (TANG et al., 2014), onde a produção de citocinas pode levar à morte celular.

Os astrócitos também fazem parte dessa cascata de sinalização, pois fazem parte dos ciclos regulatórios dos processos inflamatórios intrínsecos do tecido nervoso. Além disso, os astrócitos reativos são uma característica importante em muitos eventos neuropatológicos (RANJBAR et al., 2019). Após sua ativação, eles sofrem alterações morfológicas e funcionais severas. O fenótipo funcional dos astrócitos ativados pode ser prejudicial (pró-inflamatório) ou protetor (anti-inflamatório). Os astrócitos pró-inflamatórios perdem a sua capacidade de promover a sobrevivência neuronal, o crescimento, a sinaptogênese e a fagocitose, além de induzir a morte de neurônios e oligodendrócitos (LIDDELOW et al., 2017). Além disso, os astrócitos reativos podem inibir a regeneração do axônio e a plasticidade neuronal (SOFRONIEW, 2015). Em contraste, eles estão envolvidos na regulação da homeostase da água e dos íons, no fluxo sanguíneo cerebral e no controle do nível extracelular de glutamato, além de serem a fonte de uma variedade de fatores neuroprotetores (GABRYEL et al., 2015). Os astrócitos podem ser ativados por sinais de imunidade inata ou adaptativa como, por exemplo, estimulação (direta ou indiretamente) por lipopolissacarídeos (LPS) via sinalização do receptor do tipo Toll (TLR) - uma clássica cascata de imunidade inata (CHISTYAKOV et al., 2018). Além das células da microglia serem cruciais para o sistema imune inato no encéfalo, elas são potentes ativadoras de astrócitos (MANDER et al., 2006).

No encéfalo de ratos neonatos, após uma lesão, os astrócitos proliferam e sofrem hipertrofia, invadindo o local da lesão para formar uma barreira entre tecidos saudáveis e danificados (SIZONENKO et al., 2008) e formar cicatrizes gliais (GARCIA et al., 1993). Esses processos auxiliam o tecido cerebral circundante de várias maneiras, incluindo a limpeza excessiva de glutamato e a manutenção de gradientes iônicos e processos metabólicos. Em contraste, os astrócitos ativados também são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias que tendem a piorar a lesão (LEE et al., 1993). Algumas características patológicas adquiridas após o insulto são: proliferação, inchaço rápido e aumento da ocorrência de níveis de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que denomina o processo em astrogliose reativa (SUZUKI et al., 2011).

O estresse oxidativo é outra consequência da HI no SNC. Durante as últimas semanas de gravidez há a maturação e regulação para cima dos sistemas de defesa antioxidantes que são utilizados pelo feto para lidar com o estresse oxidativo fisiológico que ocorre durante o nascimento (DAVIS e AUTEN, 2010; AL-GUBORY et

al., 2010). Quando a geração de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) excedem a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos. Os radicais livres podem ser gerados em situações metabólicas estressantes, como hipóxia, isquemia, reperfusão, infecções, ativação de neutrófilos e macrófagos, ácidos graxos livres, entre outros (BUONOCORE, 2001). Em condições fisiológicas normais, baixas concentrações de ROS e RNS atuam até como moléculas sinalizadoras (ZHU et al., 2007), estando também envolvidas na proliferação e diferenciação das células neuronais (NUGUD, 2018). Os bebês prematuros e recém-nascidos são particularmente suscetíveis a esse evento devido ao fato de que: 1) a mudança no ambiente hipóxico intrauterino para condições normóxicas no nascimento; 2) recém-nascidos, especialmente prematuros, são imunodeficientes, sendo, portanto, suscetíveis a infecções; 3) os prematuros e recém-nascidos possuem mecanismos de defesa antioxidante imaturos; 4) recém-nascidos têm altos níveis de ferro livre, o que pode induzir a geração de radicais hidroxila (OZSUREKCI e AYKAC, 2016; PANFOLI et al., 2018).

O descompasso desses radicais pode levar a consequências como a neuroinflamação, o dano mitocondrial e a alteração irreversível do estado redox dos neurônios, comprometendo suas funções e sobrevivência (TORRES-CUEVAS et al., 2017). A HI leva à diminuição da síntese de ATP nas mitocôndrias e ao comprometimento da regulação do metabolismo cerebral. Posteriormente, à acidose láctica, à perturbação de transporte iônico nas células (com o aumento no influxo de cálcio intracelular) e a estimulação do óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), que gera a produção de óxido nítrico (NO), um radical livre responsável pela falha de energia secundária e morte celular neuronal (THORNTON et al., 2017).

Nessas circunstâncias, desenvolve-se o estresse oxidativo/nitrosativo, levando à ativação de vias que amplificam o dano original no tecido, como é o caso dos fatores de transcrição pró-inflamatórios (NF- κ B) ou das vias proapoptóticas (Bcl-2, caspase-3) (DI FIORE e VENTO, 2019). Danos devido ao acúmulo excessivo de ROS/RNS e reações redox prejudicadas são considerados como fatores causais ou resultados da patogênese cerebral de muitos problemas neonatais no encéfalo (KURUTAS, 2016). Por exemplo, a acumulação de ROS ou RNS mostra-se crítica para a potenciação do hipocampo a longo prazo (LTP), uma forma de plasticidade sináptica que é considerada como um substrato biológico para aprendizagem e memória (KNAPP, L.T.; KLANN, 2002). ROS e RNS influenciam fortemente a

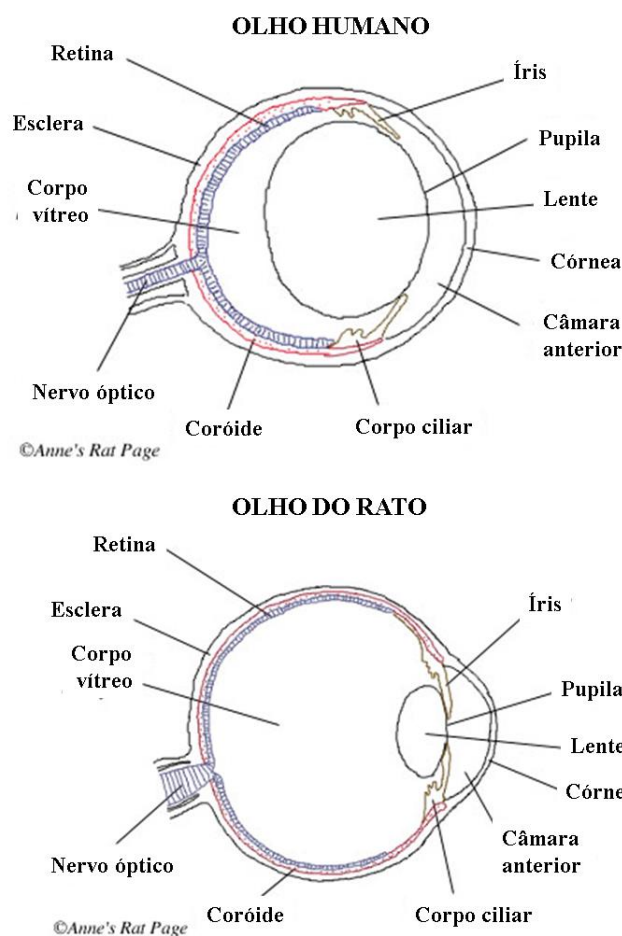
excitotoxicidade, a morte celular e a mitocôndria (PERRONE et al., 2010; MAYURASAKORN et al., 2016). Porém, as ROS também ativam as moléculas citoprotetoras endógenas para o sistema de defesa antioxidante fetal (HOLMSTRÖM e FINKEL, 2014).

1.2 Olho: diferenças e semelhanças entre o humano e o rato

O olho permite uma análise detalhada do objeto, diferenciando tonalidades de cores e luminosidade com a retina. Estruturalmente, consiste em três túnicas altamente organizadas; possui - da camada mais externa para a mais interna - esclera (ou esclerótica) e córnea; coroide, corpo ciliar e íris, também nomeada de túnica vascular; e a retina, que se comunica pelo nervo óptico com o encéfalo. A camada pigmentar é formada pela coroide, que possui um leito capilar que nutre a retina (MARMOR, 2011), também se comunicando com o segmento externo dos fotorreceptores, participando da reciclagem de suas membranas (YOUNG e BOK, 1969) e da troca de metabólitos com a retina (KUBRUSLY et al., 2003).

Nos olhos, tanto humanos quanto de roedores (Figura 1), a luz percorre das estruturas mais externas do olho em direção a mais interna, passando pela córnea, seguindo para o cristalino e incidindo sobre a retina (HEMMINGSEN e DOUGLAS, 1970). Chegando à retina, a luz é detectada pelos fotorreceptores, que se dividem nos tipos cone e bastonete. Em contraste com os seres humanos, os roedores possuem dois tipos de cones, com fotopigmentos que apenas detectam as faixas de comprimento de onda verde e azul (JACOBS et al., 1991). Inclusive, a retina de ratos possui apenas 1% de cones, diferentemente da retina humana que contém 5% (LAVAIL, 1976), justificando que os seres humanos sejam diurnos, contrapondo os roedores em geral que são notívagos, (ANDRADE et al., 2002).

Figura 1 - Ilustrações da anatomia do olho de ratos e de humanos



Fonte: The Rat's Eyes. Disponível em:< <http://www.ratbehavior.org/Eyes.htm>>. Acesso em: 09mai. 2019. Adaptado de Fry (1949).

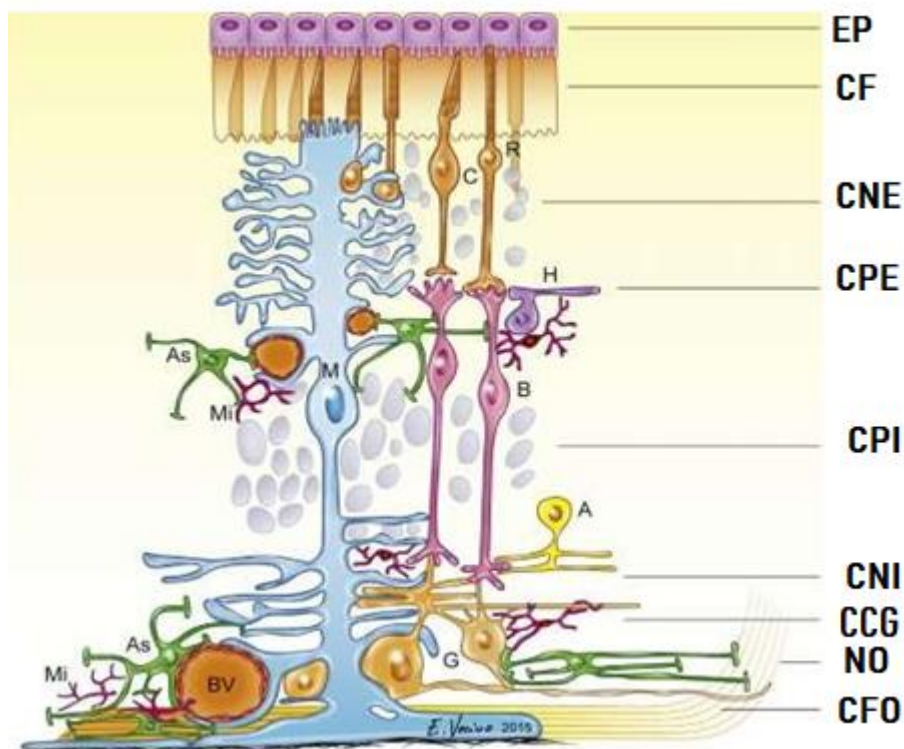
1.3 Retina: função e morfologia

As camadas da retina são justapostas de forma laminar (Figura 2) e diferenciam-se, da superfície externa para a mais interna, em oito camadas com cinco tipos celulares neuronais principais. São eles os fotorreceptores, as células amácrinas, as horizontais, as bipolares e as ganglionares (LIVESEY e CEPKO, 2001); as camadas são: o Epitélio Pigmentar (EP), sendo um componente não neuronal; a Camada dos Fotorreceptores (CF), com os cones e bastonetes; a Camada Nuclear Externa (CNE), com os corpos celulares dos fotorreceptores; a Camada Plexiforme Externa (CPE), que contém os terminais axônicos dos fotorreceptores e dos dendritos das células horizontais e bipolares; a Camada

Nuclear Interna (CNI), com os corpos das células bipolares, horizontais, amácrinas e da glia de Müller; a Camada Plexiforme Interna (CPI), contendo os terminais axônicos das células amácrinas e bipolares, bem como os dendritos das células ganglionares; a Camada de Células Ganglionares (CCG), com os corpos das células ganglionares e amácrinas deslocadas; e ao final, a Camada de Fibras Ópticas (CFO), contendo os axônios das células ganglionares, que formam o nervo óptico que projetam para os núcleos encefálicos da visão. Os prolongamentos da glia de Müller percorrem desde o fim da camada dos fotorreceptores até a camada de fibras ópticas (MARQUARDT E GRUSS, 2002; WÄSSLE, 2004). Os astrócitos estão presentes apenas na CFO e a microglia é quase restrita às camadas retinianas mais internas da retina, mais especificamente, a partir da CPE (STONE e DREHER, 1987; WATANABE e RAFF, 1988; SILVERMAN e WONG, 2018; RATHNASAMY, 2018).

De acordo com cada tipo celular, há características e funções específicas para manter o correto funcionamento da retina. Iniciando pela camada mais externa, onde se encontram os cones e bastonetes, elas são células com dipolo. Seu dendrito é fotossensível e seu axônio faz sinapse com as células bipolares. Em sua composição há pigmentos sensíveis à luz, nos cones é a iodopsina e nos bastonetes a rodopsina, que se convertem na proteína opsina após a decomposição pela luz, sendo esta substância um carotenoide relacionado a aldeídos de vitamina A (GUYTON e HALL, 2006). Esses dois tipos celulares são responsáveis pela primeira parte da transdução do estímulo visual, dessa forma, a alteração do potencial elétrico dos fotorreceptores que em seguida irá modificar o potencial de membrana das células bipolares e desencadear o potencial de ação das células ganglionares (BICAS, 1997), que são as responsáveis por levar a informação da retina para os diversos núcleos visuais do encéfalo.

Figura 2 - Ilustração das camadas da retina e seus corpos celulares



Legenda: Esquema das camadas da retina madura e a localização dos seus respectivos. Observar a localização das diferentes camadas da retina (das camadas mais internas para as externas): Nervo Óptico (NO) ou 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 de glia Müller (M) e microglia (Mi).

Fonte: Adaptada de VECINO et al., 2016.

Os cones possuem uma resposta mais rápida e permitem a distinção de cores por um sistema de comparações de sinais entre seus subtipos. Este pode se direcionar para uma única célula ganglionar, formando um campo menor e aumentando a precisão visual. Dessa forma, sabe-se que na retina de humanos e primatas há uma região chamada mácula e, no seu centro, a fóvea e a foveola, áreas que permitem alcançar o maior grau de precisão de nitidez, formada unicamente de fotorreceptores do tipo cone (GUYTON e HALL, 2006). Já os bastonetes são mais sensíveis à luz do que os cones. Eles são capazes de serem ativados por um único fóton de luz (RODRIGUES, 2010). Contudo, os bastonetes levam mais tempo na conversão uma resposta, são facilmente sujeitos à saturação, e sua estrutura permite um campo visual maior, ou seja, na retina humana, de 15 a 30 bastonetes convergem para uma única célula ganglionar, podendo estar localizada na periferia ou na região central da retina. Estima-se que existam

aproximadamente seis milhões de cones em uma retina humana e aproximadamente 120 milhões de bastonetes (BICAS, 1997).

Na CNI, se localizam tipos celulares distintos, como as células bipolares difusas, com o potencial de estabelecer sinapse com dois ou mais fotorreceptores; as células bipolares (midget), que estabelecem contato com apenas um cone e uma célula ganglionar na camada CCG na camada CPI; as células horizontais, com seus prolongamentos posicionados horizontalmente e que estabelecem contato com vários fotorreceptores na CPE; as células amácrinas, que estabelecem contato com as células ganglionares (STRETTOI; MASLAND, 1995; JEON et al., 1998) e microglia.

A camada mais interna é a camada de células ganglionares (CCG). As células ganglionares podem estabelecer contato com as células bipolares e enviar seus axônios em direção à papila do nervo óptico, são difusas, monossinápticas e com um grande núcleo. Há uma diversidade nos tipos de células ganglionares, sendo cada um deles responsável por codificar diferentes aspectos das cenas visuais (WÄSSLE, 2004). Astrócitos e microglia também podem ser localizados na CCG.

1.3.1 Glia de Müller e Astrócitos

A retina de vertebrados pode conter três tipos de glia: microglia, glia de Müller e astrócitos. A microglia em condições normais expressa fatores neuroprotetores e anti-inflamatórios (STREIT, 2002), mas em condições patológicas ela pode beneficiar a retina, removendo resíduos e células degeneradas e secretando fatores de sobrevivência neuronal (STREIT, 2002; RIVEST, 2009). A microglia, conforme já descrito, também pode ser prejudicial por desencadear um ciclo de ativação persistente e levar ao recrutamento de células de inflamação adicionais (RIVEST, 2009). O contato da glia de Müller e astrócitos com neurônios e vasos circulantes os tornam vitais para a sobrevivência neuronal (KANDEL et al., 2001), podendo até desempenhar um papel na transmissão correta dos impulsos nervosos (PEREZ-ALVAREZ et al., 2013).

Predominantemente, a glia de Müller representa 90% das células da glia na retina (LIU et al., 2014). É um tipo de célula glial exclusiva da retina e possui uma ampla variedade de funções, além de compartilhar funções com astrócitos e células endoteliais em outras áreas do SNC, ela participa da homeostase, imunidade inata da retina e regeneração (KIMELBERG e NEDERGAARD, 2010). Porém, sua alta reatividade vem sendo associada a patologias retinianas e do sistema visual (BRINGMANN et al., 2006; DE MELO REIS et al., 2008; JADHAV et al., 2009; BRINGMANN e WIEDEMANN, 2012; WOHL et al., 2012; KUMAR et al., 2013; REICHENBACH e BRINGMANN, 2013; SEITZ et al., 2013; GALLINA et al., 2014; GOLDMAN, 2014; GORSUCH e HYDE, 2014; LENKOWSKI e RAYMOND, 2014; HAMON et al., 2016). Sua função fagocitária para detritos celulares mostra interações dinâmicas altamente coordenadas entre as células de Müller e a microglia (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2017).

A glia de Müller pode expressar marcadores astrogliais (ROESCH et al., 2008), como proteínas de filamentos intermediários, como vimentina, assim como podem expressar proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e nestina (LU et al. 2010; NICHIDA et al. 2000), bem como alguns genes envolvidos na fagocitose, sugerindo que esse tipo de célula pode fagocitar in vivo (BEJARANO-ESCOBAR et al., 2011).

Em resposta a uma lesão, as células de Müller passam a proliferar e expressar genes associados a progenitores retinianos, marcadores de ciclo celular e até mesmo marcadores de células-tronco (CHEN et al., 2013; VERKHRATSKY et al., 2014; JADHAV et al., 2009; ROESCH et al., 2008; ROESCH et al., 2008). Embora não permaneçam como progenitores (GOLDMAN, 2014), sob circunstâncias patológicas, a glia de Müller pode adotar características de progenitor retiniano e atuar no reparo, como já foi mostrado em cultura de roedores e células humanas, onde as células da glia de Müller geraram neurônios e/ou outras células gliais (DAS et al., 2006; Lawrence et al., 2007). Em culturas humanas primárias desse tipo celular observou-se a capacidade de gerar fotorreceptores e CGRs, ou seja, um potencial reparador quando transplantados na retina lesada de roedores (SINGHAL et al., 2012; JAYARAM et al., 2014; GIANNELLI, 2011).

A glia de Müller é resistente a danos, uma propriedade que pode ser atribuída às suas características metabólicas (glicólise anaeróbia) (BRINGMANN et al., 2009; GOHDO et al., 2001; PAASCHE et al., 1998). Ela responde à lesão da retina e doenças alterando sua morfologia, bioquímica e fisiologia (BRINGMANN et

al., 2009). Esta resposta gera a chamada gliose reativa, que dependendo da gravidade do dano pode incluir a proliferação dessa célula. Porém, os gatilhos para gliose proliferativa não são bem compreendidos ainda. Sendo uma resposta proliferativa e não proliferativa à lesão, são acompanhadas por mudanças na expressão de gene e proteínas, além de serem frequentemente associadas com hipertrofia da glia de Müller (GOLDMAN, 2014). Essa gliose reativa pode ser benéfica para os neurônios impedindo a neurotoxicidade do glutamato e liberando uma variedade de fatores que protegem os neurônios de morte celular (BRINGMANN et al., 2009). Entretanto, a manutenção desta ação de forma prolongada é prejudicial porque interfere na homeostase da retina e na capacidade da glia de Müller em dar suporte aos neurônios, levando, muitas vezes à neurodegeneração, além de exacerbar a progressão da doença, aumentando a permeabilidade vascular, a infiltração de compostos tóxicos e até mesmo a neovascularização (PENN et al., 2008). Ademais, o acúmulo de células em consequência de gliose proliferativa impede a função normal da retina (GOLDMAN, 2014).

Na retina de humanos, ratos e camundongos, os astrócitos se localizam principalmente na camada de fibras nervosas e na CCG (RAMIREZ et al., 1994; GALLEGO et al., 2012; RAMÍREZ et al., 2004). Sua morfologia difere entre as espécies: 1) humanos: dois tipos de astrócitos - os alongados (localizados na camada de fibras nervosas) e os em forma de estrela (localizados no CCG) (RAMÍREZ et al., 1996; RAMÍREZ et al., 2010); 2) em camundongos e ratos: os astrócitos são em forma estrelada (GALLEGO et al., 2012, RAMÍREZ et al., 2010). Numa resposta à lesão ou à doença, os astrócitos regulam a expressão de vários genes que codificam citocinas e quimiocinas, comprometendo a integridade da barreira hematorretiniana, promovendo a degeneração da retina (KIM e DUSTIN, 2006).

Esses dois tipos celulares participam da organização estrutural da retina por meio da criação de domínios microanatômicos não sobrepostos que se integram através de junções comunicantes (gap) (RAMÍREZ et al., 1996). Fornecem suporte físico e suplementam os neurônios com metabólitos, fatores de crescimento participam na orientação dos axônios, no controle da sinaptogênese (PFRIEGER, 2002; PFRIEGER, 2003).

Sabe-se que a glia de Müller está envolvida na manutenção da homeostase de neurotransmissores como o glutamato e o GABA (JOHNSON e MORRISON, 2009). Os neurotransmissores são metabolizados após a recaptação e convertidos em neurotransmissores ativos pelos astrócitos (HOZ et al., 2016). Esses podem responder à liberação do neurotransmissor, já que expressam muitos receptores de neurotransmissores, além de também modular a eficácia da sinapse liberando gliotransmissores (glutamato, GABA, ATP e D-serina) (HENEKA et al., 2010). Essa dupla também se envolve no metabolismo da glicose na retina, onde fornece aos neurônios da retina nutrientes (lactato/piruvato) para seu metabolismo oxidativo (BRINGMANN et al., 2006; TSACOPOULOS et al., 1996; POITRY-YAMATE et al., 1995) e na remoção de detritos metabólicos. Essas células também produzem uma grande quantidade de citocinas e fatores de crescimento (PENA et al., 1999; PENA et al., 2001), o que pode contribuir para as consequências malélicas, efeitos neurotóxicos, ou benéficas, efeitos neuroprotetores (SEITZ et al., 2013). Também possuem mais resistência ao dano oxidativo do que os neurônios. Este potencial é devido ao fato de que essas células contêm altas concentrações de antioxidantes, como a glutatona reduzida e vitaminas (WILSON, 1997).

Astrócitos e glia de Müller estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo local (VERKHRATSKY et al., 2014) em resposta a mudanças na atividade neuronal (KOEHLER et al., 2008). Sabe-se que moléculas como prostaglandinas (PGE), NO e ácido araquidônico (AA), que aumentam e/ou diminuem o diâmetro dos vasos sanguíneos do SNC e o fluxo sanguíneo, são produzidas pelos astrócitos (GORDON et al., 2007; IADECOLA e NEDERGAARD, 2007). Além de serem responsáveis pela indução de propriedades nas barreiras dos capilares da retina, BRB (barreira hemato-retiniana do inglês *Blood-Retinal Barriers*) (ABBOTT et al., 2006; TOUT et al., 1993). Eles liberam substâncias que estabilizam as junções entre células vasculares endoteliais (TOUT et al., 1993), dessa forma auxiliando na proteção dos neurônios ao dano potencial de uma resposta imune inflamatória. Além disso, as células da glia desempenham papéis fundamentais nas respostas imunes locais e na vigilância imunológica (ALOISI, 2001; DONG e BENVENISTE, 2001).

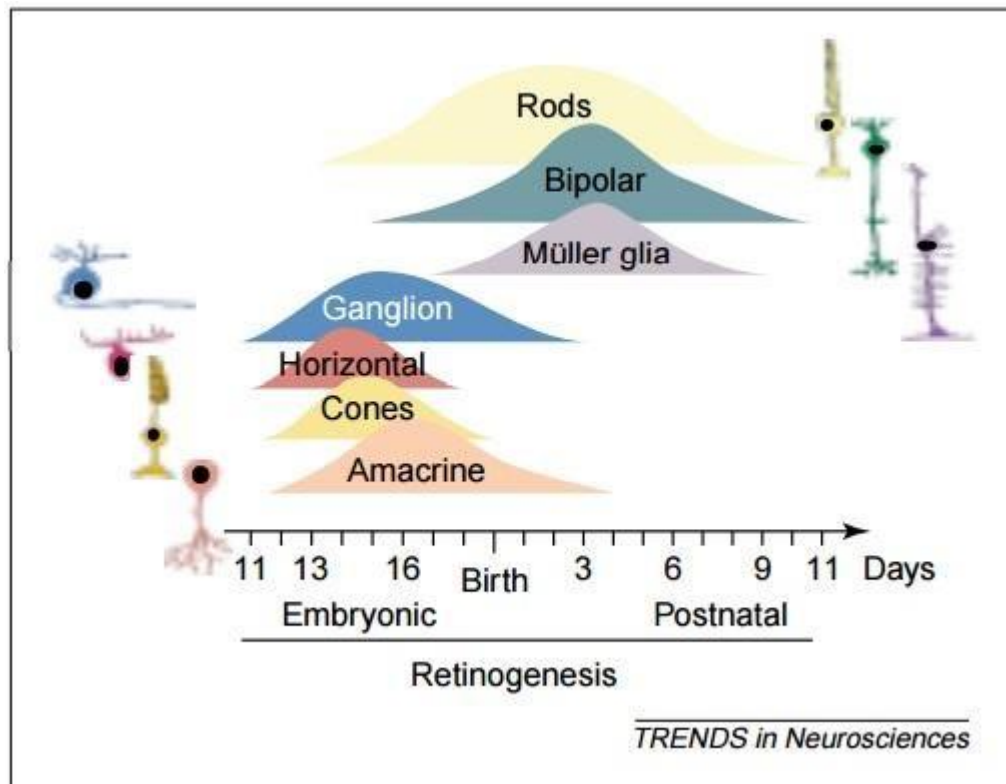
1.3.2 Desenvolvimento embrionário da retina

A retina dos vertebrados é composta principalmente por células de origem neuroectodérmica (BEJARANO-ESCOBAR, et al., 2017) e ao desenvolver-se do diencéfalo, passa por mudanças morfogênicas para formar o cálice óptico (NELSON et al., 2007), de onde irá se desenvolver a retina neural da camada mais interna, e o epitélio ciliar da camada não pigmentada, constituída por células-tronco que dão origem a qualquer tipo neuronal ou à glia de Müller (TURNER; CEPKO, 1987; ADLER, 1999). Esse padrão de desenvolvimento envolve diversas vias de sinalização que ainda não são bem elucidadas, sendo que já foram demonstradas três vias com as participações de EGF, FGF e Shh (LAMBA et al., 2008; NELSON et al., 2007).

Em geral, a retinogênese em vertebrados possui dois pontos chave: 1) a multipotência das células progenitoras da retina (CPR) e 2) a ordem de nascimento destas (CEPKO et al., 1996; LIVESEY e CEPKO, 2001; MARQUARDT e GRUSS, 2002; YANG, 2004). Essas células com característica multipotente mostraram potencial para gerar todos os diferentes tipos de neurônios e células da glia de Müller (TURNER E CEPKO, 1987). Desta forma, são semelhantes às células progenitoras neuronais distribuídas por outras partes do SNC, que podem responder a fatores mitogênicos semelhantes (NELSON et al., 2007). Além disso, podem expressar muitos dos mesmos genes das células-tronco (AKAGI et al., 2004). Uma das implicações para essa diferenciação está associada à Shh, uma conhecida proteína da família de sinalizadores hedgehog. Ela pode estar auxiliando ou ser a responsável por conduzir a progressão da onda de diferenciação das células ganglionares, que, por sua vez, começam a secretar Shh (ZHANG et al., 2017).

O desenvolvimento retiniano possui uma linha cronológica bem estabelecida e conservada mesmo em diferentes espécies (Figura 3), mantendo um padrão de primeiro as células ganglionares e ao final, a glia de Müller e as bipolares. Conforme observado na figura 3, os períodos de saída do ciclo celular dos tipos celulares se sobrepõem tanto durante o período embrionário como durante o período pós-natal (PRADA et al., 1991; CEPKO et al., 1996; YANG, 2004).

Figura 3 - Linha temporal do desenvolvimento das células retinianas em roedores

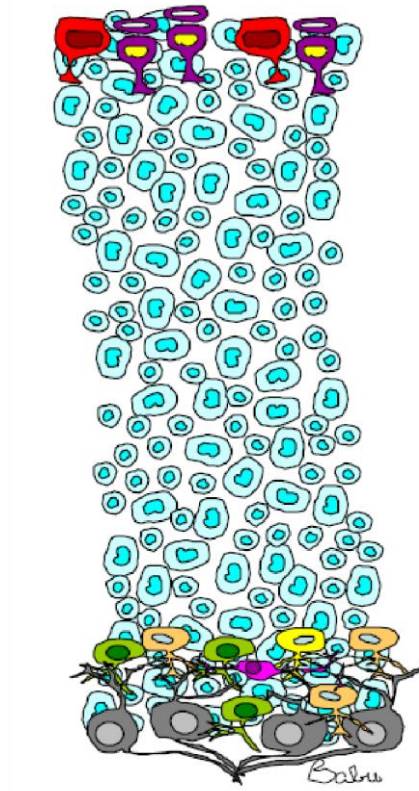


Legenda: Esquema de proliferação celular retiniana a partir do décimo primeiro dia embrionário (E11) até o décimo primeiro dia pós-natal (P11) do desenvolvimento murino. Note que as curvas não refletem os valores absolutos, mas sim a proporção relativa de células produzidas para cada tipo celular.

Fonte: MARQUARDT e GRUSS, 2002.

A retina de mamíferos, incluindo humanos e murinos, não possui fontes neurogênicas persistentes significativas. Para os ratos, a neurogênese está finalizada dentro dos primeiros 10 dias pós-natal (MOSHIRI e REH, 2004). O rato no primeiro dia pós-natal (P0) possui uma retina muito imatura composta por apenas duas camadas, a camada ganglionar e uma extensa camada neuroblástica (Figura 4). Basicamente, a retina destes animais se mantém nessa conformação até o segundo dia pós-natal (P2) quando ainda não tem sua estrutura laminar completamente formada (CUNHA, 2006).

Figura 4 - Ilustração da retina de ratos entre o dia do nascimento (P0) e o segundo dia pós-natal (P2)



Legenda: Esquema da retina de rato neonato (entre P0 e P2). Observe a camada ganglionar (cinza), as células amácrinas (verde e amarelo), os fotorreceptores (roxo e vermelho) e extensa camada de neuroblastos (azul).

Fonte: CUNHA, 2006.

1.4 Transportador de Glutamato no SNC

O L-glutamato (Glu) é o mais importante neurotransmissor excitatório no SNC dos mamíferos e se liga tanto a receptores que são canais iônicos quanto a receptores acoplados a proteína G (FAGG, et al., 1983; NAKANISHI, 1992 e 1994; ROBINSON e COYLE, 1987). Ele é o mediador de cerca de 80 a 90% das sinapses excitatórias centrais (MCKENNA, 2007) e participa da regulação da formação de redes neurais (no desenvolvimento e envelhecimento), das etapas de proliferação, migração, diferenciação e morte celular (MCDONALD e JOHNSTON 1990; PRYBYLOWSKI e WENTHOLD, 2004). Porém, diante de certos eventos patológicos pode ocorrer a hiperativação do sistema glutamatérgico, que consiste no aumento da liberação de glutamato e da sinalização mediada por seus receptores, podendo

levar à morte neuronal, chamada de excitotoxicidade glutamatérgica (LIPTON e ROSEMBERG, 1994).

A excessiva ativação de receptores Glu contribui para a perda neuronal em uma variedade de insultos neurológicos agudos como acidente vascular cerebral ou traumatismo crânio-encefálico (BENVENISTE, et al., 1984; FADEN, et al., 1989; ROSSI, et al., 2000; ROTHMAN, 1984) e os antagonistas dos receptores Glu atenuam os danos de alguns insultos agudos (GILL, et al., 1987). Dessa forma tornou-se claro a excitotoxicidade mediada por Glu, pois seu comportamento anormal causou morte neuronal por necrose e apoptose (CHEUNG, et al., 1998).

A glutamina é o precursor utilizado para sintetizar esse aminoácido não-essencial pelos neurônios. Sabe-se que esse precursor pode ser convertido em glutamato através da enzima mitocondrial glutaminase nos neurônios pré-sinápticos e o contrário ocorre por ação da enzima glutamina sintetase, que é uma enzima exclusiva de células de linhagem astrocitária (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1977; DAI et al., 2012; TORGNER e KVAMME, 1990). A literatura descreve que cerca de 80% do glutamato captado por astrócitos é convertido a glutamina (MCKENNA et al., 1996).

No total, há cinco subtipos de transportador de glutamato, que foram clonados: EAAC1 - Carreador de aminoácidos excitatórios do tipo 1 (KANAI e HEDIGER, 1992); EAAT1 - Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 1 (STORCK et al., 1992; TANAKA, 1994); EAAT2 - Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 2 (PINES et al., 1992); EAAT4 - Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 4 (FAIRMAN et al., 1995); EAAT5 - Transportador de aminoácidos excitatórios do tipo 5 (ARRIZA et al., 1997). Suas expressões ocorrem em lugares distintos, e na linhagem de células gliais estão descritos EAAT1, EAAT2 e EAAT5 (ROTHSTEIN et al., 1994; LEHRE et al., 1995; ELIASOF et al., 1998).

Na retina neural, fotorreceptores, neurônios, glia de Müller e astrócitos expressam transportadores de glutamato de alta afinidade (GLT - EAAT2) (RAUEN e WIESSNER, 2000) e os astrócitos também expressão EAAT4 quando localizados na CFO (WARD et al., 2004). Porém, na parte interna da retina, o transportador GLAST (EAAT1) (NASKAR et al., 2000) é o principal transportador de glutamato da glia de Müller (RAUEN, 2000), localizado ao longo da membrana dessa célula (BRINGMANN et al., 2013). Ele é essencial para manter a concentração de

glutamato extracelular abaixo dos níveis neurotóxicos (IZUMI et al., 2013) e também para regular os níveis de glutamato na glia de Müller (REICHELT et al., 1997).

A glia de Müller é responsável pela maior parte da captação de glutamato (WHITE e NEAL, 1976; HARADA et al., 1998), sua regulação é realizada através dos sistemas de absorção de sódio-dependentes e independentes (SARTHY et al., 2005). Quando a glia de Müller se encontra em um estado de despolarização, que pode ser induzido por lipídios inflamatórios, tais como o ácido araquidônico e prostaglandinas, que são produzidas em condições de estresse oxidativo (BIRKLE e BAZAN, 1989; LANDINO et al., 1996), estas células liberam glutamato pela reversão eletrogênica dos transportadores de GLT (SZATKOWSKI et al., 1990; BILLUPS e ATTWELL, 1996), e essa liberação não-vesicular de glutamato, quando aumentada, provoca danos excitotóxicos aos neurônios (SZATKOWSKI et al., 1990; BILLUPS e ATTWELL, 1996; MAGUIRE et al., 1998; REICHENBACH e BRINGMANN, 2013). Já quando a glia de Müller está regulada para baixo há um aumento na concentração de glutamato na retina (YANG e ZHONG, 2015). As células de Müller também podem liberar aspartato, um agonista do NMDA, através de reversão de GLTs; o aspartato derivado da glia contribui para a ativação de receptores NMDA durante a isquemia (MARCAGGI et al., 2005).

A captação e o metabolismo de glutamato pela glia de Müller está mais envolvido na regulação da atividade de neurônios das camadas internas da retina do que na dos fotorreceptores, pois o precursor da síntese de glutamato em células bipolares e ganglionares, a glutamina, é derivada quase exclusivamente das células de Müller (BRINGMANN et al., 2013). Além disso, uma quantidade significativa de GABA nas células amácrinas é sintetizada a partir de glutamato após absorção de glutamina derivada de células de Müller (POW e ROBINSON, 1994).

Assim, a deficiência desse transportador resulta na degeneração das CGRs devido à excitotoxicidade e estresse oxidativo (YANAGISAWA et al., 2015). Ademais, a excitotoxicidade do glutamato e o estresse oxidativo estão envolvidos em danos na retina em casos de glaucoma (BALTMER et al., 2010; NASKAR et al., 2000) e elevados níveis de glutamato extracelular provoca perda neuronal em muitas desordens da retina, incluindo glaucoma, isquemia, retinopatia diabética e degeneração de fotorreceptores hereditária (LIETH et al., 1998; DKHISSI et al., 1999; DELYFER et al., 2005b). Porém, quando GLAST é ativado por interleucina-1 (IL-1)

há um aumento da absorção de glutamato pelas células de Müller, que tem um efeito protetor nas CGRs da excitotoxicidade (NAMEKATA, et al., 2008).

1.5 Hipóxia-Isquemia – Suas consequências em diversos modelos

Em geral, embora a escala de tempo seja diferente, a sequência dos principais eventos na maturação do encéfalo é amplamente confiável entre humanos e roedores. A maioria dos modelos animais de lesão cerebral no desenvolvimento utilizam roedores no dia 7-10 pós-natal (P7-P10) como sendo aproximadamente equivalentes a um neonato a termo humano. Nessa idade, podemos decifrar os principais passos do desenvolvimento do encéfalo que ocorrem tanto em roedores quanto em seres humanos, e assim delinear um curso comparável de tempo de desenvolvimento cerebral pós-natal entre as espécies (TORRES-CUEVAS et al., 2019).

Muitos modelos que visam mimetizar o insulto HI perinatal foram desenvolvidos. No modelo de ligadura unilateral da carótida em ratos de 7 dias (P7) há necrose aguda em parte do hemisfério direito, bem como déficits no hipocampo, córtex cerebral, substância branca periventricular e estriado (SILVERSTEIN e JOHNSTON, 1984). Neste modelo foram realizados estudos com alvo na avaliação das neurotoxicidades glutamatérgica (SILVERSTEIN et al., 1991) e do óxido nítrico (FERRIERO et al., 1988; FERRIERO et al., 1995) decorrentes da lesão, e nos sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI (BURKE et al., 1991). Os resultados também demonstram déficits na coordenação motora (LUBICS et al., 2005) relacionados à ansiedade e ao comprometimento cognitivo no desenvolvimento precoce e tardio, devido a lesões no hipocampo, estriado e córtex (ARTENI et al., 2010; SANCHES et al., 2015). Além disso, estudos utilizando HI em P7 mostraram que a morte celular ocorre em regiões do encéfalo que não são diretamente afetadas pela isquemia, como o cerebelo (JOYAL et al., 1996 ; KIM et al., 2004 ; NORTHINGTON et al. 2011), sugerindo que a conectividade neuronal pode desempenhar um papel na neurodegeneração após HI para o encéfalo imaturo. Ainda há estudos que utilizam a ligadura unilateral da carótida, porém no dia 3 pós-natal, visando observar a lesão em um encéfalo prematuro quando comparado a humanos (SIZONENKO et al., 2003; SANCHES et al., 2013; GINET et

al., 2016), mostrando que, nesse período, o insulto HI no encéfalo do rato muito imaturo causa ruptura no metabolismo celular, bem como no desenvolvimento e citoarquitetura cortical (SIZONENKO et al., 2008; VAN DE LOOIJ et al., 2011; MISUMI et al., 2016), altera o padrão de mielinização e leva a prejuízos comportamentais (HUANG et al., 2009; SANCHES et al., 2015; MISUMI et al., 2016).

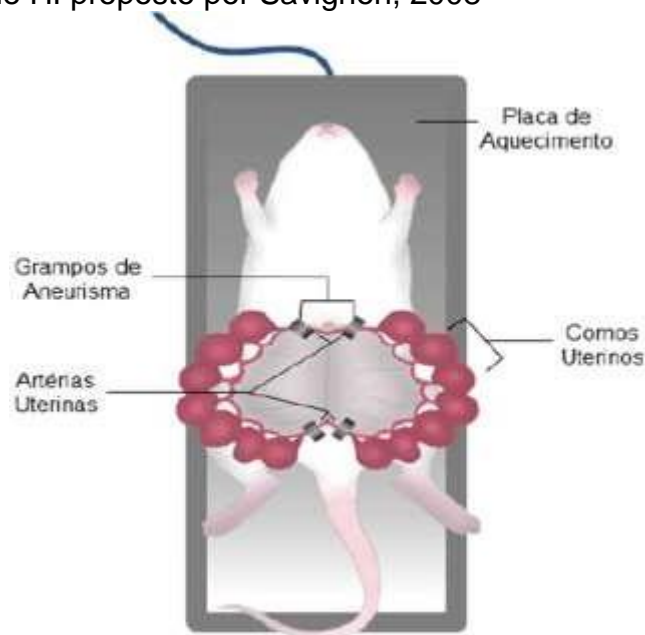
Na maioria dos modelos propostos de HI é realizada a oclusão unilateral, momentânea ou permanente, da artéria carótida de ratos seguida por um período de exposição hipóxica (LEVINE, 1960; RICE et al., 1981), ou seja, não são insultos HI de forma sistêmica. Além disso, excluem a relação entre feto e mãe, ou seja, não são reproduzidas as principais ocorrências desse insulto em humanos. No primeiro modelo que visou uma similaridade maior com o que é observado em humanos, ocorre asfixia e ressuscitação dos filhotes de rato no vigésimo segundo dia gestacional (E22): os cornos uterinos de ratas grávidas são retirados e imersos em água a 37°C, entre 15 a 21 minutos (BJELKE et al., 1991). Como resultado foi observado uma ligeira redução do peso corporal dos filhotes, aumento do número de neurônios dopaminérgicos, associado ao aumento da expressão do gene do fator básico de crescimento de fibroblasto (em inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*, bFGF) e aumento no número de corpos celulares imunorreativos para tirosina hidroxilase na zona compacta da substância negra (ANDERSSON et al., 1995). Contudo, os diversos modelos existentes para injúria cerebral e de HI que visam estudar os mecanismos das lesões nos sistemas de neurotransmissores e da plasticidade cerebral no desenvolvimento não mimetizam integralmente os insultos sistêmicos ocorridos no final do segundo terço/início do último trimestre de gestação humano (BACK et al., 2001), ou tampouco levam em consideração as trocas que ocorrem através da barreira hemato-placentária entre mãe e concepto.

Em um modelo que propôs o insulto hipóxico-isquêmico de forma pré-natal e transitória no décimo oitavo dia gestacional/embrionário (E18), foi observada astrogliose na substância branca, morte de oligodendrócitos, e lesão axonal tanto na substância branca como no córtex cerebral, lesões semelhantes às observadas em humanos que sofrem HI pré-natal (ROBINSON et al., 2005). As ratas grávidas tinham seus cornos uterinos expostos e o fluxo sanguíneo das artérias uterinas era obstruído por 15, 30 e 45 minutos. Os resultados demonstraram que 87% dos ratos jovens têm lesão na substância branca detectável em secções coronais. Porém, dentre estes animais, nem todos possuem a mesma severidade de lesão: 27%

possuem lesões leves, 33% moderadas e 27% lesões severas. O que pode justificar as diferenças nas lesões celulares, como a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (KINNEY e BACK, 1998), o aumento do nível de radicais livres (VOLPE, 2003), o aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (BAUD et al., 1999; DAMMANN e LEVITON, 1997; NELSON et al., 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (ITOH et al., 2002; KAVANAUGH et al., 2000; TEKKOK e GOLBERG, 2001).

Nos últimos anos, o laboratório de Neurobiologia-UERJ vem utilizando uma modificação do modelo descrito por Robinson e colaboradores (2005), onde há obstrução temporária ao fluxo uterino e ovariano em ratas grávidas em E18 por 45 minutos (SAVIGNON, 2008) (Figura 6). Foi demonstrado que nesse modelo ocorrem alterações profundas e duradouras na morfologia do cerebelo (SAVIGNON et al., 2012; BARRADAS et al., 2016) e no hipocampo (PINTO, 2015; CUNHA-RODRIGUES et al., 2018).

Figura 6 - Modelo de HI proposto por Savignon, 2008



Fonte: PINTO, 2015.

1.6 Justificativa do estudo

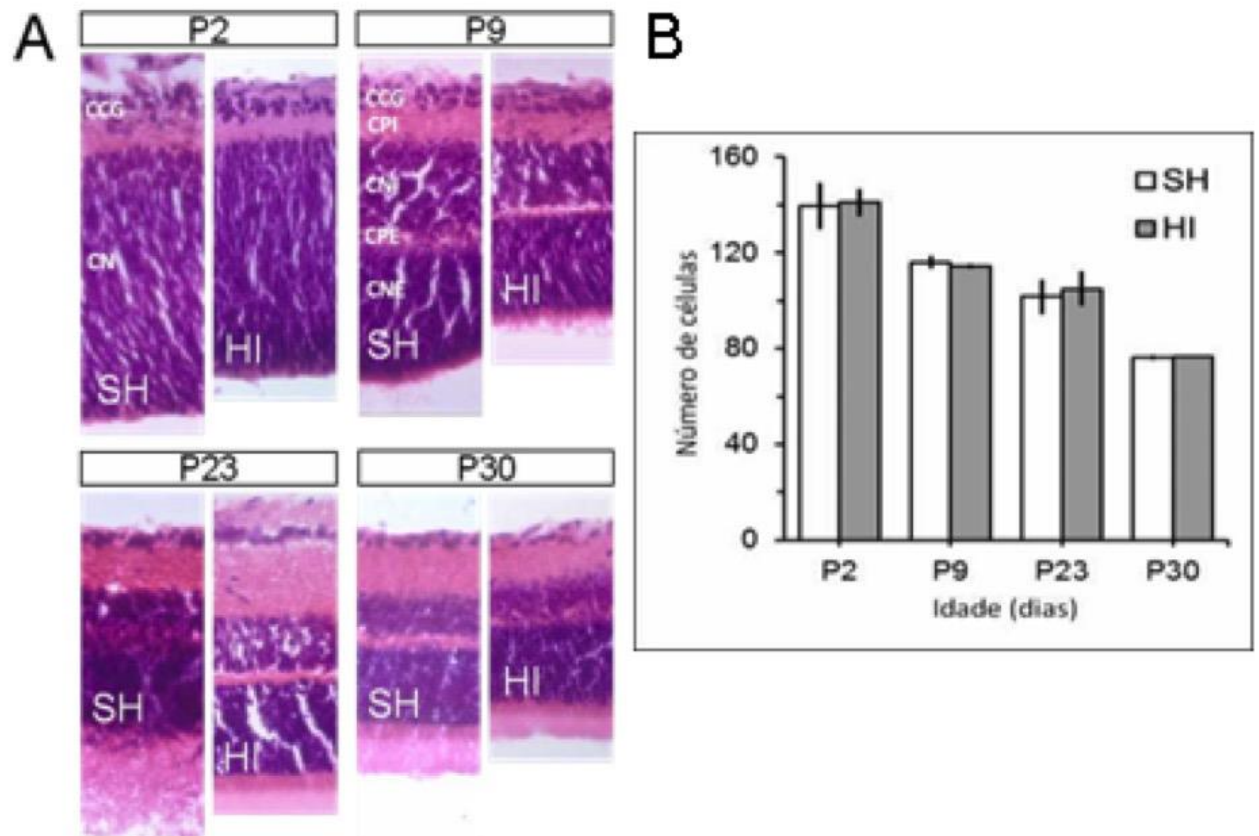
Tem sido relatado um déficit sensorial envolvendo a visão advindo do insulto hipóxico-isquêmico (VAN HOF-VAN DUIN e MOHN, 1984; ROLAND et al., 1986;

GROENENDAAL et al., 1989; GUZZETTA et al., 2001). Resultados demonstram que 66% a 94% das crianças que sofreram HI demonstram algum tipo de comprometimento visual (HUANG et al., 2012), sendo que mais da metade das crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) neonatal apresentam estrabismo, ambliopia, nistagmo, neuropatia óptica, campo visual reduzido, visão de cor defeituosa e baixa acuidade visual. (GOOD; HARDY, 2001; GUZZETTA et al., 2001). Como a retina possui uma alta atividade metabólica (COHEN; NOELL, 1960), o insulto HI traz graves consequências (CAPRARA; GRIMM, 2012; RIVERA et al., 2011; HELLSTROM et al., 2013; JANÁK, Y. et al., 2007), desempenhando um papel significativo na deficiência visual que tende a ser permanente (BLENCOWE et al., 2013). Dessa forma, o número de estudos avaliando esse tipo de insulto na morfologia e função da retina tem aumentado (KISS et al., 2009; HUANG et al., 2012; JUNG et al., 2016; JUNG et al., 2015).

Além de insultos HI durante o desenvolvimento, há patologias oculares em adultos que são geradas a partir desse mesmo insulto, como neuropatia óptica isquêmica, oclusão do vaso retiniano, retinopatia diabética e glaucoma (OSBORNE et al., 2004). Estudos em modelos corroboraram a literatura médica em humanos, mostrando que a oclusão da carótida comum em ratos adultos traz degeneração e comprometimento funcional da retina e do nervo óptico (BLOCK et al., 1992; BARNETT e OSBORNE, 1995; DAVIDSON et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2000; LAVINSKY et al., 2006; STEVENS et al., 2002), bem como a oclusão da artéria carótida média demonstrou degeneração celular na CCG, além de provocar a ativação das células de Müller (BLOCK et al., 1997; KAJA et al., 2003), consequentemente afetando também a regulação do conteúdo de glutamato na retina (CHEN, F. et al., 2010).

No modelo de HI proposto por Savignon, 2008, foi relatada redução no número de células ganglionares identificadas pelo anticorpo anti-BRN3a, durante o desenvolvimento e mantida em P30, bem como diminuição da espessura do nervo óptico e das projeções retinianas no Núcleo Geniculado Lateral dorsal (NGLd), além de incapacidade, por parte dos animais, de sustentar a constrição pupilar (DINIZ-TAVEIRA, 2018). Também foi observada a perda de células marcadas positivamente para NeuN (marcador neuronal) na CCG com a manutenção na quantidade de núcleo corados pela Hematoxilina-Eosina, figura 7, na mesma camada e idades analisadas (FONSECA, 2016; DINIZ-TAVEIRA, 2018).

Figura 7 - Retina de animais SH e HI coradas com HE



Legenda: A - Fotomicrografias representativas de secções transversais da retina de ratos SH e HI em diferentes idades pós-natais (P), coradas com hematoxilina-eosina. Camada de Células Ganglionares (CCG); Camada Neuroblástica (CN); Camada Plexiforme Interna (CPI); Camada Nuclear Interna (CNI); Camada Plexiforme Externa (CPE); Camada Nuclear Externa (CNE). B - Quantificação do número de células identificadas. Não foi observada diferença significativa no número de células na CCG em ambos os grupos. HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade (para ambos os grupos, média de 4 secções por animal).

Fonte: DINIZ-TAVEIRA, 2018.

Decorrente desse resultado formulou-se a hipótese de que o aumento no número de um tipo celular não neuronal poderia justificar a manutenção no número total de células na CCG. Como os astrócitos se localizam na camada de fibras nervosas e na CCG (RAMIREZ et al., 1994; GALLEGO et al., 2012; WANG et al., 2011), e são capazes de responder à lesões com hipertrofia e hiperplasia, torna-se importante avaliar o padrão de distribuição dessas células na retina de animais submetidas ao modelo de HI desenvolvido em nosso laboratório, assim como a expressão do transportador de glutamato EAAT-1 nesse mesmo modelo.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral é avaliar os efeitos da hipóxia-isquemia sistêmica transitória pré-natal, no modelo descrito por Savignon e colaboradores (2012), sobre a reatividade astrogliar na retina de ratos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos envolvem a caracterização dessa reatividade durante o desenvolvimento por:

- a) Imunomarcção de GFAP e de vimentina;
- b) Imunomarcção para o transportador de glutamato EAAT1.

3 METODOLOGIA

A Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ, Protocolo nº CEUA/006/2016) aprovou todos os procedimentos experimentais, estando estes 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, nascidos e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, com temperatura controlada a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo de luminosidade de 12 h, e com livre acesso a ração NUVILAB CR-1 e a água.

Para a obtenção das ratas grávidas, o acasalamento foi realizado colocando um ou dois ratos machos para cada duas ou três fêmeas nulíparas pelo período de 12 h, sendo importante destacar que se inicia esse procedimento a partir das 18 h, pois sabe-se que os ratos são notívagos. No dia seguinte, as ratas foram pesadas e registradas por numeração em suas caudas. Após 17 dias (E17), suas massas corporais foram comparadas e as fêmeas com aumento maior do que 15 g foram separadas para que, no dia seguinte, fosse feito o procedimento cirúrgico.

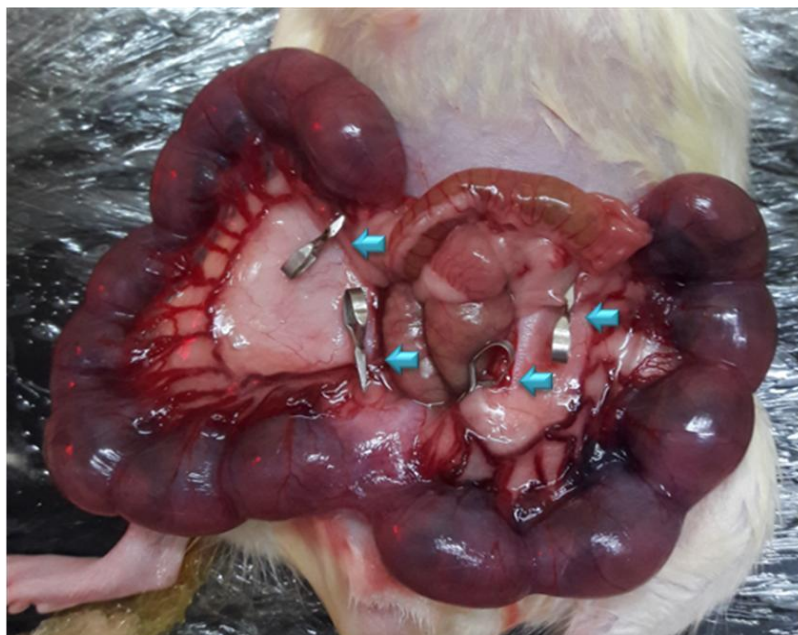
3.2 Procedimento cirúrgico

Como anteriormente descrito por Savignon e colaboradores (2012), no décimo oitavo dia de gestação (E18) as ratas grávidas foram anestesiadas por administração de isoflurano por via inalatória (indução - dose inicial de 4% em 2 min/L e manutenção com máscara de gás com 1,5 – 2% de isoflurano em 0,8 min/L de oxigênio). Durante todo o procedimento cirúrgico, o nível de anestesia foi

verificado por avaliação periódica do reflexo de retirada das patas traseiras. O procedimento cirúrgico é realizado com as gestantes sobre uma placa de aquecimento (38°C). Após tricotomia e assepsia do abdome com álcool iodado foi feita a laparotomia na região mediana. Os cornos uterinos foram expostos e o fluxo uterino e ovariano foi obstruído pela instalação de 4 cliques de aneurisma nas artérias uterinas por 45 min (grupo hipóxia-isquemia, HI – figura 5). Após o tempo de 45 min, os cliques foram retirados, os cornos uterinos foram recolocados na cavidade abdominal e a incisão foi suturada. Ao final do procedimento, o animal foi aquecido com uma lâmpada incandescente (vermelha com 15 W, 127 V e 1208 AU) em sua caixa até a total recuperação da anestesia. Posteriormente, os animais foram observados diariamente para a verificação de possíveis sinais de infecção ou abertura das suturas. Para o grupo controle cirúrgico (grupo simulado, do inglês, *sham group*, SH), fêmeas grávidas foram submetidas a todo o procedimento cirúrgico descrito acima exceto a oclusão das artérias.

Após o nascimento, as ninhadas com mais de oito filhotes foram ajustadas para oito ainda nas primeiras 24 horas de vida pós-natal devido à competição por leite, diminuindo assim a variação entre animais hipernutridos e hiponutridos. Não foram usadas ninhadas com menos de seis filhotes. Foram utilizados apenas os animais nascidos a termo (i.e. 21 a 23 dias de gestação), de ambos os sexos. A pesquisadora não interviu durante o parto dos animais e a alimentação foi dada pela progenitora até os 21 dias de vida. Após essa data, os filhotes foram desmamados e iniciaram a alimentação apenas com a ração comercial NUVILAB CR-1.

Figura 5 - Cirurgia para indução de HI



Legenda: Fotografia mostrando a exposição dos cornos uterinos e a localização da obstrução com cliques de aneurisma nas artérias uterinas.

Fonte: FONSECA, 2016.

3.3 Dissecção e secção das retinas

No segundo (P2), nono (P9), vigésimo-terceiro (P23) ou trigésimo (P30) dias pós-natais, os animais dos grupos SH e HI foram anestesiados com tiopental e perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9%, seguido de uma solução de paraformaldeído 4% e finalmente de uma solução de paraformaldeído 4% com sacarose a 10%. Em seguida, os filhotes foram decapitados para retirada dos globos oculares. Posteriormente, os globos foram colocados em uma placa de Petri com solução de tampão fosfato e salina a 0,1 M e pH 7,4 (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*, PBS) e as retinas foram dissecadas com auxílio de pinças entomológicas e tesoura de iridectomia. Para a pós-fixação, as retinas foram colocadas em pequenos potes contendo paraformaldeído 4% com sacarose a 10% durante 1 h. Ao término deste período, foi realizada a troca para o tampão fosfato 0,1 M com sacarose a 20% por mais 1 h e, após, para uma solução tampão fosfato 0,1 M com sacarose a 30%, e mantidas a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as retinas foram incluídas em OCT (do inglês, *Optimal Cutting Temperature Compound*), congeladas em

nitrogênio líquido e seccionadas a 20 µm de espessura em criostato. Foram coletados quatro cortes por lâmina, num total de 15 lâminas por retina. As lâminas foram posteriormente embaladas, etiquetadas e guardadas a -20°C.

3.4 Imunohistoquímica

Os cortes foram lavados com PBS-Triton 0,3% por seis vezes, cinco min a cada vez, e incubados durante 1 h à temperatura ambiente usando uma solução de BSA (do inglês, BovineSerumAlbumin) a 5% em PBS 1% para o bloqueio das reações inespecíficas. Em seguida, cada corte foi incubado (média 4 cortes por lâmina) com 15 µl de anticorpo primário diluído em solução PBS 1% (conforme Quadro 1) e foram mantidos durante a noite (overnight) em uma câmara úmida na geladeira. Na segunda etapa, a caixa foi retirada da geladeira e mantida em temperatura ambiente (22°C), por trinta minutos, para retorno à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas seis vezes com PBS 1%, durante cinco minutos a cada vez. Após as secções foram incubadas com o anticorpo secundário adequado (Quadro 1) durante 1 h à temperatura ambiente. As lâminas foram posteriormente montadas em galato de n-propila. As secções de ambos os grupos experimentais e oriundas de animais da mesma idade foram imunomarcadas simultaneamente para reduzir a variabilidade.

Quadro1 - Anticorpos que foram utilizados para a identificação por imunohistoquímica neste trabalho

Anticorpos Primários				
Anticorpo anti-	Marca	Isotipo	Origem	Diluição
EAAT-1	Abcam	IgG	Coelho	1:200
GFAP	Sigma	IgG	Coelho	1:400
GFAP	Sigma	IgG	Camundongo	1:400
Vimentina	Sigma	IgG1	Camundongo	1:400
Anticorpos Secundários				
Anticorpo anti-	Conjugado a	Marca	Origem	Diluição
IgG Camundongo	Alexa 555	LifeTechnologies	Cabra	1:500
IgG Coelho	Alexa 488	LifeTechnologies	Cabra	1:400

3.5 Análise das imagens

As secções imunorreagidas foram observadas no microscópio de fluorescência, com os filtros apropriados aos fluorocromos utilizados (microscópio óptico Olympus BX40). A captura das imagens foi realizada com o uso da câmera de vídeo digital (Olympus DP71) acoplada ao microscópio e com o uso do programa cellSensEntry 1.13 (Olympus®).

As imagens digitalizadas foram obtidas com lente objetiva de 40x para uma melhor visualização das camadas da retina, e para melhor definição, em todas as imunomarcações. Cada corte da retina foi dividido em quatro campos, para padronização e referência entre as diferentes idades e animais. As fotos capturadas de cada animal foram usadas na quantificação, quatro fotos por lâmina no total, e suas médias foram utilizadas para a estatística final.

As análises de densidade óptica foram realizadas no software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, versão 6.0.0.260) para as camadas CCG e CPE + CNI, sendo utilizado uma quadrícula de 130 x 2 μm . Enquanto para obter a densidade de pixels foi utilizada a ferramenta "Plot Profile" do software ImageJ 1.51j8 na quadrícula padronizada para essa análise de 270 x 7 μm .

3.6 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e avaliados quanto à sua distribuição utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em todos os testes empregados, as diferenças entre as variáveis analisadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Na análise das imagens para avaliações morfológicas (imunofluorescência), os grupos SH e HI foram comparados através do teste t de Student para amostras independentes. Quanto aos dados de peso corporal, foram avaliados a partir da análise de variância de repetição (ANOVAR), onde a variável dependente foi o peso e fator de repetição a idade. Posteriormente foi realizado o teste post hoc de Tukey.

4 RESULTADOS

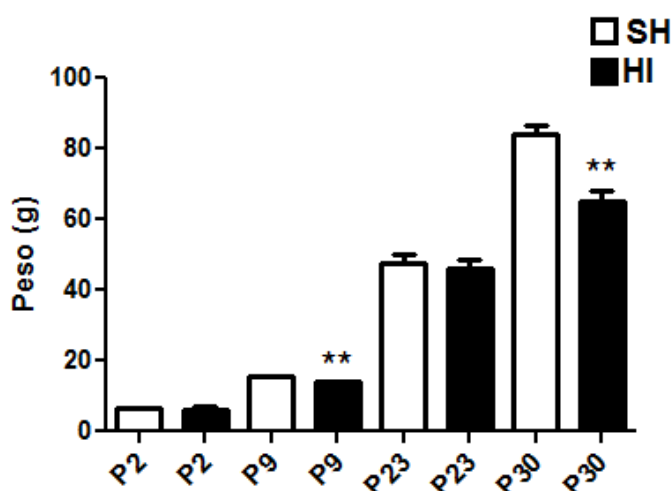
4.1 Perda de ninhadas após o procedimento cirúrgico

Durante o procedimento de hipóxia-isquemia, a quantidade de fetos foi contada para as comparações de nascidos vivos e mortos. De um total de 29 cirurgias, onde 16 foram SH e 13 HI, apenas 8 ninhadas SH tiveram pelo menos 6 filhotes nascidos vivos, para viabilizar a utilização da ninhada, enquanto 6 ninhadas HI foram viáveis. As ninhadas com mais de 8 filhotes passaram pelo acerto de número.

4.2 HI apresenta menor massa corporal em P9 e P30

Antes do processamento histológico dos animais provenientes das ninhadas viáveis em P2, P9, P23 e P30, estes tiveram suas massas aferidas. Foi observado (Gráfico 1) que, em P9, os animais do grupo HI apresentavam massa corporal menor do que os do grupo SH, sendo o mesmo padrão observado na adolescência, em P30.

Gráfico 1 - Evolução da massa corporal (em gramas) dos animais entre o dia pós-natal P2 e P30



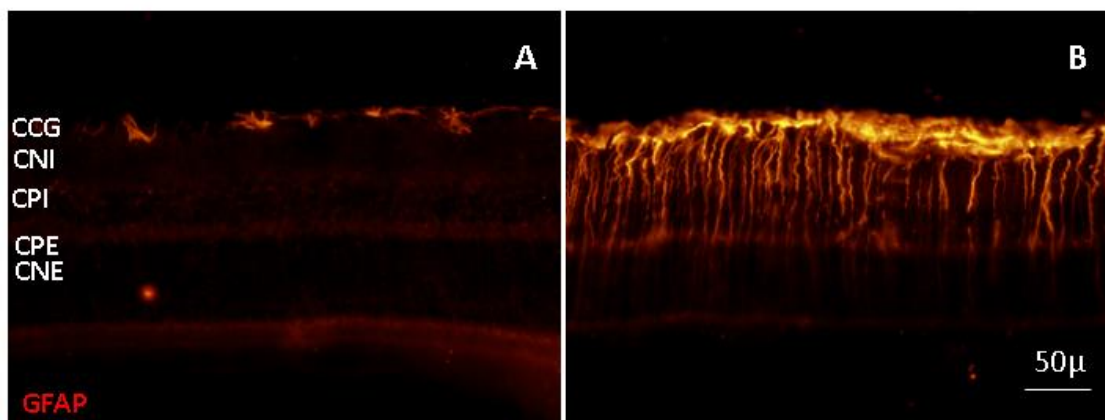
Legenda: O grupo HI apresenta queda na massa corporal dos filhotes em relação ao grupo SH nas idades P2 e P30. n = 4 por grupo e por idade. Teste t de Student: ** p < 0,01.

4.3 Análise Morfológica

4.3.1 HI apresenta aumento da expressão de GFAP

Tendo em vista os resultados obtidos em trabalhos anteriores, que mostraram manutenção no número de células na CCG, porém com redução de células neuronais em P30, como primeiro passo realizou-se a imunoidentificação para GFAP, marcador específico da linhagem astrogliar. A imunomarcação no grupo SH, observou-se uma marcação restrita à CCG e demonstrou células positivas para GFAP na CCG no grupo SH (Figura 6). No grupo HI, a imunomarcação demonstrou células com perfil radial que atravessa todas as camadas da retina, compatível com o fenótipo da Glia de Müller. Também se observou uma nítida diferença na intensidade da marcação, que pode ser tanto pela quantidade de células e/ou pela quantidade de expressão da proteína GFAP.

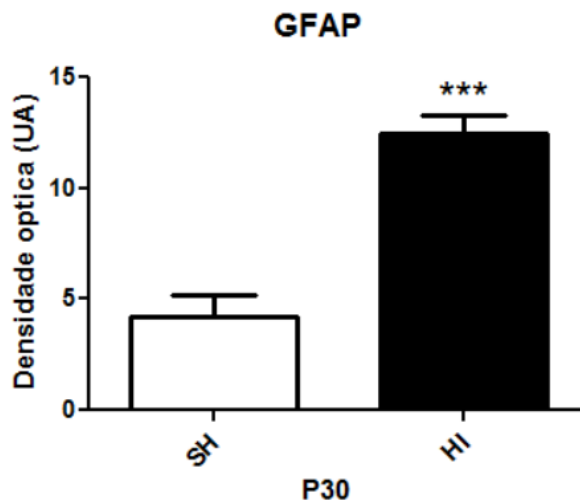
Figura 6 - Imunomarcação para GFAP nas retinas de ratos na idade P30



Legenda: Fotomicrografias representativas de secções transversais da retina de ratos SH (A) e HI (B) imunomarcadas para GFAP na idade de 30 dias pós-natal (P30). Camada de Células Ganglionares (CCG), Camada Plexiforme Interna (CPI), Camada Nuclear Interna (CNI), Camada Plexiforme Externa (CPE), Camada Nuclear Externa (CNE). HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal.
Barra de Calibração: 50 μ m.

A quantificação demonstrou uma maior imunorreatividade no grupo experimental HI quando comparado ao SH na idade P30 na densidade óptica das imagens (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI

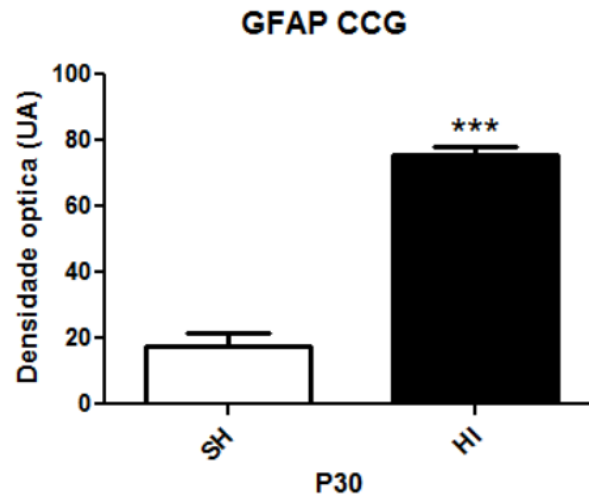


Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação de GFAP na retina em P30. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. Teste t de Student: ***p < 0,001.

Fonte: FONSECA, 2019.

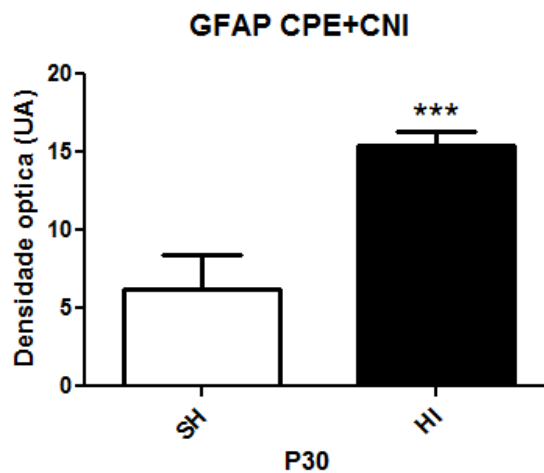
Com o objetivo de verificar possíveis diferenças de marcação entre a CCG e as camadas Plexiformes (CP) e Nuclear Interna (CPE+CNI) retinianas foi padronizada uma quadricula que foi posicionada na região referente à CCG e no eixo CPE+CNI. Em ambas as regiões, foi observado um aumento com diferença estatística para o grupo HI na medida de densidade óptica (Gráficos 3 e 4). Observou-se que a escala do Gráfico 3 nos sugere uma maior densidade na CCG.

Gráfico 3 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI na CCG



Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação de GFAP na CCG em P30. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. Teste t de Student: ***p < 0,001.

Gráfico 4 - Densidade óptica da imunomarcção para GFAP em P30 nos grupos SH e HI no eixo CPE+CNI

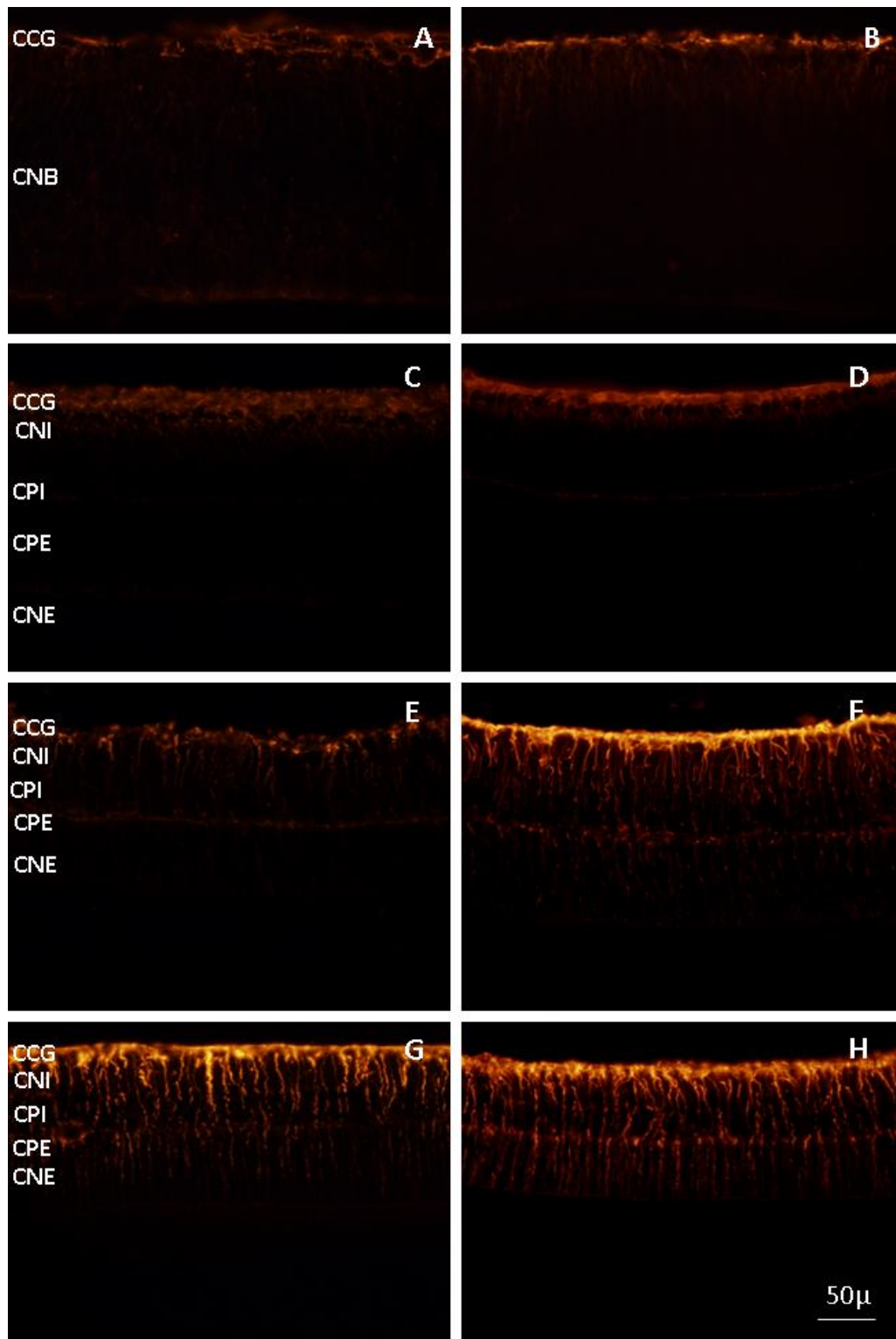


Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação de GFAP nas Camada Plexiforme Externa (CPE) e Camada Nuclear Interna (CNI), CPE+CNI, em P30. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. Teste t de Student: ***p < 0,001.

4.3.2 HI altera o fenótipo da Glia de Müller

Após o resultado obtido com a imunomarcção de GFAP, avaliou-se os efeitos de HI sobre a glia de Müller, imunomarcada com precursor de astrócitos, vimentina. Na idade P2 (Figura 10), a marcação no grupo SH foi mais restrita à CCG, enquanto o grupo HI demonstrou uma marcação mais intensa na CCG e alguns prolongamentos já marcados na sua porção mais próxima à CCG. Em P9, ambos os grupos apresentaram um perfil de marcação e intensidade semelhante na CCG, porém notou-se uma leve marcação delimitando a região dos plexos. Já em P23, o grupo SH demonstrou marcação mais intensa na CCG e uma nítida marcação nas camadas plexiformes, diferentemente do grupo HI, que teve a marcação ainda mais intensa na CCG e CP. Nessa idade já é observável o padrão radial da Glia de Müller, onde, no grupo SH, esta se limitou da CCG até a CPE, mas em HI chegou a camada dos fotorreceptores. Em P30, o padrão de marcação tomou toda a retina em ambos os grupos, porém é nítida a diferença de intensidade nas marcações da CCG e nas camadas plexiformes, onde grupo HI apresentou uma marcação mais intensa quando comparado ao SH.

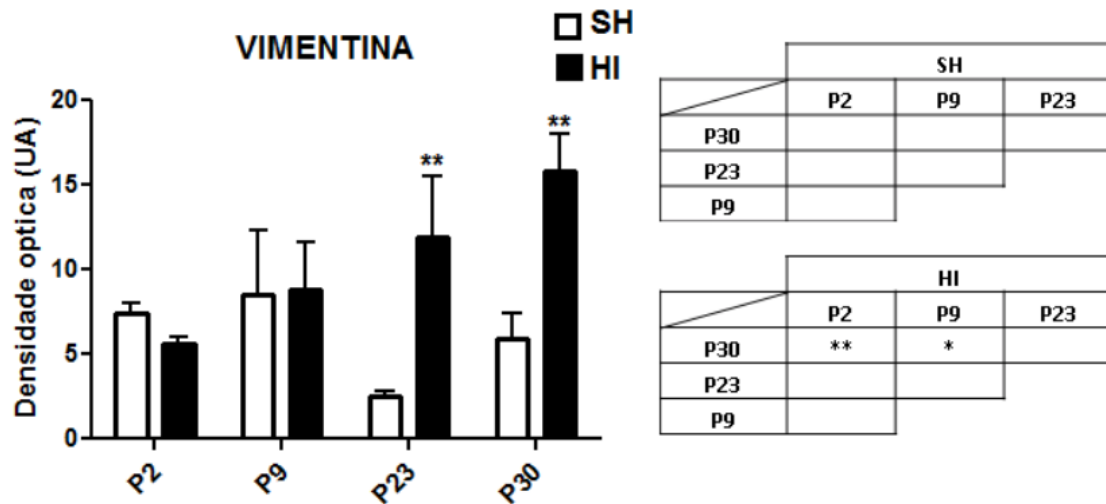
Figura 7 - Imunomarcacão para vimentina nas idades P2, P9, P23 e P30, respectivamente nos grupos SH e HI



Legenda: Fotomicrografias representativas de secções transversais da retina de ratos SH (A, C, E e G) e HI (B, D, F e H) imunomarcadas com vimentina (VIM+) em diferentes idades pós-natais (P2 – A e B; P9 – C e D; P23 – E; F e P30 – G e H). Camada de Células Ganglionares (CCG), 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.
Barra de Calibração: 50 µm.

A análise quantitativa revelou um aumento significativo da marcação para vimentina na retina dos animais HI aos 23 e 30 dias pós-natal (Gráfico 5).

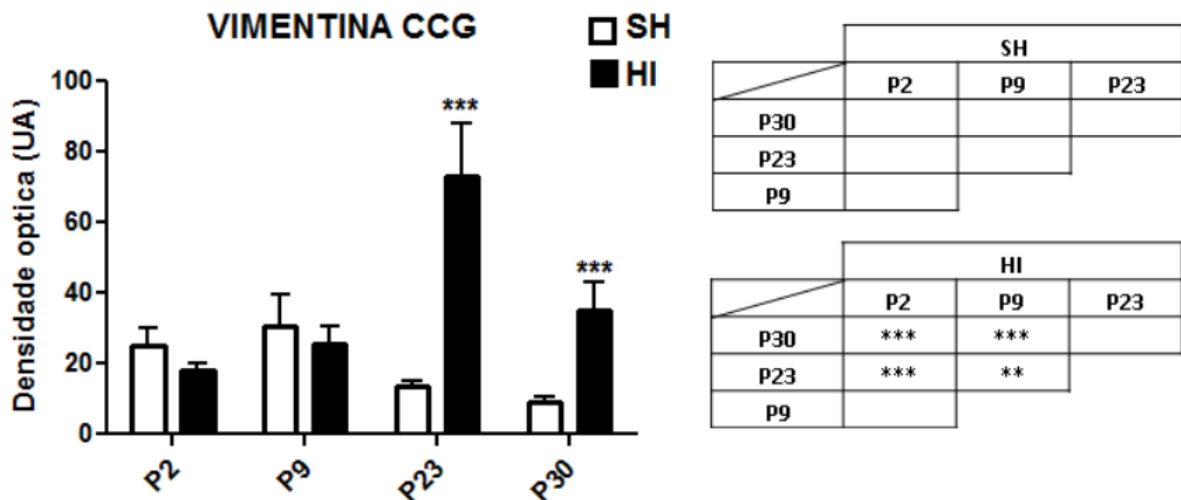
Gráfico 5 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcação para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI



Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação VIM+ na retina em P23 e P30. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. *p < 0,05; **p < 0,01. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

Da mesma forma que para GFAP, também foi realizada a quantificação da densidade óptica da imunomarcação para vimentina na CCG e na CPE+CNI (Gráficos 6 e 7). Observamos que a reatividade foi maior na CCG nas idades P23 e P30 no grupo HI (Gráfico 6).

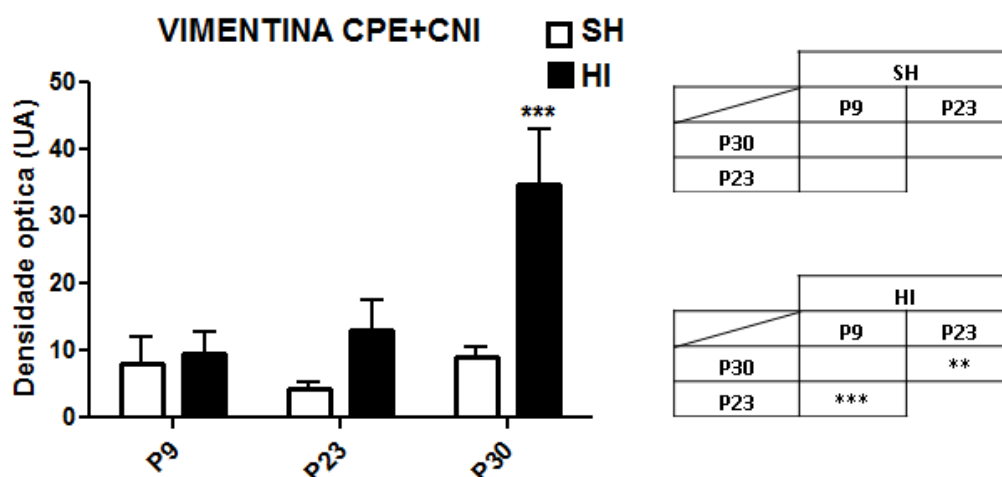
Gráfico 6 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI na CCG



Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação VIM+ na retina em P23 e P30 na CCG. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. **p < 0,01; ***p < 0,001. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

Em comparação aos gráficos 5 e 6, o gráfico 7 mostra diferença estatística apenas na idade P30 quando comparado SH com HI. Porém, a expressão ainda é menor nas CPE+CNI quando comparado a CCG.

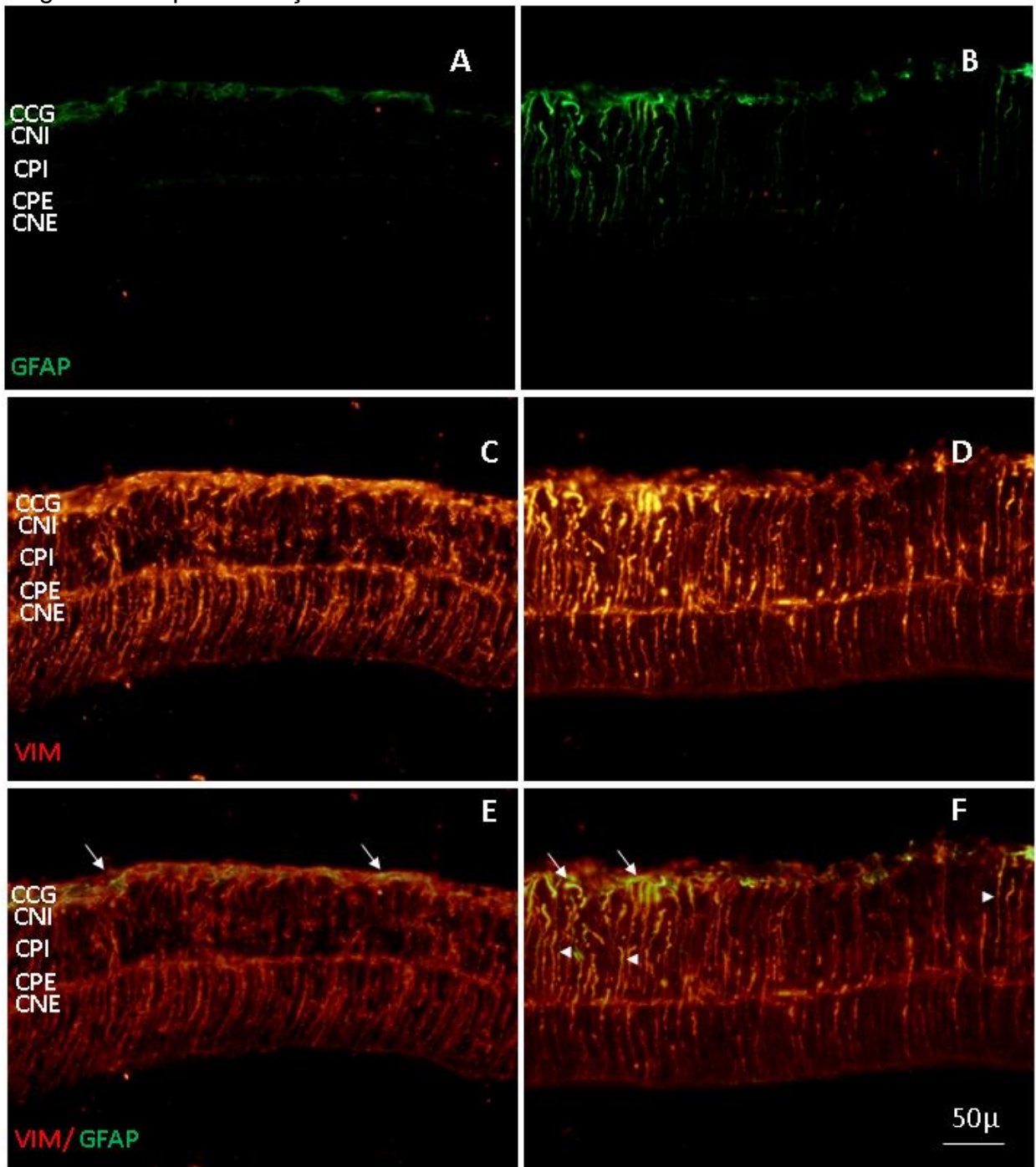
Gráfico 7 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para vimentina em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI nas Camadas Plexiformes



Legenda: Grupo HI apresenta aumento na densidade óptica da marcação VIM+ na retina em P30 no eixo da Camada Plexiforme Externa (CPE) e Camada Nuclear Interna (CNI). HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. **p < 0,01; ***p < 0,001. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

Como o padrão de marcação para GFAP é bastante diferente nos animais SH e HI, e considerando que a vimentina também é expressa na astrogliia imatura, realizamos duplas marcações para GFAP e vimentina em P30 (Figura 11). Nos animais SH, a marcação de GFAP estava restrita aos corpos celulares na CCG e a marcação não se sobrepôs a de vimentina (setas na Figura 11E), enquanto que, nos animais HI, a marcação de GFAP evidenciou corpos celulares e perfis radiais que expressavam ambos os marcadores, sugerindo a presença de astrócitos jovens (GFAP+/VIM+) na CCG (setas na Figura 11F), além da reatividade da Glia de Müller, demonstrada pela presença de prolongamentos radiais (GFAP+/VIM+) na CPE+CNI (cabeça de seta na figura 11F).

Figura 8 - Dupla marcação de GFAP e vimentina em P30



Legenda 11: Fotomicrografias representativas de secções transversais da retina de ratos SH (A) e HI (B) imunomarcadas com GFAP (verde); SH (C) e HI (D) imunomarcadas com vimentina (vermelho); superposição VIM+ e GFAP+, SH (E) e HI (F), em P30. Camada de Células Ganglionares (CCG), Camada Plexiforme Interna (CPI), Camada Nuclear Interna (CNI), Camada Plexiforme Externa (CPE), Camada Nuclear Externa (CNE). HI, n = 1; SH, n = 1.

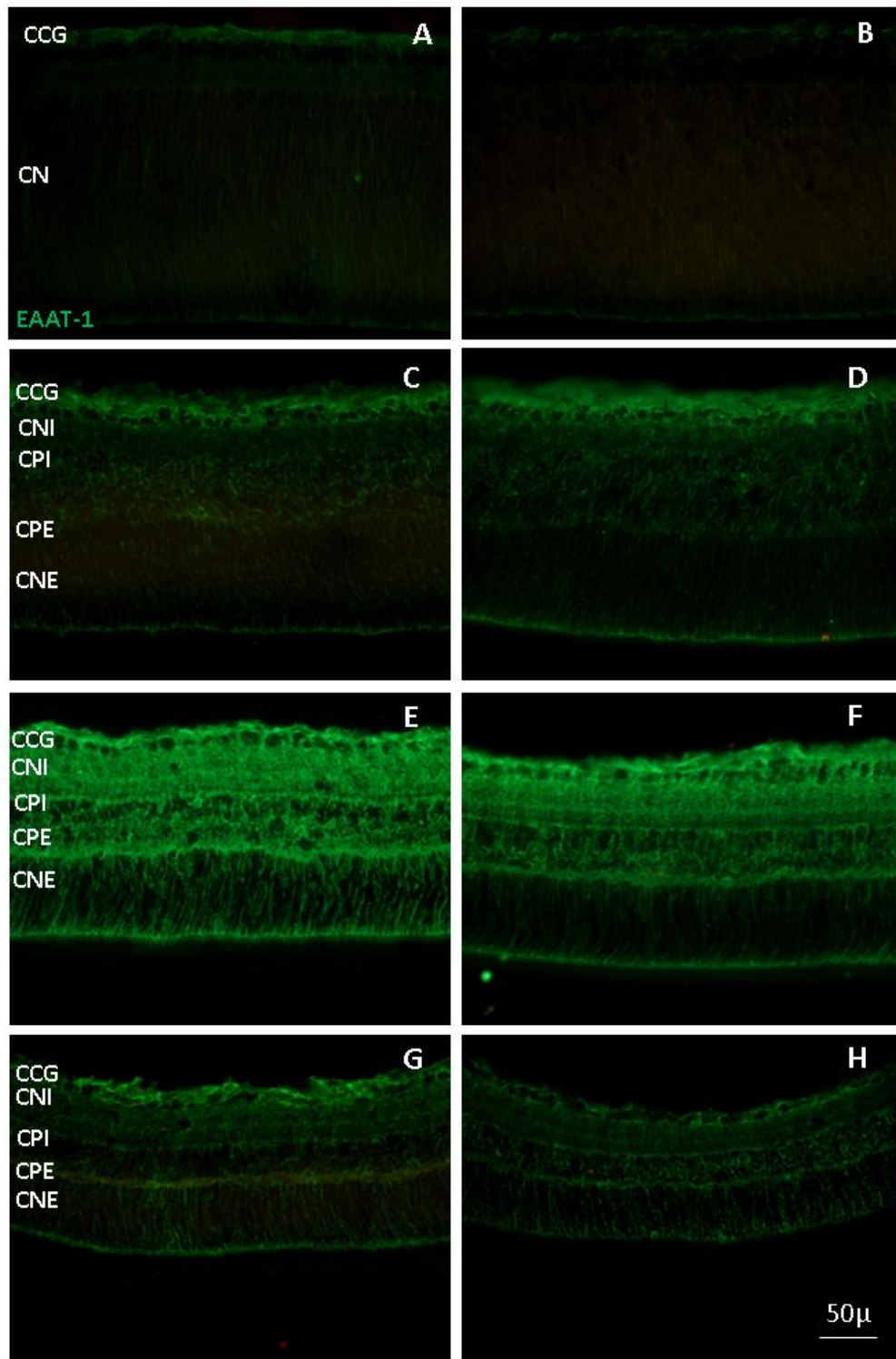
Barra de Calibração: 50 μm.

4.3.3 EAAT-1

A imunomarcção para o Transportador de Aminoácidos Excitatórios 1 (EAAT1), também conhecida como Transportador de Glutamato Aspartato 1 (GLAST), mostrou uma maior marcação da camada ganglionar em todas as idades e nos dois grupos. A partir de P9, as camadas plexiformes mostraram uma maior marcação quando comparadas as demais camadas (figura 9). Observou-se que, durante o desenvolvimento, a expressão da marcação foi se espalhando e mostrando a conformação das diferentes camadas da retina de forma mais nítida.

Em P23, houve uma maior intensidade do marcador em ambos os grupos quando comparados com as demais idades, e foi observada uma consolidação das diversas camadas da retina a partir dessa idade. O grupo HI mostrou uma marcação um pouco mais intensa do que o SH, que não se manteve na idade seguinte, P30.

Figura 9 - Imunomarcacão para EAAT-1 nas idades P2, P9, P23 e P30 nos grupos SH e HI

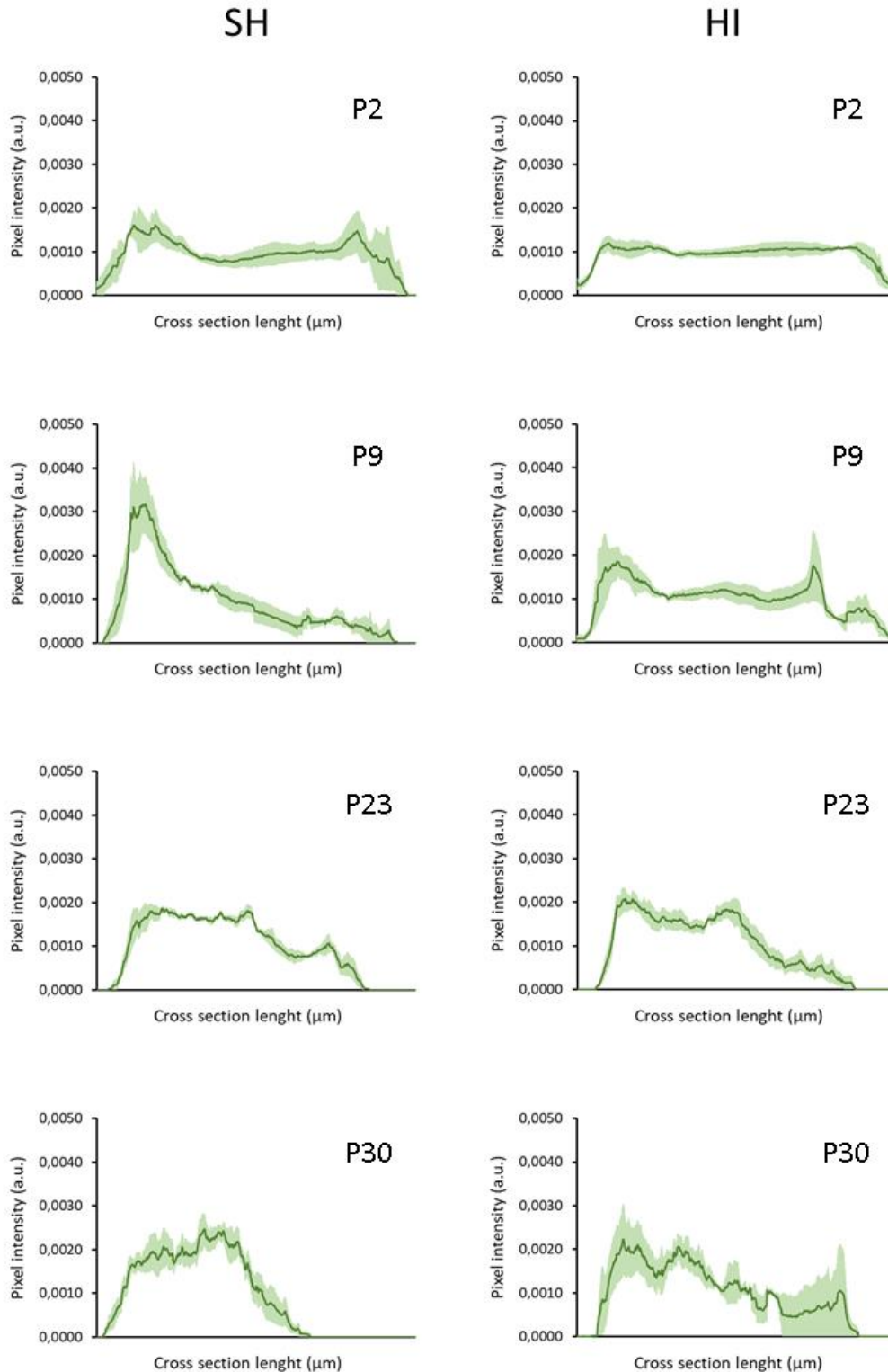


Legenda: Fotomicrografias representativas de secoes transversais da retina de SH (A, C, E e G) e HI (B, D, F e H) imunomarcadas com EAAT-1 em diferentes idades pós-natal (P2 – A e B; P9 – C e D; P23 – E; F e P30 – G e H). Camada de Células Ganglionares (CCG), Camada Plexiforme Interna (CPI), Camada Nuclear Interna (CNI), Camada Plexiforme Externa (CPE), Camada Nuclear Externa (CNE). HI, n = 4 animais por idade; SH, n = 4 animais por idade. Barra de Calibrao: 50 µm.

O gráfico a seguir auxilia numa melhor visualização da distribuição da marcação do transportador de glutamato durante a laminação da retina e migração dos tipos celulares. Proporciona observar as diferentes intensidades (eixo X) desse imunomarcador a partir da CCG (esquerda), seguindo para as demais camadas da retina (direita).

Comparando os grupos, percebe-se que, em P2, não houve diferença na intensidade, mas que, em P9, o SH apresentou um aumento na região referente à CCG, enquanto, no HI, houve um pico referente à CCG e outro semelhante referente às camadas mais internas da retina. A partir de P23, os gráficos mostram uma variação na intensidade, com diversos picos menores. Também foi observado que a linha de intensidade se tornou mais curta quando comparadas com P2 e P9. Em P23, o grupo SH mostrou um padrão decrescente, com um pico logo ao final da retina, enquanto o grupo HI persistiu no padrão decrescente. A idade P30 mostrou que houve diferença no tamanho da linha de intensidade, onde o grupo SH é mais curto que o HI. Além disso, no grupo SH houve um aumento referente a CPE+CNI que não foi observado no HI, mas mantendo o padrão decrescente.

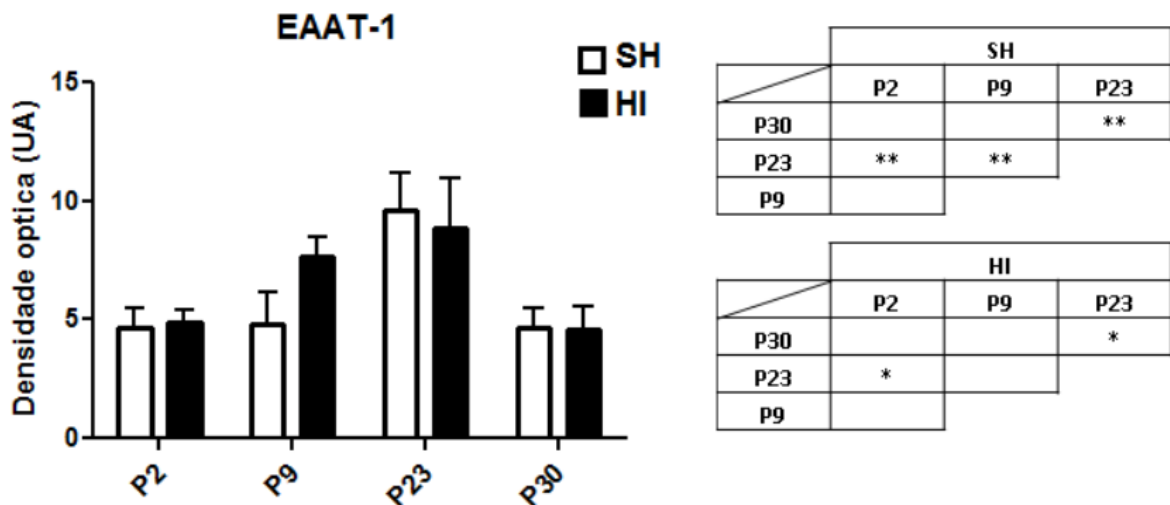
Gráfico 8 - Distribuição da marcação de EAAT-1 na retina, em intensidade de pixels, dos grupos HI e SH durante o desenvolvimento



Legenda: Gráfico representativo da intensidade de pixels em secções transversais da retina de ratos HI e SH imunomarcadas com EAAT-1 em diferentes idades pós-natal (P2, P9, P23 e P30). A medida foi padronizada de forma que a Camada de Células Ganglionares sempre estivesse voltada para o lado esquerdo e a coleta dos dados fosse realizada com um retângulo padronizado, começando sempre de cima para baixo em cada imagem. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal.

Na quantificação por densidade óptica foi observado um perfil crescente no SH até a idade P23, seguida por uma queda em P30. Na comparação entre os grupos não foi constatada diferença estatística em nenhuma idade. Em P2 e P30, as densidades mantiveram um padrão semelhante para ambos os grupos. A partir de P9, houve um aumento na densidade no grupo HI, porém sem diferença estatística.

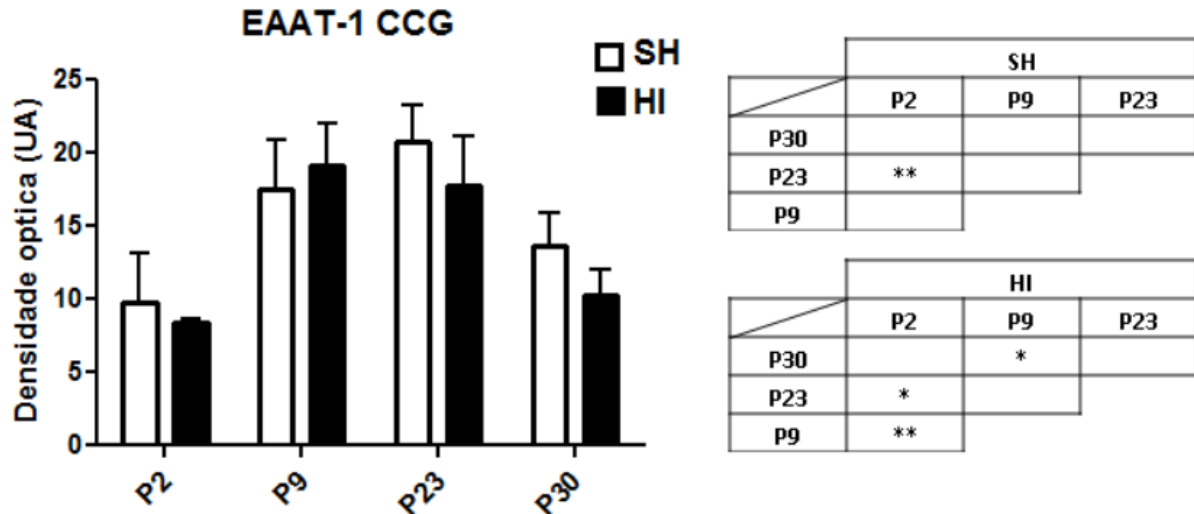
Gráfico 9 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI



Legenda: Não foi observada diferença estatística entre os grupos SH e HI nas idades analisadas (P2, P9, P23, P30). HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. *p < 0,05; **p < 0,01. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

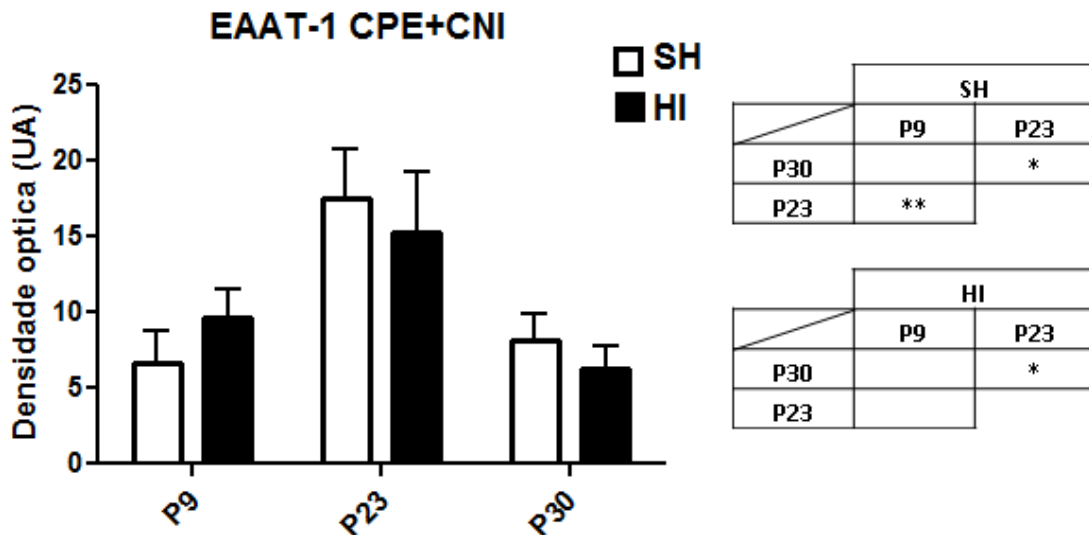
Quando se analisou a distribuição da imunomarcção para EAAT-1 na CCG (Gráfico 10) ao longo do tempo, observou-se que o grupo HI apresentava um aumento da marcação em P9, o que diferia do grupo SH, onde o aumento somente foi observado em P23. Em P30, a marcação para EAAT-1 caiu no grupo HI. Na CPE+CNI (Gráfico 11) houve um pico na imunomarcção para EAAT-1 em P23 no grupo SH. O grupo HI não apresentou um pico em P23, pois não houve diferença estatística em relação a idade P9, porém apresentou uma queda com diferença significativa em P30.

Gráfico 10 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI na camada CCG



Legenda: Não foi observada diferença estatística entre os grupos SH e HI nas idades analisadas (P2, P9, P23, P30) na CCG. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. *p < 0,05; **p < 0,01. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

Gráfico 11 - Quantificação da densidade óptica da imunomarcção para EAAT-1 em diferentes idades pós-natais nos grupos SH e HI nas Camadas Plexiformes



Legenda: Não foi observada diferença estatística entre os grupos SH e HI nas idades analisadas (P2, P9, P23, P30) nas CP. HI, n = 4; SH, n = 4. Média de 4 secções por animal. ANOVA. *p < 0,05; **p < 0,01. Os quadros à direita demonstram as comparações entre as idades nos grupos SH (acima) e HI (abaixo).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que ratos submetidos à hipóxia-isquemia transitória pré-natal apresentam alterações na massa corporal. No modelo de ligadura temporária bilateral de carótida em P4, seguido por hipóxia (8%) por 10 ou 15 minutos (FAN et al., 2005), foi descrita a redução da massa corporal de P5 a P21. Em um modelo com ligadura permanente das artérias de um único corno uterino em E17, onde também foram descritos danos na substância branca, inflamação e astrogliose durante as primeiras 2 semanas de vida, seguido de mielinização deficiente (OLIVIER et al, 2005), também há restrição no crescimento, que varia de moderada (apenas na primeira semana de vida pós-natal) a severa (em todo o desenvolvimento e mantida até P60). Em humanos, em mais de 60% dos casos de hipóxia-isquemia perinatal os bebês nascem prematuros ou com baixo peso (VANNUCCI et al., 2000; ZANELLI et al., 2008). A literatura ainda descreve que animais HI apresentam menor quantidade de tecido adiposo marrom, porém o modelo é o de câmara hipobárica, realizado nos últimos dias de gestação, onde a mãe também passou pelo insulto. Uma das justificativas usadas estaria relacionada a alterações no comportamento materno (MORTOLA e NASO, 1995).

Resultados anteriores do nosso grupo nesse mesmo modelo (CUNHA-RODRIGUES, 2018) demonstraram redução da massa corporal de P1 até P30. É importante destacar que no atual estudo encontramos diferenças significativas apenas nas idades P9 e P30. Porém, cabe ressaltar que, no atual estudo, apenas os animais processados para a histologia tiveram a massa corporal aferida, o que pode justificar o fato de não termos encontrado diferenças significativas, nas idades P2 e P23, em oposição aos dados anteriores que foram obtidos a partir da aferição diária da massa corporal de todos os animais da ninhada até a idade P45.

Nossos resultados demonstram aumento na imunomarcção para GFAP, o que demonstra reatividade glial. Quando comparamos os resultados obtidos nesse estudo com os dados prévios mostrando que o número de células na CCG permanece estável, mesmo com a redução na população neuronal, podemos concluir que o aumento da densidade na marcação é também gerado por aumento no número de células GFAP+, ou seja, hiperplasia. Além disso, identificamos perfis

radiais GFAP+ no grupo HI em P30, compatível com a presença de glia de Müller reativa.

A imunomarcagem para vimentina mostrou um aumento no grupo HI durante o desenvolvimento da retina e apresentou diferença estatística entre as idades e quando comparado com o grupo SH. Esse resultado demonstra que essas células também respondem ao insulto hipóxico-isquêmico e que essa resposta permanece até, pelo menos, o primeiro mês de vida pós-natal. A presença de corpos celulares GFAP+/VIM+ na CCG demonstra a presença de astrócitos imaturos, o que reforça a hipótese de que há aumento no número de astrócitos nessa camada em resposta ao evento HI.

Na literatura há trabalhos demonstrando que a gliose reativa é uma resposta comum a lesões no encéfalo adulto (RICE et al., 1981; VANNUCCI et al., 1996; VANNUCCI e VANNUCCI, 1997; RUNGGER-BRÄNDLE et al., 2000) e no imaturo (SHELDON et al., 1998; ROBINSON et al., 2005; CIKLA et al., 2016). No modelo usado nesse trabalho já foi demonstrada a presença de astrogliose que persiste, pelo menos até P23 no cerebelo e corpo caloso (SAVIGNON et al, 2012, COSTA, 2019), e até P90 no giro dentado do hipocampo (PINTO, 2015) e na porção dorsal da substância cinzenta periaqueductal (DE ALMEIDA, 2017). Também na retina em modelo de ligadura unilateral de carótida em P7 (HUANG et al., 2012) foi observado aumento da imunorreatividade a GFAP na CCG.

Assim, em diferentes estruturas encefálicas há um aumento exacerbado de astrócitos, tanto em número quanto em comprimento e largura dos processos astrogliais, com hipertrofia, migração e aumento da expressão de componentes do citoesqueleto (NORTON et al., 1992; RAMIREZ et al., 2001; PENG et al., 2014; CAHOY et al., 2008). Porém, já foi relatado que quando os astrócitos apresentam perfil de gliose também pode ocorrer a diminuição em seu número decorrente de lesões vasculares, como o aumento da permeabilidade da barreira hemato-retiniana ou de uma perda massiva de neurônios. Diferentes estudos de lesões retinianas mostram que primeiro há uma maior expressão de GFAP em glia de Müller ao invés de hiperplasia, porém há indícios que ambas as consequências não sejam induzidas pelo mesmo mecanismo (RUNGGER-BRÄNDLE et al., 2000). Contudo, pode haver co-expressão de vimentina com GFAP induzida pela expressão de astrócitos reativos proliferativos no sítio da lesão (JANECZKO, 1993). Dados mais recentes na retina de ratos demonstraram que apesar dos astrócitos possuírem uma

imunorreatividade menor para GFAP, alterações morfológicas e de distribuição persistem por até 3 meses após o insulto HI (ZAITOUN et al., 2018).

A gliose é caracterizada pelo aumento na expressão de GFAP, vimentina e nestina (ANDERSON et al., 2008; LUNA et al., 2010), mas alguns trabalhos mostraram que a ativação das células de glia pode ter papel neuroprotetor pela produção de fatores neurotróficos, fatores de crescimento e citocinas (HARADA et al., 2003; BRINGMANN et al., 2006). Assim, diversas patologias têm sido caracterizadas pela hipertrofia e queda da BRB (SHEN et al., 2010; KLAASSEN et al., 2013). Quando a gliose persiste e se torna crônica, esta resulta em danos diretos e indiretos para os neurônios e o sistema vascular na retina, auxiliando na progressão da doença, já que aumenta a permeabilidade dos vasos e a infiltração de compostos tóxicos (BRINGMANN et al., 2006; COOREY et al., 2012).

A vimentina faz parte da configuração estrutural de astrócitos imaturos durante o desenvolvimento retiniano e são substituídas por GFAP conforme o amadurecimento do sistema, em circunstâncias normais (JING et al., 2007). A glia de Müller da retina de roedores expressa predominantemente vimentina e, após uma lesão, ela sofre uma rápida mudança na composição do citoesqueleto com a regulação positiva da vimentina e de GFAP, uma resposta indicativa de um estado de reatividade (HUXLIN et al., 1995). Esta reatividade engloba uma ampla gama de eventos moleculares, bioquímicos e morfológicos. Anatomicamente, esse processo leva a um aumento no tamanho da glia de Müller, assim como seu crescimento fora da retina neural, produzindo uma cicatriz que cria uma barreira física entre o epitélio pigmentado da retina (RPE) e os fotorreceptores, impedindo a regeneração de segmentos externos fotossensíveis danificados após a reinserção retiniana (ANDERSON et al., 1986).

De modo semelhante, esse fenômeno também foi observado em outras retinopatias, tais como: retinopatia diabética, deslocamento de retina, glaucoma e processos inflamatórios (AMIN et al., 1997; HAMMES et al., 1995; HIRATA et al., 2012; PANNICKE et al., 2005, 2006; RUNGGER-BRÄNDLE et al., 2000; FRANCKE et al., 1997; GROSCHE et al., 1995; TEZEL et al., 2003; ZENG et al., 2000; WANG et al., 2000), mostrando que a expressão de GFAP pode ser induzida em células gliais de Müller (WANG e PENG, 2017). Além disso, tem sido descrito que as células de Müller, ao contrário dos neurônios na retina, são resistentes a uma variedade de insultos, incluindo isquemia, hipóxia e hipoglicemia (POITRY-YAMATE et al., 1995).

Uma possível explicação para tal resistência pode ser devido ao seu metabolismo energético especializado (WINKLER et al., 2000). Como ocorre em outros tipos de células gliais, as células de Müller utilizam-se da glicólise para produção de energia e, portanto, possuem uma baixa taxa metabólica de consumo de oxigênio. Diferentes estudos têm demonstrado que as células de Müller podem resistir inclusive a anóxia de longa duração (POITRY-YAMATE et al., 1995 e WINKLER et al., 2000).

Outras respostas da glia de Müller à degeneração da retina induzida por lesão incluem a indução da proliferação (GELLER et al., 1995; LEWIS et al., 2010) e a regulação negativa de enzimas e moléculas vitais à homeostasia da retina, como glutamina sintetase, anidrase carbônica C e proteína ligadora de retinaldeído celular (LEWIS et al., 1989). Além disso, o mau funcionamento do transporte de glutamato glial contribui para o aumento de glutamato extracelular aos níveis de excitotoxicidade. Sabe-se que na retinopatia diabética e na isquemia da retina não há alteração significativa na expressão de GLAST (BARNETT et al., 2001; PANNICKE et al, 2005, 2006; WARD et al, 2005), mas há redução da eficiência do transporte de glutamato em células de Müller (BARNETT et al., 2001; LI e PURO, 2002). Dessa forma, uma grande quantidade de glutamato fica disponível para atuar nos fotorreceptores, nas células bipolares e nas células ganglionares (BARNETT et al., 2001), gerando a neurotoxicidade por glutamato.

Com relação à imunomarcação para o transportador EAAT-1, não encontramos diferenças estatísticas quando comparamos animais SH e HI da mesma idade. Entretanto, o perfil da marcação ao longo do desenvolvimento é diferente nos animais HI: ocorre aumento na marcação já em P9 na CCG, enquanto que, no grupo SH, esse aumento somente ocorre em P23, o que reforça, mais uma vez, a identificação de um fenótipo reativo da astroglia, que é o grupo celular que expressa majoritariamente esse transportador.

O aumento da marcação de EAAT-1 observado no grupo HI em P9, idade anterior a do pico dessa marcação no grupo SH, também pode estar associado ao aumento da reatividade da glia de Müller, pois um trabalho anterior mostrou que a glia de Müller domina o transporte de glutamato na retina, influenciada pela atividade da glutamina sintetase e que a mesma expressa somente GLAST-1 (EAAT-1) (RAUEN, et al., 1997; POW e BARNETT, 1999). É importante destacar que, embora nossos dados demonstrem o aumento do transportador em P9 na CCG, não há aumento da imunomarcação para vimentina nessa idade, o que sugere que há

aumento nos transportadores, mesmo antes da resposta de hipertrofia/hiperplasia dessas células (ver gráficos 6 e 10).

Embora exista uma extensa literatura em humanos sobre a expressão do transportador de glutamato na retina adulta (POW e BARNETT, 1999; POW e ROBINSON, 1994), há dados limitados sobre a expressão de EAAT1 na retina de mamíferos em desenvolvimento (GEORGES et al., 2006; POW e BARNETT, 1999; WALCOTT e PROVIS, 2003).

Como a literatura é limitada sobre os efeitos de HI na retina, esse é o primeiro trabalho utilizando o insulto HI proposto por Savignon e colaboradores (2012) que acompanha o desenvolvimento retiniano desde neonato até trinta dias pós-natal (idade em que a retina já é considerada madura), para avaliar a resposta astrogliar e o padrão da imunomarcagem do transportador GLAST no contexto da lesão hipóxico-isquêmica pré-natal.

Nossos resultados demonstram que o insulto HI sistêmico também acarreta gliose na retina observada, mesmo após o fim do período de desenvolvimento dos seus diferentes tipos celulares, assim como altera a distribuição do transportador GLAST ao longo do desenvolvimento, o que sugere um desbalanço glutamatérgico. Além disso, reforçam que o modelo que vem sendo utilizado pelo grupo pode auxiliar na investigação dos mecanismos relacionados às lesões oriundas de eventos HI durante o período gestacional, assim como na avaliação de novas ferramentas terapêuticas.

CONCLUSÃO

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

- a) A lesão hipóxico-isquêmica pré-natal foi capaz de promover gliose na retina, demonstrada pelo aumento na imunomarcção para GFAP e VIM. Essa gliose justifica a manutenção do número de corpos celulares na CCG e é um dos fatores que pode contribuir para o aumento da morte das CGRs já descrita em trabalhos anteriores do grupo (FONSECA, 2016 e DINIZ-TAVEIRA, 2018);
- b) A alteração no padrão da imunomarcção do transportador de glutamato GLAST durante o desenvolvimento sugere que a excitotoxicidade glutamatérgica (por reversão do transportador) também pode contribuir para as lesões oriundas da HI pré-natal na retina;
- c) Nossos resultados reforçam a importância desse modelo para avaliação dos efeitos da HI pré-natal sobre o desenvolvimento do SNC.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N.J.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41–53.
- ADÉN, U.; FAVRAIS, G.; PLAISANT, F.; WINERDAL, M.; FELDERHOFF-MUESER, U.; LAMPA, J.; LELIÈVRE, V.; GRESSENS, P. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNFalpha pathway and protection by etanercept. *Brain Behav Immun* 2010;24:747–58.
- ADLER, R.; CURCIO, C.; HICKS, D.; PRICE, D.; WONG, F. Cell death in age-related macular degeneration. *Mol Vis.*, 1999.
- AKAGI, T.; INOUE, T.; MIYOSHI, G.; BESSHO, Y.; TAKAHASHI, M.; LEE, J.E.; GUILLEMOT, F.; KAGEYAMA, R. Requirement of multiple basic helix-loop-helix genes for retinal neuronal subtype specification. *J Biol Chem*. 2004 Jul 2;279(27):28492-8. Epub 2004 Apr 22.
- AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42 (2010), pp. 1634-1650, 10.1016/j.biocel.2010.06.001
- ALOISI, F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001;36(2):165–179.
- 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.
- ANDERSON, D.H.; GUÉRIN, C.J.; ERICKSON, P.A.; STERN, W.H.; FISHER, S.K. Morphological recovery in the reattached retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1986 Feb;27(2):168-83.
- ANDERSON, P.J.; WATTS, H.; HILLE, C.; PHILPOTT, K.; CLARK, P.; GENTLEMAN, M.C.; JEN, L.S. Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat. *Clin Ophthalmol*. 2008 Dec;2(4):801-16.
- ANDERSSON, K. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport*, v. 6, n.2, p. 375-378, 1995.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Editora FIOCRUZ, 2002.
- ARTENI, N.S.; PEREIRA, L.O.; RODRIGUES, A.L.; LAVINSKY, D.; ACHAVAL, M.E.; NETTO, C.A. (2010). Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behav. Brain Res*. 210 92–98. 10.1016/j.bbr.2010.02.015

AUTRY, A.E.; MONTEGGIA, L.M. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64:238–258 (2012).

BACK, S.A.; LUO, N.L.; BORENSTEIN, N.S.; LEVINE, J.M.; VOLPE, J.J.; KINNEY, H.C. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J. Neurosci.*, v. 21, n.4, p. 1302-1312, 2001.

BALTMER, A.; DUGGAN, J.; NIZARI, S.; SALT, T.E.; CORDEIRO, M.F. Neuroprotection in glaucoma - is there a future role. *Exp Eye Res.* 2010;91:554–566.

BARNETT, N. L.; POW, D. V.; BULL, N. D. (2001). Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem. Int.* 39, 291–299. 10.1016/S0197-0186(01)00033-X.

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.

BARONE, F.C.; FEUERSTEIN, G.Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:819–834.

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. et al. Amniotic fluid concentrations of interleukin 1h, interleukin-6 and TNF α in chorioamnionitis before 32 weeks of gestation: histological associations and neonatal outcome. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, v. 106, p. 72-77, 1999.

BEJARANO-ESCOBAR, R.; HOLGUÍN-ARÉVALO, M.S.; MONTERO, J.A.; FRANCISCO-MORCILLO, J.; MARTÍN-PARTIDO, G. Macrophage and microglia ontogeny in the mouse visual system can be traced by the expression of Cathepsins B and D. *Dev Dyn.* 2011 Jul;240(7):1841-55. Epub 2011 Jun 3.

BEJARANO-ESCOBAR, R.; SÁNCHEZ-CALDERÓN, H.; OTERO-ARENAS, J.; MARTÍN-PARTIDO, G.; FRANCISCO-MORCILLO, J. Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *J Anat.* 2017 Oct;231(4):471-483. Epub 2017 Jul 10.

BENJELLOUN, NN; RENOLLEAU, S; REPRESA, A; BEN-ARI, Y; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat. *Stroke*, 1999.

BENVENISTE, H; DREJER, J; SCHOUSBOES, A; DIEMER, NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 1984.

BICAS, H.E.A. Morfologia do sistema visual. Medicina. Ribeirão Preto, Simpósio: Oftalmologia para o clínico, 1997.

BILLUPS, B.; ATTWELL, D. (1996). Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* 379, 171–174.10.1038/379171a0

BIRKLE, D.L.; BAZAN, N.G. Light exposure stimulates arachidonic acid metabolism in intact rat retina and isolated rod outer segments. *Neurochem (1989). Res.* 14, 185–190.10.1007/BF00969637

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 Aug 22;232(1):45-8.

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.

BLOMGREN, K.; HAGBERGN, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006 Feb 1;40(3):388-97. Epub 2005 Nov 9.

BLUMBERG, R.M.; CADY, E.B.; WIGGLESWORTH, J.S.; MCKENZIE, J.E.; EDWARDS, A.D. (1997) Relation between delayed impairment of cerebral energy metabolism and infarction following transient focal hypoxia-ischaemia in the developing brain. *Exp Brain Res* 113, 130–137.

BRINGMANN, A.; GROSCHE, A.; PANNICKE, T.; REICHENBACH, A. GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013; 4: 48.

BRINGMANN, A.; IANDIEV, I.; PANNICKE, T.; WURM, A.; HOLLBORN, M.; WIEDEMANN, P.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28:423–451.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; BIEDERMANN, B.; FRANCKE, M.; IANDIEV, I.; GROSCHE, J.; WIEDEMANN, P.; ALBRECHT, J.; REICHENBACH, A. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* 2009;54:143–160.

BRINGMANN, A.; PANNICKE, T.; GROSCHE, J.; FRANCKE, M.; WIEDEMANN, P.; SKATCHKOV, S.N.; OSBORNE, N.N.; REICHENBACH, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* 2006 Jul;25(4):397-424. Epub 2006 Jul 12.

BRINGMANN, A.; WIEDEMANN, P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*. 2012;227(1):1-19. Epub 2011 Sep 15.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; BRACCI, R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Neonatology*, 79 (2001), pp. 180-186, 10.1159/000047088.

BURKE, R.E.; KENT, J.; KENYON, N.; KARANAS, A. Unilateral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat results in a persistent increase in the density of striatal tyrosine hydroxylase immunoperoxidase staining. *Brain Res Dev Brain Res.*, v. 58, n.2, p.171-179, 1991.

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.

CANNON, T.D.; YOLKEN, R.; BUKA, S.; TORREY, E.F. Decreased neurotrophic response to birth hypoxia in the etiology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 64:797–802 (2008).

CAPRARA, C.; GRIMM, C. From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease. *Prog Retin Eye Res.*, 2012.

CASEY, B.J.; GLATT, C.E.; TOTTENHAM, N.; SOLIMAN, F.; BATH, K.; AMSO, D.; ALTEMUS, M.; PATTWELL, S.; JONES, R.; LEVITA, L.; MCEWEN, B.; MAGARIÑOS, A.M.; GUNNAR, M.; THOMAS, K.M.; MEZEY, J.; CLARK, A.G.; HEMPSTEAD, B.L.; LEE, F.; S. Brain-derived neurotrophic factor as a model system for examining gene by environment interactions across development. *Neuroscience* 164:108–120 (2009).

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.

CERRETELLI, P. Energy sources for muscular exercise. *International journal of sports medicine*, 1992.

CHANDEL, NS; SCHUMACKER, PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. *Journal of applied physiology*, 2000.

CHEN, F.; MI, M.; ZHANG, Q.; WEI, N.; CHEN, K.; XU, H.; YUAN, J.; ZHOU, Y.; LANG, H.; YU, X.; WANG, B.; WANG, J.; TANG, Y.; CHANG, H. Taurine buffers glutamate homeostasis in retinal cells in vitro under hypoxic conditions. *Ophthalmic Res.* 2010;44(2):105-12. Epub 2010 May 13.

CHEN, M.; ZHANG, L. Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discov Today*, v. 16, n. 23-24, p. 1007-1018, 2011.

CHEN, S.D.; WANG, L.; ZHANG, X.L. Neuroprotection in glaucoma: present and future. *Chinese Medical Journal*. 2013;126(8):1567–1577.

CHEUNG, N.S.; PASCOE, C.J.; GIARDINA, S.F.; JOHN, C.A.; BEART, P.M. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology*. 1998;37:1419–1429.

CHISTYAKOV, D.V.; AZBUKINA, N.V.; LOPACHEV, A.V.; KULICHENKOVA, K.N.; ASTAKHOVA, A.A.; SERGEEVA, M.G. Rosiglitazone as a modulator of tlr4 and tlr3 signaling pathways in rat primary neurons and astrocytes. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:113.

CIKLA, U.; CHANANA, V.; KINTNER, D.B.; UDHO, E.; EICKHOFF, J.; SUN, W.; MARQUEZ, S.; COVERT, L.; OTLES, A.; SHAPIRO, R.A.; FERRAZZANO, P.; VEMUGANTI, R.; LEVINE, J.E.; CENGIZ, P. ERalpha Signaling Is Required for TrkB-Mediated Hippocampal Neuroprotection in Female Neonatal Mice after Hypoxic Ischemic Encephalopathy (1,2,3). *eNeuro* 3, (2016).

COHEN, L.H; NOELL, W.K. Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. *J Neurochem.*, 1960.

COSTA, E.L.N. Modulação do Estresse Oxidativo em um modelo de hipóxia- isquemia pré-natal: avaliação morfofuncional do hipocampo. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. Pós-graduação em Biociências. 2019.

COOREY, N.J; SHEN, W.; CHUNG, S.H.; ZHU, L.; GILLIES, M.C. The role of glia in retinal vascular disease. *Clin Exp Optom*. 2012 May;95(3):266-81. Epub 2012 Apr 22.

CORNELL-BELL, A.; FINKBEINER, S.M.; COOPER, M.S.; SMITH, S.J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* v. 247, n. 4941, p. 470-473, 1990.

CUI, C.; ZHOU, T.; LI, J.; WANG, H.; LI, X.; XIONG, J.; XU, P.; XUE, M. Proteomic analysis of the mouse brain after repetitive exposure to hypoxia. *Chem Biol Interact*. 2015;236:57–66.

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.

DAI, M.; XIA, X.B.; XIONG, S.Q. BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells. *J Cell Physiol*. 2012 Feb;227(2):596-603. doi: 10.1002/jcp.22762.

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

DAS, A.V.; MALLYA, K.B.; ZHAO, X.; AHMAD, F.; BHATTACHARYA, S.; THORESON, W.B.; HEGDE, G.V.; AHMAD, I. Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol.* 2006;299:283–302.

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 Mar 17;859(1):96-103.

DAVIS, J.M.; AUTEN, R.L. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 15 (2010), pp. 191-195, 10.1016/j.siny.2010.04.001.

DE ALMEIDA, L.S. Hipóxia-isquemia sistêmica pré-natal altera a resposta algica e a distribuição da enzima óxido nítrico sintase neuronal e GFAP na substância cinzenta periquedutal de ratos machos jovens e adultos. *Dissertação (Mestrado)*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. 2017.

de HAAN, M; WYATT, J.S.; ROTH, S.; VARGHA-KHADEM, F.; GADIAN, D.; MISHKIN, M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci.*, v. 9, n. 4, p. 350-358, 2006.

de HOZ, R.; ROJAS, B.; RAMÍREZ, A.I.; SALAZAR, J.J.; GALLEGO, B.I.; TRIVIÑO, A.; RAMÍREZ, J.M. Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 2954721.

de MELO REIS, R.A.; CABRAL-DA-SILVA, M.E.; DE MELLO, F.G.; TAYLOR, J.S. Müller glia factors induce survival and neurogenesis of peripheral and central neurons. *Brain Res.* 2008 Apr 18;1205:1-11. Epub 2008 Mar 4.

DEL BIGIO, M.R.; BECKE L.E. Microglial aggregation in the dentate gyrus: a marker of mild hypoxic-ischaemic brain insult in human infants. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20 (2) (1994), pp. 144-151

DEL ZOPPO, G; GINIS, I; HALLENBECK, JM; IADECOLA, C; WANG, X; FEUERSTEIN, GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain pathology*, 2000.

DELYFER, M.N.; FORSTER, V.; NEVEUX, N.; PICAUD, S.; LÉVEILLARD, T.; SAHEL, J.A. (2005b). Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol. Vis.* 11, 688–696

DI FIORE, J.M.; VENTO, M. Intermittent hypoxemia and oxidative stress in preterm infants. *Respir. Physiol. Neurobiol.* (2019), 10.1016/j.resp.2019.05.006.

DINIZ -TAVEIRA, G.M. Hipóxia-isquemia transitória pré-natal e desenvolvimento da retina de ratos: alterações morfológicas e funcionais. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências. 2018.

DKHISSI O., CHANUT E., WASOWICZ M., SAVOLDELLI M., NGUYEN-LEGROS J., MINVIELLE F., VERSAUX-BOTTERI, C. (1999). Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 990–994.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36(2):180–190.

DUCSAY, C.A.; GOYAL, R.; PEARCE, W.J.; WILSON, S.; HU, X.Q.; ZHANG, L. Gestational Hypoxia and Developmental Plasticity. *Physiol Rev.* 2018 Jul 1;98(3):1241-1334. doi: 10.1152/physrev.00043.2017.

ELIASOF, S.; ARRIZA, J.L.; LEIGHTON, B.H.; KAVANAUGH, M.P.; AMARA, S.G. Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J Neurosci.* v.18, n. 2, p. 698-712, 1998.

FADEN, A.I.; DEMEDIUK, P.; PANTER, S.S.; VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science.* 1989 May 19;244(4906):798-800.

FAGG, G.E.; MENA, E.E.; COTMAN, C.W. L-glutamate receptor populations in synaptic membranes: effects of ions and pharmacological characteristics. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1983;37:199-209. No abstract available.

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. *FASEB J.* v. 9, p. 343-350, 1995.

FERRIERO, D.M.; SHELDON, RA; BLACK, SM; CHUAI, J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res.*, v. 38, n.6, p. 912-918, 1995.

FERRIERO, D.M.; ARCAVI, LJ; SAGAR, SM; MCINTOSH, TK; SIMON, RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.*, v. 24, p.670–676, 1988.

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

FLEISS, B.; GRESSENS, P. (2012) Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy? *Lancet Neurol* 11, 556–566.

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.

FRANÇA, E.B.; LANSKY, S.; REGO, M.A.S.; MALTA, D. C.; FRANÇA, J.S.; TEIXEIRA, R.; PORTO, D.; ALMEIDA, M. F.; SOUZA, M.F.M; SZWARCOWALD, C.L.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; VASCONCELOS, AM.N. Principais causas da mortalidade na infância no Brasil, em 1990 e 2015: estimativas do estudo de Carga Global de Doença. *Rev Bras Epidemiol MAIO* 2017; 20 SUPPL 1: 46-60.

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.

GABRYEL, B.; KASPROWSKA, D.; KOST, A.; LABUZEK, K.; URBANEK, T. Astrocytes in ischemic stroke—A potential target for neuroprotective strategies. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 2015;69:384–397.

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-TRIQUEROS, M.; VILLEGAS-PEREZ, M.P.; VIDAL-SANZ, M.; TRYIÑO, A.; RAMÍREZ J.M. IOP induces upregulation of GFAP and MHC-II and microglia reactivity in mice retina contralateral to experimental glaucoma. *Journal of Neuroinflammation*. 2012;9(1, article 92).

GALLINA, D.; ZELINKA, C.; FISCHER, A.J. Glucocorticoid receptors in the retina, Müller glia and the formation of Müller glia-derived progenitors. *Development*. 2014 Sep;141(17):3340-51. Epub 2014 Aug 1.

GARCIA, J.H.; YOSHIDA, Y.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, Z.G.; LIAN, J.; CHEN, S.; CHOPP, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol*. 1993 Feb;142(2):623-35.

GELLER, S.F.; LEWIS, G.P.; ANDERSON, D.H.; FISHER, S.K. Use of the MIB-1 antibody for detecting proliferating cells in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995 Mar;36(3):737-44.

GEORGES, P.; CORNISH, E.E.; PROVIS, J.M.; MADIGAN, M.C. Muller cell expression of glutamate cycle related proteins and anti-apoptotic proteins in early human retinal development. *Br J Ophthalmol*. 2006 Feb;90(2):223-8.

GIANNELLI, S.G.; DEMONTIS, G.C.; PERTILE, G.; RAMA, P.; BROCCOLI, V. Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells*. 2011 Feb;29(2):344-56.

GILL, R.; FOSTER, A.C.; WOODRUFF, G.N. Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1987;7:3343–3349.

GINET, V.; VAN DE LOOIJ, Y.; PETRENKO, V.; TOULOTTE, A.; KISS, J.; HÜPPI, P.S.; SIZONENKO, S.V. (2016). Lactoferrin during lactation reduces lipopolysaccharide-induced brain injury. *BioFactors* 42 323–336.

GOHDO, T.; UEDA, H.; OHNO, S.; IIJIMA, H.; TSUKAHARA, S. Heat shock protein 70 expression increased in rabbit muller cells in the ischemia-reperfusion model. *Ophthalmic Res.* 2001;33:298–302.

GOLDMAN, D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Jul;15(7):431-42. Epub 2014 Jun 4.

GOOD, W.V.; HARDY, R.J. The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP). *Ophthalmology*, 2001.

GORDON, G.R.J.; MULLIGAN, S.J.; MACVICAR, B.A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* 2007;55(12):1214–1221.

GORSUCH, R.A.; HYDE, D.R. Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina. *Exp Eye Res.* 2014 Jun;123:131-40. doi: 10.1016/j.exer.2013.07.012. Epub 2013 Jul 20.

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.

GROSCHE, J.; HÄRTIG, W.; REICHENBACH, A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci Lett.* 1995 Feb 9;185(2):119-22.

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

HAGAN, P.; BARKS, J.D.; YABUT, M.; DAVIDSON, B.L.; ROESSLER, B.; SILVERSTEIN, F.S. Adenovirus-mediated over-expression of interleukin-1 receptor antagonist reduces susceptibility to excitotoxic brain injury in perinatal rats. *Neuroscience* 1996;75:1033–45.

HAGBERG, H.; GILLAND, E.; BONA, E.; HANSON, L.A.; HAHIN-ZORIC, M.; BLENNOW, M.; HOLST, M.; MCRAE, A.; SÖDER, O. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res.* 1996 Oct;40(4):603-9.

HAGBERG, H.; THORNBERG, E.; BLENNOW, M.; KJELLMER, I.; LAGERCRANTZ, H.; THIRINGER, K.; HAMBERGER, A.; SANDBERG, M. (1993) Excitatory amino acids in the cerebrospinal fluid of asphyxiated infants: relationship to hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Paediatr* 82, 925–929.

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.

HAMON, A.; ROGER, J.E.; YANG, X.J.; PERRON, M. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn.* 2016 Jul;245(7):727-38. Epub 2016 Jan 8.

HANSSON, E.; RÖNNBÄCK, L. Astrocytes in glutamate neurotransmission. *The FASEB Journal*, vol. 9, no. 5, 1995.

HARADA T., HARADA C., NAKAMURA K., QUAH H. M., OKUMURA A., NAMEKATA K., SAEKI, T; AJHARA, M; YOSHIDA, H; MITANI, A; TANAKA, K. (2007). The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J. Clin. Invest.* 117, 1763–1770.10.1172/JCI30178.

HARADA T., HARADA C., WATANABE M., INOUE Y., SAKAGAWA T., NAKAYAMA N., SASAKI, S.; OKUYAMA, S.; WATASE, K.; WADA, K.; TANAKA, K. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4663–4666.10.1073/pnas.95.8.4663.

HARADA, C.; HARADA, T.; QUAH, H.M.; MAEKAWA, F.; YOSHIDA, K.; OHNO, S.; WADA, K.; PARADA, L.F.; TANAKA, K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience*.2003;122(1):229-35.

HEDTJÄRN, M; LEVERIN, AL; ERIKSSON, K; BLOMGREN, K; MALLARD,C; HAGBERG, H. Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci* 2002;22:5910–9.HELLSTROM, A.; SMITH, L.E.; DAMMANN, O. Retinopathy of prematurity. *Lancet.*, 2013.

HEMMINGSSEN, E. A.; DOUGLAS, E.L. Ultraviolet radiation thresholds for corneal injury in antarctic and temperate-zone animals. *Comp Biochem Physiol.*, 1970.

HENEKA, M.T.; RODRÍGUEZ, J.J.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Research Reviews.* 2010;63(1-2):189–211.

HIGGINS, R. D; RAJU, T.; EDWARDS, A. D.; AZZOPARDI, D. V.; BOSE, C. L.; CLARK, R. H.; FERRIERO, D. M.; GUILLET, R.; GUNN, A. J.; HAGBERG, H.; HIRTZ, D.; INDER, T. E.; JACOBS, S. E.; JENKINS, D.; JUUL, S.; LAPTOOK, A. R.; LUCEY, J. F.; MAZE, M.; PALMER, C.; PAPILE, L.; PFISTER, R. H.; ROBERTSON, N. J.; RUTHERFORD, M.; SHANKARAN, S.; SILVERTEIN, F. S.; SOLL, R. F., THORESEN, M.; WALSH, W. F.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Hypothermia Workshop Speakers and Moderators. Hypothermia and other treatment options for neonatal encephalopathy: an executive summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD workshop. *J Pediatr.*, v. 159, n. 5, p. 851-858, 2011.

HIRATA, C.; NAKANO, K.; NAKAMURA, N.; KITAGAWA, Y.; SHIGETA, H.; HASEGAWA, G.; OGATA, M.; IKEDA, T.; SAWA, H.; NAKAMURA, K.; IENAGA, K.; HUANG, H. M.; HUANG, C. C.; HUNG, P. L.; CHANG, Y.C. Hypoxic-ischemic retinal injury in rat pups. *Pediatr Res.*, 2012.

HOLMSTRÖM, K.M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15 (2014), pp. 411-421, 10.1038/nrm3801.

HU, X.; LEAK, R.K.; SHI, Y.; SUENAGA, J.; GAO, Y.; ZHENG, P.; CHEN, J. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol.* 2015;11:56–64.

HU, X.; NESIC-TAYLOR, O.; QIU, J.; REA, H.C.; FABIAN, R.; RASSIN, D.K.; PEREZ-POLO, J.R. Activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway by interleukin-1 after hypoxia/ischemia in neonatal rat hippocampus and cortex. *J Neurochem.* 2005 Apr;93(1):26-37.

HUANG, H.M.; HUANG, C.C.; HUNG, P.L.; CHANG, Y.C. Hypoxic-ischemic retinal injury in rat pups. *Pediatr Res.* 2012 Sep;72(3):224-31. Epub 2012 Jun 5.

HUANG, Z.; LIU, J.; CHEUNG, P.Y.; CHEN, C. (2009). Long-term cognitive impairment and myelination deficiency in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res.* 1301 100–109.

HUXLIN, K.R.; DREHER, Z.; SCHULZ, M.; DREHER, B. Glial reactivity in the retina of adult rats. *Glia.* 1995 Oct;15(2):105-18.

IADECOLA, C.; NEDERGAARD, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience.* 2007;10(11):1369–1376.

ITOH, T.; BEESLEY, J.; ITOH, A.; COHEN, A. S.; KAVANAUGH, B.; COULTER, D. A.; GRINSPAN, J. B.; PLEASURE, D. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem.*, v. 81, p. 390– 402, 2002.

IZUMI, Y.; SHIMAMOTO, K.; BENZ, A.M.; HAMMERMAN, S.B.; OLNEY, J.W.; ZORUMSKI, C.F. Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia.* 2002;39:58–68.

JACOBS, G.H.; NEITZ, J.; DEEGAN, J.F. 2nd. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature*, 1991.

JADHAV, A.P.; ROESCH, K.; CEPKO, C.L. Development and neurogenic potential of Muller glial cells in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res.* 2009;28:249–262.

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.

JANECZKO, K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int. J. Devl. Neurosci.* v. 11, p. 139-147, 1993.

JAYARAM, H.; JONES, M.F.; EASTLAKE, K.; COTTRILL, P.B.; BECKER, S.; WISEMAN, J.; KHAW, P.T.; LIMB, G.A. Transplantation of photoreceptors derived from human muller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3:323–333.

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.

JING, R.; WILHELMSSON, U.; GOODWILL, W.; LI, L.; PAN, Y.; PEKNY, M.; SKALLI, O. Synemin is expressed in reactive astrocytes in neurotrauma and interacts differentially with vimentin and GFAP intermediate filament networks. *J Cell Sci.* 2007 Apr 1;120(Pt 7):1267-77. Epub 2007 Mar 13.

JOHNSON, E.C.; MORRISON, J.C. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *Journal of Glaucoma.* 2009;18(5):341–353.

JOHNSTON, M.V.; FATEMI, A.; WILSON, M.A.; NORTHINGTON, F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol.*, 2011.

JOYAL, C.C.; MEYER, C.; JACQUART, G.; MAHLER, P.; CASTON, J.; LALONDE, R. (1996). Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordination and spatial orientation. *Brain Res.* 739 1–11.

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 Vesl-1L/Homer 1c immunoreactive synaptic connections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2003.

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

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Neuronas y conducta. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL T.M. editors. *Principios de Neurociencia*. Madrid, Spain: McGraw-Hill/Interamericana; 2001. pp. 19–35.

- KAVANAUGH, B; BEESLEY, J.; ITHON, T.; ITHON A.; GRINSPAN, J.; PLEASURE, D. Neurotrophin-3 (NT-3) diminishes susceptibility of the oligodendroglial lineage to AMPA glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.*, v. 60, p. 725–732, 2000.
- KERGOAT, H; HÉRARD, M.E; LEMAY, M. RGC sensitivity to mild systemic hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2006.
- KIM, J. V.; DUSTIN, M. L. Innate response to focal necrotic injury inside the blood-brain barrier. *J Immunol.*, 2006.
- KIM, Y.P.; KIM, H.; SHIN, M.S.; CHANG, H.K.; JANG, M.H.; SHIN, M.C., LEE, S.J.; LEE, H.H.; YOON, J.H.; JEONG, I.G.; KIM, C.J. (2004). Age-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Neurosci. Lett.* 355 152–154.
- KIMELBERG, H.K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):338–353.
- KINNEY, H.C.; BACK, S.A. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin. Pediatr. Neurol.*, v. 5, n.3, p.180-189, 1998.
- 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.
- KLAASSEN, I.; VAN NOORDEN, C.J.; SCHLINGEMANN, R.O. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res.* 2013 May;34:19-48. Epub 2013 Feb 13.
- KNAPP, L.T.; KLANN, E. Role of reactive oxygen species in hippocampal long-term potentiation: contributory or inhibitory? *J. Neurosci. Res.*, 70 (2002), pp. 1-7, 10.1002/jnr.10371
- KOBAYASHI, M.; KUROIWA, T.; SHIMOKAWA, R.; OKEDA, R.; TOKORO, T. Nitric oxide synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol.*, 2000.
- KOEHLER, R.C.; ROMAN, R.J.; HARDER, D.R. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences.* 2009;32(3):160–169.
- 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.
- KUMAR, A.; PANDEY, R.K.; MILLER, L.J.; SINGH, P.K.; KANWAR, M. Muller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis. *Crit Rev Immunol.* 2013;33(2):119-35. Review.

KURINCZUK, J.J.; WHITE-KONING, M.; BADAWI, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010 Jun;86(6):329–38.

KURUTAS, E.B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.*, 15 (2016), 10.1186/s12937-016-0186-5

LAMBA, D.; KARL, M.; REH, T. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell.* 2008 Jun 5;2(6):538-49. Review.

LANDINO, L.M.; CREWS, B.C.; TIMMONS, M.D.; MORROW, J.D.; MARNETT, L.J. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1996). 93, 15069–15074. doi:10.1073/pnas.93.26.15069

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.

LAWRENCE, J.M.; SINGHAL, S.; BHATIA, B.; KEEGAN, D.J.; REH, T.A.; LUTHERT, P.J.; KHAW, P.T.; LIMB, G.A. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells.* 2007;25:2033–2043.

LEHRE K. P. et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci*, v. 15, p.1835–1853, 1995.

LEITE, I.C.; COSTA, M.F.S.; VALENTE, J.G.; SCHRAMM, J.M.A.; DAUMAS, R.P.; RODRIGUES, R.N. *Carga de Mortalidade-Estado de Minas Gerais, 2005*. Belo Horizonte: Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais/CGDANT, 2009.

LENKOWSKI, J.R.; RAYMOND, P.A. Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res.* 2014 May;40:94-123. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.007. Epub 2014 Jan 8.

LEONARDO, C.C.; PENNYPACKER, K.R. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *J Neuroinflammation.* 2009 Apr 15;6:13.

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

LEWIS, G.P.; CHAPIN, E.A.; LUNA, G.; LINBERG, K.A.; FISHER, S.K. The fate of Müller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation. *Mol Vis.* 2010 Jul 15;16:1361-72.

LEWIS, G.P.; ERICKSON, P.A.; GUÉRIN, C.J.; ANDERSON, D.H.; FISHER, S.K. Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long-term retinal detachment. *Exp Eye Res.* 1989 Jul;49(1):93-111.

LI, Q.; PURO, D.G. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Muller cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3109–3116.

LI, S.; HAFEEZ, A.; NOORULLA, F.; GENG, X.; SHAO, G.; REN, C.; LU, G.; ZHAO, H.; DING, Y.; JIA, X. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol.* 2017 Oct; 157: 79–91.

LIDDELOW, S.A.; GUTTENPLAN, K.A.; CLARKE, L.E.; BENNETT, F.C.; BOHLEN, C.J.; SCHIRMER, L.; BENNETT, M.L.; MÜNCH, A.E.; CHUNG, W.S.; PETERSON, T.C.; WILTON, D.K.; FROUIN, A.; NAPIER, B.A.; PANICKER, N.; KUMAR, M.; BUCKWALTER, M.S.; ROWITCH, D.H.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; STEVENS, B.; BARRES, B.A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 2017.

LIETH E., BARBER A., XU B., DICE C., RATZ M. J., TANASE D.; STROTHER, J. M. (1998). Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 47, 815–820. doi:10.2337/diabetes.47.5.815

LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med.*, v. 330, p. 613-622, 1994.

LIU, B.; HUNTER, D.J.; SMITH, A.A.; CHEN, S.; HELMS, J.A. The capacity of neural crest-derived stem cells for ocular repair. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014 Sep;102(3):299-308. doi: 10.1002/bdrc.21077. Epub 2014 Sep 16.

LIVESEY, F.J.; CEPKO, C.L. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Feb;2(2):109-18. Review.

LOREK, A.; TAKEI, Y.; CADY, E.B.; WYATT, J.S.; PENRICE, J.; EDWARDS, A.D.; PEEBLES, D.; WYLEZINSKA, M.; OWEN-REECE, H.; KIRKBRIDE, V.; COOPER, C. E.; ALDRIDGE, R. F.; ROTH, S. C.; BROWN, G.; DELPY, D. T.; REYNOLDS, E.O.R. (1994) Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 36, 699–706.

LU, Y.B.; IANDIEV, I.; HOLLBORN, M.; KÖRBER, N.; ULBRICHT, E.; HIRRLINGER, P.G.; PANNICKE, T.; WEI, E.Q.; BRINGMANN, A.; WOLBURG, H.; WILHELMSSON, U.; PEKNY, M.; WIEDEMANN, P.; REICHENBACH, A.; KÄS, J.A. Reactive glial cells: increased stiffness correlates with increased intermediate filament expression. *FASEB J.* 2011 Feb;25(2):624-31. Epub 2010 Oct 25.

LUBICS A., REGLÓDI D., TAMÁS A., KISS P., SZALAI M., SZALONTAY L., LENGVÁRI, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157 157–165. 10.1016/j.bbr.2004.06.019

LUNA, G.; LEWIS, G.P.; BANNA, C.D.; SKALLI, O.; FISHER, S.K. (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Muller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Mol. Vis.* 16, 2511–2523.

MAGUIRE, G.; SIMKO, H.; WEINREB, R.N.; AYOUB, G. Transport-mediated release of endogenous glutamate in the vertebrate retina. *Pflugers Arch.* 1998 Aug;436(3):481-4.

MANDER, P.K.; JEKABSONE, A.; BROWN, G.C. Microglia proliferation is regulated by hydrogen peroxide from nadph oxidase. *J. Immunol. (Balt. Md.: 1950)* 2006;176:1046–1052.

MARCAGGI, P.; HIRJI, N.; ATTWELL, D. (2005). Release of l-aspartate by reversal of glutamate transporters. *Neuropharmacology* 49, 843–849. 10.1016/j.neuropharm.2005.07.011

MARMOR, M.F.; KELLNER, U.; LAI, T.Y.; LYONS, J.S.; MIELER, W.F. Revised recommendations on screening for chloroquine and hydroxychloroquine retinopathy. *American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology.* 2011 Feb;118(2):415-22.

MARQUARDT, T.; GRUSS, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.*, 2002.

MARTINEZ-BIARGE, M; MADERO, R.; GONZÁLEZ, A.; QUERO, J.; GARCÍA-ALIX, A. Perinatal morbidity and risk of hypoxic-ischemic encephalopathy associated with intrapartum sentinel events. *Am J. Obstet Gynecol.*, v.206e, p.141–147, 2012.

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

MAYURASAKORN, K.; NIATSETSKAYA, Z.V.; SOSUNOV, S.A.; WILLIAMS, J.J.; ZIRPOLI, H.; VLASAKOV, I; Deckelbaum, R.J.; Ten, V.S. DHA but Not EPA Emulsions Preserve Neurological and Mitochondrial Function after Brain Hypoxia-Ischemia in Neonatal Mice.. *PLoS ONE* (2016). 11, e0160870.

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

MCINTYRE, S.; BLAIR, E.; BADAWI, N.; KEOGH, J.; NELSON, K.B. Antecedents of cerebral palsy and perinatal death in term and late preterm singletons. *Obstet Gynecol.*, v. 122, n. 4, p. 869-877, 2013.

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

MCKENNA, M.C.; TILDON, J.T.; STEVENSON, J.H.; HUANG, X. New insights into the compartmentation of glutamate and glutamine in cultured rat brain astrocytes. *DevNeurosci.*, v. 18, n. 5-6, p. 380-90, 1996.

MISUMI, S.; UEDA, Y.; NISHIGAKI, R.; SUZUKI, M.; ISHIDA, A.; JUNG, C.G.; HIDA, H. (2016). Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss. *Cell Transplant.* 25 1381–1393.

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.

NAKANISHI, S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation, and plasticity. *Neuron.* 1994 Nov;13(5):1031-7. Review. No abstract available.

NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 1992 Oct 23;258(5082):597-603. Review.

NAMEKATA, K.; HARADA, C.; KOHYAMA, K.; MATSUMOTO, Y.; HARADA, T. Interleukin-1 stimulates glutamate uptake in glial cells by accelerating membrane trafficking of Na⁺/K⁺-ATPase via actin depolymerization. *Mol Cell Biol.* 2008;28:3273–3280.

NASKAR, R.; VORWERK, C.K.; DREYER, E.B. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:1940–1944.

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 Apr 15;304(2):479-98. Epub 2007 Jan 8.

NELSON, K.B.; GREYER, J.K.; DAMBROSIA, J.M.; WALSH, E.; KOHLER, S.; SATYANARAYANA, G.; NELSON, P.G.; DICKENS, B.F.; PHILLIPS, T.M. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr. Res.*, v. 53, n.4, p. 600–607, 2003.

NIJBOER, C.H.; HEIJNEN, C.J.; GROENENDAAL, F.; MAY, M.J.; VAN BEL, F.; KAVELAARS, A. Strong neuroprotection by inhibition of NF-kappaB after neonatal hypoxia-ischemia involves apoptotic mechanisms but is independent of cytokines. *Stroke.* 2008 Jul;39(7):2129-37. Epub 2008 Apr 17.

NISHIDA, A.; TAKAHASHI, M.; TANIHARA, H.; NAKANO, I.; TAKAHASHI, J.B.; MIZOGUCHI, A.; IDE, C.; HONDA, Y. 2000. Incorporation and differentiation of

hippocampus derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4268–4274.

NORTHINGTON, F.J.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; MARTIN, L.J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.* 69 743–758.

NORTON, W.T.; AQUINO, D.A.; HOZUMI, I.; CHIU, F.C.; BROSNAN, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem. Res.* v. 17, p. 877-885, 1992.

NUGUD, A.; SANDEEP, D.; EL-SERAFI, A.T. Two faces of the coin: minireview for dissecting the role of reactive oxygen species in stem cell potency and lineage commitment. *J. Adv. Res.*, 14 (2018), pp. 73-79, 10.1016/j.jare.2018.05.012

OLIVIER, P.; BAUD, O.; EVRARD, P.; GRESSENS, P.; VERNEY, C. Prenatal ischemia and white matter damage in rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64 (2005), pp. 998-1006.

OSBORNE, N.; CASSON, R.; WOOD, J.; CHIDLOW, G.; GRAHAM, M.; MELENA, J. 2004. Retinal ischemia: mechanism of damage and potential therapeutic strategies. *Ret Eye Res* 23: 91– 147.

OZSUREKCI, Y.; AYKAC, K. Oxidative stress related diseases in newborns. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016 (2016), 10.1155/2016/2768365

PAASCHE, G.; HUSTER, D.; REICHENBACH, A. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: the effects of aging and of application of free-radical scavengers. *Ophthalmic Res.* 1998;30(6):351-60.

PANFOLI, I.; CANDIANO, G.; MALOVA, M.; DE ANGELIS, L.; CARDIELLO, V.; BUONOCORE, G.; RAMENGI, L.A. Oxidative stress as a primary risk factor for brain damage in preterm newborns. *Front. Pediatr.*, 6 (2018), 10.3389/fped.2018.00369.

PANNICKE, T.; IANDIEV, I.; WURM, A.; UCKERMANN, O.; VOM HAGEN, F.; REICHENBACH, A.; WIEDEMANN, P.; HAMMES, H.P.; BRINGMANN, A. (2006). Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55, 633–639 10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1349

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.

PAOLO, T. The high-risk newborns. *J Matern Fetal Neonatal Med.*, v. 25, v. S1, p. 6-7, 2012.

PARPURA, V; BASARSKY, TA; LIU, F; JEFTINIJA, K; JETTINIJA, S; HAYDON, PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* v. 369, p. 744- 747, 1994.

PAULIAH, S.S.; SHANKARAN, S.; WADE, A. CADY, E.B.; THAYYIL, S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(3):e58834-e. and ERK1/2 Signaling Pathways. *Inflammation*, 2014.

PENA, J.D.; AGAPOVA, O.; GABELT, B.T.; LEVIN, L.A.; LUCARELLI, M.J.; KAUFMAN, P.L.; HERNANDEZ, M.R. Increased elastin expression in astrocytes of the lamina cribrosa in response to elevated intraocular pressure. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2001;42(10):2303–2314.

PENA, J.D.O.; TAYLOR, A.W.; RICARD, C.S.; VIDAL, I.; HERNANDEZ, M.R. Transforming growth factor β isoforms in human optic nerve heads. *British Journal of Ophthalmology*. 1999;83(2):209–218.

PENG, L.; PARPURA, V.; VERKHRATSKY, A. EDITORIAL Neuroglia as a Central Element of Neurological Diseases: An Underappreciated Target for Therapeutic Intervention. *Curr Neuropharmacol*. 2014 Jul;12(4):303-7.

PENN, J.S.; MADAN, A.; CALDWELL, R.B.; BARTOLI, M.; CALDWELL, R.W.; HARTNETT M. E. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2008;27(4):331–371.

PEREZ-ALVAREZ, A.; ARAQUE, A.; MARTIN, E.D. Confocal microscopy for astrocyte in vivo imaging: recycle and reuse in microscopy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7, article 51.

PERRONE, S.; NEGRO, S.; TATARANNO, M.L.; BUONOCORE, G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J. Matern. Fetal Neonatal Med* (2010). 23(Suppl 3), 63–65.

PFRIEGER, F.W. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes*. 2003;1610(2):271–280.

PFRIEGER, F.W. Role of glia in synapse development. *Current Opinion in Neurobiology*. 2002;12(5):486–490.

PINES, G.; DANBOLT, N.C.; BJØRÅS, M.; ZHANG, Y.; BENDAHAN, A.; EIDE, L.; KOEPESELL, H.; STORM-MATHISEN, J.; SEEBERG, E.; KANNER, B.I. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, v. 360, p. 464–467, 1992.

PINTO, C.R.A. Avaliação da distribuição de receptores NMDA-2B e da astrogliã no hipocampo de ratos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia pré-natal. 74 f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

POITRY-YAMATE, C.L.; POITRY, S.; TSACOPOULOS, M. Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci*. 1995 Jul;15(7 Pt 2):5179-91.

- POW, D.V.; BARNETT, N.L. Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Müller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res.* 1999 Jul;297(1):57-66.
- POW, D.V.; ROBINSON, S.R. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience.* 1994 May;60(2):355-66.
- 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 Jun;3(6):559-569.
- PROCIANOY, R. S.; SILVEIRA, R. C. Hypoxic-ischemic syndrome. *J Pediatr (Rio J)*, 2001.
- PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem.*, v. 279, n. 11, p. 9673-9676, 2004.
- PUKA-SUNDEVALL, M.; GAJKOWSKA, B.; CHOLEWINSKI, M.; BLOMGREN, K.; LAZAREWICZ, J.W.; HAGBERG, H. Subcellular distribution of calcium and ultrastructural changes after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000 Dec 29;125(1-2):31-41.
- 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.
- RANJBAR, T.F.; GASTERICH, N.; SCHELD, M.; WEISKIRCHEN, R.; BEYER, C.; CLARNER, T.; ZENDEDEL, A. Hypoxia Induces Astrocyte-Derived Lipocalin-2 in Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci.* 2019 Mar; 20(6): 1271.
- RAMÍREZ, A.I.; SALAZAR, J.J.; DE HOZ, R.; ROJAS, B.; GALLEGO, B.I.; SALINAS-NAVARRO, M.; ALARCÓN-MARTÍNEZ, L.; ORTÍN-MARTÍNEZ, A.; AVILÉS-TRIGUEROS, M.; VIDAL-SANZ, M.; TRIVIÑO, A.; RAMÍREZ, J.M. Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2010;51(11):5690–5696.
- RAMIREZ, J.M.; TRIVIÑO, A.; RAMIREZ, A.I.; SALAZAR, J.J.; GARCIA-SANCHEZ, J. Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vision Research.* 1994;34(15):1935–1946.
- RAMIREZ, J.M.; TRIVIÑO, A.; RAMIREZ, A.I.; SALAZAR, J.J.; GARCIA-SANCHEZ, J. Structural specializations of human retinal glial cells. *Vision Research.* 1996;36(14):2029–2036.
- 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 Nov;73(5):601-15.

RATHNASAMY, G.; FOULDS, W.S.; LING, E.A.; KAUR, C. Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Prog Neurobiol.* 2019 Feb;173:18-40. Epub 2018 Jun 1.

RAUEN T. (2000). Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19, 53–62. [10.1007/s007260070033](https://doi.org/10.1007/s007260070033).

RAUEN, T.; WIESSNER, M. (2000). Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem. Int.* 37, 179–189. [10.1016/S0197-0186\(00\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(00)00021-8)

RAUEN, T.; ROWLAND TAYLOR, W.; KUHLBRODT, K. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell and Tissue Research Res.* v. 219 , p. 19-31. Dec, 1997.

REICHELT, W.; STABEL-BUROW, J.; PANNICKE, T.; WEICHERT, H.; HEINEMANN, U. The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience.* 1997;77:1213–1224.

REICHENBACH, A.; BRINGMANN, A. New functions of Müller cells. *Glia.* 2013;61:651–678.

REY-FUNES, M., DORFMAN, V.B.; IBARRA, M.E.; PEÑA, E.; CONTARTESE, D.S.; GOLDSTEIN, J.; ACOSTA, J.M.; LARRÁYOZ, I.M.; MARTÍNEZ-MURILLO, R.; MARTÍNEZ, A.; LOIDL, C.F. Hypothermia prevents gliosis and angiogenesis development in an experimental model of ischemic proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Apr 23;54(4):2836-46.

RICE, J. E. 3RD; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology* 9, 131–141(1981).

RIVERA, J. C.; SAPIEHA, P.; JOYAL, J. S.; DUHAMEL, F.; SHAO, Z.; SITARAS, N.; RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.*, 2009.

RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):429-39. Review.

ROBINSON, M.B.; COYLE, J.T. Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J.* 1987 Dec;1(6):446-55. Review.

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.

ROESCH, K.; JADHAV, A.P.; TRIMARCHI, J.M.; STADLER, M.B.; ROSKA, B.; SUN, B.B.; CEPKO, C.L. The transcriptome of retinal Müller glial cells. An analysis of the

mouse Müller glia transcriptome at the single cell level suggests some similarity with retinal progenitors and that there may be heterogeneity among Müller glia. *J Comp Neurol.* 2008;509:225–238.

ROLAND, E.H; JAN, J.E; HILL, A; WONG, P.K. Cortical visual impairment following birth asphyxia. *Pediatr Neurol.*, 1986.

ROSSI, D.J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 2000 Jan 20;403(6767):316-21.

ROTHMAN, S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1984;4:1884–1891.

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

RUNGGER-BRÄNDLE, E.; DOSSO, A.A.; LEUENBERGER, P.M. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Jun;41(7):1971-80.

RUTHERFORD, M.; RAMENGI, L.A.; EDWARDS, A.D.; BROCKLEHURST, P.; HALLIDAY, H.; LEVENE, M.; STROHM, B.; THORESEN, M.; WHITELAW, A.; AZZOPARDI, D. (2010) Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*9, 39–45.

SANCHES, E.F.; ARTENI, N.; NICOLA, F.; ARISTIMUNHA, D.; NETTO, C.A. (2015). Sexual dimorphism and brain lateralization impact behavioral and histological outcomes following hypoxia-ischemia in P3 and P7 rats. *Neuroscience* 290 581–593. 10.1016/j.neuroscience.2014.12.074

SANCHES, E.F.; ARTENI, N.S.; SCHERER, E.B.; KOLLING, J.; NICOLA, F.; WILLBORN, S.; WYSE, A.T.; NETTO, C.A. (2013). Are the consequences of neonatal hypoxia-ischemia dependent on animals' sex and brain lateralization? *Brain Res.* 1507 105–114.

SARTHY, V.P.; PIGNATARO, L.; PANNICKE, T.; WEICK, M.; REICHENBACH, A.; HARADA, T.; TANAKA, K.; MARC, R. (2005). Glutamate transport by retinal Müller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice. *Glia* 49, 184–196. 10.1002/glia.20097.

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, M; SAVKOVIC-CVIJIC, H.; EICHLER, W.; UNTERLAUFT, J.D. [Protective Effects of Müller Glia Cells Towards Retinal Ganglion Cells]. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2018 Jan;235(1):58-63. Epub 2017 May 16

SEITZ, R.; OHLMANN, A.; TAMM, E.R. The role of Müller glia and microglia in glaucoma. *Cell and Tissue Research.* 2013;353(2):339–345.

SEITZ, R.; TAMM, E.R. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated excitotoxic damage: a mouse model of acute retinal ganglion cell damage. *Methods Mol Biol.* 2013;935:99-109.

SHELDON, R. A.; SEDIK, C.; FERRIERO, D. M. Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain research* 810, 114–122 (1998).

SHEN, H.; HU, X.; LIU, C.; WANG, S.; ZHANG, W.; GAO, H.; STETLER, R.A.; GAO, Y.; CHEN J. Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neurobiol Dis.* 2010 Mar; 37(3): 711–722.

SHEN, W.; LI, S.; CHUNG, S.H.; GILLIES, M.C. Retinal vascular changes after glial disruption in rats. *J Neurosci Res.* 2010 May 15;88(7):1485-99.

SHIAN, W.J.; CHI, C.S.; CHEN, J.W.; HSIEH, K.S. Hypoxic-ischemic effect on infants and children with cyanotic congenital heart disease: clinical assessment of neurological examination and brain magnetic resonance images. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 1994 Mar;53(3):154-7.

SHOVAL, G.; WEIZMAN, A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:319–329 (2005).

SILVERMAN, S.M.; WONG, W.T. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci.* 2018 Sep 15;4:45-77. Epub 2018 May 31.

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

SILVERSTEIN, F.S.; NAIK, B.; SIMPSON, J. Hypoxia-ischemia stimulates hippocampal glutamate efflux in perinatal rat brain: An in vivo microdialysis study. *Pediatr Res.*, v.30, p. 587–590, 1991.

SINGHAL, S.; BHATIA, B.; JAYARAM, H.; BECKER, S.; JONES, M.F.; COTTRILL, P.B.; KHAW, P.T.; SALT, T.E.; LIMB, G.A. Human Muller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1:188–199.

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 Pathol*, 2011.

SIZONENKO, S.V.; CAMM, E.J.; DAYER, A.; KISS, J.Z. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 26 (1) (2008), pp. 37-45.

SIZONENKO, S.V.; SIRIMANNE, E.; MAYALL, Y.; GLUCKMAN, P.D.; INDER, T.; WILLIAMS, C. Selective cortical alteration after hypoxic-ischemic injury in the very immature rat brain. *Pediatr Res.* 2003 Aug;54(2):263-9. Epub 2003 May 7.

SOFRONIEW, M.V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2015;16:249–263.

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.

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

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.

SZATKOWSKI, M.; BARBOUR, B.; ATTWELL, D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* 348, 443–446. doi:10.1038/348443a0.

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

TANG, Z.; GAN, Y.; LIU, Q.; YIN, J.X.; LIU, Q.; SHI, J.; SHI, F.D. CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *J. Neuroinflamm.*, 11 (2014), p. 26

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

TEO, J.D.; MORRIS, M.J.; JONES, N.M.. Hypoxic postconditioning reduces microglial activation, astrocyte and caspase activity, and inflammatory markers after hypoxia–ischemia in the neonatal rat brain. *Pediatric Research* volume 77, pages 757–764 (2015).

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.

THORNTON, C.; BABURAMANI, A.A.; KICHEV, A.; HAGBERG, H. Oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress in the development of neonatal hypoxic–ischaemic brain injury. *Biochem Soc Trans.* 2017 Oct 15; 45(5): 1067–1076.

TORNER, I.; KVAMME, E. Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol.* 1990 Jan;12(1):11-7. Review.

TORRES-CUEVAS, A.; PARRA-LLORCA, A.; SÁNCHEZ-ILLANA, A.; NUÑEZ-RAMIRO, J.; KULIGOWSKI, C. CHÁFER-PERICÁS, M.; CERNADA, J.; ESCOBAR, M.V. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol.*, 12 (2017), pp. 674-681, 10.1016/j.redox.2017.03.011

TOUT, S.; CHAN-LING, T.; HOLLÄNDER, H.; STONE, J. The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* 1993;55(1):291–301.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of Neuroscience.* 1996;16(3):877–885.

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 DE LOOIJ, Y.; CHATAGNER, A.; HÜPPI, P.S.; GRUETTER, R.; SIZONENKO, S.V. (2011). Longitudinal MR assessment of hypoxic ischemic injury in the immature rat brain. *Magn. Reson. Med.* 65 305–312.

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.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 835, 234–249 (1997).

VANNUCCI, S. J.; SEAMAN, L. B.; VANNUCCI, R. C. Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996 Jan;16(1):77-81.

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

VERKHRATSKY, A.; PARPURA, V.; PEKNA, M.; PEKNY, M.; SOFRONIEW, M. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions.* 2014;42(5):1291–1301.

- VOLPE, J. Cerebral white matter injury of the premature infant—More common than you think. *Pediatrics*, v. 112, n. 1, p.176– 180, 2003.
- VOLPE, J. J. Neonatal encephalopathy: an inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Ann Neurol.*, 2012.
- WALCOTT, J.C.; PROVIS, J.M. Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clin Exp Ophthalmol*. 2003 Jun;31(3):246-9.
- WANG, D.; HUANG, Y.; LI, Q.; XU, S.; LIU, X. Anti-apoptotic effect of ginsenoside Rg1 on neuron after neonatal hypoxia ischemia brain damage. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2010 Sep;24(9):1107-12. Chinese.
- WANG, L.; PENG, L. Expressions of nestin and glial fibrillary acidic protein in rat retina after optic nerve transection. *Int J Ophthalmol*. 2017; 10(10): 1510–1515.
- WANG, X.; TAY, S.S.; NG, Y.K. An immunohistochemical study of neuronal and glial cell reactions in retinæ of rats with experimental glaucoma. *Exp Brain Res*. 2000 Jun;132(4):476-84.
- WANG, Y.J.; PAN, K.L.; ZHAO, X.L.; QIANG, H.; CHENG, S.Q. Therapeutic effects of erythropoietin on hypoxic-ischemic encephalopathy in neonates. *Zhongguo dang dai er ke za zhi (Chin. J. Contemp. Pediatr.)*, 13 (11) (2011), pp. 855-858
- WARD M. M., JOBLING A. I., KALLONIATIS M., FLETCHER E. L. (2005). Glutamate uptake in retinal glial cells during diabetes. *Diabetologia* 48, 351–360.10.1007/s00125-004-1639-
- WARD, M.M.; JOBLING, A.I.; PUTHUSSERY, T.; FOSTER, L.E.; FLETCHER, E.L. Localization and expression of the glutamate transporter, excitatory amino acid transporter 4, within astrocytes of the rat retina. *Cell Tissue Res*. 2004 Mar;315(3):305-10. Epub 2004 Jan 16.
- WASSLE, H. Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Review Neuroscience*, 2004.
- WATANABE, T.; RAFF, M. C. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature*, 1988.
- WHITE R. D., NEAL M. J. (1976). The uptake of l-glutamate by the retina. *Brain Res*. 111, 79–93.10.1016/0006-8993(76)91050-7
- WILSON, J.X. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 1997;75(10-11):1149–1163.
- WINKLER, B.S.; ARNOLD, M.J.; BRASSELL, M.A.; PURO, D.G. Energy metabolism in human retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Sep;41(10):3183-90.

WOHL, S.G.; SCHMEER, C.W.; ISENMANN, S. Neurogenic potential of stem/progenitor-like cells in the adult mammalian eye. *Prog Retin Eye Res.* 2012 May;31(3):213-42. Epub 2012 Feb 13. Review.

WOOD TR; STUBBS BJ; JUUL SE. Exogenous Ketone Bodies as Promising Neuroprotective Agents for Developmental Brain Injury. *Dev Neurosci* 2018;40:451–462

YANAGISAWA, M.; AIDA, T.; TAKEDA, T; NAMEKATA, K.; HARADA, T.; SHINAGAWA, R; TANAKA, K. Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis.* 2015 Mar; 6(3): e1693.

YANG, X.J. Roles of cell-extrinsic growth factors in vertebrate eye pattern formation and retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol.*, 2004.

YANG, Z.J.; ZHONG; Y.S. Effect of adenosine on GLAST expression in the retina of a chronic ocular hypertension rat model. *Exp Ther Med.* 2015 Sep;10(3):991-994. Epub 2015 Jul 1.

YOUNG, R. W.; BOK, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol.*, 1969.

ZAITOUN, I.S.; CIKLA, U.; ZAFER, D.; UDHO, E.; ALMOMANI, R.; SUSCHA, A.; CENGIZ, P; SORENSON, CM.; SHEIBANI, N. Attenuation of Retinal Vascular Development in Neonatal Mice Subjected to Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Scientific Reports.v.8, Article number: 9166 (2018).*

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. *JPerinatol.* 2008 Mar;28(3):171-5. Epub 2007 Dec 6.

ZENG, X.X.; NG, Y.K.; LING, E.A. Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci.* 2000 May-Jun;17(3):463-71.

ZHANG, Q.; DING, Y.; YAO, Y.; YU, Y.; YANG, L.; CUI, H. Creating rat model for hypoxic brain damage in neonates by oxygen deprivation. *PLoS One.* 2013 Dec 17;8(12):e83589.

ZHU, C.; WANG, X.; HUANG, Z.; QIU, L.; XU, F.; VAHSEN, N. et al. (2007) Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 14, 775–784.

ZIEMKA-NALECZ, M.; JAWORSKA. J.; ZALEWSKA. T. Insights Into the Neuroinflammatory Responses After Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017 Aug 1;76(8):644-654.