



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e
Experimental

**Efeitos de lesão por hipóxia-isquemia pré-natal
sobre o desenvolvimento do sistema motor: córtex e
cerebelo**

Tiago Savignon Cardoso Machado

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tiago Savignon Cardoso Machado

**Efeitos de lesão por hipóxia-isquemia pré-natal
sobre o desenvolvimento do sistema motor: córtex e
cerebelo**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia Clínica e
Experimental da Universidade do Estado do Rio
de Janeiro para a obtenção do grau de Mestre**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/UERJ), sob a orientação da Dra. Penha Cristina Barradas Daltro-Santos e colaboração do Prof^o Alex C. Manhães, do Prof^o Frank Tenório, da doutoranda Márcia Dias Ferraz e do aluno Everton Costa.

**Rio de Janeiro
2008**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Flávia Alcântara Gomes
(IBCCF-UFRJ)

Grau

Prof^a. Dra. Daniela Uziel Rozental
(IBCCF-UFRJ)

Grau

Prof^a. Dra. Yael Abreu-Villaça
(IBRAG-UERJ)

Grau

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

M149 Machado, Tiago Savignon Cardoso.

Efeitos de lesão por hipóxia-isquemia pré-natal sobre o desenvolvimento do sistema motor: córtex e cerebelo / Tiago Savignon Cardoso Machado. - 2008.
xi, 75 f. il.

ORIENTADOR: PENHA CRISTINA BARRADAS DALTRO-SANTOS.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
Bibliografia: f. 63-75

1. Neurofisiologia – Teses. 2. Oligodendroglia – Teses. 3. Hipóxia-isquemia. 4. Sistema nervoso. I. Daltro-Santos, Penha Cristina Barradas. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

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

Assinatura

Data

Agradecimentos

Acima de tudo a Deus, por minha vida. A Ele dou meu louvor e minha adoração.

À minha família, pelo apoio e entusiasmo. Ao orgulho de meus pais pela minha vida. Alegra-me muito. Vocês são importantes demais em minha vida.

Ao meu irmão, que sempre perguntou pelo meu trabalho, me incentivou, aí vai meu muito obrigado. Valeu Betinho!

À minha esposa por sempre me ajudar, por cuidar de mim, por permitir e facilitar meus estudos. Pela dedicação, pelo companheirismo, e por ser minha marida amada.

À professora Penha, pela orientação, pelas dicas, pela maneira de escrever. Pelas conversas que muito ajudaram em minha formação como pesquisador. Uma grande amiga. Muito obrigado!

Agradeço ao professor Frank por toda ajuda, pelos cafés, pela orientação nas técnicas, sem a qual este trabalho não teria sido possível. Também pelas broncas, que fazem parte...

Agradeço ao professor Alex pela orientação, pela ajuda na elaboração do projeto. Pelas muitas risadas quando se refugiava no nosso lab.

À professora Olga, pela revisão da dissertação. Também pelas guloseimas das festas.

Andréa fofinha, pelo eterno bom humor, até mesmo pelas mensagens bonitinhas que manda pelo email.

À Márcia, por ganhar milhas na maionese, e também por me ajudar nas cirurgias, nas perfusões. Minha companheira de projeto. Obrigado por toda ajuda.

Vivi, minha irmã no lab, obrigado por todas as conversas, pela orientação desde a iniciação científica. Que Deus continue te abençoando!

Ao Serginho, meu companheiro de IC, estamos juntos até hoje... Valeu por toda ajuda.

Ao Everton, que fez muitas "imunós" e pescou grande parte dos cortes para esta dissertação.

Ao Jorge, por me incentivar sempre a chegar a diretor do instituto...

A todos do lab que ajudaram de alguma forma, meu muito obrigado. Gabi, Luis Otávio, Michael, Bruninha, Fábio, Ive. Ao professor Marcos, desde a graduação, e agora juntos no lab.

A todos que eu não tenha citado, mas ajudaram na finalização desta dissertação, meu muito obrigado, e que Deus continue abençoando a vida de vocês!!!

Resumo

Crianças que sofrem insultos hipóxico-isquêmicos perinatais têm hipomielinização, astrogliose e desenvolvimento cortical alterado. Robinson e cols., usando um modelo de hipóxia-isquemia (HI) por obstrução das artérias uterinas na rata grávida, mostraram astrogliose, morte de oligodendrócitos e ruptura axonal na prole. Neste trabalho avaliamos a expressão de 2'3' nucleotídeo 3'fosfodiesterase (CNPase) no córtex e cerebelo e a distribuição da NADPH-diaforase (NADPH-d) no cerebelo de ratos submetidos a este modelo de HI. Ratas no 18º dia de gestação foram anestesiadas, os cornos uterinos expostos e as 4 artérias uterinas obstruídas por 45 minutos (Grupo HI). Animais controle tiveram os úteros expostos sem sofrer a obstrução (Grupo Sham). Após a cirurgia a gestação prosseguiu. Somente animais nascidos a termo foram utilizados. Um terceiro grupo de animais não foi operado (Grupo NM). Após anestesia e perfusão-fixação com paraformaldeído 4% aos 9, 23 e 90 dias pós-natais, cortes coronais do prosencéfalo e parassagitais do cerebelo foram obtidos em criótomo e submetidos à imunohistoquímica para CNPase. Adicionalmente, cortes parassagitais do cerebelo obtidos em criótomo foram submetidos à histoquímica para NADPH-d. Observamos uma diminuição da imunorreatividade à CNPase no cingulum dos animais HI comparados aos animais NM e Sham em todas as idades. Em P9, nos animais HI, há menor número de células CNPase+ no cingulum e córtex motor. Aos 23 dias, há um menor número de células e fibras CNPase+ no córtex motor e mais corpos celulares no cingulum dos animais HI. Aos 90 dias, os animais HI apresentaram menos fibras no córtex motor que os animais controle. No cerebelo, observamos corpos celulares e fibras CNPase+ em regiões mais distais na folha 1 nos animais NM e Sham que nos animais HI aos 9 dias. A imunorreatividade à CNPase estava alterada na substância branca e nas fibras na substância cinzenta nos animais HI tanto aos 23 quanto aos 90 dias. A substância branca nos animais HI apresentaram maior número de células marcadas para NADPH-d que os animais controle aos 9 e 23 dias, sendo que em P23 a marcação se encontrava tanto no corpo celular quanto nos prolongamentos. As células de Purkinje na folha 1 apresentaram marcação para NADPH-d+, tanto no corpo celular quanto na árvore dendrítica, nos animais NM e Sham, enquanto nos animais HI somente a árvore dendrítica apresentava marcação. Animais do grupo HI aos 23 dias apresentaram células NADPH-d+ na camada molecular das folhas 1, 6 e 10, sendo que animais dos grupos controle não apresentaram células NADPH-d+ nesta região. Este padrão de marcação se manteve nos animais adultos (P90). Nossos resultados mostram alterações na oligodendroglia que podem ser causadas por um menor número de células progenitoras, problemas na migração aos destinos finais e/ou atraso na diferenciação. Mostramos também que a HI perinatal altera a distribuição das células NADPH-d+ durante o desenvolvimento do cerebelo, com algumas destas alterações mantidas na vida adulta, indicando um dano permanente nesta estrutura. Estas alterações poderão resultar em distúrbios motores nos ratos adultos jovens que sofrerem HI perinatal, constituindo então um modelo interessante para desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Abstract

Infant human brains show hypomyelination, astrogliosis and impairments in cortical development after perinatal hypoxic-ischemic insults. Robinson and colleagues, using a model of hypoxia-ischemia (HI) in which they clamped the uterine arteries of pregnant rats, showed astrogliosis, oligodendroglial death and axonal rupture in the offspring. In this work we evaluated the expression of 2'3' cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase (CNPase) in motor cortex and cerebellum and the NADPH-diaphorase (NADPH-d) distribution in the cerebellum of rats submitted to this HI model. Rats in the 18th gestation day were anesthetized, the uterine horns were exposed and the four uterine arteries were clamped for 45 minutes. Sham controls had the uterine horns exposed, but no arteries were clamped. Gestation proceeded after surgery. Only full term animals were used. A third group of animals were not submitted to the surgical procedure (NM). Animals were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde at 9, 23 and 90 days. Coronal prosencephalus and parasagittal cerebellum sections were submitted to CNPase immunohistochemistry. Additionally, parasagittal cerebellum sections were submitted to NADPH-d histochemistry. We observed a decrease in CNPase immunoreactivity in the cingulum of HI animals at all ages compared with NM and Sham animals. At P9 a lower number of CNPase+ cells in the cingulum and motor cortex of HI animals was observed. At P23 we observed a lower number of CNPase+ cells and fibers in the motor cortex and a greater number of cells in the cingulum of HI animals. A lower number of CNPase+ fibers were observed in the HI animals in the motor cortex at P90. In the cerebellum, at P9, CNPase+ fibers and cells were observed in more distal positions in the folium 1 of Sham and NM than in HI animals. The immunoreactivity to CNPase was altered in the white matter and in the fibers in the gray matter of HI animals at P23 and P90. The cerebellar white matter of HI animals showed a greater number of NADPH-d+ cells than that of control groups at both P9 and P23. At P23 the labeling was observed in the body as well as in the processes. Purkinje cells of Sham animals showed NADPH-d+ labeling in the body and dendritic arborization at folium 1, meanwhile animals of HI group did not show this labeling in the body, but the dendritic arborization had a widespread strong labeling. HI animals at P23 showed NADPH-d+ cells in the molecular layer of cerebellum folia 1, 6 and 10. Sham or NM animals did not show NADPH-d+ cell in this region. This pattern was maintained up to P90. Our results showed impairments in oligodendroglial cells that may have been caused by reductions in the number of progenitors, alterations in migration patterns and/or delays in differentiation. We also showed that perinatal HI altered the distribution of NADPH-d+ cells during cerebellar development and that some alterations persist into adulthood, which suggests a permanent impairment. These alterations could lead to motor deficits in young adult HI rats, which, if present, could be used in devising new therapeutic strategies.

Lista de abreviaturas

A2B5 – anticorpo que identifica gangliosídeos de superfície em oligodendrócitos imaturos
Aq – aqueduto cerebral
ATV – área tegmental ventral
bFGF – fator básico de crescimento de fibroblasto, do inglês *basic fibroblast growth factor*
B2 – receptor do tipo 2 da bradicinina
BH4 – tetrahidrobiopterina
BMP – proteína morfogenética do osso
CNPase - 2',3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase
cg – cingulum
CG – camada granular
CGI – camada germinativa interna
cgi – camada granular interna
CGE – camada germinativa externa
cge – camada granular externa
CM – camada molecular
CP – camada de células de Purkinje
DAB – diaminobenzeditetrahidrocloro
DMSO - dimetil-sulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
E14 – décimo quarto dia embrionário
E16 – décimo sexto dia embrionário
E18 – décimo oitavo dia embrionário
E22 – vigésimo segundo dia embrionário
EDRF – fator de relaxamento derivado do endotélio, do inglês *endothelium derived relaxing factor*
eNOS – isoforma do tipo III ou endotelial da óxido nítrico sintase
FAD – dinucleotídeo adenina-flavina
FMN – o mononucleotídeo flavina
g – grama
GalC – galactocerebrosídeo
GC – guanilato ciclase
GD3 – gangliosídeo GD3
GFAP – proteína ácida fibrilar glial, do inglês *glial fibrillary acid protein*
GMPc – guanosina monofosfato cíclico
GQ1 – gangliosídeo GQ1
GTP – guanosina trifosfato
H1 – receptor histamínico do tipo 1
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HI – hipóxia-isquemia
IC - colículo inferior
iNOS – isoforma do tipo II ou induzida da óxido nítrico sintase
LTP – potenciação de longo prazo, do inglês *long term potentiation*

M – molar
mL – mililitro
mg – miligrama
MBP – proteína básica de mielina, do inglês *myelin basic protein*
M3 – receptor de acetilcolina
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT – azul de tetrazol, do inglês *nitrobluetetrazolium*
NG2 – proteoglicanos sulfatados de ratos
NGS – soro normal de cabra, do inglês *normal goat serum*
NM – não manipulado
NMDA – N-metil D-aspartato
NOS – óxido nítrico sintase, do inglês *nitric oxide synthase*
nNOS – isoforma do tipo I ou neuronal da óxido nítrico sintase
OCT – optimal cutting temperature (meio de inclusão)
ON – óxido nítrico
O₂ – oxigênio molecular
P10 – dez dias pós-natal
P30 – trinta dias pós-natal
P45 – quarenta e cinco dias pós-natal
P90 – noventa dias pós-natal
PBS – salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate buffer saline*
PDGF α R – receptor alfa do fator de crescimento derivados de plaquetas, do inglês *plateled derived growth factor alpha receptor*
PLP – proteína proteolípídica
PSA-NCAM – a forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro
SARRN – síndrome da angústia respiratória do recém-nascido
SB – substância branca
SHAM – controle cirúrgico
SN – substância negra
SNC – sistema nervoso central
TH – tirosina hidroxilase
VSM – véu supra-medular
ZSV – zona sub-ventricular
 μ m – micrômetro
4V – quarto ventrículo

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Linha de tempo mostrando os períodos do desenvolvimento neural, comparando ratos e humanos..... | 7 |
| FIGURA 2 – Esquema da estrutura do córtex cerebelar..... | 11 |
| FIGURA 3 – Esquema representativo do desenvolvimento do cerebelo, mostrando as zonas germinativas e a direção da migração dos progenitores neuronais..... | 14 |
| FIGURA 4 – Representação esquemática do desenvolvimento do cerebelo e o padrão de migração dos progenitores de oligodendrócitos..... | 16 |
| FIGURA 5 – Representação esquemática da formação do óxido nítrico, e os co-fatores necessários à sua síntese..... | 19 |
| FIGURA 6 – Fotografia de uma rata grávida com as 4 artérias uterinas obstruídas por pinças hemostáticas..... | 23 |
| FIGURA 7 – Imunomarcção para CNPase no córtex motor..... | 30 |
| FIGURA 8 – Imunomarcção para CNPase na folha 1 de animais P9..... | 32 |
| FIGURA 9 – Imunomarcção para CNPase na folha 1 de animais P23..... | 34 |
| FIGURA 10 – Imunomarcção para CNPase na folha 1 de animais P90..... | 36 |
| FIGURA 11 – Imunomarcção para CNPase na folha 6 de animais P23..... | 38 |
| FIGURA 12 – Imunomarcção para CNPase na folha 6 de animais P90..... | 40 |
| FIGURA 13 – Histoquímica da NADPH-d em animais P9..... | 42 |
| FIGURA 14 – Histoquímica da NADPH-d na folha 1 de animais P23..... | 44 |
| FIGURA 15 – Histoquímica da NADPH-d na folha 10 de animais P23..... | 45 |
| FIGURA 16 – Histoquímica da NADPH-d na folha 1 de animais P90..... | 47 |
| FIGURA 17 – Histoquímica da NADPH-d na folha 10 de animais P90..... | 48 |
| FIGURA 18 – Histoquímica da NADPH-d na substância branca de animais P9.... | 50 |
| FIGURA 19 – Histoquímica da NADPH-d na substância branca de animais P23.. | 52 |

Índice

1.Introdução

| | |
|---|----|
| 1.1 - Considerações iniciais..... | 1 |
| 1.2 - Modelos de hipóxia-isquemia..... | 3 |
| 1.3 - Desenvolvimento do Sistema nervoso central..... | 5 |
| 1.4 - Oligodendrócitos..... | 8 |
| 1.5 - Cerebelo..... | 10 |
| 1.6 - Óxido nítrico..... | 17 |

| | |
|--------------------------|----|
| 2.Objetivos | 21 |
|--------------------------|----|

3.Material e métodos

| | |
|---|----|
| 3.1 - Realização da Hipóxia – Isquemia..... | 22 |
| 3.2 - Processamento histológico..... | 24 |
| 3.3 - Imunohistoquímica..... | 25 |
| 3.4 - Procedimento histoquímico..... | 26 |
| 3.5.Análise das lâminas e aquisição de imagens..... | 27 |

4.Resultados

| | |
|--|----|
| 4.1.a – Identificação da CNPase no córtex motor..... | 28 |
| 4.1.b – Identificação da CNPase no cerebelo..... | 31 |
| 4.2 – Histoquímica da NADPH-diaforase | 41 |

| | |
|--------------------------|----|
| 5.Discussão | 53 |
|--------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| 6.Conclusões | 61 |
|---------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 7.Referências bibliográficas | 63 |
|---|----|

1.INTRODUÇÃO

1.1.Considerações iniciais

Insultos sistêmicos peri e pré-natais alteram o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), ocasionando diferentes danos ao indivíduo, sendo que estes são relacionados com o tipo de insulto, o período do desenvolvimento em que ocorrem, a intensidade e a área afetada. Apesar dos avanços na medicina neonatal, permanece estável a proporção de crianças com déficits neurológicos após sofrerem insultos perinatais (Nelson et al., 2003). A interrupção momentânea ou permanente do fluxo sangüíneo e aporte nutricional caracteriza uma dessas lesões, a hipóxia-isquemia (HI). Eventos de HI podem levar a atraso cognitivo e problemas no desenvolvimento motor, hiperatividade, dificuldade de concentração (du Plessis & Johnston, 1997; Filloux et al, 1996), e em casos mais graves a epilepsia e paralisia cerebral em crianças (Nelson et al., 2003).

A paralisia cerebral é uma desordem debilitante, não progressiva, afetando principalmente o sistema motor e sendo fortemente relacionada com injúrias cerebrais perinatais (Kuban & Leviton, 1994; Volpe, 2001, 2003). A prematuridade e corioamniotite também têm sido associadas com a paralisia cerebral como um fator de risco (Perlman et al., 1996; Spinillo et al., 1998; Terzidou & Bennett, 2001; Verma et al., 1997; Wu & Colford, 2000). Problemas no aprendizado são considerados mais comuns em crianças prematuras, onde há um risco de 3 a 5 vezes maior de estas serem afetadas na leitura, fala, matemática ou escrita (Aylward, 2002)

A HI é a segunda principal causa de mortalidade e doenças neurológicas crônicas em neonatos, perdendo apenas para a síndrome da angústia respiratória do recém-nascido (SARRN – anteriormente chamada de doença da membrana hialina). A asfixia sistêmica pré-natal pode ocorrer tanto por um processo mecânico, insuficiência placentária, trabalho de parto prolongado, dobras no cordão umbilical, ou mesmo incapacidade de o neonato começar a respirar (de Haan et al., 2006), assim como outros fatores de risco, entre eles o tabagismo

materno, anemia, hipotensão, nascimentos múltiplos e uso de drogas (Pundik et al., 2006).

As estatísticas indicam que de um a seis recém-nascidos em mil nascimentos passaram por um evento de asfixia sistêmica (Hill, 1991; Pierrat et al., 2005; Thornberg et al., 1995). Em recém-nascidos prematuros (ou baixo peso) a incidência de asfixia é de 60% e, 20 a 50% dos bebês que passaram pelo evento de hipóxia apresentam encefalopatias durante os seus primeiros meses de vida. Dos que sobrevivem, mais de 25% exibem déficits neurofisiológicos permanentes como: retardamento, paralisia cerebral, dificuldade de aprendizado ou epilepsia (Vanucci et al, 1999).

Estudos *post mortem*, em crianças que passaram por eventos de HI, demonstraram a perda de oligodendrócitos, hipomielinização e astrogliose (Marin-Padilla, 1997), além de desenvolvimento cortical perturbado (Marin-Padilla, 1999). A inerente dificuldade de diagnóstico, prevenção e tratamento de eventos de hipóxia-isquemia em humanos levou, e ainda leva, à criação de modelos experimentais na tentativa de elucidar os diferentes eventos que decorrem das injúrias peri e pré-natais. A caracterização de modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo dos efeitos e mecanismos da HI permitiu o desenvolvimento, ao longo das décadas, de várias intervenções farmacológicas na tentativa de amenizar as neuropatologias ocorridas após uma injúria no desenvolvimento, incluindo o uso de glicocorticóides, antagonistas de receptores glutamatérgicos, inibidores de radicais livres, bloqueadores de canais de cálcio, entre outros (Altman et al, 1984; Barks et al., 1991; Hagberg et al., 1994; Gunn et al., 1989; Palmer et al., 1993.)

A terapêutica futura, assim como as estratégias de prevenção, necessita de conhecimentos gerados a partir dos diferentes modelos de HI disponíveis. Portanto, é evidente a importância da compreensão dos eventos que levam à HI e os que decorrem de lesões por esse tipo de insulto no desenvolvimento do SNC, assim como as diversas estruturas que podem ser afetadas e suas conseqüências.

1.2. Modelos de hipóxia isquemia

Em 1960, Levine criou o primeiro modelo de HI, que era baseado na oclusão unilateral das artérias carótidas, momentânea ou permanentemente, no rato adulto. Em 1981, Rice o modificou, realizando a oclusão em ratos com 7 dias de vida. Neste modelo os danos ocorrem no hemisfério ipsilateral, com o hemisfério contralateral servindo como controle do experimento. Os danos observados ocorrem no córtex cerebral, substância branca periventricular, estriado e hipocampo (Rice et al., 1981). Diversos pesquisadores passaram a utilizar este modelo para verificar as conseqüências das lesões na plasticidade cerebral durante o desenvolvimento (Silverstein & Johnston, 1984; Romijin et al., 1992), da neurotoxicidade glutamatérgica (Silverstein et al., 1991; Gordon et al., 1991), da neurotoxicidade do óxido nítrico (Ferriero et al., 1988; Ferriero et al., 1995) e nos sistemas de neurotransmissores durante o evento de HI (Burke et al., 1991; Romijin et al., 1992). Apesar dos inúmeros achados observados neste modelo a partir de então, uma crítica que pode ser feita é o fato de ele não mimetizar uma lesão sistêmica, o que é, freqüentemente, o que ocorre em humanos.

Algumas variações foram feitas nesse modelo, associando a ligação unilateral das carótidas com um período variável numa câmara hipobárica, ou mesmo a ligação bilateral das artérias carótidas. Foram observados aumento de apoptose no hipocampo, giro denteado, tálamo laterodorsal, assim como áreas corticais e núcleos da base (Nakajima et al, 2000) e infarto do córtex frontotemporal (Mark et al, 2004). Em 2003, Arteni e colaboradores, utilizando o modelo de ligação unilateral das artérias carótidas, esquerda ou direita, encontrou danos comportamentais em ratos machos adultos: déficit em memória e aprendizado utilizando o teste de Morris water maze (labirinto aquático de oito braços), e déficits cognitivos relacionados ao hemisfério lesionado.

Em outro modelo de HI pré-natal criado por Bjelke e colaboradores (1991), os cornos uterinos da fêmea são retirados e imersos em água a 37° C por 15 a 21 minutos, no vigésimo segundo dia de gestação (E22). Depois da asfixia os filhotes são retirados do útero e ressuscitados. O filhote controle é retirado do útero por

cesareana antes do procedimento de asfixia. Através desse modelo foi verificado um aumento no número de corpos celulares imunorreativos para a tirosina hidroxilase (TH) na zona compacta da substância negra (SN). O aumento do número de neurônios dopaminérgicos marcados foi associado ao aumento da expressão do gene do fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF) tanto na SN quanto na área tegmental ventral (ATV) (Andersson et al., 1995). Ratos adolescentes (P30-P45) que passaram por este modelo de hipóxia não apresentaram alterações em teste de comportamento de busca e discriminação de objetos novos (novelty seeking behaviour), enquanto animais adultos apresentaram diminuição de atividade locomotora e menor comportamento estereotipado (Venerosi et al., 2004). Em outro estudo foram observadas alterações comportamentais tanto nos animais que sofreram apenas a cesareana quanto em animais que passaram por hipóxia (Venerosi et al., 2006).

Tan, em 1998, descreveu um modelo de hipóxia onde um balão de ar era inflado dentro das artérias uterinas de coelhas grávidas no vigésimo nono dia de gestação (coelhos nascem a termo com aproximadamente 32 dias). Nesse modelo foi detectada imediatamente bradicardia nos fetos e diminuição da microcirculação no córtex cerebral. Também foi observada a formação de nitrotirosina, um marcador da produção de espécies reativas derivadas de óxido nítrico (ON) como peroxinitrito. Houve um aumento significativo de óxidos de nitrogênio, peroxidação de lipídeos e oxidação de proteínas, com diminuição concomitante da capacidade antioxidante. Nesse mesmo modelo, Derrik, em 2004 mostrou hipertonia em coelhos com um dia de vida, numa bateria de testes neurocomportamentais desenvolvidos especificamente para esses animais. Os filhotes do grupo que sofreu a lesão hipóxica apresentavam alterações em testes de locomoção espontânea, atividade motora de reflexo, e coordenação no ato de sugar e engolir.

Com o intuito de criar um modelo capaz de mimetizar os eventos que podem ocorrer em humanos, Robinson estabeleceu em 2005 um modelo de HI pré-natal, onde o fluxo das artérias uterinas da rata grávida é obstruído por 15, 30 ou 45 minutos no décimo oitavo (E18) dia de gestação (nascimento, aproximadamente, em E22). Neste modelo foram observadas astrogliose na

substância branca, morte de oligodendrócitos, e lesão axonal tanto na substância branca como no córtex cerebral, principalmente nos animais submetidos à HI por 45 minutos (Robinson et al., 2005), alterações estas que são similares às observadas em cérebros humanos que passaram por hipóxia perinatal (Marin-Padilla, 1997, 1999). Morfologicamente, 87% dos ratos jovens que foram submetidos à isquemia têm lesão na substância branca detectável em secções coronais. Mas, dentre estes animais, nem todos possuem a mesma severidade de lesão: 27% possuem lesões leves, 33% moderadas e 27% lesões críticas severas. Algumas hipóteses para as lesões celulares ocorridas após HI são a vulnerabilidade das linhagens celulares de oligodendrócitos em desenvolvimento (Kinney & Back, 1998), o aumento do nível de radicais livres (Volpe, 2001 e 2003), o aumento anormal da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Baud et al, 1999; Dammann & Leviton, 1997; Nelson et al, 2003) e da toxicidade excitatória glutamatérgica (Kavanaugh et al., 2000, Itoh et al., 2002; Tekkok & Golberg, 2001).

Embora existam outros modelos de injúria cerebral e de HI que estudam os mecanismos das lesões nos sistemas de neurotransmissores e da plasticidade cerebral no desenvolvimento, esses não mimetizam integralmente insultos sistêmicos ocorridos no final do segundo terço/início do último trimestre de gestação humano (Back et al., 2001), e que provavelmente são uma causa importante de nascimentos prematuros e de baixo peso (Pundik et al., 2006). Este modelo, portanto, pode mimetizar os efeitos estruturais e funcionais de uma lesão ocorrida neste período, e ser utilizado para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações celulares como também na citoarquitetura de diversas estruturas cerebrais importantes, relacionados com o controle motor, com o aprendizado e a memória.

1.3.Desenvolvimento do sistema nervoso central

O sistema nervoso central, formado por neurônios e células gliais, começa seu desenvolvimento ainda no período embrionário, e termina na vida pós-natal,

tanto em roedores quanto em humanos. Durante o desenvolvimento, ocorrem algumas janelas temporais, as quais são cruciais para o pleno desenvolvimento. Qualquer perturbação ocorrida nestes intervalos de tempo pode acarretar alterações celulares, como eventos de migração neurais, morte celular por apoptose ou necrose, entre outros, que poderão comprometer a função neural ao longo da vida.

No início do desenvolvimento do sistema nervoso, ocorre a histogênese neural e migração celular. Estes dois eventos estão entre os primeiros processos a ocorrer no encéfalo de mamíferos e são bem precoces. No córtex de mamíferos, neurônios têm origem na zona ventricular e células gliais têm origem na zona sub-ventricular (ZSV) (Doetsch et al., 1997), a qual é um mosaico de progenitores multipotentes, que dependem de um número grande de fatores tróficos e de outras pistas ambientais, que podem influenciar o destino e a sobrevivência destas células (Jensen & Raff, 1997).

A expressão temporal de genes específicos, como da proteína morfogenética de osso (BMPs), Notch, entre outras, e interações célula-célula, induzindo ou inibindo a diferenciação de células germinais em neurônios ou células gliais é de fundamental importância para que o sistema nervoso tenha o número normal de células neurais. Durante a diferenciação, os neurônios começam a estender seus axônios, e a estabelecer contatos sinápticos com células alvo. Este processo depende de um grande número de moléculas-guia, repulsivas ou atrativas às células em migração e da expressão de genes que codificam proteínas que se localizam em sinapses resultando na formação, acúmulo e tráfego direcional de vesículas transportando complexos protéicos pré e pós-sinápticos. Axônios e dendritos começam a fazer contatos, por vezes transitórios. A definição das sinapses corretas é controlada por um grande número de fatores tróficos liberados no meio, receptores e moléculas sinalizadoras que tornam os neurônios mais receptivos a formar sinapses (para revisão ver Clarissa et al, 2005).

Outra fase corresponde a um período mais tardio do desenvolvimento, onde também ocorrem a proliferação, migração e diferenciação neuronal do cerebelo e

hipocampo (Koibuchi & Chin, 2000; Gould et al,1991). A fase final pode ser considerada o encéfalo maduro, apesar de que isto não significa a não ocorrência de mudanças, mas sim uma aparente estabilidade. Processos como neurogênese no hipocampo, em adultos, assim como a mielinização continuam a ocorrer por um período longo da vida.

Estes períodos do desenvolvimento encefálico ocorrem em diferentes tempos em diferentes espécies, e também em diferentes regiões do sistema nervoso central. A Figura 1 mostra de maneira geral os eventos do desenvolvimento neural e compara em escala temporal o que ocorre em humanos e ratos. O surgimento e desenvolvimento de oligodendrócitos que povoarão o córtex cerebral tem início por volta do 18º dia de gestação em ratos e por volta do início do terceiro trimestre de gestação em humanos. A maturação neuronal e formação cerebelar e hipocampal têm seu início ainda na vida embrionária, tanto em ratos quanto em humanos.

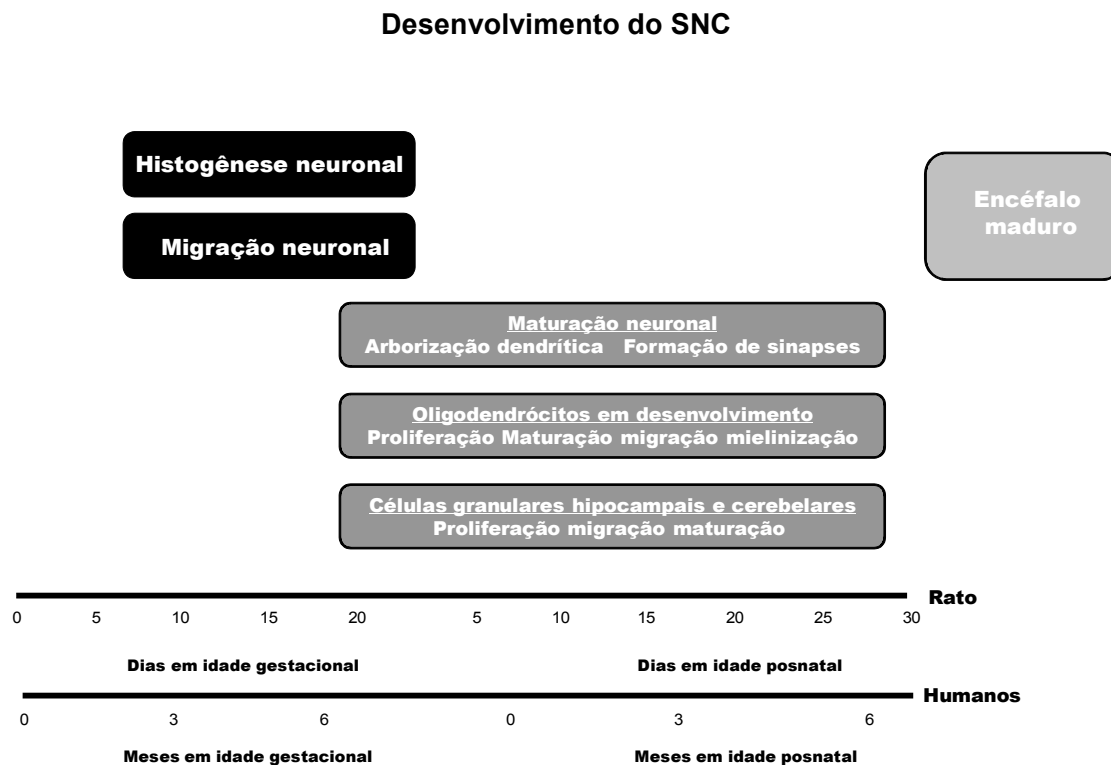


Figura 1: Linha de tempo mostrando os períodos do desenvolvimento neural, em ratos e humanos, e os eventos que ocorrem nos períodos pré e pós-natal. Adaptado de Anderson e colaboradores, 2003.

1.4.Oligodendrócitos

O termo oligodendroglia foi introduzido por Del Rio Hortega (1921) para descrever aquelas células que mostram poucos prolongamentos na técnica com material impregnado com metais. Além dos oligodendrócitos responsáveis pela formação de mielina, existem também oligodendrócitos satélites (Penfield, 1932), que podem não estar diretamente ligados à formação e/ou à manutenção da bainha de mielina. Estes são perineuronais e parecem atuar na regulação do microambiente ao redor dos neurônios (Ludwin, 1997; Peters et al., 1991).

Oligodendrócitos humanos iniciam sua diferenciação durante o terceiro trimestre de gestação e no período neonatal (Back et al., 2001), o que torna este sub-tipo glial particularmente suscetível a injúrias perinatais (Kinney & Back, 1998). Oligodendrócitos são especialmente vulneráveis à hipóxia-isquemia neonatal e são preferencialmente perdidos após ligação unilateral da artéria carótida combinada com hipóxia em roedores (Back et al., 2002a,b; Jelinski et al., 1999; Liu et al., 2002; Skoff et al., 2001). Em crianças muito prematuras, oligodendrócitos progenitores e oligodendrócitos imaturos são particularmente vulneráveis à depleção de anti-oxidantes e à exposição a estresse oxidativo (Baud et al, 2004). Embora o desenvolvimento do sistema nervoso de ratos e de humanos seja bem diferente na complexidade e em aspectos da mielinogênese, marcadores estágio-específicos da oligodendroglia marcam células similares nas duas espécies (Back et al., 2002a,b).

Oligodendrócitos se originam de precursores migratórios e mitóticos, passam a progenitores, e com a progressiva maturação passam a células pós-mitóticas produtoras de mielina (Miller, 2002). A expressão seqüencial de marcadores do desenvolvimento, identificados por um painel de anticorpos específicos da oligodendroglia divide a linhagem em diferentes estágios fenotípicos, caracterizados pela capacidade proliferativa, habilidade de migração e mudanças morfológicas dramáticas, desde células com morfologia unipolar e bipolar (precursores e progenitores) até células com múltiplos prolongamentos e expansões de membrana (oligodendrócitos maduros mielinizantes).

Caracterizam os estágios com maior capacidade proliferativa (precursores e progenitores) os gangliosídeos de superfície, ainda não totalmente caracterizados, identificados pelo anticorpo A2B5 (Raff, 1989); o receptor alfa do fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGFR α) (Hart et al., 1989; Decker & french-Constant, 2004); os proteoglicanos sulfatados de ratos (NG2) (Nishiyama et al., 1996), que aparecem logo depois do PDGFR α e se co-localizam com este tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Nishiyama et al., 1996); a forma embrionária polisialilada da molécula de adesão celular neural (PSA-NCAM), (Ben-Hur et al., 1998); nestina, uma proteína que distingue linhagens de células neuroepiteliais (Lendahl et al., 1990); e o RNAm para 2',3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase), que é o primeiro marcador protéico específico de oligodendrócito a surgir (de Vries et al, 1997).

Após a migração no SNC de mamíferos, progenitores se estabelecem ao longo do caminho das fibras da futura substância branca e se transformam em pré-oligodendrócitos, células com múltiplos prolongamentos, que mantêm a propriedade de divisão celular. O pré-oligodendrócito se torna oligodendrócito imaturo, caracterizado em ratos pelo aparecimento do antígeno lipídico galactocerebrosídeo (GalC), e pela perda da expressão dos antígenos reconhecidos pelo anticorpo A2B5 na superfície da célula (Raff, 1989). Em cerebelos de ratos, a CNPase aparece ao mesmo tempo do GalC, e a proteína básica de mielina (MBP) é expressa 2-3 dias depois, juntamente com a proteína proteolipídica (PLP) (Baumann & Pham-Dinh, 2001) e imediatamente antes da formação de mielina.

A partir de sua expressão, a CNPase é encontrada inicialmente no corpo celular, sendo posteriormente distribuída para os prolongamentos (para revisão ver Dyer, 2002). Na fase de embainhamento dos axônios pelo prolongamento de oligodendrócito a CNPase se encontra ancorada na membrana plasmática e relacionada com o citoesqueleto (Brophy, 1992). Quando os níveis de MBP aumentam, a CNPase é deslocada da membrana e a MBP interage com os fosfolipídeos de membrana dando início à compactação da bainha de mielina (Brophy, 1992; Dyer, 2003). Na mielina madura a CNPase se localiza apenas nas

regiões de mielina não-compacta, onde ainda é encontrado citoplasma de oligodendrócitos, alças interna e externa e alças paranodais (Kim & Pfeiffer, 1999).

Uma das maneiras de se detectar lesões em oligodendrócitos é a avaliação da mielina em animais durante o desenvolvimento e adultos. Vários autores (Pantoni et al, 1996; Mandai et al, 1997; McDonald et al, 1998; Petito et al, 1998; Lyons & Kettenmann, 1998, Robinson et al, 2005) têm mostrado danos na substância branca após eventos de HI em ratos neonatos. A CNPase é um marcador excelente para esta avaliação pois é expresso precocemente na linhagem oligodendroglial, inclusive em células com capacidade proliferativa (Barradas et al, 1998), e pode também ser identificado na mielina madura (Kim & Pfeiffer, 1999).

1.5.Cerebelo

O cerebelo está localizado na fossa craniana posterior, dorsalmente à ponte e ao bulbo e separado dos hemisférios cerebrais por uma dobra de dura-máter, a tenda do cerebelo. O cerebelo está ligado ao tronco encefálico através dos pedúnculos (superior – axônios eferentes; médio – axônios aferentes; inferior – axônios eferentes e aferentes) Ele está recoberto por um córtex (substância cinzenta que contém os corpos celulares de neurônios). Esta camada cortical envolve uma região que contém, predominantemente, axônios mielinizados (substância branca) e os núcleos profundos.

O cerebelo é uma grande parte do encéfalo em todos os vertebrados. Em humanos constitui cerca de 10% do peso encefálico, mas suas células granulares, pequenas e densamente empacotadas fazem com que haja nesta pequena estrutura aproximadamente 50 bilhões de neurônios (Zagon, 1997). Esta imensa quantidade de neurônios permite uma enorme capacidade de processamento de informações, oriundas principalmente do córtex cerebral, relacionada tradicionalmente, desde a década de 60, ao sistema motor (Albus, 1971; Blomfield & Marr, 1970; Marr, 1969). Métodos de imageamento funcional têm mostrado atividade cerebelar evocadas comumente em condições muito distintas daquelas

de domínio do controle motor, sugerindo outras funções que não as tradicionais (Fiez et al, 1996; Allen et al, 1997; Ivry & Baldo, 1992; Kim et al, 1994). Corroborando com estas descobertas, alguns estudos também sugerem associações entre patologias cerebelares e desordens de funções superiores, relacionadas à cognição, memória e aprendizado, que não podem ser explicadas apenas por lesões no controle motor (Schmahmann, 2004; Desmond et al, 1998, Chen & Desmond, 2005).

O córtex cerebelar maduro contém três camadas celulares que de fora para dentro são: a camada molecular, camada de Purkinje e camada granular, estando esta última em contato com a substância branca. No córtex cerebelar estão presentes cinco tipos de neurônios com distribuição diferente pelas camadas corticais (Figura 2). Na camada molecular estão presentes as células estreladas, e no limite entre esta camada e a camada de células de Purkinje se localizam as células em cesto. Na camada granular estão localizadas as células de Golgi e as células granulares.

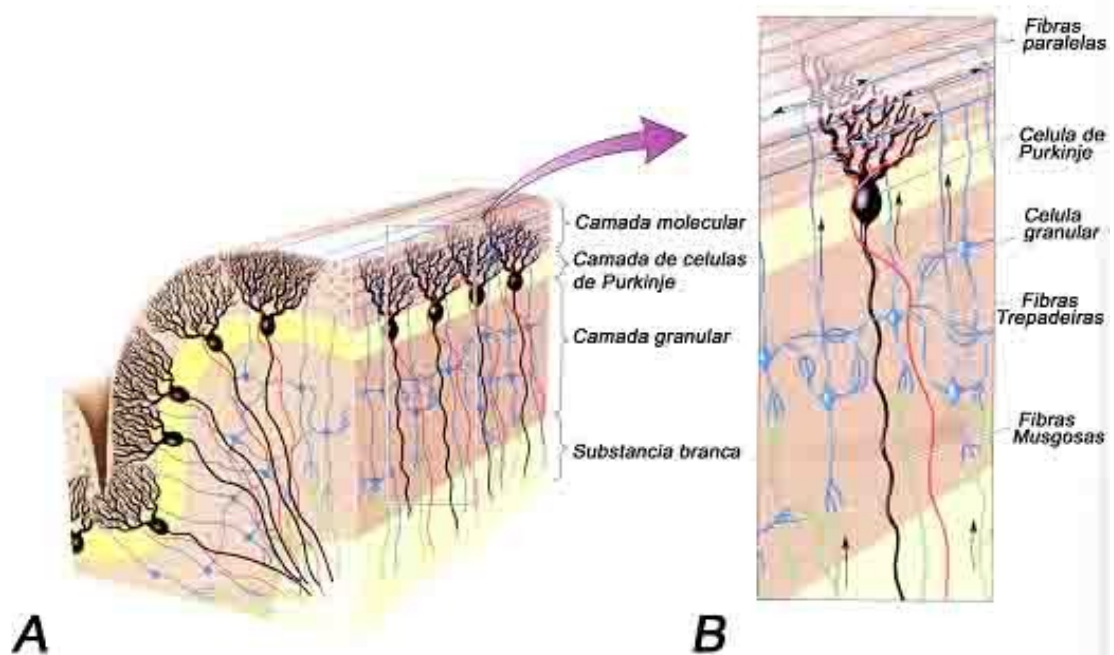


Figura 2 – Estrutura do córtex cerebelar. A – Representação esquemática do córtex cerebelar maduro mostrando a organização das camadas molecular, de células de Purkinje e de células granulares. B – As aferências mais importantes das células de Purkinje são as fibras paralelas, originárias das células granulares e as fibras trepadeiras originárias da oliva inferior. As aferências mais importantes das células granulares são as fibras musgosas, originárias de neurônios do núcleo pontino. (Modificado de Bear et al., 1995).

A principal unidade processadora de informação no cerebelo é a célula de Purkinje. Estas estão organizadas em monocamadas entre a camada molecular e a granular, integrando informações de dois outros importantes pontos de re-transmissão pré-cerebelares: núcleo olivar inferior e núcleo pontino. Cada célula de Purkinje recebe até 200.000 entradas de informação provenientes das fibras paralelas, as quais recebem as informações do núcleo pontino. Já outra classe de fibras, as chamadas fibras trepadeiras, recebem informações do núcleo olivar inferior. Cada uma dessas fibras forma múltiplas sinapses com cada célula de Purkinje. Devido às características singulares da organização cerebelar, como sua regularidade, provavelmente há também uma uniformidade quanto ao modo como o cerebelo processa as informações que chegam, e como transmite informações aos seus alvos (Bloedel, 1992).

O cerebelo pode ser dividido regionalmente de acordo com suas aferências principais, que são tradicionalmente descritas como três divisões funcionais (Kandel et al., 2000):

- O cerebelo vestibular, ou vestibulocerebelo, que recebe aferências do labirinto vestibular, participa da manutenção do equilíbrio e do controle da cabeça e do movimento ocular;
- O cerebelo espinhal, ou espinocerebelo, que recebe aferências sensoriais somáticas altamente organizadas oriundas da medula espinhal, e é importante no controle da postura e do movimento do tronco e dos membros.
- O cerebelo telencefálico ou cortical, ou cerebrocerebelo, que recebe aferências do córtex cerebral e participa do planejamento dos movimentos. Esta região é a mais recente na escala filogenética.

Em roedores, grande parte do desenvolvimento do cerebelo ocorre ao final da gestação e nos primeiros dias da vida pós-natal. Ainda na vida embrionária o primórdio cerebelar se origina por espessamento dos lábios rômnicos em torno do décimo quarto dia embrionário (E14). A população celular dos núcleos cerebelares

e do córtex cerebelar tem origens distintas. Como acontece em outras porções do tubo neural, o neuroepitélio da região do lábio rômboide sofre uma intensa proliferação para produzir as chamadas zona ventricular, zona do manto e zona marginal (Figura 3). Entretanto, em um período posterior do desenvolvimento uma nova camada de células proliferativas aparece na região mais superficial da zona marginal. A zona ventricular proliferativa é então chamada de camada germinativa interna (CGI) e a nova camada é chamada de camada germinativa externa (CGE). A CGI dá origem aos neuroblastos primitivos nucleares, que migram para formar os núcleos cerebelares, a partir do décimo sexto dia embrionário (E16). Além disto, esta camada produz outros dois tipos de neuroblastos que migram para o córtex cerebelar, os neuroblastos primitivos de Purkinje, que se diferenciam para formar as células de Purkinje, e os neuroblastos de Golgi, que se diferenciam para formar as células de Golgi.

A camada germinativa externa sofre três ondas de proliferação para produzir, em sucessão, as três populações de neuroblastos cerebelares restantes no córtex cerebelar: os neuroblastos em cesto, os granulares e os estelares. Estas células migram tangencialmente pela superfície externa do cerebelo em desenvolvimento e posteriormente migram radialmente para seus locais definitivos nas camadas do córtex cerebelar descritas previamente, a partir de E18 e nos primeiros dias da vida pós-natal. A Figura 3 mostra esquemas do surgimento da zona marginal, as camadas germinativas interna e externa e a direção da migração dos neuroblastos.

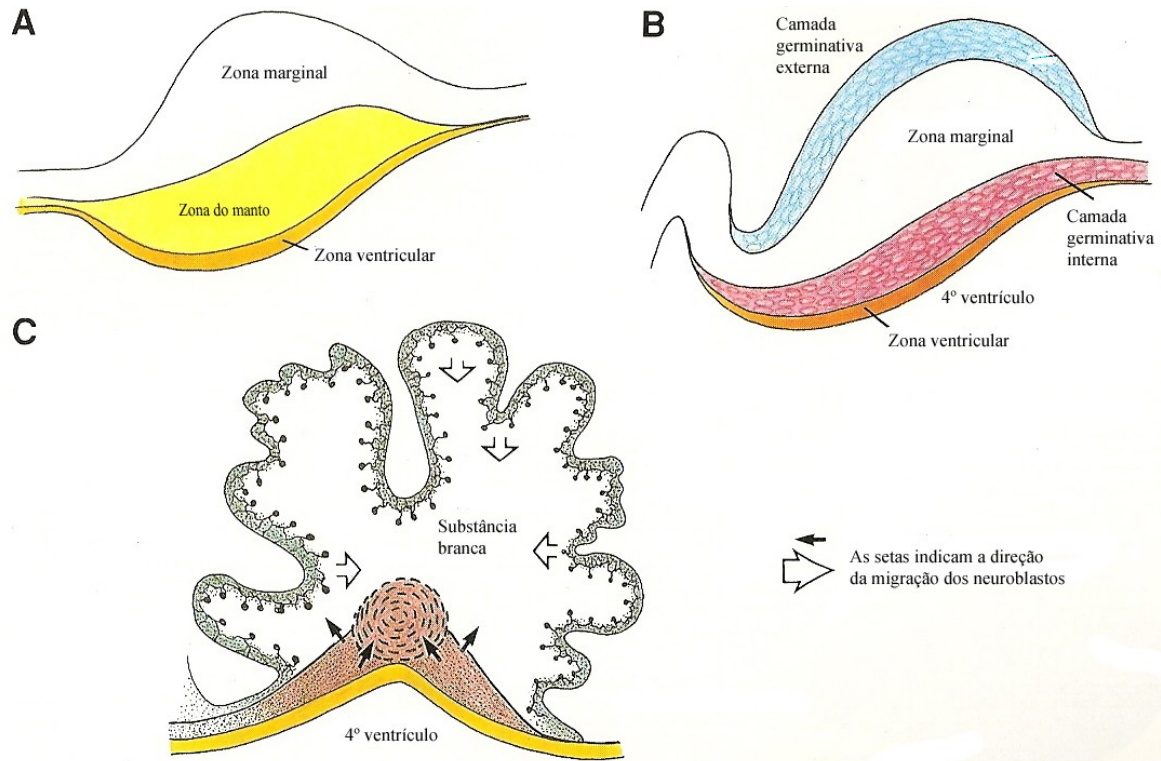


Figura 3 – Desenvolvimento do cerebelo. A – Formação das zonas marginal, do manto e ventricular a partir de intensa proliferação das margens do lábio rômico. B – Neuroblastos são produzidos pela proliferação celular na camada germinativa interna (CGI), adjacna à zona ventricular, e na região mais periférica da zona marginal que constitui a camada germinativa externa (CGE). C – Neuroblastos produzidos na CGE migram tangencialmente e radialmente constituindo a camada molecular e granular. Neuroblastos produzidos na CGI incluem os neuroblastos de Purkinje, que migram para fora e se localizam entre as camadas granular e molecular (camada de células de Purkinje (cf.Figura 2) e os neuroblastos que constituem os núcleos profundos do cerebelo. Modificado de Larsen, 1993.

No fim da década de 1980, trabalhos do grupo de Goldman, utilizando uma série de marcadores celulares como: o gangliosídeo GD3, presente em células neuro-epiteliais; o gangliosídeo GQ1 (reconhecido pelo A2B5); anidrase carbônica II, Galactocerebrosídeo (GalC) e MBP, marcadores da oligodendroglia; e marcadores precoces (vimentina) e tardios (GFAP) da astroglia; demonstrou divergência precoce de células astrogliais e oligodendrogliais no cerebelo, com o último tipo se originando de precursores da zona sub-ventricular do IV ventrículo (LeVine & Goldman, 1988). A diferenciação da oligodendroglia do cerebelo do rato também foi estudada nesta mesma época utilizando, além dos marcadores já citados, a CNPase. Neste trabalho foi demonstrada a origem dos oligodendrócitos do cerebelo a partir de precursores do véu supra-medular e da região adjacente ao IV ventrículo (Reynolds & Wilkin, 1988). Ao nascimento, oligodendroglia que

expressa CNPase (CNPase+) é encontrada na base do cerebelo (Figura 4A – setas). Após 1 dia (Figura 4B) está presente na folha 1, e com o avanço do desenvolvimento já é encontrada em todas as folhas cerebelares (Figura 4C e D).

O cerebelo apresenta aspectos próprios que o torna distinto de toda e qualquer outra estrutura encefálica. Primeiramente, o córtex cerebelar com suas células organizadas de maneira regular e simples, repetidas de maneira muito semelhante ao longo de toda a estrutura. Além disso, a natureza de suas conexões com outras áreas, em particular com o córtex cerebral. Essas características fazem com que qualquer alteração na estrutura regular possa alterar o processamento de informações, acarretando possíveis danos ao indivíduo.

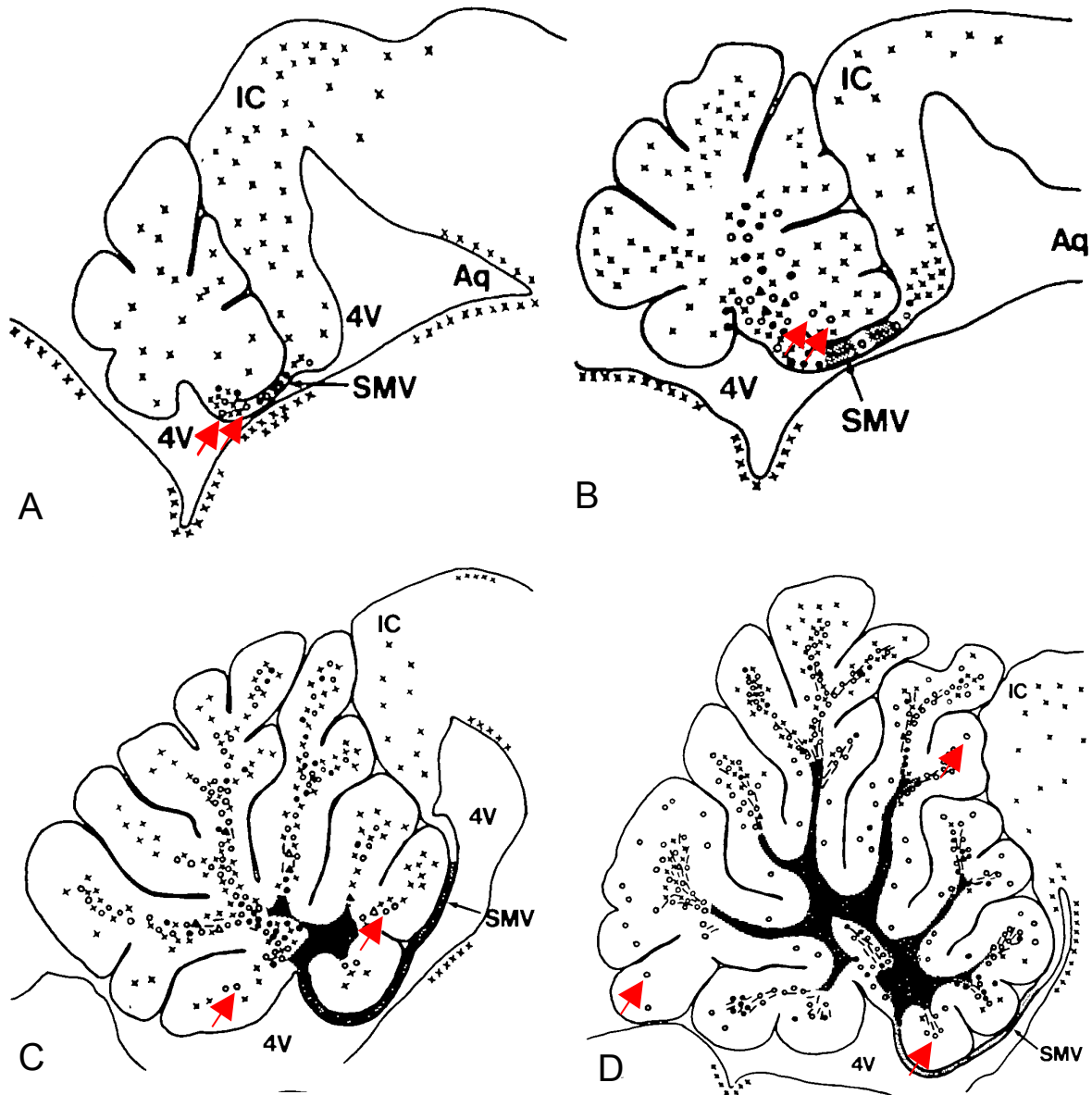


Figura 4 - Representação esquemática do desenvolvimento oligodendroglial no cerebelo do rato do nascimento até P10, como determinado pela imunohistoquímica para diferentes marcadores. (A) Nascimento, (B) 24 h, (C) 5 dias, (D) 10 dias. Os diagramas foram desenhados a partir de fotografias de seções parassagitais coradas com azul de toluidina após a imunohistoquímica, de acordo com os símbolos: x, células GD3+; O, células GalC+/CNPase+; Δ, corpos de células GalC+/CNPase+/MBP+; =, pequenos segmentos de mielina MBP+; em negro, áreas densamente mielinizadas. A presença de células GD3+ nas zonas sub-ventriculares e no colículo inferior foi adicionada para dar uma indicação de uma possível origem de precursores gliais entrando no cerebelo. As setas vermelhas realçam a localização das células GalC+/CNPase+. Nas áreas densamente mielinizadas não foram desenhados os corpos celulares para maior clarificação. 4V, quarto ventrículo; Aq, aqueduto cerebral; IC, colículo inferior; VSM, véu supra-medular. Adaptado de Reynolds e Wilkin, 1988.

1.6. Óxido Nítrico

Há algumas décadas atrás o óxido nítrico (ON) era conhecido apenas como um gás tóxico, componente da fumaça do cigarro, da poluição do ar e também como um produto derivado do metabolismo de bactérias. Em 1980, Furchgott e Zawadzki identificaram o ON como uma molécula mensageira, um produto das células dos mamíferos. Este estudo demonstrou que as células endoteliais quando estimuladas pela acetilcolina liberavam um vasodilatador, inicialmente denominado de fator de relaxamento derivado do endotélio (*endothelium-derived relaxing factor*, EDRF). Posteriormente, essa molécula sintetizada pelo endotélio e com propriedades relaxadoras do músculo liso foi identificada como sendo o ON (Furchgott & Zawadzki, 1980).

O ON é um gás inorgânico com uma meia vida curta (menos de 30 segundos em sistemas biológicos), produzido por diferentes tipos de células, controlando ou influenciando importantes processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão. A descoberta do ON, como molécula mensageira atuante no sistema nervoso, mudou o conceito convencional de comunicação inter-neurônios, devido a suas características incomuns para um neurotransmissor como: não ser armazenado em vesículas e ser liberado na fenda após uma despolarização da membrana; não se ligar a receptores; e não ser degradado após recaptação. Pelo fato do ON ser um gás, a comunicação entre neurônios ocorre através da difusão; seu alcance pode ir muito além de sua célula de origem; e sua atividade é finalizada apenas quando reage com um substrato (para revisão ver Calabrese, 2007)

Nos mamíferos, o ON é sintetizado a partir do aminoácido essencial L-arginina por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS: tipo I ou neuronal (nNOS), encontrada em todas as regiões do cérebro, sendo que se apresenta em maior quantidade no cerebelo (Bishop & Anderson, 2005); tipo II ou induzível (iNOS); e tipo III ou endotelial (eNOS). As isoformas nNOS e eNOS são constitutivas e suas atividades reguladas pelo Ca^{++}

intracelular e pela calmodulina, uma proteína associada ao Ca^{++} (Simon et al., 2007). Em contraste, iNOS é Ca^{++} e calmodulina-independente, podendo ser induzida por citocinas e endotoxinas, produzindo grande quantidade de ON por longo período de tempo (Simon et al., 2007). A L-arginina é convertida a ON e citrulina pela NOS através de uma via com duas etapas, uma hidroxilação e uma redução, exigindo a presença de oxigênio molecular (O_2) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida NADPH. Outros co-fatores necessários para a síntese de ON (Figura 5) são o dinucleotídeo adenina-flavina (FAD), o mononucleotídeo flavina (FMN) e o tetrahydrobiopterina BH_4 (Schulz, 2008; Bredt & Snyder, 1990).

A identificação da NOS pode ser feita por métodos imunohistoquímicos e imunocitoquímicos, utilizando anticorpos específicos para cada uma das três isoformas, ou pelo método da NADPH-diaforase. Dawson e cols. (1991) demonstraram a co-localização da NADPH-diaforase com a marcação imunocitoquímica para NOS. Neste método não há distinção entre as três isoformas.

Em condições fisiológicas, baixos níveis de ON produzidos pelas nNOS e eNOS irão ativar a guanilato ciclase, levando à produção de GMPc , que está associado a uma série de processos fisiológicos como, por exemplo: relaxamento do músculo liso vascular; inibição da agregação e adesão plaquetárias; e sinalização no sistema nervoso. A NOS encontrada em neurônios é dependente de íons Ca^{++} e calmodulina, que estão associados à modulação de neurotransmissores como: a acetilcolina (receptor M_3), histamina (receptor H_1), bradicinina (receptor B_2), entre outros (Simon et al., 2007; Skidgel & Erdös, 2007).

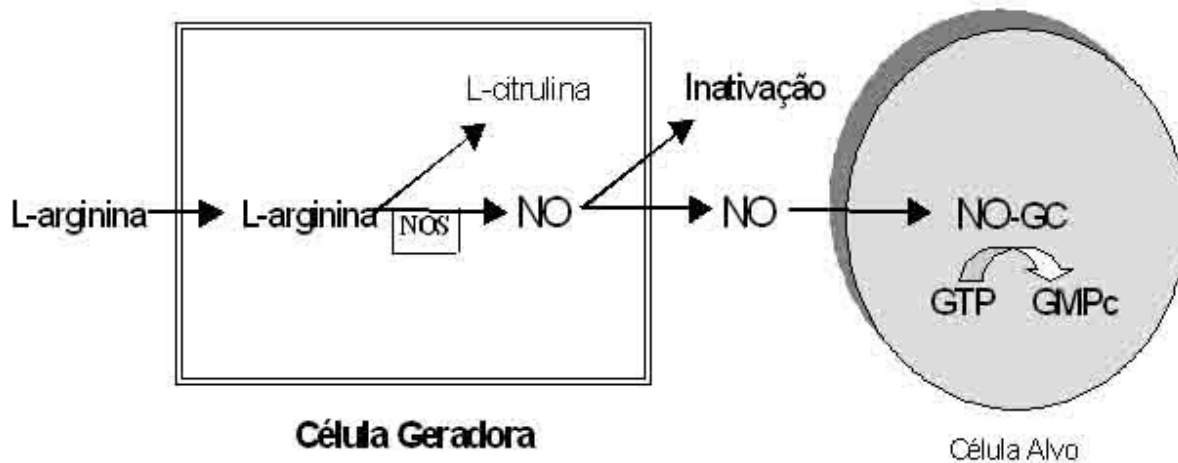


Figura 5. A via L-arginina-óxido nítrico. O óxido nítrico é produzido quando a enzima converte a L-arginina em L-citrulina, e se difunde livremente. NOS=óxido nítrico sintase; GC=guanilato ciclase; GTP=guanosina trifosfato; GMPc= guanosina monofosfato cíclica.

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

Em situações de injúria e inflamação no SNC, o ON é produzido em grande quantidade pela isoforma iNOS expressa em macrófagos, microglia e astrócitos. Nestas condições patológicas, ocorre a facilitação de células do sistema imune de atravessarem a barreira hematoencefálica, levando a produção ainda maior de ON e superóxido (Le Mellédo et al, 2004).

Estudos em modelos de HI em fetos e ratos neonatos demonstraram que a atividade da NOS é elevada após o evento isquêmico (Hamada et al, 1994) e que

o aumento da atividade da nNOS ocorre nas áreas mais suscetíveis à lesão (Fullerton et al, 1998). O óxido nítrico é produzido em eventos de HI, assim como diversas outras moléculas pró-inflamatórias como citocinas e moléculas de adesão (Iadecola & Alexander, 2001). Em elevadas concentrações, especialmente na presença de radicais superóxidos, o ON pode inibir vários processos metabólicos e causar danos diretos no DNA. Num estudo com fatias de hipocampo de rato, o ON e citocinas pró-inflamatórias foram parcialmente responsáveis pela morte neuronal (Lee et al, 2003). Este estudo mostrou que a morte de células neurais não ocorre somente por falta de glicose e oxigênio (necrose), mas também por moléculas liberadas pela microglia. Durante a HI, ocorre um acentuado aumento dos níveis de ON, seja pela atividade da nNOS seja pela atividade da forma induzida, particularmente a de microglia e leucócitos polimorfonucleares (Battueur-Parmentier et al, 2000; Chopp et al, 1996; Beray-Berthat et al, 2003)

Após a asfixia acredita-se que ocorra uma cascata de eventos neurotóxicos como o aumento do fluxo de cálcio, o qual entra na célula após a ativação de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e a liberação em excesso de glutamato e ON. Este último contribuiria para o dano através da formação de radicais livres: o ON se ligaria ao radical superóxido, formando o peroxinitrito (Bolaños & Almeida, 1999). É de interesse, portanto, avaliar a expressão e a distribuição da NOS em encéfalos de animais submetidos a modelos de hipóxia-isquemia.

2.OBJETIVOS

- Avaliar a diferenciação de oligodendrócitos através da imunorreatividade à 2'3' nucleotídeo cíclico 3' fosfodiesterase (CNPase) no córtex motor e cerebelo.
- Avaliar a distribuição da óxido nítrico sintase (NOS), através da histoquímica da NADPH-diaforase, no cerebelo de ratos submetidos ao mesmo modelo de HI.

3.METODOLOGIA

3.1.Realização da Hipóxia – Isquemia

Para a realização desse estudo utilizamos o modelo de oclusão das artérias uterinas em E18 descrito por Robinson e colaboradores em 2005. Ratas Wistar em estro foram postas para acasalar por um período de 12 horas, entre 20:00h e 8:00h. No 18º dia de gestação, foram anestesiadas com aproximadamente 8mL de Avertin® (0,5 g de tribromoetanol + 0,31 mL de 2-metil-2-butanol + 39,5 mL de água destilada) aplicados em doses fracionadas durante a cirurgia. Após a laparotomia os cornos uterinos foram expostos. As quatro artérias uterinas foram obstruídas com pinças hemostáticas por 45 minutos (Grupo HI) – (Figura 5). Nos animais Sham (Grupo Sham) os úteros foram expostos, mas nenhuma oclusão das artérias uterinas foi realizada. Após o período de oclusão, as pinças hemostáticas foram removidas, os cornos uterinos recolocados na cavidade peritoneal, e foi feita a sutura por planos anatômicos. Após fechamento da parede abdominal foi administrada dipirona (10mg/100g de peso corporal via oral) para analgesia. A gestação segue normalmente até o parto. Nenhuma intervenção por parte do pesquisador acontece antes ou durante o parto. Os filhotes são alimentados pela própria mãe até os 21 dias de vida, quando são desmamados e passam a comer ração comercial. Há ainda um grupo de animais os quais não sofrem nenhuma manipulação (Grupo NM). Ninhadas com menos de 4 animais não foram utilizadas neste estudo, e o número médio de animais por ninhada variou de 6 a 8. Foram utilizados de quatro a cinco animais por grupo por idade, provenientes de pelo menos 2 ninhadas diferentes, de ambos os sexos.



Figura 6 - Fotografia ilustrando a cirurgia realizada em ratas grávidas (E18) com o clampeamento das artérias uterinas (setas). Modelo de hipóxia-isquemia desenvolvido por Robinson e colaboradores (2005).

3.2. Processamento histológico

Ratos nas idades de P9, P23, e P90 foram anestesiados com éter ou pentobarbital (adultos) e perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9%, paraformaldeído 4% em tampão fostato 0,1M e paraformaldeído com sacarose a 10%, nessa ordem. Após serem retirados da caixa craniana os encéfalos permaneceram em paraformaldeído com sacarose a 10% por aproximadamente 1 hora e foram posteriormente armazenados em solução de tampão fosfato com sacarose a 20% durante a noite a 4°C. Processada a crioproteção, foi feita a inclusão em OCT para a criotomia: o congelamento rápido do bloco foi obtido por imersão em nitrogênio líquido. Os cortes, com espessura de 25µm, em plano coronal, foram obtidos em criótomo e montados em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%. As lâminas foram mantidas a -20 °C, enquanto aguardavam o processamento imunohistoquímico. Para a histoquímica da NADPH cortes com 40µm de espessura, para os animais de 9 e 23 dias, ou 60µm, para os animais com 90 dias, foram recolhidos em 1mL de tampão Tris, pH 7,4, e mantidos sob refrigeração a 4°C até o início da reação. As regiões de interesse foram coletadas segundo as coordenadas obtidas do Atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 1998). Para a análise do cerebelo, recolhemos cortes parassagitais na região do vermis, a partir da linha média até aproximadamente 1mm, e para o córtex motor, recolhemos cortes coronais entre a posição Bregma -0,26 mm até Bregma -0,40 mm.

3.3. Imunohistoquímica

Foi utilizado o anticorpo anti-CNPase (Sigma, monoclonal IgG, 1:100) para identificação dos oligodendrócitos e mielina. A revelação foi feita com anticorpo anti-IgG de camundongo biotinilado (Santa Cruz, 1:100), posteriormente ligado a extravidina conjugada ao fluorógeno CY3 (Zymed, 1:400), ou com extravidina conjugada a peroxidase e revelada com diaminobenzina (DAB). As lâminas foram mantidas em metanol a -20°C por 30 minutos, para a facilitação do acesso dos anticorpos à mielina, depois lavadas 3 vezes em PBS (salina tamponada com fosfato: KCl 2,7mM; KH_2PO_4 1,47mM; NaCl 136mM e Na_2HPO_4 8mM; pH 7,4) por 5 minutos, e depois 3 vezes em PBS + Triton 0,3% por 5 minutos. Após as lavagens os cortes foram incubados em soro normal de cabra (NGS) a 10% em PBS por duas horas. Após a incubação em NGS, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-CNPase durante a noite, a 4°C em geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos e 3 vezes com PBS + triton 0,3% por 5 minutos, e então incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado a biotina 1:100, diluído em PBS, por 1 hora. Após esse período, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase, por 30 minutos 1:150 em PBS. Seguiram-se três lavagens em tampão fosfato por 5 minutos, e posterior incubação por 15 minutos com 3,3' - diaminobenzedinetetrahydrocloro (DAB), e incubação com DAB e H_2O_2 por 5 a 15 minutos. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com tampão fosfato e 3 vezes com água destilada por 5 minutos. Após secagem durante a noite as lâminas foram sucessivamente imersas por períodos de três minutos em álcool a 70%, 80%, 90%, 95% e por cinco minutos em álcool absoluto, e imersas em xilol por 10 minutos para desidratação. Para posterior análise em microscópio óptico, as lâminas foram montadas com Entellan® (MERCK) como meio de montagem.

Para as reações de imunofluorescência, após a incubação com o anticorpo secundário, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com estravidina conjugada a Cy3, 1:400, em PBS. Seguiram-se 3 lavagens com PBS e montagem com n-propil galacto.

3.4.Procedimento histoquímico

Os cérebros foram aparados para serem cortados em plano parassagital impregnados em meio de inclusão (OCT). Os blocos foram congelados em nitrogênio líquido e cortados a 40 µm de espessura (P9 e P23) ou 60 µm de espessura (P90), em um criostato Slee a -20°C. Os cortes foram recolhidos em placas de 24 poços com 1 mL de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4, foram lavados 2 vezes com o mesmo tampão. Estes cortes foram reagidos pela reação da Di-hidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d) direta, utilizando um protocolo modificado do de Vincent e Kimura (1992). O tempo de reação foi de 60 a 90 minutos em estufa a 37°C. A solução de reação utilizada continha 100 µl de Triton X-100 diluídos 12 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, 10mg de NADPH, 5 mg de azul de tetrazol (NBT) diluído em 100 µl de dimetil-sulfóxido (DMSO). Após a marcação os cortes foram lavados 2 vezes em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,4, montados em lâminas gelatinizadas, deixados para secagem durante a noite. As lâminas foram sucessivamente imersas por períodos de três minutos em álcool a 70%, 80%, 90%, 95% e por cinco minutos em álcool absoluto, e imersas em xilol por 10 minutos para desidratação. Para posterior análise em microscópio óptico, as lâminas foram montadas com Entellan® (MERCK) como meio de montagem.

Para a coloração com hematoxilina, as lâminas foram sucessivamente imersas em álcool 100%, 95%, 90%, 80%, 70% e água destilada por 1 minuto, imersas em hematoxilina por 3 minutos, e lavadas e água corrente. Após a coloração, as lâminas foram sucessivamente imersas por períodos de um minuto em álcool a água destilada, álcool a 70%, 80%, 90%, 95% e 100% por um minuto, e imersas em xilol por 3 minutos para clarificação. Para posterior análise em microscópio óptico, as lâminas foram montadas com Entellan® (MERCK) como meio de montagem.

3.5. Análise das lâminas e aquisição de imagens

A análise foi feita com o auxílio de um microscópio óptico Olympus BX40, acoplado a câmera de vídeo digital. As imagens foram adquiridas com o programa “Digital Camera Acquire” (Optronics) acoplado a uma câmera de vídeo digital (Sony DXC 151A). Após a aquisição, as imagens foram trabalhadas no programa Programa Adobe Photoshop.

4 – Resultados

4.1. Imunohistoquímica

4.1.a - Identificação da CNPase no córtex motor

Após a cirurgia, as fêmeas grávidas foram mantidas em caixas separadas, com água e alimento *ad libitum*, e o parto ocorreu sem intervenção dos pesquisadores. Poucos dias após o parto, o local da incisão já se encontra totalmente cicatrizado. Poucos casos de aborto total da ninhada aconteceram. Na maioria das vezes, do total de fetos observados durante a cirurgia, aproximadamente 70% sobreviveram pelos dois primeiros dias. As mães se apresentam bastante agitadas neste período, por isso, manipulamos a mãe e a ninhada apenas após o segundo dia pós-parto.

De mais de 100 animais avaliados, tanto do grupo HI quanto do grupo Sham, apenas dois animais que sobreviveram após os dois primeiros dias apresentavam hemiplegia nos membros inferiores. Estes animais não foram utilizados neste estudo. Todos os animais estudados não apresentaram alterações comportamentais grosseiras, não sendo possível identificar o grupo a que pertenciam apenas visualmente.

Nossos resultados demonstram que nos animais do grupo NM e Sham em P9, a imunohistoquímica para a CNPase revela corpos de oligodendrócitos imunorreativos na região do cingulum e no córtex sobrejacente (Figura 7A - setas). Nos animais experimentais da mesma idade há um menor número de corpos imunorreativos na região do cingulum (Figura 7B- setas) e ausência de corpos CNPase+ no córtex sobrejacente. Nesta idade, fibras embainhadas por prolongamentos CNPase+ não foram observadas em nenhum dos grupos no córtex sobrejacente.

Observamos nos animais do grupo NM e Sham, aos 23 dias, grande número de corpos de oligodendrócitos imunorreativos no córtex motor e córtex

cingulado (Figura 7C – setas), enquanto nos animais do grupo HI há um menor número de corpos celulares imunorreativos nestas regiões (Figura 7D – setas). Na região do cíngulo (cg), observamos um menor número de corpos celulares CNPase+ quando comparados aos animais com 9 dias dos mesmos grupos, enquanto ainda observamos muitos corpos celulares CNPase+ no cíngulo (cg) nos animais HI, sugerindo um atraso na distribuição da CNPase durante o desenvolvimento dessas células. Feixes de fibras embainhadas na região do cíngulo (cg), nesta idade, foram observados em ambos os grupos, sendo que nos animais HI há uma diminuição da imunorreatividade à CNPase nestas fibras, quando comparado aos grupos NM e Sham. Grande número de fibras CNPase+ foram observadas no córtex motor dos animais NM e Sham (Figura 7C – cabeças de seta), enquanto poucas fibras CNPase+ foram observadas no córtex motor dos animais HI (Figura 7D – cabeças de seta).

Nos animais dos grupos NM e Sham, aos 90 dias de vida, foram observados grande número de fibras CNPase+ na região do córtex motor e cíngulo (Figura 7E – cabeças de seta), enquanto nos animais HI estas fibras estão em menor número (Figura 7F – cabeças de seta). Na região do cíngulo observamos feixes de fibras embainhadas nos três grupos, sendo que os animais do grupo HI continuaram apresentando menor imunorreatividade à CNPase.

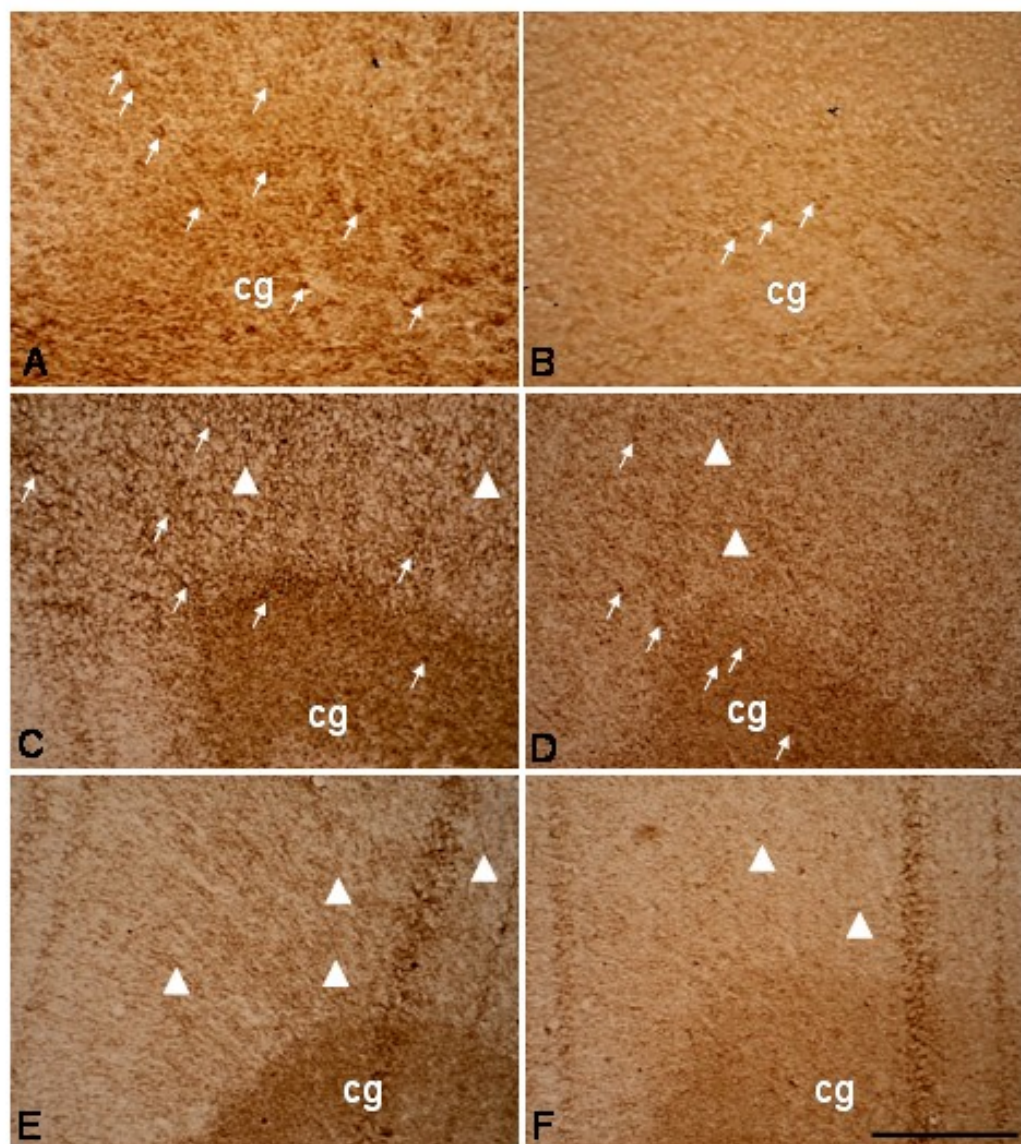


Figura 7: Imunoreatividade à CNPase diminuída na junção da substância branca com a substância cinzenta. A e B animais aos 9 dias (P9); C e D animais aos 23 dias (P23); E e F animais aos 90 dias (P90). A, C e E animais do grupo Sham, mostrados aqui também como representativo do grupo NM que apresenta resultados similares; B, D e F animais do grupo HI. Cg = cingulum. Aos 9 dias, observar o grande número de corpos celulares imunorreativos no cingulum, córtex motor e dingulado dos animais Sham (A – setas), e o pequeno número de corpos celulares no dingulum nos animais HI (B – setas) e ausência nos córtices sobrejacentes. Em C observar o grande número de corpos celulares imunorreativos no córtex motor e dingulado (setas), e o pequeno número de corpos celulares no dingulum, enquanto nos animais HI (D - setas) existem poucos oligodendrócitos CNPase+ na região cortical, mas na região do dingulum número aparentemente maior de corpos de oligodendrócitos CNPase+ que nos animais NM e Sham. Em C e D cabeças de setas apontam fibras CNPase+ que se apresentam em menor número no animal HI. Em E e F observar o grande número de fibras CNPase+ no córtex motor nos animais Sham e o pequeno número nos animais HI (cabeças de seta). Observar ainda a menor imunoreatividade na região do cingulum nos animais HI aos 23 (D) e 90 dias (F) comparados com o Sham (C e E). Barra de calibração: 200 µm.

3.1.b – Identificação da CNPase no cerebelo

Avaliamos o padrão de expressão e a localização dos corpos de oligodendrócitos e fibras CNPase+ no cerebelo em desenvolvimento. Não observamos corpos de oligodendrócitos nem fibras CNPase+ na camada molecular em nenhum animal, de nenhum grupo, em nenhuma idade. As figuras 8A (Sham) e B (HI) mostram cortes parassagitais da folha 1 do cerebelo aos 9 dias, observados em menor aumento, na altura da linha média, e em C (Sham) e D (HI) figuras dos mesmos campos em maior aumento. Esta folha é uma das primeiras a ser mielinizada, uma vez que o desenvolvimento do cerebelo ocorre em sentido antero-posterior, como mostrado por Reynolds e Wilkin em 1998. Podemos observar a distribuição da CNPase principalmente na substância branca (SB) e a presença de fibras embainhadas por prolongamentos CNPase+ (cabeças de seta em A) se aproximando do limite da camada de células de Purkinje (CP), nos animais do grupo Sham mostradas melhor na figura de maior aumento (C, setas apontam corpos celulares e cabeças de seta apontam fibras CNPase+). Nos animais do grupo experimental também observamos fibras e corpos celulares imunorreativos, mas estes se localizam em regiões mais próximas à substância branca (Figura 8D), como se ainda não houvessem atingido toda a extensão das fibras a serem embainhadas nesta idade, sugerindo um atraso na mielinização nesta região.

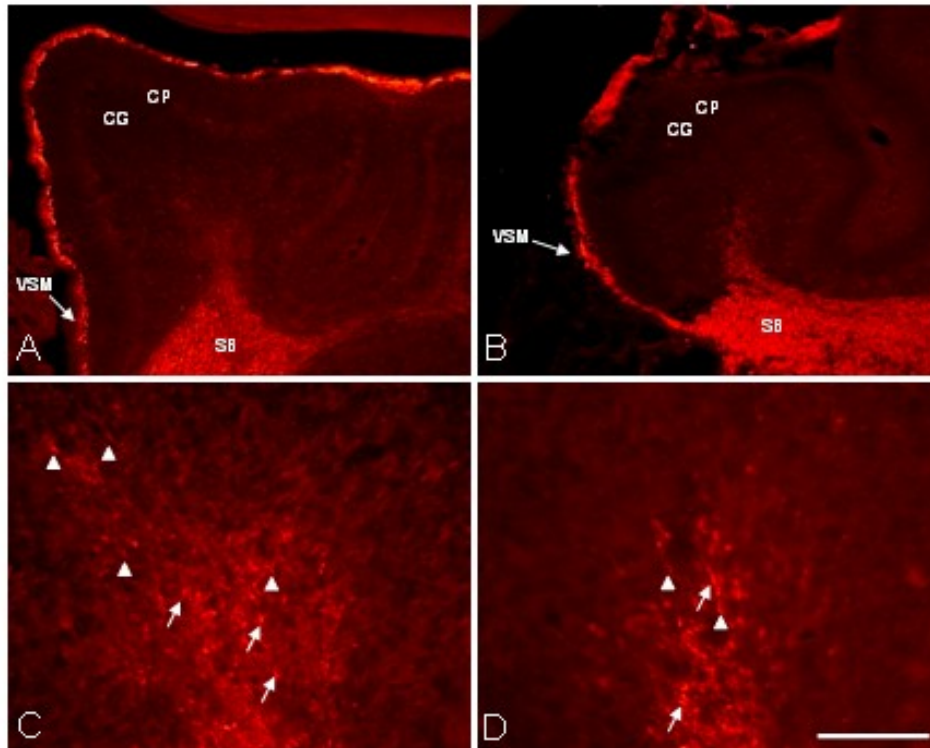


Figura 8: Distribuição da CNPase nos corpos celulares e prolongamentos de oligodendrócitos na folha 1 cerebelar em animais P9. A e C (Sham); B e D (HI). CP = camada de células de Purkinje; CG = camada granular; SB = substância branca; VSM = véu supra medular. Observar que nos animais Sham encontramos corpos celulares (setas) e fibras (cabeças de seta) CNPase+ mais próximas da CP, enquanto nos animais HI ambos se concentram ainda próximos à substância branca. Observar também a presença de perfis CNPase+ no VSM. Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 50 µm.

Aos 23 dias, observamos fibras imunorreativas para CNPase em toda a camada granular (CG) da folha 1, tanto nos animais do grupo Sham (Figura 9A) quanto no grupo experimental (Figura 9B). Nos animais do grupo HI as fibras CNPase+ aparecem mais bem definidas do que no grupo Sham. Na substância branca, observamos diminuição da imunorreatividade à CNPase nos animais HI, quando comparado ao grupo Sham, (Figura 9C e D – SB).

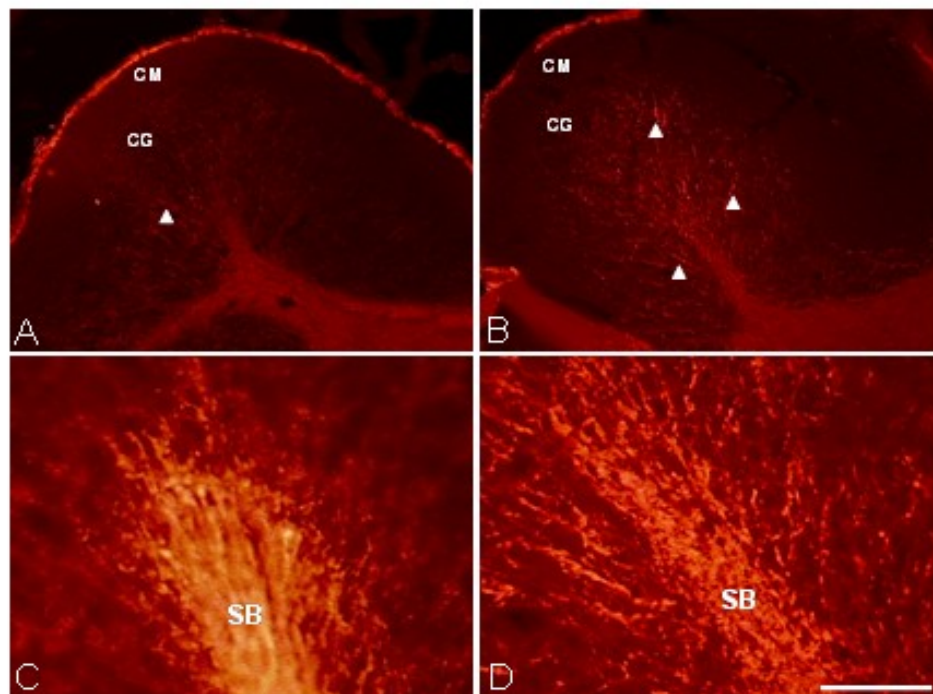


Figura 9: Alteração da imunoreatividade à CNPase nos animais HI comparados aos do grupo Sham, em animais P23. A e C (Sham); B e D (HI). CM = camada molecular; CG = camada granular. Observe a presença de fibras e corpos de oligodendrócitos CNPase+ nos animais Sham (A) e HI (B), ocupando toda a extensão da CG; além disso as fibras CNPase+ na substância cinzenta do grupo HI se apresentam mais bem definidas (cabeças de seta). Em C observamos uma intensa marcação para CNPase na substância branca (SB) enquanto nos animais HI observamos a imunoreatividade diminuída nesta região (D). Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 50 µm.

Aos 90 dias, a substância branca dos animais Sham não apresenta uma marcação intensa para a CNPase (Figura 10A), enquanto nos animais HI esta marcação ainda é intensa (Figura 10B). Nos animais Sham observamos ao longo de toda a CG grande número de fibras CNPase+ (Figura 10C – cabeças de seta) e poucos corpos celulares de oligodendrócitos imunorreativos (setas), enquanto nos animais experimentais observamos grande número de corpos celulares (Figura 10D – setas) e aparente redução no número de fibras (cabeças de seta), sendo que estas apresentam uma maior imunorreatividade em comparação aos animais do grupo Sham.

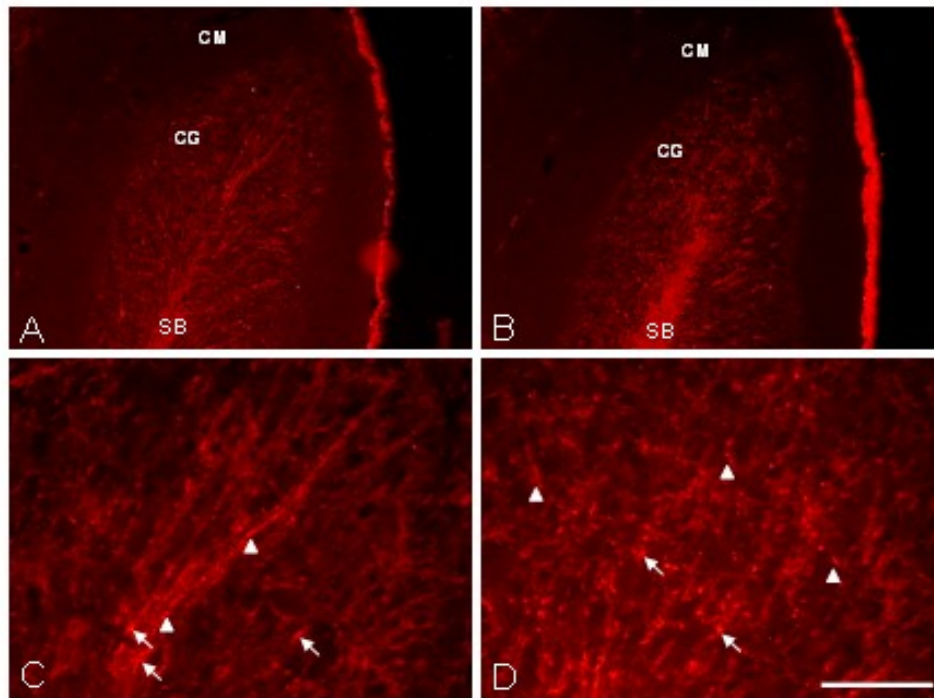


Figura 10: Aumento na imunoreatividade à CNPase nos animais HI comparados aos do grupo Sham. A e C (Sham); B e D (HI). CM = camada molecular; CG = camada granular. Observe em B que os animais HI ainda apresentam intensa imunoreatividade à CNPase, concentrada na substância branca, enquanto nos animais Sham a substância branca não apresenta forte imunoreatividade. Observe os corpos celulares e fibras imunoreativas ao longo de toda a CG tanto nos animais Sham (C – setas) quanto HI (D - setas). Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 50 µm.

A avaliação da folha 6 cerebelar é de interesse, pois é uma região relacionada com o córtex motor em primatas. A imunohistoquímica para a CNPase na folha 6 dos animais Sham em P23 revelou uma intensa imunorreatividade na substância branca (figura 11A), enquanto nos animais do grupo HI (figura 11B) há uma marcante diminuição da marcação a esta proteína. Grande número de fibras CNPase+ foi observado na CG nos animais Sham (Figura 11C – cabeças de seta), com forte marcação. Já nos animais HI, o número de fibras CNPase+ na CG é menor que nos Sham e a imunorreatividade está bastante diminuída (Figura 11D).

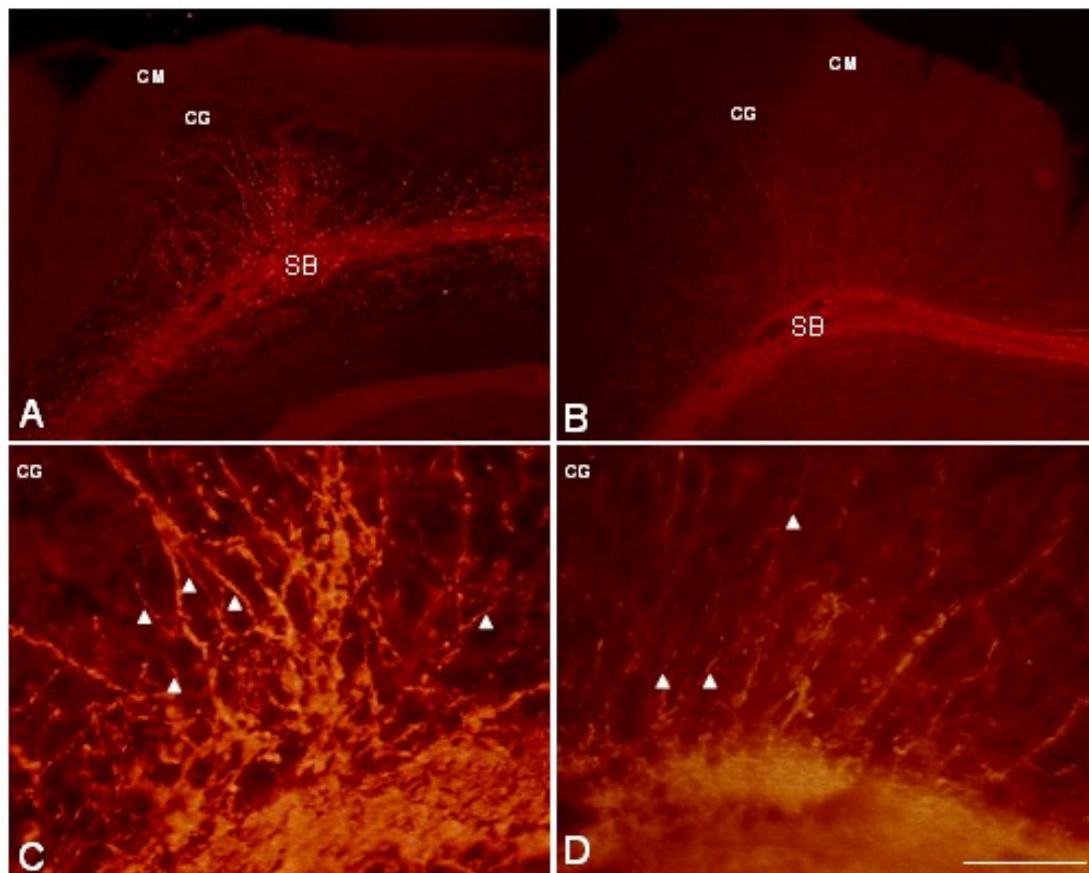


Figura 11: Imunoreatividade à CNPase diminuída na folha 6 dos animais HI comparados aos Sham aos 23 dias. A e C (Sham); B e D (HI). CG = camada granular; CM = camada molecular. Observar a menor imunoreatividade à CNPase na substância branca nos animais HI (B) e nas fibras da CG (D) e o menor número de fibras marcadas (D – cabeças de seta), comparado ao Sham. Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 50 µm.

Aos 90 dias, não observamos alterações na imunorreatividade à CNPase na substância branca da folha 6 entre os grupos Sham e HI (Figura 12 A e B). Nos animais Sham a marcação da CNPase revela segmentos maiores de mielina na camada granular (Figura 12C – cabeças de seta). O número de fibras não parece estar alterado entre os grupos.

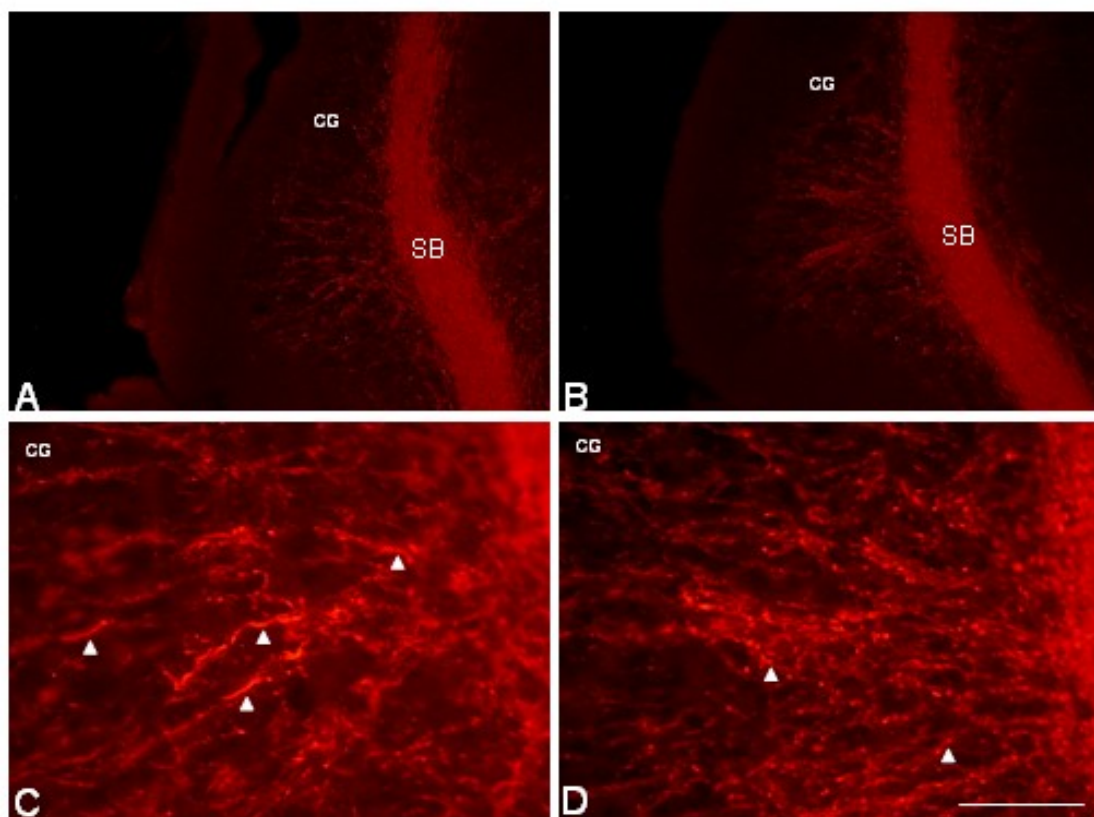


Figura 12: Imunoreatividade à CNPase na folha 6 dos animais HI comparados aos Sham aos 90 dias. A e C (Sham); B e D (HI). CG = camada granular. Não observamos alterações na imunoreatividade à CNPase entre os grupos. Nos animais Sham observamos maiores segmentos de mielina que nos animais HI (cabeças de seta em C e D). Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 50 µm.

4.2.Histoquímica da NADPH-diaforase

Avaliamos a distribuição da NADPH-d durante o desenvolvimento do cerebelo. Na folha 1 cerebelar aos 9 dias, podemos observar a substância branca (SB), a camada granular interna (cgi), a camada de células de Purkinje (CP) e a camada granular externa (cge) em animais do grupo Sham (Figura 13A). No grupo Sham, a atividade NADPH-d nas células de Purkinje é bastante intensa e encontrada tanto no corpo celular quanto na árvore dendrítica, estando esta individualizada (Figura 13C – setas brancas). Nos animais do grupo HI não foi observada marcação da NADPH-d no corpo celular das células de Purkinje (Figuras 13D – os asteriscos pretos mostram a presumível CP), não sendo possível identificá-las. Observamos, porém, uma marcação difusa e bastante intensa na camada molecular, onde podemos identificar nos animais do grupo Sham a arborização dendrítica das células de Purkinje (Figura 13D). A fim de verificar se as células de Purkinje estavam presentes, fizemos colorações com hematoxilina, onde identificamos estas células morfológicamente (Figuras 13E e F – setas pretas).

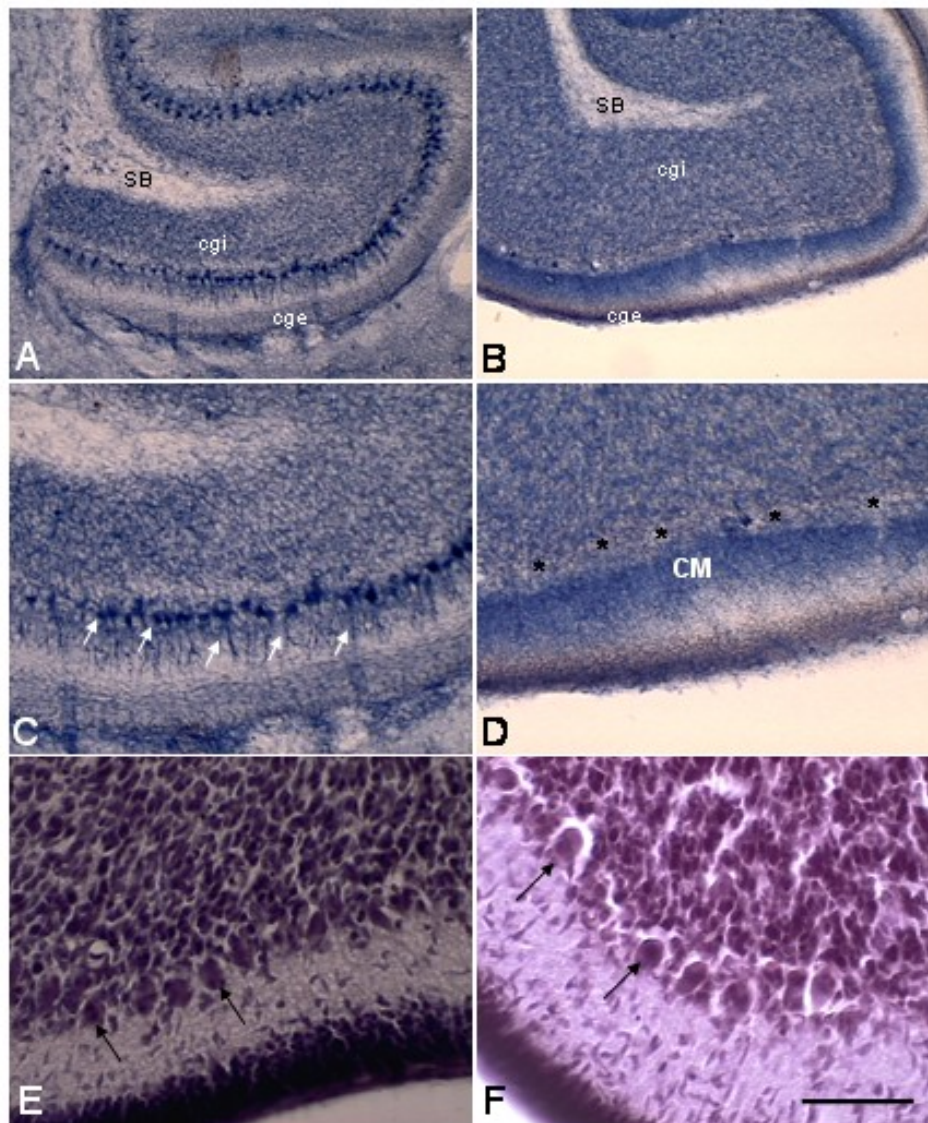


Figura 13: Alteração do padrão da marcação da NADPH-d nas células de Purkinje nos animais Sham (A e C) e nos animais HI (B e D). SB = substância branca; ogi = camada granular interna; oge = camada granular externa. Observar que nos animais do grupo Sham, tanto no corpo celular quanto na árvore dendrítica, existe atividade NADPH-d (C – setas), enquanto nos animais do grupo HI o corpo celular é desprovido da atividade da enzima (D – asteriscos na presumível CP). A CM apresenta uma marcação intensa e difusa em D na região equivalente a da árvore dendrítica das células de Purkinje em C. Em E (sham) e F (HI), a presença das células de Purkinje é confirmada com a coloração de hematoxilina (setas pretas), sendo as células identificadas pela morfologia característica. Barra de calibração: A e B 200µm, C e D 100 µm, E e F 50 µm.

Aos 23 dias, em nenhum dos grupos foi observada marcação para NADPH-d nas células de Purkinje. Os animais dos grupos NM e Sham apresentam a camada molecular com a marcação da NADPH-d difusa (Figuras 14 e 15, A e B), enquanto nos animais HI essa marcação é menos intensa (Figuras 14 e 15, C e D). Os animais dos grupos NM e Sham não apresentaram células NADPH-d+ em nenhuma das folhas 1, 6 e 10. Nos animais HI, nessas mesmas folhas, observamos células com fraca marcação para NADPH-d na camada molecular, sendo a sua maioria próxima à CP (Figura 14F e 15F).

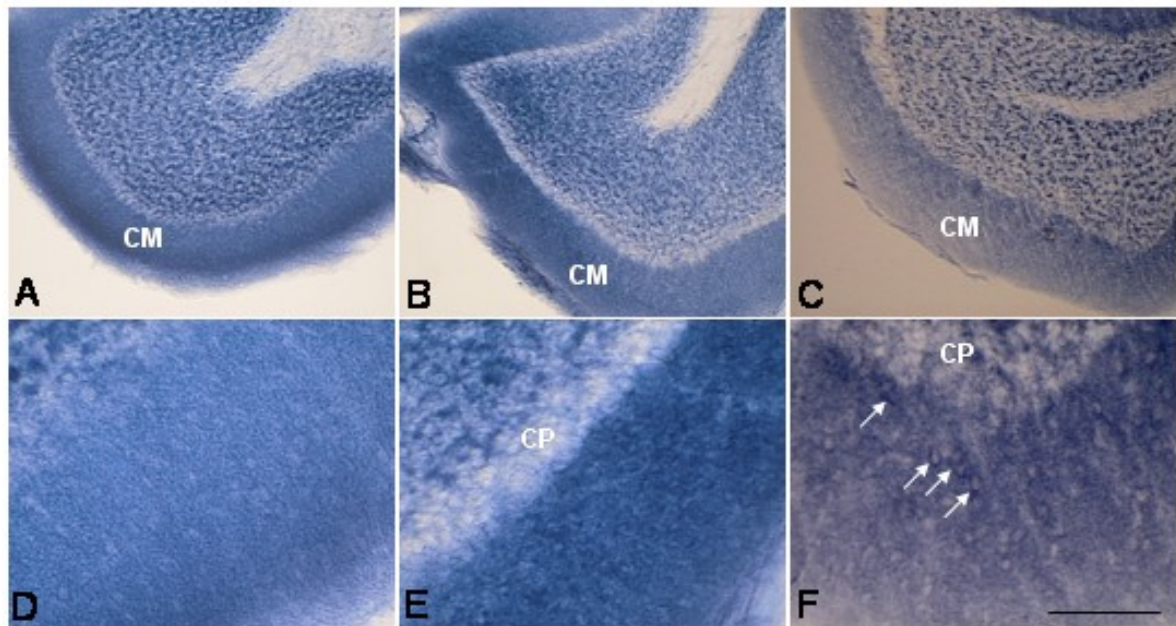


Figura 14: Padrão da marcação NADPH-d na folha 1 cerebelar aos 23 dias. NM(A e D); Sham (B e E); HI(C e F) CM = camada molecular; CP = camada de células de Purkinje. Observar a marcação menos intensa da NADPH-d na camada molecular dos animais HI em relação aos animais NM e Sham. Observar também a presença de células NADPH-d+ (setas) na camada molecular nos animais HI, em geral próximas à CP. Barra de calibração: A, B e C 200 μ m, D, E e F 50 μ m.

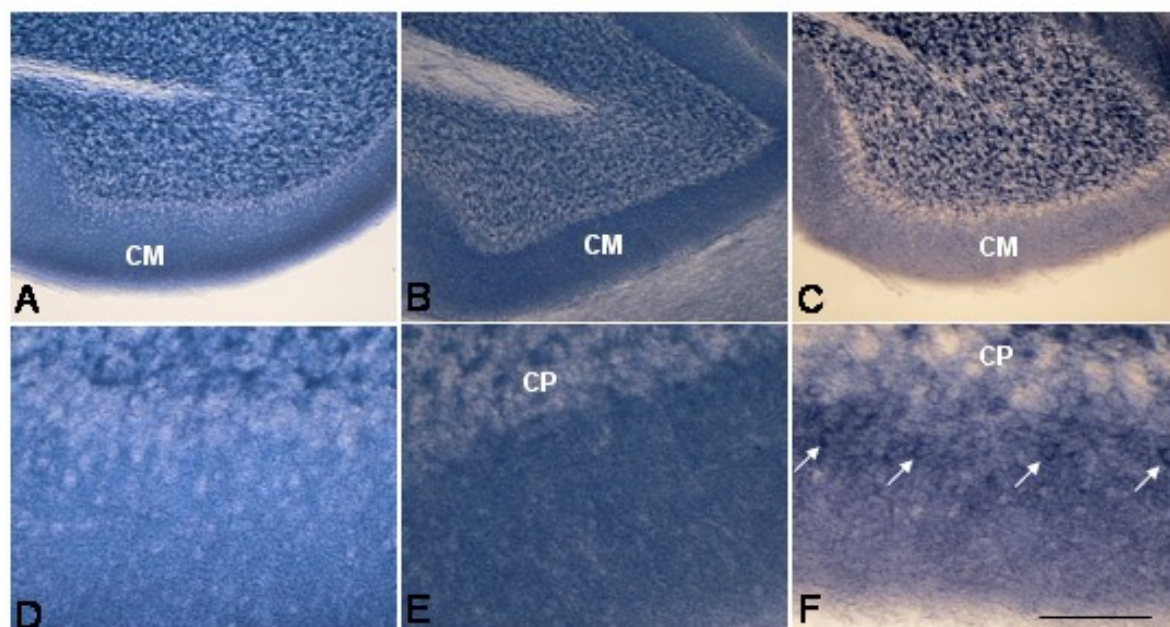


Figura 15: Padrão da marcação NADPH-d na folha 10 cerebelar aos 23 dias. NM (A e D); Sham (B e E); HI (C e F). CM = camada molecular; CP = camada de células de Purkinje. Observar a marcação menos intensa da NADPH-d na camada molecular dos animais HI em relação aos animais NM e Sham. Observar também a presença de células NADPH-d+ (setas) na camada molecular nos animais HI, em geral próximas à CP. Barra de calibração: A, B e C 200 μ m, D, E e F 50 μ m.

Aos 90 dias, não observamos diferenças em relação ao padrão de marcação na camada molecular das folhas 1 e 6 entre os grupos NM/Sham e HI (Figura 17). Não foram observadas células NADPH-d+ na camada molecular nos animais NM e Sham em nenhuma dessas folhas.

Na folha 10 cerebelar observamos uma marcação mais intensa da NADPH-d na camada molecular nos animais do grupo HI. Células NADPH-d+ também foram observadas na camada molecular da folha 10 (Figura 17F – setas; comparar com figura 16F), indicando uma alteração da atividade NADPH-d que se mantém na idade adulta.

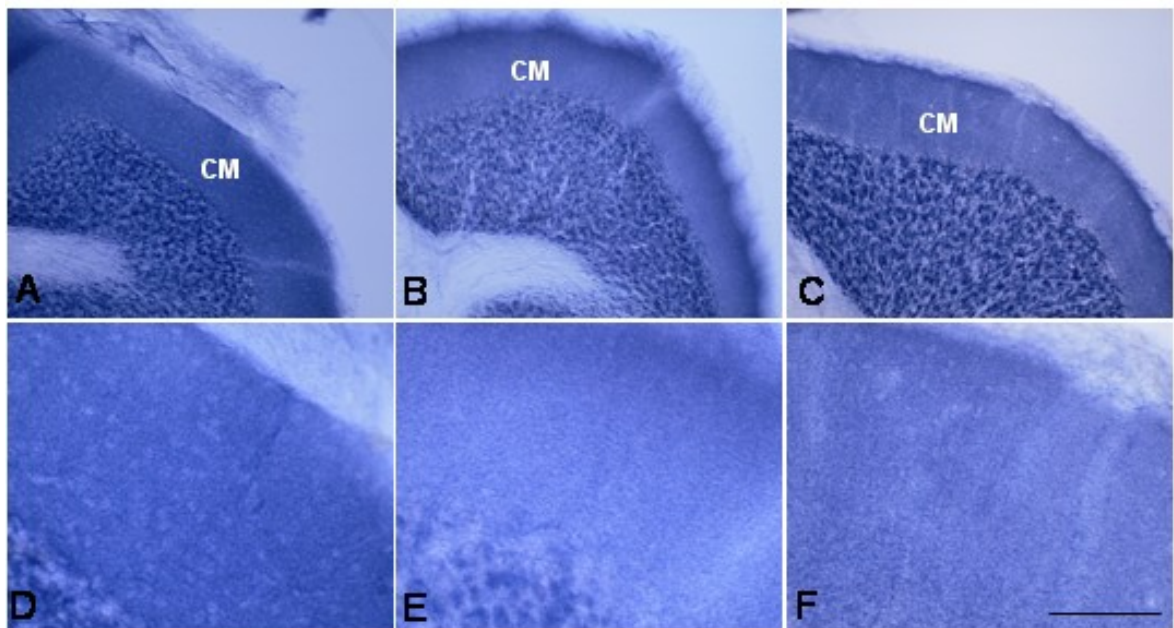


Figura 16: Padrão da marcação NADPH-d na folha 1 cerebelar aos 90 dias. NM (A e D); Sham (B e E); HI (C e F). CM = camada molecular; CP = camada de células de Purkinje. Observar a marcação menos intensa da NADPH-d na camada molecular dos animais HI em relação aos animais NM e Sham. Barra de calibração: A, B e C 200µm, D, E e F 50µm.

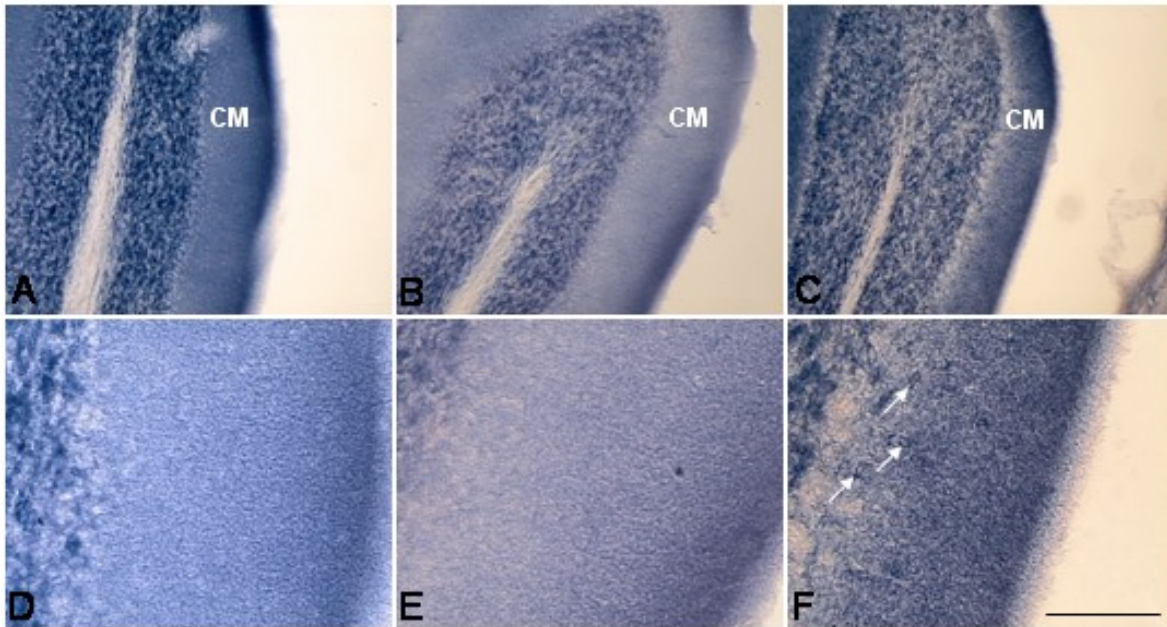


Figura 17: Padrão da marcação NADPH-d na folha 10 cerebelar aos 23 dias. NM (A e D); Sham (B e E); HI (C e F). CM = camada molecular; CP = camada de células de Purkinje. Observar a marcação menos intensa da NADPH-d na camada molecular dos animais HI em relação aos animais NM e Sham. Observar também a presença de células NADPH-d+ (setas) na camada molecular nos animais HI, em geral próximas à CP. Barra de calibração: A, B e C 200 μ m, D, E e F 50 μ m.

Como o ON tem sido relacionado a alterações no desenvolvimento da oligodendroglia em modelos de lesão (Merril et al, 1997), avaliamos o padrão da marcação da NADPH-d na substância branca ao longo do desenvolvimento. As figuras 18 A, B e C mostram a substância branca cerebelar dos animais NM, Sham e HI, respectivamente, na altura da linha média aos 9 dias. Os animais NM apresentaram marcação fraca e restrita a um pequeno número de corpos celulares (Figura 18D - seta). Os animais Sham apresentaram número maior de células marcadas que os animais NM, com marcação mais intensa, mas ainda restrita ao corpo celular (Figura 18E - setas). Os animais do grupo HI apresentaram um número aparentemente maior de corpos celulares marcados que os animais NM e Sham, com marcação mais intensa (Figura 18F - setas).

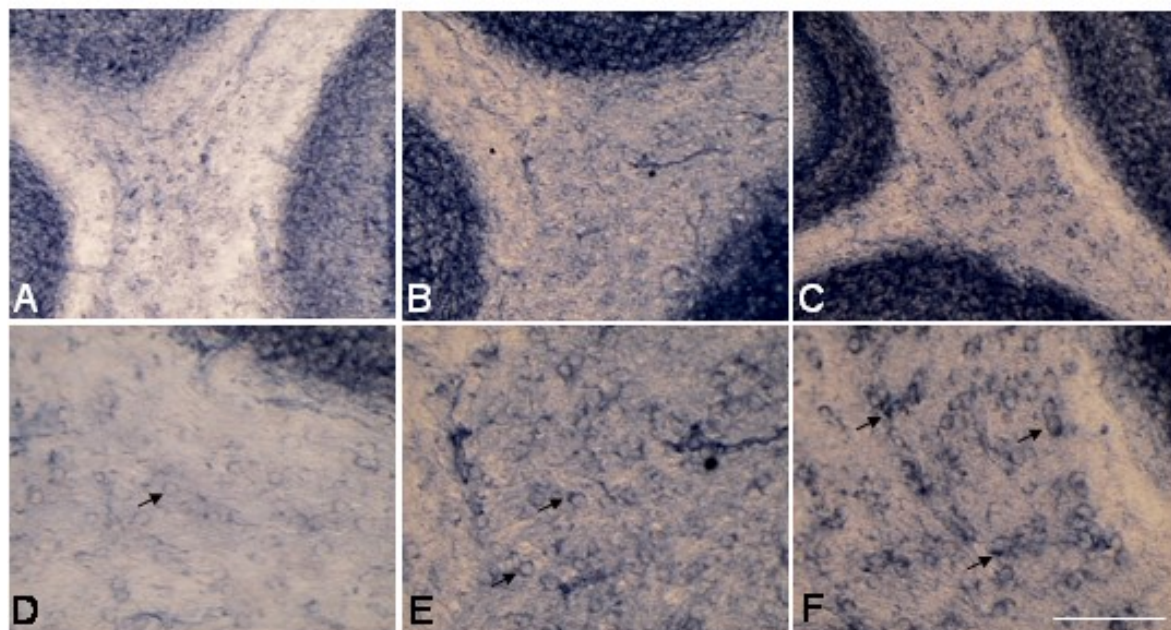


Figura 18: Padrão da marcação NADPH-d na folha substância branca aos 9 dias. NM (A e D); Sham (B e E); HI (C e F). Observar que a marcação da NADPH-d é restrita aos corpos celulares em todos os animais (setas). Nos animais HI a marcação é mais intensa que nos animais Sham. Barra de calibração: A, B e C 100 μ m, D, E e F 50 μ m.

Aos 23 dias os animais NM apresentaram padrão de marcação da NADPH-d na substância branca semelhante ao observado em P9 (Figuras 19 A e D). Os animais Sham apresentaram o mesmo padrão de marcação que os animais NM, com poucas células marcadas, e quando havia marcação esta era fraca (Figuras 19 B e E). Os animais HI apresentaram grande número de células marcadas, com marcação bastante intensa no corpo celular e prolongamentos, quando comparado aos animais NM e Sham (Figuras 19 C e F).

Aos 90 dias não observamos células NADPH-d+ na substância branca de nenhum animal, de nenhum grupo.

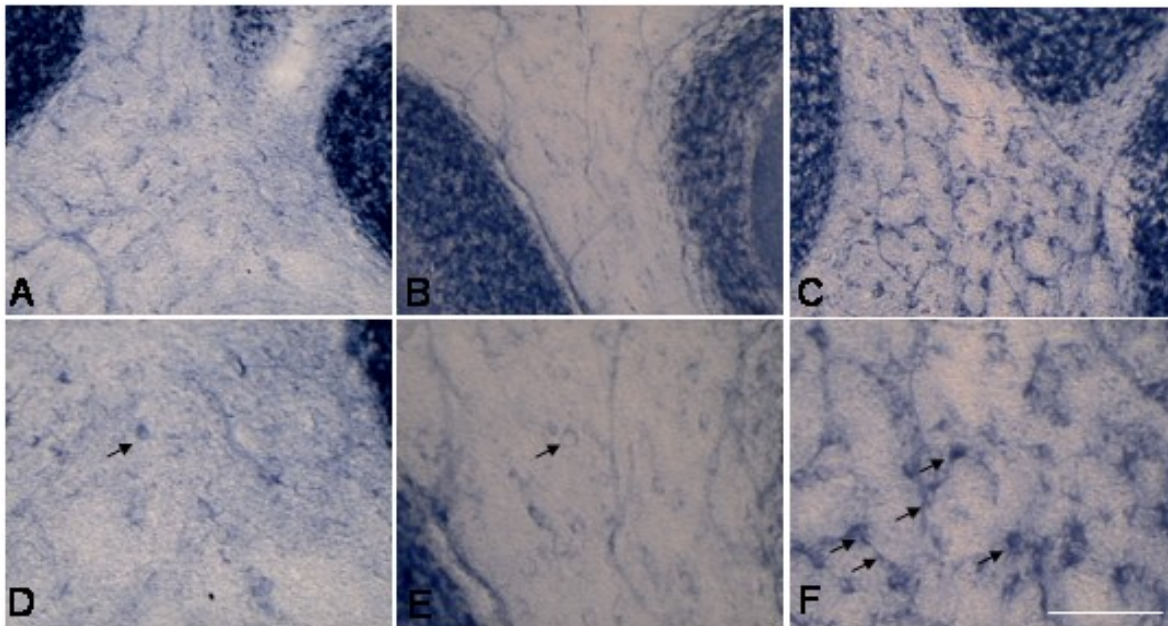


Figura 19: Padrão da marcação NADPH-d na folha substância branca aos 23 dias. NM (A e D); Sham (B e E); HI (C e F). Observar o menor número de células marcadas na substância branca nos animais NM e SH comparado com os animais HI. Observar também a marcação menos intensa da NADPH-d na substância branca dos animais NM e SH (setas), e a intensa marcação das células nos animais HI (setas), tanto nos corpos celulares quanto nos prolongamentos. Barra de calibração: A, B e C 100µm, D, E e F 50µm.

5. Discussão

Nossos resultados demonstraram que uma lesão hipóxica-isquêmica pré-natal é capaz de perturbar o desenvolvimento de células da linhagem oligodendroglial no córtex motor e cerebelo, assim como alterar o padrão de distribuição da NADPH-d no cerebelo ao longo do desenvolvimento.

Robinson e colaboradores, em 2005, observaram diminuição da imunorreatividade à proteína básica de mielina (MBP) no córtex motor de ratos adultos que foram submetidos ao mesmo modelo de hipóxia-isquemia. A MBP é uma proteína importante para o processo de compactação da mielina, sendo encontrada em oligodendrócitos maduros e na mielina compacta. Nossos resultados nos animais adultos do grupo HI se assemelham aos observados por Robinson, visto que a identificação da CNPase revela um menor número de fibras no córtex motor nos animais adultos do grupo HI, indicando que o modelo apresenta resultados semelhantes com outro marcador de oligodendroglia. A CNPase é uma proteína expressa desde precursores de oligodendrócitos até células maduras mielinizantes, sendo então uma boa ferramenta para avaliar alterações na linhagem oligodendroglial.

Nossos resultados também acrescentam informações relevantes para a compreensão dos efeitos de HI sobre o desenvolvimento da oligodendroglia e mielinização. Aos 9 dias, observamos células CNPase+ na região do cingulum nos animais do grupo NM e Sham, enquanto nos animais experimentais estas células não foram observadas nesta região. Os progenitores de oligodendrócitos surgem e proliferam na ZSV e migram radialmente para o córtex subjacente através da substância branca. Estes eventos requerem um grande número de fatores, como fatores tróficos (Vartanian et al., 1999), moléculas na matriz extracelular que funcionem como guia (Echelard et al., 1993; Roelink et al., 1994), interações célula-célula (Raff et al., 1990), entre outros. Diversos estudos mostraram que existem, tanto em animais quanto em humanos que sofreram hipóxia-isquemia, zonas de infarto, caracterizadas por grande número de células mortas e o conteúdo citoplasmático dessas células, além das células do sistema imune

responsáveis pela limpeza local (para revisão ver Dwyer et al, 2008). Nesse sentido, todas essas novas variáveis podem alterar ou mesmo impedir a migração dos progenitores para seus locais de destino. A diminuição da imunorreatividade à CNPase observada no cingulum em animais HI aos 9 dias pode ser consequência de um menor número de células nesta região. Além das possíveis alterações com relação à migração dos progenitores de oligodendrócitos, a morte celular em decorrência da lesão pode contribuir para um menor número de células. Progenitores de oligodendrócitos são especialmente vulneráveis a eventos de HI (Back et al., 2002a,b; Jelinski et al., 1999; Liu et al., 2002; Skoff et al., 2001), provavelmente por não possuírem ainda um repertório enzimático capaz de lidar com o aumento de radicais livres.

Usando o mesmo modelo, Robinson mostrou maior número de células da microglia em animais jovens, mas não em adultos na ZSV. Estas células constituem o sistema imune no SNC (Barron, 1995 para revisão), e produzem óxido nítrico em grande quantidade (Brosnan et al, 1997), sendo que este gás é um importante formador de radicais livres, como o peroxinitrito. Em vários modelos de HI foram relatados aumento no nível da citocinas pró-inflamatórias (Robinson et al, 2005; Baud et al, 1999; Dammann & Leviton, 1997; Nelson e col., 2003), radicais livres (Volpe, 2001 e 2003), necrose (Martin et al, 2000; Ishimaru et al, 1999) e apoptose (Nakajima et al, 2000; Pulera et al, 1998). Todos esses eventos combinados podem diminuir consideravelmente a população de progenitores em proliferação e migração, com danos muitas vezes irreversíveis no desenvolvimento das diferentes linhagens celulares que compõem o sistema nervoso, especialmente a oligodendroglia, já que por volta de E18 há um grande número de progenitores sendo formados na ZSV (Kinney & Back, 1998; Back et al., 2001). O menor número de células progenitoras em proliferação e migração pode explicar o menor número de células na substância branca dos animais jovens e adultos neste modelo de HI.

Os animais dos grupos NM e Sham, aos 23 dias, apresentaram menor número de corpos de oligodendrócitos no cingulum que aos 9 dias. Este resultado era esperado. A CNPase é localizada no corpo celular durante uma fase transitória

do desenvolvimento dos oligodendrócitos, onde são observadas poucas ou nenhuma fibra mielinizada (Barradas et al, 1998). À medida que os prolongamentos vão sendo emitidos, a CNPase é redistribuída para estes, não se localizando mais no corpo celular. Nestes animais, a diferenciação dos oligodendrócitos, com a emissão de inúmeros prolongamentos, faz com que um menor número de corpos celulares sejam imunorreativos, mas também que haja uma intensa imunorreatividade nas fibras na região do cingulum. Nos animais HI encontramos maior número de corpos celulares imunorreativos e menor imunorreatividade nas fibras do cingulum que nos animais NM e Sham. Este resultado mostra um atraso na diferenciação da linhagem oligodendroglial, com redução na distribuição da CNPase para os prolongamentos e retenção no corpo celular.

Nos animais NM e Sham grande número de corpos de oligodendrócitos CNPase+ foram observados nos córtices motor e cingulado, enquanto ainda há um número pequeno de oligodendrócitos imunorreativos nesta região nos animais do grupo HI. Essa alteração pode ser decorrente de um atraso na migração dos progenitores oriundos da ZSV, que ainda não atingiram a região cortical, ou mesmo da redução na proliferação dos progenitores. O córtex motor nos animais NM e Sham apresenta grande número de fibras imunorreativas, e estas são poucas nos animais HI. A diferenciação das células da linhagem oligodendroglial parece estar atrasada também no córtex motor, assim como no cingulum nos animais experimentais.

Aos 90 dias de vida, a menor imunorreatividade à CNPase no córtex motor e substância branca permanece nos animais HI comparados aos animais NM e Sham. O menor número de fibras CNPase+ no córtex motor no animal HI indica que um dano permanente ocorreu nesta região. Oligodendrócitos precursores continuam existindo da ZSV na idade adulta (Wolswijk & Noble, 1989; Wolswijk et al., 1991, Rivera et al, 2008), mas estes aparentemente não são capazes de compensar as perdas sofridas ao longo do desenvolvimento, seja por apoptose, necrose ou por problemas na migração dos progenitores até as regiões alvo.

Esses resultados mostram um dano permanente no processo de mielinização de uma região encefálica importante relacionada ao comportamento motor.

Os neurônios do córtex motor se conectam a diversas estruturas encefálicas, como o cerebelo e a medula (Eccles et al, 1967, Bloedel, 1992), coordenando os diversos movimentos que um indivíduo realiza. Alterações nos neurônios corticais, seja por menor número devido à morte neuronal ou alterações na mielinização, mostradas neste e em outros estudos, que acarretem dificuldades de conexão com as áreas eferentes ao córtex motor podem modular negativamente o desenvolvimento dessas áreas por diminuição das conexões aferentes. O cerebelo, como um centro coordenador da função motora em todos os mamíferos, torna-se então objeto de interesse. A avaliação da oligodendroglia no cerebelo revelou alterações importantes ao longo do desenvolvimento.

Oligodendrócitos no cerebelo surgem a partir de precursores do véu supra-medular e da região adjacente ao IV ventrículo (Reynolds & Wilkin, 1988) e migram para o cerebelo pelo VSM, e posteriormente pela substância branca em desenvolvimento. Após atingir as folhas cerebelares, e migrar para as regiões mais distais, ocupando toda a folha, se diferenciam em oligodendrócitos imaturos e posteriormente em oligodendrócitos maduros mielinizantes, emitindo prolongamentos em direção aos axônios a serem mielinizados. Nossos resultados mostraram que corpos e prolongamentos de oligodendrócitos, assim como segmentos de mielina são encontrados, nos animais NM e Sham aos 9 dias de vida, já muito próximos do limite entre a camada granular e a camada de células de Purkinje na folha 1. Já nos animais HI os corpos e prolongamentos também foram observados, porém muito mais próximos à substância branca, por onde os oligodendrócitos chegam ao cerebelo, indicando um atraso na migração deste tipo celular e conseqüente diferenciação.

Aos 23 dias observamos diminuição da imunorreatividade à CNPase na substância branca da folha 1 nos animais HI, e uma marcação mais intensa nos segmentos de mielina na substância cinzenta. Isto sugere que há uma menor quantidade de fibras embainhadas por prolongamentos CNPase+ na substância branca dos animais HI e que os segmentos de mielina na substância cinzenta

podem não apresentar a compactação normal, ou mesmo serem mais finos que o normal, permitindo um maior acesso do anticorpo à proteína. A diminuição de imunorreatividade na substância branca pode ser devido à menor expressão da proteína ou menor número de oligodendrócitos nesta região, seja por morte dos precursores e/ou problemas durante a migração destes ao seu destino final (como já discutido acima para o córtex motor).

Aos 90 dias, a marcação mais intensa na substância branca dos animais HI sugere um atraso na distribuição desta proteína durante a mielinização, mantendo a imunorreatividade por mais tempo. Nesta idade a mielina já está compactada, e a CNPase é localizada apenas nas regiões de mielina não-compacta, as chamadas alças paranodais, alças interna e externa (Barradas et al, 2000).

Diversos estudos tem mostrado que o ON está relacionado a aumento de morte celular, principalmente da linhagem oligodendroglial, através da formação de radicais livres (Merril et al, 1997). As células desta linhagem, especialmente os progenitores, são vulneráveis a aumento de radicais livres (Hemdan & Almazan, 2007; Juurlink et al, 1998). Decidimos, então, avaliar a distribuição da NADPH-d na substância branca cerebelar. Observamos maior número de células na substância branca nos animais HI que nos animais Sham, e estes também apresentaram maior número de células que os animais NM. Este aumento de células marcadas nos animais Sham em comparação com o NM pode ser devido à manipulação materna com liberação de mediadores inflamatórios e conseqüente microgliose e/ou astrogliose (Hutton et al, 2008, para revisão ver [Jonakait, 2007](#)). Alguns estudos mostram danos no desenvolvimento neural dos fetos pela inflamação materna (Dammann & Leviton, 1997; Yoon et al, 1997). Nos animais HI a marcação mais intensa é um indicativo de que a causa desse aumento é devido à própria lesão a que foram submetidos, e não apenas à manipulação. O ON que estas células produzem nos animais HI pode ser responsável por algumas das alterações observadas nas células da linhagem oligodendroglial neste e em outros estudos ([Blomgren & Hagberg, 2006](#); Brazel et al, 2004; Bolaños & Almeida, 1999)

Aos 23 dias tanto os animais NM quanto os Sham apresentaram poucas células NADPH-d+ na substância branca, e com a marcação bastante fraca. A

diminuição da marcação NADPH-d nos animais Sham provavelmente se deve à diminuição no número de células ativadas, porque apenas a manipulação e a cirurgia não são suficientes para a sustentação dessa ativação. Já os animais HI continuaram apresentando marcação NADPH-d intensa na substância branca, com grande número de corpos celulares e de prolongamentos marcados. A morfologia das células marcadas nesta idade se assemelha a de astrócitos reativos. Assim a lesão causada pelo ON liberado neste período crítico do desenvolvimento pode acarretar aumento de morte celular de outras células, principalmente de oligodendrócitos, e mesmo alterar processos de migração celular, que ainda ocorrem nesta idade (Reynolds & Wilkin, 1988).

Na substância cinzenta das folhas cerebelares, observamos que aos 9 dias de vida as células de Purkinje dos animais HI não apresentam atividade NADPH-d no corpo celular, diferentemente dos animais Sham, que a apresentam tanto no corpo celular quanto na árvore dendrítica em desenvolvimento, estando esta individualizada. Nos animais HI a árvore dendrítica estava fortemente marcada, mas não individualizada. O padrão de marcação da NADPH-d nas células de Purkinje foi alterado pela lesão, possivelmente de modo indireto, através da modificação do microambiente, como o aumento de citocinas e a produção de radicais livres, que já foram mostrados estarem alterados nesse modelo. Nossa hipótese é que exista uma alteração na distribuição da NOS, demonstrada pelas alterações observadas no padrão de marcação da NADPH-d. O aumento de citocinas pró-inflamatórias ocasionado pelo insulto hipóxico-isquêmico pode levar a morte celular na camada granular externa, e estas células mortas podem causar inflamação, levando a excitotoxicidade. Esta excitotoxicidade pode hiper-estimular a NOS na árvore dendrítica, distribuindo a enzima para o local de maior atividade. Pisu e colaboradores, em 2003, mostraram que as células de Purkinje de animais P10 diminuem a expressão da NOS e a atividade NADPH-d em decorrência de uma única injeção de cisplatina. Já outros estudos mostram aumento da atividade NADPH-d em decorrência de lesões químicas, térmicas e mecânicas (Saxon & Beitz, 1994 e 1996, Yan & Garey, 1997). Esses trabalhos mostram que as células de Purkinje não apresentam um padrão de marcação da NADPH-d em resposta a

lesões. Normalmente, as células de Purkinje deixam de apresentar atividade NADPH-d por volta do fim da segunda semana de vida em roedores (Yan et al, 1993). Não sabemos se o que ocorre nesses animais é um atraso ou antecipação da atividade NADPH-d. Torna-se necessária a avaliação de idades anteriores e posteriores ao 9º dia de vida para a confirmação desses resultados.

Aos 23 dias encontramos células NADPH-d+ localizadas na camada molecular das folhas 1, 6 e 10 do cerebelo dos animais HI, e nenhuma célula NADPH-d+ nessa região nos animais NM e Sham. Morfologicamente não conseguimos identificar a natureza dessas células, mas pela localização pode se tratar de células em cesto. Outra hipótese é que sejam células granulares, que por razões desconhecidas interromperam o processo de migração da camada granular externa para a camada granular interna. Durante o desenvolvimento, as células da camada granular externa migram radialmente para o interior do cerebelo para formar a camada granular. Muitas dessas células, no animal controle, são NADPH-d+. Isto sugere um papel importante do NO na migração celular, que termina por volta da terceira semana de vida pós-natal, quando a camada granular externa deixa de existir (Altman & Bayer, 1997). O NO liberado tanto pelas células em migração quanto pelos neurônios de Purkinje pode sinalizar para as células da camada granular externa pelo período de tempo em que a migração deve acontecer. O NO que permanece sendo liberado por estas células, pelo menos até os 90 dias de vida, pode alterar o funcionamento normal do cerebelo, influenciando a comunicação entre as fibras paralelas e as células de Purkinje. Estas possíveis alterações na comunicação podem incluir maior ou menor facilidade para atingir a potencialização de longo prazo (LTP), fenômeno de ocorrência entre células de Purkinje e as fibras paralelas, e é utilizado para explicar mecanismos de aprendizagem do cerebelo, e em que o NO tem um papel fundamental.

Em conjunto nossos resultados mostram que a HI pré-natal afeta o desenvolvimento da oligodendroglia tanto no córtex motor quanto no cerebelo, além da distribuição da NADPH-d no cerebelo. Algumas destas alterações são similares às observadas em crianças que sofreram eventos de HI. Nossos

resultados também são similares aos de Robinson, de 2005, utilizando o mesmo modelo. Portanto, a padronização de um modelo reproduzível, e que mimetiza os efeitos da hipóxia-isquemia pré-natal, ajuda na elucidação dos mecanismos celulares subjacentes às diferentes lesões observadas e é de grande utilidade, pois permite testar diversas estratégias terapêuticas, no intuito de evitar ou reverter os danos observados ao longo do desenvolvimento.

6. Conclusões

- A diferenciação da oligodendroglia está atrasada tanto no cingulum quanto no córtex motor, de acordo com a distribuição de CNPase nos corpos celulares de oligodendrócitos e a menor quantidade de fibras imunorreativas.
- A diferenciação da oligodendroglia está atrasada no cerebelo nos animais HI. A menor imunorreatividade na substância branca e menor número de fibras imunorreativas na substância cinzenta aos 23 e 90 dias de vida são indicativos deste atraso. As alterações observadas em relação à oligodendroglia tanto no cerebelo quanto no córtex motor possivelmente são decorrentes de uma maior morte celular dos progenitores e/ou problemas relacionados à migração destes para seus destinos finais.
- A HI pré-natal altera o número de corpos celulares NADPH-d+ e a intensidade da marcação da NADPH-d na substância branca. Este resultado pode ser devido a um aumento da microgliose e/ou astrogliose causados pela lesão.
- A HI pré-natal altera o padrão de distribuição da NADPH-d nas células de Purkinje nos animais HI aos 9 dias. Estas alterações podem estar relacionadas a um aumento de morte celular na camada granular externa ocasionado pela lesão, o que pode hiper-estimular a NOS e distribuí-la para a árvore dendrítica.
- A HI pré-natal altera a distribuição de células NADPH-d+ na camada molecular do cerebelo nos animais HI ao longo do desenvolvimento. A presença dessas células sugere uma alteração na migração celular.

Perspectivas

- Avaliar a natureza das células NADPH-d+ encontradas na camada molecular e na substância branca.
- Avaliar se a migração celular está alterada em decorrência lesão por HI pré natal, utilizando marcadores celulares específicos para as diferentes linhagens celulares.

7.Referências bibliográficas.

Albus J S. A theory of cerebellar function. *Math. Biosci.* 1971; 10: 25–61.

Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E. Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 1997; 275: 1940–1943.

Altman DI, Young RSK, Yagel SK. Effects of dexamethasone in hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Biol. Neonate.* 1984; 46: 149–156.

Altman J & Bayer SA. *The Development of the Cerebellar System: In Relation to its Evolution, Structure, and Functions.* CRC Press, 1997

Andersson K, Blum M, Chen Y, Eneroth P, Gross J, Herrera-Marschitz M, Bjelke B, Bolme P, Diaz R, Jamison L. Perinatal asphyxia increases bFGF mRNA levels and DA cell body number in the mesencephalon of rats. *Neuroreport* 1995; 6(2): 375-8.

Anderson GW, Schoonover CM, Jones SA. Control of thyroid hormone action in the developing rat brain. *Thyroid.* 2003; 13(11):1039-56.

Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Netto CA. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res.* 2003; 973(2):171-8.

Aylward GP. Cognitive and neuropsychological outcomes: more than IQ scores. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8(4):234-40.

Back S, Luo N, Borenstein N, Levine J, Volpe J, Kinney H. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J. Neurosci.* 2001; 21 (4), 1302– 1312.

Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Volpe JJ, Kinney HC. Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(2):197-211.

Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci.* 2002; 22(2):455-63.

Barradas PC, Gomes SS, Cavalcante LA. Heterogeneous patterns of oligodendroglial differentiation in the forebrain of the opossum *Didelphis marsupialis*. *J Neurocytol.* 1998; 27(1):15-25.

Barradas PC, Ferraz AS, Ferreira AA, Daumas RP, Moura EG. 2'3'Cyclic nucleotide 3'phosphodiesterase immunohistochemistry shows an impairment on myelin compaction in hypothyroid rats. *Int J Dev Neurosci*. 2000; 18(8):887-92.

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

Barron KD. The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci*, 1995; 134 Suppl:57-68

Batteur-Parmentier S, Margail I, Plotkine M. Modulation by nitric oxide of cerebral neutrophil accumulation after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000; 20(5):812-9.

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

Baud O, Daire JL, Dalmaz Y, Fontaine RH, Krueger RC, Sebag G, Evrard P, Gressens P, Verney C. Gestational hypoxia induces white matter damage in neonatal rats: a new model of periventricular leukomalacia. *Brain Pathol*. 2004; 14(1):1-10.

Baumann N & Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in The Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, 2001; 81:871-927.

Bear MF, Connors BW, Paradiso, MA. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Pennsylvania: Williams and Wilkins, 1996

Beray-Berthat V, Croci N, Plotkine M, Margail I. Polymorphonuclear neutrophils contribute to infarction and oxidative stress in the cortex but not in the striatum after ischemia-reperfusion in rats. *Brain Res*. 2003; 987(1):32-8.

Ben-Hur T, Rogister B, Murray K. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursor of the postnatal brain. *Journal of Neuroscience*. 1998; 18:5777-5788.

Bishop A & Anderson JE. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. *Toxicology*. 2005; 208(2):193-205. Review.

Bjelke B, Andersson K, Ogren SO, Bolme P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res*. 1991; 543(1):1-9.

Bloedel JR. Functional heterogeneity with structural homogeneity: how does the cerebellum operate? *Behav. Brain Sci.* 1992; 15:666–678.

Blomfield S & Marr D. How the cerebellum may be used. *Nature* 1970; 227: 1224–1228.

Blomgren K & Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(3): 388-97.

Bolaños JP & Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(2-3):415-36. Review.

Brazel CY, Rosti RT 3rd, Boyce S, Rothstein RP, Levison SW. Perinatal hypoxia/ischemia damages and depletes progenitors from the mouse subventricular zone. *Dev Neurosci.* 2004; 26(2-4):266-74.

Bredt DS & Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(2):682-5.

Brosnan CF, Lee SC, Liu J. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in human glia: implications for inflammatory central nervous system diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 1997; 25:679– 683.

Burke RE, 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.* 1991; 58(2):171-9.

Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Oct;8(10):766-75.

Chen SH & Desmond JE. Cerebrocerebellar networks during articulatory rehearsal and verbal working memory tasks. *Neuroimage* 2005; 24: 332–338.

Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probstak J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996; 16(4):578-84.

Clarissa LW, Ann MC, Craig CG. Mechanisms of Vertebrate Synaptogenesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 2005; 28:251–74

Dammann O & Leviton A. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr. Res.* 1997; 42(1): 1– 8.

Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(17): 7797-801.

Decker L & Ffrench-Constant C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *Journal of Neuroscience*, 2004; 24(15): 3816-3825.

Del Rio Hortega. Histogenesis y evolución normal; exodo y distribución regional de la microglia. *Memor Real Soc Esp Hist Nat*. 1921; 14: 5-122.

Desmond JE, Gabrieli JD, Glover GH. Dissociation of frontal and cerebellar activity in a cognitive task: evidence for a distinction between selection and search. *Neuroimage* 1998; 7: 368–376.

Derrick M, Luo NL, Bregman JC, Jilling T, Ji X, Fisher K, Gladson CL, Beardsley DJ, Murdoch G, Back SA, Tan S. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci*. 2004; 24: 24–34.

Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997; 17: 5046–5061.

Dwyer TA, Earl DE, Wang L. The utility of a new in vitro model of the stroke penumbra. *J Neurosci*. 2008; 28(26):6537-8. Review.

Edwards TM & Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007; 31(3): 413-25.

Echelard Y, Epstein DJ, St JB, Shen L, Mohler J, McMahon JA. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 1993; 75: 1417–1430.

Eccles JC, Ito M, Szentagothai J. *The Cerebellum as a Neuronal Machine* Springer, New York, 1967.

Fiez JA, Raife EA, Balota DA, Schwarz JP, Raichle ME, Petersen SE. A positron emission tomography study of the short-term maintenance of verbal information. *J Neurosci*. 1996; 16(2): 808-22.

Ferriero DM, Arcavi LJ, Sagar SM, McIntosh TK, Simon RP. Selective sparing of NADPH-diaphorase neurons in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*. 1988; 24:670–676.

Ferriero DM, Sheldon RA, Black SM, Chuai J. Selective destruction of nitric oxide synthase neurons with quisqualate reduces damage after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 1995; 38(6): 912-8.

Filloux FM, Adair J, Narang N. The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 1996; 94: 81-91.

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

Furchgott RF & Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373-6.

Gordon KE, Simpson JS, Statman D, Silverstein FS. Effects of perinatal stroke on striatal amino acid efflux in rats studied with in vivo microdialysis. *Stroke* 1991; 22: 928-932.

Gould E, Woolley CS, McEwen BS. The hippocampal formation: Morphological changes induced by thyroid, gonadal and adrenal hormones. *Psychoneuroendocrinology* 1991; 16: 67-84.

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

de Haan M, Wyatt JS, Roth S, Vargha-Khadem F, Gadian D, Mishkin M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci*. 2006; 9(4): 350-8.

Hagberg H, Gilland E, Diemer NH, Andine P. Hypoxia/ischemia in the neonatal rat brain: histopathology after post-treatment with NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *Biol Neonate* 1994; 66: 205-213.

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

Hart JK, Richardson WD, Bolsover SR, Raff MC. PDGF and intracellular signaling in the timing of oligodendrocyte differentiation. *Journal of Cell Biology* 1989; 109: 3411-3417.

Hemdan S & Almazan G. Deficient peroxide detoxification underlies the susceptibility of oligodendrocyte progenitors to dopamine toxicity. *Neuropharmacology*. 2007; 52(6):1385-95.

Hill A. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatric Neurology* 1991; 7: 317–325.

Hull EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Res. Bull.* 1997; 44 (4): 327-333.

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

Hutton LC, Castillo-Melendez M, Smythe GA, Walker DW. Microglial activation, macrophage infiltration, and evidence of cell death in the fetal brain after uteroplacental administration of lipopolysaccharide in sheep in late gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198:117.e1-117.e11.

Iadecola C & Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr Opin Neurol.* 2001; 14(1):89-94.

Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der K, Dikranian TC, Sesma MA, Olney JW. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp. Neurol.* 1999; 408: 461– 476.

Itoh T, Beesley J, Itoh A, Cohen A, Kavanaugh B, Coulter D, Grinspan J, Pleasure D. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J Neurochem* 2002; 81: 390– 402.

Ivry RB & Baldo JV. Is the cerebellum involved in learning and cognition? *Curr. Opin. Neurobiol* 1992; 2: 212–216.

Jelinski SE, Yager JY, Juurlink BH. Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res.* 1999; 815(1):150-3.

Jensen AB & Raff MC. Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture. *Dev Biol* 1997; 188: 267–279.

Jonakait GM. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* 2007; 25(7):415-25. Review.

Juurlink BH, Thorburne SK, Hertz L. Peroxide-scavenging deficit underlies oligodendrocyte susceptibility to oxidative stress. *Glia.* 1998; 22(4):371-8.

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

Kavanaugh B, Beesley J, Itoh T, Itoh A, Grinspan J, Pleasure D. Neurotrophin-3 (NT-3) diminishes susceptibility of the oligodendroglial lineage to AMPA glutamate receptor-mediated excitotoxicity. *J. Neurosci. Res.* 2000; 60: 725–732.

Kim S G, Ugurbil K, Strick PL. Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science* 1994; 265: 949–951.

Kim T & Pfeiffer ST. Myelin glycosphingolipids/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNPase and MOG. *Journal of Neurocytology* 1999; 28:281-293.

Kinney HC & Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin. Pediatr. Neurol* 1998; 5(3):180-9.

Koibuchi N & Chin WW. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:123–128.

Kuban KC & Leviton A. Cerebral palsy. *N Engl J Med.* 1994; 20; 330(3):188-95. Review.

Larsen WJ. Human embryology. London: Churcill Livingstone, 1993.

Lee P, Son D, Lee J, Kim YS, Kim H, Kim SY. Excessive production of nitric oxide induces the neuronal cell death in lipopolysaccharide-treated rat hippocampal slice culture. *Neurosci Lett.* 2003; 25; 349(1):33-6.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell in the rat cerebellum. *Cell* 1990; 7:307-321.

Le Mellédo JM, Mahil N, Baker GB. Nitric oxide:a key player in the relation between cardiovascular disease and major depressive disorder? *J Psychiatry Neurosci.* 2004; 29(6):414-6.

Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960; 36:1-17.

LeVine SM & Goldman JE. Embryonic divergence of oligodendrocyte and astrocyte lineages in developing rat cerebrum. *J Neurosci.* 1988; 8(11):3992-4006.

Liu Y, Silverstein FS, Skoff R, Barks JD. Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatr Res.* 2002; 51(1):25-33.

Ludwin SK. The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997; 56(2):111-24. Review.

Lyons SA & Kettenmann H. Oligodendrocytes and microglia are selectively vulnerable to combined hypoxia and hypoglycemia injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998; 18(5):521-30.

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

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

Marr D. A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol.* 1969; 202: 437–470.

Mandai K, Matsumoto M, Kitagawa K, Matsushita K, Ohtsuki T, Mabuchi T, Colman DR, Kamada T, Yanagihara T. Ischemic damage and subsequent proliferation of oligodendrocytes in focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 1997; 77(3): 849-61.

Mark KS, Burroughs AR, Brown RC, Huber JD, Davis TP. Nitric oxide mediates hypoxia-induced changes in paracellular permeability of cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(1): 174-80.

Martin LJ, Brambrink AM, Price AC, Kaiser A, Agnew DM, Ichord RN, Traystman RJ. Neuronal death in newborn striatum after hypoxia– ischemia is necrosis and evolves with oxidative stress, *Neurobiol. Dis.* 2000; 7: 169– 191.

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med.* 1998; 4(3): 291-7.

Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie–Graham A, Dopp JC, Ding M, Griscavage J, Ignarro LJ, and Lowenstein CJ. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997; 48: 372–384.

Miller RH. Regulation of Oligodendrocyte Development in the Vertebrate CNS. *Progerss in Neurobiology* 2002; 67: 451-467.

Nakajima W, Ishida A, Lange MS, Gabrielson KL, Wilson MA, Martin LJ, Blue ME, Johnston MV. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci.* 2000; 20(21):7994-8004.

Nelson K, Dambrosia J, Grether J, Phillips T. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 665–675.

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

Nishiyama A, Lin X-H, Giese N. Colocalization of NG-2 proteoglycan and

PDGF α -receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, 1996; 43: 299-314.

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

Pantoni L, Garcia JH, Gutierrez JA. Cerebral white matter is highly vulnerable to ischemia. *Stroke*. 1996; 27(9):1641-7.

Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margail I, Plotkine M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21(1): 15-21.

Paxinos G & Watson C. The rat brain – In stereotaxic coordinates. Fourth Edition, Academic Press. USA, 1998

Penfield W. Neuroglia: normal and pathological. *Cytology and Cellular Pathology in the Nervous System*, 1932; 2: 421-479.

Perlman J, Risser R, Boyles R. Bilateral cystic periventricular leukomalacia in the premature infant: associated risk factors. *Pediatrics* 1996; 97(6): 822–827.

Peters A, Palay S, Webster HF. *The Fine Structure of the Nervous System: the Neuron and the Supporting Cells*. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 1991.

Petito CK, Olarte JP, Roberts B, Nowak TS Jr, Pulsinelli WA. Selective glial vulnerability following transient global ischemia in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; 57(3): 231-8.

Pierrat V, Haouari N, Liska A, Thomas D, Subtil D, Truffert P, on behalf of the Groupe d'Etudes en Epidemiologie Perinatale. Prevalence, causes and outcomes at 2 years of age of newborn encephalopathy: a populationbased study. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* 2005; 90: 257–261.

Pisu MB, Guioli S, Conforti E, Bernocchi G. Signal molecules and receptors in the differential development of cerebellum lobules. Acute effects of cisplatin on nitric oxide and glutamate systems in Purkinje cell population. *Developmental Brain Research* 2003; 145: 229– 240.

du Plessis AJ & Johnston MV. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. Cellular mechanisms and potential strategies for neuroprotection. *Clin Perinatol*. 1997; 24(3):627-54. Review.

Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, Yang F, Cole GM, Wasterlain CG. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. *Stroke*. 1998; 29(12): 2622-30.

Pundik S, Robinson S, Lust WD, Zechel J, Buczek M, Selman WR. Regional metabolic status of the E-18 rat fetal brain following transient hypoxia/ischemia. *Metabolic Brain Disease*. 2006; 21(4):309-17.

Raff MC. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science* 1989; 243: 1450-1455.

Raff MC, Hart IK, Richardson WD, Lillien LE. An analysis of the cell-cell interactions that control the proliferation and differentiation of a bipotential glial progenitor cell in culture. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1990;55:235-8.

Reynolds R & Wilkin G. Development of macroglial cells in rat cerebellum II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. *Development* 1988; 102: 409-425.

Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*. 1981; 9(2):131-41.

Rivera FJ, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Sanchez R, Huber C, Weidner N, Bogdahn U, Aigner L. Oligodendrogenesis of Adult Neural Progenitors: Differential Effects of Ciliary Neurotrophic Factor and Mesenchymal Stem Cell Derived Factors. *J Neurochem*. 2008. [Epub ahead of print]

Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, Dechant A, Tabrizi N, Bucek M, Lust D, Miller RH. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol Dis*. 2005; 18(3): 568-81.

Roelink H, Ausgsburger A, Heemskerk J, Korzh V, Norlin S, Ruiz IAA, Tanabe Y, Placzek M, Jessel TM. Floor plate and motor neuron Induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 1994; 76: 761–775.

Romijn HJ, Hanszen AWJW, Van Voorst MJD, Buijs RM, Balazs R, Swaab DF. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. The proportion of GABA-immunoreactive neurons in the cerebral cortex of the rat. *Brain Res*. 1992; 592:17–28.

Saxon DW & Beitz AJ. Induction of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brainstem trigeminal system resulting from cerebellar lesions. *J Comp Neurol*. 1996; 371(1): 41-71.

Saxon DW & Beitz AJ. Cerebellar injury induces NOS in Purkinje cells and cerebellar afferent neurons. *Neuroreport*. 1994; 5(7):809-12.

Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2004; 16: 367–378.

Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(6):1115-26. Review.

Silverstein FS & Johnston MV. Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol.* 1984; 15:342–347.

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

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

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

Skoff RP, Bessert DA, Barks JD, Song D, Cerghet M, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci.* 2001; 19(2): 197-208.

Spinillo A, Capuzzo E, Stronati M, Ometto A, De Santolo A, Acciano S. Obstetric risk factors for periventricular leukomalacia among preterm infants. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 1998; 105: 865–871.

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

Tan S, Zhou F, Nielsen VG, Wang Z, Gladson CL, Parks DA. Sustained hypoxia-ischemia results in reactive nitrogen and oxygen species production and injury in the premature fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1998 ; 57(6): 544-53.

Tanaka M, Yoshida S, Yano M, Hanaoka F. Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport.* 1994; 5(16): 2049-52.

Tekkok S & Goldberg M. AMPA/kainate receptor activation mediates hypoxic oligodendrocyte death and axonal injury in cerebral white matter. *J. Neurosci.* 2001; 15: 4237– 4248.

Terzidou V & Bennett P, Maternal risk factors for fetal and neonatal brain damage. *Biol. Neonate* 2001; 79: 157–162.

Thornberg E, Thiringer K, Odeback A, Milsom I. Birth asphyxia: incidence, clinical course and outcome in a Swedish population. *Acta Paediatr.* 1995; 84(8): 927-32.

Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res.* 1999; 55(2):158-63. Review.

Vartanian T, Fischbach G, Miller R. Failure of spinal cord oligodendrocyte development in mice lacking neuregulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(2):731-5.

Verma U, Tejani N, Klein S, Reale M, Beneck D, Figueroa R, Visintainer P. Obstetric antecedents of intraventricular hemorrhage and periventricular leukomalacia in the low-birth-weight neonate. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997; 176: 275– 281.

Venerosi A, Valanzano A, Cirulli F, Alleva E, Calamandrei G. Acute global anoxia during C-section birth affects dopamine-mediated behavioural responses and reactivity to stress. *Behav Brain Res.* 2004; 154(1): 155-64.

Venerosi A, Cutuli D, Chiarotti F, Calamandrei G. C-section birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats. *Behav Brain Res.* 2006; 15;168(1):56-63.

Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 1992; 46(4):755-84.

Volpe J. Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr. Res.* 2001; 50(5): 553– 562.

Volpe J. Cerebral white matter injury of the premature infant—More common than you think. *Pediatrics* 2003; 112(1): 176– 180.

de Vries H, de Jonge JC, Schrage C, van der Haar ME, Hoekstra D. Differential and cell development-dependent localization of myelin mRNAs in oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 1997; 47(5):479-88.

Yan XX & Garey LJ. NADPH-diaphorase reactivity is reduced in the molecular layer but increased in the granular layer of primate cerebellum after prolonged anaesthesia. *Neurosci Lett.* 1997; 230(2):125-8.

Yan XX, Jen LS, Garey LJ. Parasagittal patches in the granular layer of the developing and adult rat cerebellum as demonstrated by NADPH-diaphorase histochemistry. *Neuroreport.* 1993; 4(11):1227-30.

Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, Kim IO Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(1): 19-26.

Zagon IS, McLaughlin PJ, Smith S. Neural populations in the human cerebellum: estimations from isolated cell nuclei. *Brain Res.* 1977; 127: 279–282.

Wolswijk G & Noble M. Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* 1989; 105: 387–400.

Wolswijk G, Riddle PN, Noble M. Platelet derived growth factor is mitogenic for O-2A adult progenitor cell. *Glia* 1991; 4: 495–503.

Wu YW & Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA.* 2000; 284(11):1417-24. Review.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)