

AMRITA JHA KUMAR

INFLUÊNCIA DE GÊNERO NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E SENSORIO
MOTOR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ANÓXIA NEONATAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociência e Comportamento
do Instituto de Psicologia da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

São Paulo
2017

AMRITA JHA KUMAR

INFLUÊNCIA DE GÊNERO NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E
SENSÓRIO MOTOR DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À ANÓXIA
NEONATAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:
Neurociência e Comportamento
Orientadora: Profa.
Dra. Maria Inês Nogueira

Versão original.

São Paulo
2017

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo**

Kumar, Amrita Jha.

**Influência de gênero no desenvolvimento somático e
sensório motor de ratos wistar submetidos à anóxia neonatal
/ Amrita Jha Kumar; orientadora Maria Inês Nogueira. -- São
Paulo, 2016.**

80 f.

**Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em
Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e
Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade
de São Paulo.**

**1. Anoxia global 2. Desenvolvimento 3. Córtex sensorial
motor 4. Diferenças de sexo I. Título.**

RB150.A67

AGRADECIMENTOS

Difícil reduzir meus agradecimentos a apenas uma folha, pois todos que fizeram parte da minha vida, nesse período, contribuíram de alguma forma para o resultado final.

Sinto-me honrada de ter sido aluna da Prof.^a Dra. Maria Inês Nogueira a qual agradeço pela oportunidade de trabalho, paciência e dedicação constantes.

Agradeço também à Dr.^a Sílvia Honda Takada, por sempre se dispor a me ensinar e auxiliar quando necessário dispondo de seu valioso tempo e conhecimentos e pela amizade.

Agradeço, também, à Aline Vilar Machado pela indispensável e significativa contribuição nos experimentos de comportamento animal.

Agradeço à Lívia Clemente Teixeira, pela atenção carinhosa em vários momentos e pela companhia.

Agradeço aos demais amigos que conheci no laboratório, Carlos Alexandre dos Santos Haemmerle, Mike Yoshio Hamasaki, Luana angelica, Natalia Andrea Cruz Ochoa, Bruna Petrucelli Arruda pela amizade, pelos bons momentos e pelo espírito cooperativo.

Agradeço à técnica Sra Kelly Patrícia Nery Borges pelo apoio nos experimentos, na adaptação ao laboratório e e mesmo ao país e universidade.

Agradeço, também de forma especial, ao Prof. Jackson Cioni Bittencourt e à Professora Luciane Valéria Sitta pelo compartilhamento do criostato; do sistema de estereologia e do programa Stereo Investigator.

Agradeço ao Prof. Gilberto Fernando Xavier pela colaboração e disponibilização do laboratório para manutenção e realização de experimentos com os animais

Agradeço aos alunos do Laboratório de Neurociências e Comportamento do IB-USP Mateus Torres Cruz, Priscila Moreira e Victor Daniel Vasquez Matsuda pelo auxílio em diversos momentos no laboratório.

Agradeço também ao técnico de biotério Manoel Ferreira de Britto, pelo cuidado e atenção com os animais.

Agradeço imensamente a Sra Rosana Duarte Prisco, pelo tratamento e análises estatísticas, sua dedicação e empenho em esclarecê-los foram significativos.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Comportamento, Profa. Dra Miriam Garcia Mijares e Prof. Dr. Marcelo Fernandes da Costa, pelo apoio durante o desenvolvimento deste estudo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela confiança e apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

Agradeço aos animais que foram utilizados nessas pesquisas, que contribuíram às descobertas aqui apresentadas, devo a eles grande parte dessa conquista.

Agradeço aos cientistas que se dedicam a estudar nosso mundo incrível e repleto de surpresas, e de cujos conhecimentos muito me beneficiei.

Por fim, agradeço à minha eterna família: Satish Kumar, Shrija Mishra, Aaditya Mishra que torceram por mim durante essa jornada e compreenderam minhas ausências.

O que eu faço,
é uma gota no meio de um oceano.
Mas sem ela,
o oceano seria menor.

Madre Teresa de Calcutá

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenvolvimento cerebral em roedores e humanos	18
Figura 2	Processos do desenvolvimento neural em humanos.	19
Figura 3	A influência da epigenética nas diferenças de sexo no cérebro.	24
Figura 4	Delineamento Experimental do estudo dos efeitos da anóxia neonatal	32
Figura 5	Sistema de anóxia	33
Figura 6	Esquema Esquema dos níveis das secções utilizadas para as reações de Nissl e a contagem por estereologia	35
Figura 7	Fotomicroscopia de campo claro de corte coronal do encéfalo de rato	37
Figura 8	Avaliação da densidade do Córtex Motor Primário em corte coronal	53
Prancha I	Crescimento somático	42
	Figura A- compração de peso corporal	
	Figura B- Eixo latero-lateral de crânio	
	Figura C- Eixo ântero-posterior do crânio	
	Figura D- Eixo longitudinal do corpo	
Prancha II	Desenvolvimento Ontogenético	45
	Figura A- Desdobramento do pavilhão auricular	
	Figura B- Abertura do canal auditivo	
	Figura C- Aberturas dos olhos	
	Figura D- Erupção dos incisivos inferiores	
	Figura E- Erupção dos incisivos superiores	
Prancha III	Reflexos Sensório-Motores	48
	Figura A- Recuperação do decúbito	
	Figura B- Aceleração	
	Figura C- Prensão Palmar	
	Figura D- Colação pelas vibrissas	
	Figura E- Resposta de sust	
	Figura F- Geotaxia Negativa	
	Figura G- Aversão ao precipício	
Prancha IV	Densidade da células no córtex sensório-motor	50
	Figura A- Quantidade da células na M2	
	Figura B- Quantidade da células na M1	
	Figura C- Quantidade da células na S1HL	
	Figura D- Quantidade da células na S1FL	
		59

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1	Metodologia - Parametros para avaliação Somáticas.	28
Tabela 2	Metodologia-Parâmetros para avaliação ontogenético.	28
Tabela 3	Metodologia-Parametros para avaliação reflexos sensório motores.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Aceleração	EII	Irrupção dos incisivos inferiores
ACA	Abertura do conduto auditivo	EIS	Errupção dos incisivos superiores
AF	Anóxia Fêmea	LEC	Labirinto Em Cruz Elevado
AM	Anóxia Macho	LSBP	Lesão da Substância Branca Periventricular
ANOVA	Analyse de variação	MWM	Labirinto de Aquático de Morris
AO	Abertura dos olhos	NO	Óxido Nítrico
AP	Aversão ao precipício	PBM	Proteína Básica Mielina
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	PBS	Phosphate buffered saline
CA1	Região Corno de Amon 1	PC	Peso corporal
CA3	Região Corno de Amon 3	pH	Potencial hidrogeniônico
CF	Controle Fêmea, grupo	PP	Preensão palmar
CM	Controle Macho, grupo	RD	Resposta ao decúbito
DG	Giro Dentado	ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
DPA	Desdobramento do pavilhão auditivo	RS	Resposta ao susto
DPX	Dybutil phthalate in xylene	SNC	Sistema Nervoso Central
EAPC	Eixo ântero-posterior da cabeça	ZSV	Zona Subventricular
EL	Eixo longitudinal		
ELLC	Eixo látero-lateral da cabeça		
EP	Erro padrão		
GN	Geotaxia negativa		
HI	Hipóxia Isquemia		
HPA	Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal		

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	pág. 13
1.1	Anóxia Neonatal	pág. 14
1.2	Sistema Nervoso Central e Privação de Oxigênio	pág. 15
1.3	Desenvolvimento Cerebral em Roedores e Humanos	pág. 16
1.3.1	Período crítico de injúria e Proliferação celular	pág. 17
1.3.2	Diferenças de gênero no Sistema Nervoso	pág. 19
2	JUSTIFICATIVA	pág. 28
3	OBJETIVOS	pág. 28
4	MATERIAIS E MÉTODOS Objetivos específicos	pág. 28
4.1	Animais de experimentação	pág. 30
4.2	Grupos experimentais	pág. 31
4.3	Condições experimentais	pág. 32
4.4	Processamento do material biológico	pág. 33
4.5	Quantificação estereológica	pág. 35
4.6	Avaliação do crescimento somáticos	pág. 36
4.7	Início dos reflexos neonatais	pág.37
5	RESULTADOS	pág.38
5.1	Desenvolvimento somática	pág.39
5.2	Desenvolvimento ontogenético	pág.43
5.3	Avaliação Reflexos sensorio-motores	pág.46
5.3.1	Recuperação de decúbito	pág.46
5.3.2	Aceleração	pág.46
5.3.3	Preensão Palmar	pág.47
5.3.4	Colocação pelas vibrissas	pág.47
5.3.5	Reposta ao susto	pág.48
5.3.6	Geotaxia negativa	pág.48
5.3.7	Aversão ao precipício	pág.49
6	DISCUSSÃO	pág.54
7	CONCLUSÕES	pág.62
8	REFERÊNCIAS	pág.63

RESUMO

Na atualidade, uma das causas importantes de lesão encefálica em neonatos é a anóxia neonatal. Este é um problema grave nos serviços de perinatologia dos hospitais em todo o mundo sendo ainda pior em países subdesenvolvidos, devido à carência de precauções e cuidados requeridos. Modelos animais de anóxia vêm sendo empregados para avaliar seus efeitos, tanto em nível neurológico, como em nível comportamental. A anóxia neonatal tem sido estudada pelo laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com modelos de estudo já desenvolvidos, adaptados e validados. Para investigar se a anóxia neonatal afeta o desenvolvimento motor somático e sensorial, ratos foram submetidos a um modelo não invasivo de anóxia global (Takada et. al., 2011). Ratos Wistar com 30 h de idade (6-8 gramas), machos e fêmeas, foram expostos por 25 minutos a gás nitrogênio 100% num fluxo de 3L/min, pressão 101.7 kPa e temperatura de 37°C em câmara semi-hermética de policarbonato. O grupo controle foi submetido às mesmas condições porém com o ar ambiente normal. Os animais foram avaliados durante o período de aleitamento (P2 a P21) quanto a parâmetros do desenvolvimento somático; desenvolvimento ontogenético e quanto a reflexos sensorio motores. Os resultados indicaram que o grupo Anoxia macho(AM) apresentou aumento no peso corporal {AM(42.25±3.62);CM(38.76±5.60);AF(40.64±5.08);CF(41.33±5.45)} e diminuição do eixo longitudinal do corpo {AM(10.15±0.27);CM(10.39±0.50);AF(9.82±0.44);CF(10.82±0.46)} em relação ao grupo Controle macho(CM) e Anoxia fêmea(AF), AF foi menor em relação ao Controle fêmea (CF). AM apresentou maior eixo látero-lateral do crânio em relação CM e AF {AM (3.18 ±0.10); CM (3.17 ±0.13); AF(3.06 ±0.16); CF(3.00 ±0.15)} No desenvolvimento ontogenético houve retardo na abertura do canal auditivo {AM (13.79± 0.58); CM (13.75±0.83); AF(14.21±1.01); CF(13.36±0.50)} e abertura dos olhos {AM (14.00± 0.88); CM (14.64±1.28); AF(15.14±0.86); CF(13.79±0.42)} no grupo AF em relação a CF e AM, mas no grupo AM não houve diferença significativa. Na erupção dos incisivos superiores {AM (10.79± 0.43); CM(11.71±1.68); AF(11.43±0.65); CF(10.07±0.27)} o grupo AM adiantou enquanto o AF atrasou em relação ao grupo controle. A avaliação dos reflexos sensoriais mostrou que a anoxia adiantou a colocação pelas vibrissas {AM (8.80± 1.21); CM (9.50±1.56); AF (9.93±1.14); CF(10.14±1.28)} no AF e AM. Apenas o AM adiantou {AM (10.93± 2.09); CM(13.43±0.94); AF(10.50±0.85); CF(9.57±0.76)} no reflexo de aversão ao precipício. Nos reflexos de geotaxia negativa {AM (14.87± 1.30); CM (13.57±2.34); AF(14.57±1.40);CF (12.00±2.11)} e sobressalto ao susto {AM (14.00±0.53); CM (13.21±1.31); AF (13.29±0.61); CF (11.93±0.27)} e preensão palmar {AM (6.60±0.83); CM (4.71±0.47); AF(10.14±0.83); CF(4.71±0.47)} a anóxia provocou atraso tanto em macho quanto em fêmeas motores. Houve atraso na ontogênese da maioria dos testes de reflexos dos filhotes do grupo Anóxia. Os resultados deste estudo demonstraram que a anóxia causa danos persistentes na maioria dos parâmetros avaliados em relação aos grupos controle, e diminuição no número de neurônios do córtex sensoriomotor {M2: AM (46.84±1.72); CM (52±1.66); AF (45.55±1.80); CF (52±1.55)M1: AM (23.70±1.33); CM (41.89±1.49); AF (25.69±0.83); CF (43.88±1.46) S1HL: AM (27.93±2.69); CM (30.19±1.31); AF(23.42±2.38); CF (38.88±1.48) S1FL: AM (31.85±1.09); CM (33.88±0.48); AF(27.66±1.36); CF(32.28±1.70)}, com diferença de gênero o que evidencia a importância de que estratégias e procedimentos para minimizar os efeitos desse estímulos sejam consideradas em relação ao gênero.

Palavras-chave: anóxia neonatal, diferença de gênero, desenvolvimento corporal, desenvolvimento sensório-motor, ontogênese de reflexos neonatais.

Abstract

At present, one of the important causes of brain injury is the neonatal anoxia. This is a serious problem in the perinatology services of hospitals around the world being even worse in underdeveloped countries because of the lack of precautions and care required. Animal models of anoxia have been employed to assess their effects, both at the neurological level and at the behavioral level. Neonatal anoxia has been studied by the Neuroscience Laboratory of the Biomedical Sciences Institute of the University of São Paulo, with animal models already developed, adapted and validated. To investigate whether neonatal anoxia affects somatic and sensory motor development, rats were subjected to a non-invasive model of global anoxia (Takada et al., 2011). Male and female 30-h old (6-8 grams) Wistar rats were exposed for 25 minutes to 100% nitrogen gas in a flow of 3 L/min, pressure 101.7 kPa and temperature of 37°C in a semi-hermetic chamber of polycarbonate. The control group was subjected to the same conditions but with normal ambient air. The animals were evaluated during the lactation period (P2 to P21) for parameters of somatic development; Ontogenetic development and for sensorimotor reflexes. The results indicated that the male Anoxia (AM) group presented increase in body weight (AM (42.25 ± 3.62), CM (38.76 ± 5.60), FA (40.64 ± 5.08), CF (41.33 ± 5.45)) and decrease in the longitudinal (10.82 ± 0.46), in relation to the male control group (CM) and the female Anoxia (AF), AF was lower in relation to the control group (AM) (10.15 ± 0.27), CM (10.39 ± 0.50), AF (9.82 ± 0.44) Female control (CF). AM increase in the cranio-lateral axis in relation to CM and AF (AM (3.18 ± 0.10); CM (3.17 ± 0.13); AF (3.06 ± 0.16); CF (3.00 ± 0.15). Concerning the ontogenetic development there was delay in opening the (13.79 ± 0.58), and the eyes {AM (14.00 ± 0.88); CM (14.64 ± 1.28), AF (15.14 ± 0.86), CF (13.79 ± 0.42)} in the AF group in relation to CF and AM, but in the AM group there was no significant difference. In the eruption of maxillary incisors (AM (10.79 ± 0.43), CM (11.71 ± 1.68), AF (11.43 ± 0.65), CF (10.07 ± 0.27), the AM group advanced while the AF delayed in control ration. The evaluation of the sensory reflexes showed that anoxia improved the placement of vibrissae (AM (8.80 ± 1.21), CM (9.50 ± 1.56), AF (9.93 ± 1.14), CF (10.14 ± 1.28) in AF and AM. Only AM advanced (AM (10.93 ± 2.09), CM (13.43 ± 0.94), AF (10.50 ± 0.85), CF (9.57 ± 0.76) in the reflex of aversion to the precipice. In negative geotaxia relays (AM (14.87 ± 1.30); CM (13.57 ± 2.34), AF (14.57 ± 1.40), CF (12.00 ± 2.11)) and startle reflex {AM (14.00 ± 0.53); CM (13.21 ± 1.31); AF (13.29 ± 0.61); CF (11.93 ± 0.27) and palmar grip (AM (6.60 ± 0.83); CM (4.71 ± 0.47), AF (10.14 ± 0.83), CF (4.71 ± 0.47)), anoxia caused delay in both male and female groups. There was a delay in the ontogenesis of most of the reflex tests of the puppies of the anoxia group. The results of this study demonstrated that anoxia causes persistent damage in most of the parameters evaluated in relation to the control groups, and a decrease in the number of sensory motor cortex neurons (M2: AM (46.84 ± 1.72), CM (52 ± 1.66), AF 1.80), CF (52 ± 1.55) M1: AM (23.70 ± 1.33), CM (41.89 ± 1.49), AF (25.69 ± 0.83), CF (43.88 ± 1.46) S1HL: AM (27.93 ± 2.69), CM (30.19 (31.88 ± 1.48), FA (27.66 ± 1.36), CF (32.28 ± 1.70), , which shows that strategies and procedures to minimize the effects of such stimuli should be considered in relation to gender.

Keywords: neonatal anoxia, gender difference, body development, sensorimotor development, neonatal reflex ontogenesis.

I - INTRODUÇÃO

Este estudo objetiva avaliar a influência da anóxia neonatal no desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos submetidos a anóxia neonatal, também denominada asfixia perinatal, que é considerada problema clínico mundial em que recaem 23% das mortes neonatais (Lawn et al. 2005). A literatura relata que clinicamente existe relação entre déficits cognitivos e comportamentais com os episódios de anóxia (Buwalda et al., 1992

A anóxia neonatal resulta de privação severa de oxigênio durante o nascimento o que pode contribuir para a incapacidade neural permanente, pois seus efeitos podem ser persistentes (Ferrara et al., 1984). Ela tem sido considerada causa de alterações motoras e cognitivas na vida adulta, além de dificuldades de aprendizado e memória espacial, paralisia cerebral, epilepsia, déficit de atenção e hiperatividade, entre outros (Herrera-Marschitz et al., 2014).

A asfixia perinatal é, também, causa comum de morbidez e mortalidade em neonatos e prematuros. A asfixia antes, durante ou após o nascimento é uma causa importante de mortalidade perinatal e morbidade neurológica. Após episódio asfíxico, algumas crianças podem se recuperar neurologicamente sem seqüelas, enquanto outras, conforme já citado, desenvolvem déficits permanentes (Bennet et al., 2000)

A hipóxia, também, representa estado de baixo teor de oxigênio nos tecidos orgânicos que pode ocorrer por diversos fatores, como obstrução física do fluxo sanguíneo em qualquer nível da circulação corpórea ou ainda em ambiente com concentrações baixas de oxigênio no ar. Essa exposição do cérebro à condição de baixo oxigênio e reduzido fornecimento de sangue é chamada de Hipóxia Isquêmica (HI), cujas consequências incluem paralisia cerebral e anormalidades comportamentais (Lynch et al., 2009).

Em humanos, alterações na perfusão e oxigenação do cérebro é a principal causa de danos perinatais cerebrais (Nyakas et al., 1996). Aproximadamente 0.3 - 0.9% dos humanos recém-nascidos são expostos à isquemia-anóxia perinatal ou à injúria anóxica prolongadas, período em que são particularmente susceptíveis a danos teciduais (Tutor et al., 1996). Hipóxia Isquêmica (HI) nos recém-nascidos humanos durante as semanas gestacionais 23-32, considerados prematuros, em geral causa danos na substância branca

subcortical em desenvolvimento por morte celular. como colocado por Marcela Lucomaltia tem outra cauxa.

Injúrias devido à HI ocorrem mais frequentemente num contexto de comprometimento clínico inequívoco como, por exemplo, disfunção placentária, trabalho de parto prolongado, nascimento prematuro e ressucitação cardiorespiratória. Adicionalmente, complicações obstétricas podem estar associadas com psicopatologias posteriormente na vida, e.g. esquizofrenia (Boksa et al., 2004), especialmente naqueles com baixo peso corporal ao nascimento, de acordo com a idade gestacional.

Para ampliar nosso conhecimento sobre os mecanismos, o uso de animais modelos fornece a natureza e o alcance das anormalidades no desenvolvimento neural que devem ser esperadas em crianças afetadas. Estes modelos são essenciais para desenvolver intervenções terapêuticas. O desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), que começa na segunda semana de desenvolvimento gestacional em ratos e no primeiro mês de gestação em humanos, é o mesmo. Períodos críticos são os períodos de vulnerabilidade à injúrias ou à fatores que influenciam negativamente a maturação (Nyakas et al., 2009).

1.2 Sistema Nervoso Central e Privação de Oxigênio

Os efeitos morfológicos da asfixia perinatal sobre a degeneração da retina foram observados nas camadas nuclear externa e interna da retina (Kiss et al., 2008). O tipo de degeneração retiniana é diferente do encontrado na lesão excitotóxica neonatal, onde principalmente as camadas internas da retina são afetadas e os fotorreceptores permanecem intactos (Babai et al., 2005; Tamas et al., 2004). Várias lesões perinatais têm afetado o sistema nervoso central, o que pode levar à degeneração da retina e à disfunção motora e é um problema clínico importante em recém-nascidos e prematuros humanos (Vidal-Sanz et al., 2000, Simola, 2008; Van de Berg, 2002), sendo os membros anteriores os mais afetados na quinta semana pós-natal em ratos (Lubics et al., 2005).

A privação de oxigênio desencadeia diferentes caminhos bioquímicos que poderiam modular a expressão de fatores de transcrição ou fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento epidérmico - EGF, fator de crescimento transformador alfa - FGF) com papéis críticos no desenvolvimento epitelial e na maturação dos olhos (Calamandrei et al., 1989, Cirruli et al., 1994, Vexler & Ferriero, 2001). Presumimos que esses atrasos de desenvolvimento físico são devidos à excitotoxicidade, inflamação e produção de radicais livres induzida pela privação de oxigênio que pode alterar a expressão de fatores de transcrição ou níveis de fatores de crescimento no recém-nascido.

A formação de cavidades císticas na substância branca periventricular ocorre nos estágios tardios e é acompanhada por mielinização atrasada ou danificada (Cai et al., 2001). A redução na proteína básica de mielina (PBM) após injúria hipóxica tem sido reportada, sugerindo alterações no processo de mielinização na substância branca periventricular (Liu et al., 2002). A injúria na substância branca periventricular (SBP) pode também ser acompanhada de hemorragia intraventricular (Okoshi et al., 2001) ou de alterações no revestimento endotelial dos ventrículos laterais, como vacuolização de células endoteliais e ampliação dos espaços intercelulares. A alteração estrutural nas células epiteliais do plexo coroide pode resultar numa produção desordenada de líquido cefalorraquidiano (LCR) (Sivakumar et al., 2008). Além disso, a ocorrência de edema no PWM é evidenciada pelo alargamento dos espaços perivascularares, reportado em diversos estudos (Kaur et al., 2006a). Mudanças estruturais nas células endoteliais podem levar a extravasão do líquido cefalorraquidiano (LCR) na substância branca periventricular, aumentando a formação do edema. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, o desenvolvimento neural (neurogênese, surgimento das sinapses, surgimento da apoptose, surgimento da glia e mielinização) que ocorre no período pré-natal, ao redor do mês gestacional 6-7, que corresponde a 15 dias de gestação em ratos, período em que começa a formação do hipocampo pela proliferação celular no CA1, CA2 e CA3.

Na privação de oxigênio é disparada complexa cascata de eventos bioquímicos praticamente simultâneos que promovem interrupção do metabolismo energético, desequilíbrio ácido-básico, acúmulo de espécies oxigênio-reativo e de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, perda do equilíbrio de água celular e início da apoptose (Vexler et al., 2001). É importante, ressaltar que estes eventos são rápidos e de curta duração, assim, o espaço de tempo para intervenções terapêuticas é bastante reduzido.

Danos neonatais em ratos podem perturbar o sistema neuroendócrino, apresentar baixos níveis de glucocorticóides circulantes, alterando o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) o que pode causar obesidade abdominal. O aumento dos níveis de corticostereona basal aumenta a frequência de pulso, e pode resultar em hipertensão. As alterações decorrentes podem também afetar o sistema monoaminérgico em regiões como corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo e causar depleção de serotonina, norepinefrina e dopamina. Condições estas associadas a sintomas depressivos (Flandreu et al., 2012; Krishnan et al., 2008). A dopamina diminui em função da diminuição da atividade da tirosina hidroxilase no córtex motor e hipocampo e pode ser causa da ansiedade reduzida em modelos animais (Perrin et al., 2004; Hoeger et al., 2000).

A desregulação do eixo hipotalamo-pituitária-adrenal (HPA) tem papel central na patofisiologia da ansiedade e da depressão, que se manifesta através do fator de liberação de corticosteroide hipotalâmico (Flandreu et al., 2012). Na asfixia perinatal, o comportamento do tipo ansiedade reduzida é visto em modelos animais (Hoeger et al., 2000), e também, quando a dopamina é reduzida.

Hipoglicemia também resulta desse processo e muda a estrutura das sinapses, a remodelação de sinapses está associada com a plasticidade. Modificações sinápticas relacionadas com a sua eficácia, como as de potencial de longo prazo, são comuns (Jourdan et al., 2002).

O cérebro, por ser tecido de alto metabolismo requer fornecimento adequado de glicose e oxigênio para manter suas funções normais. Este requisito crítico fica comprometido durante as alterações bioquímicas geradas pela injúria anóxica, que levam à excitotoxicidade e influxo de íons Ca^{2+} , e que

resultam na superprodução de óxido nítrico (NO), além de outras espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da mitocôndria (Herrera Marschitz et al., 2014).

A depleção de ATP, por anóxia ou hipóxia tem importantes consequências, pois implica em falha no funcionamento das bombas iônicas de sódio-potássio, ativação da formação de radicais livres (Dell'Anna et al., 1997), mudanças no estado de fosforilação de diferentes enzimas e proteínas estruturais. A falha nas bombas iônicas causa passagem de íons pela membrana abaixo dos gradientes de concentração e promove consequente despolarização com consequências letais e perda massiva de neurotransmissores como glutamato, aspartato e dopamina para o espaço extracelular em quantidade tóxica (Lofton., 1989).

1.3 Estágios do Desenvolvimento Cerebral em Roedores e Humanos

O principal evento na formação do SNC, em todos os vertebrados, é a formação de uma dobra especializada do tecido ectodérmico chamada de tubo neural, do qual a coluna espinhal e o cérebro se diferenciam subsequentemente. A formação do tubo neural ocorre aproximadamente no meio da gestação em roedores, no dia gestacional (GD) 10.5 - 11 e 9.95 em ratos. Nos humanos, este evento ocorre mais precocemente durante o desenvolvimento pré-natal, entre GD 24 e 28 (3 - 4 semanas), em um período gestacional de 266 - 280 dias (40 semanas) (Rice et al., 2000). Figura 1 – Desenvolvimento cerebral em ratos : resumo de processos chave do desenvolvimento ao longo de idades comparativas em humanos e roedores.

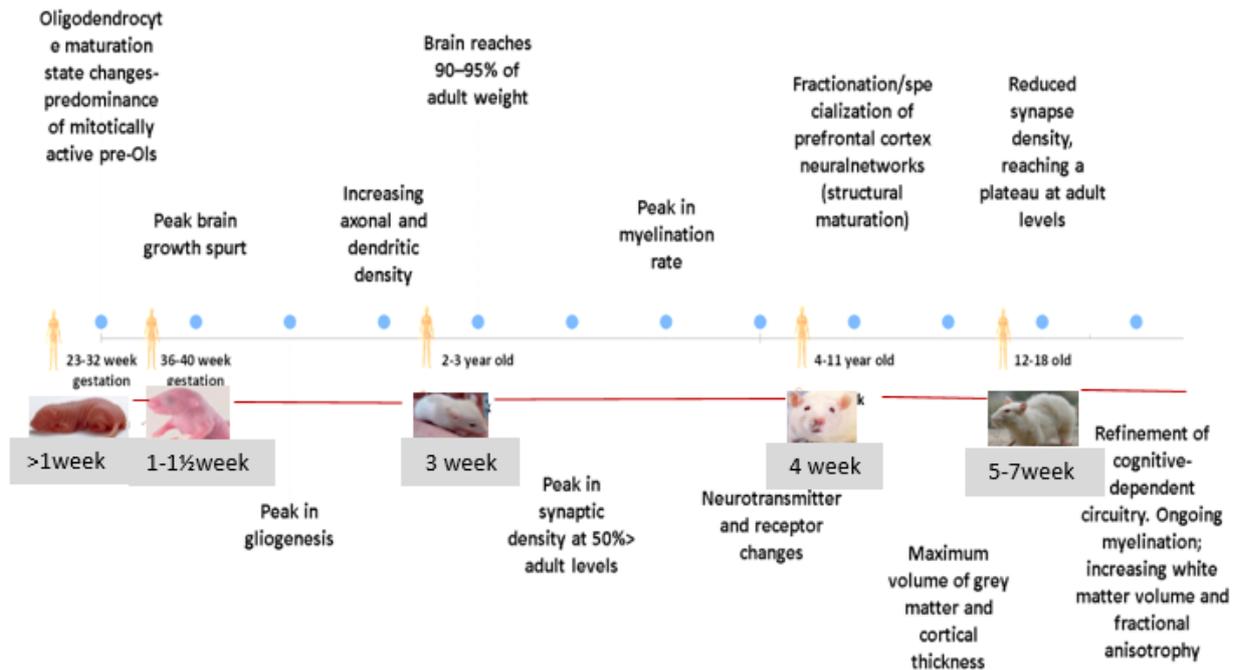


Figura 2 . Estágios do Desenvolvimento cerebral em roedores e humanos. Resumo dos processos chave d desenvolvimento ao longo de idades comparativas em humanos e ratos. Adaptado de Semple et al., 2013.

1.4 Período crítico de injúria e Proliferação celular

O período crítico, corresponde a aquele em que há maior susceptibilidade dos neurônios e da glia a danos, este compreende a fase da proliferação e migração celular, a qual é considerável no último trimestre de gestação dos cérebros humanos e em ratos se dá na primeira semana pós-natal (Bayer et al., 1993).

Durante o desenvolvimento, no cérebro neonatal de mamíferos a camada de neurônios glutamatérgicos e de ácido gama-aminobutírico (GABA), ou GABA-érgicos, entre o córtex cerebral imaturo e a região da substância branca, abaixo da placa neural, constitui a fonte de novos neurônios (Kostovic et al., 1989). A neurogênese cortical no rato começa no GD 9.5 e se completa por volta do DPN 15 (Rice et al., 2000) enquanto que em humanos, há

predominância durante a gestação, que pode continuar até 2.5 anos de idade (Hovda et al., 2003).

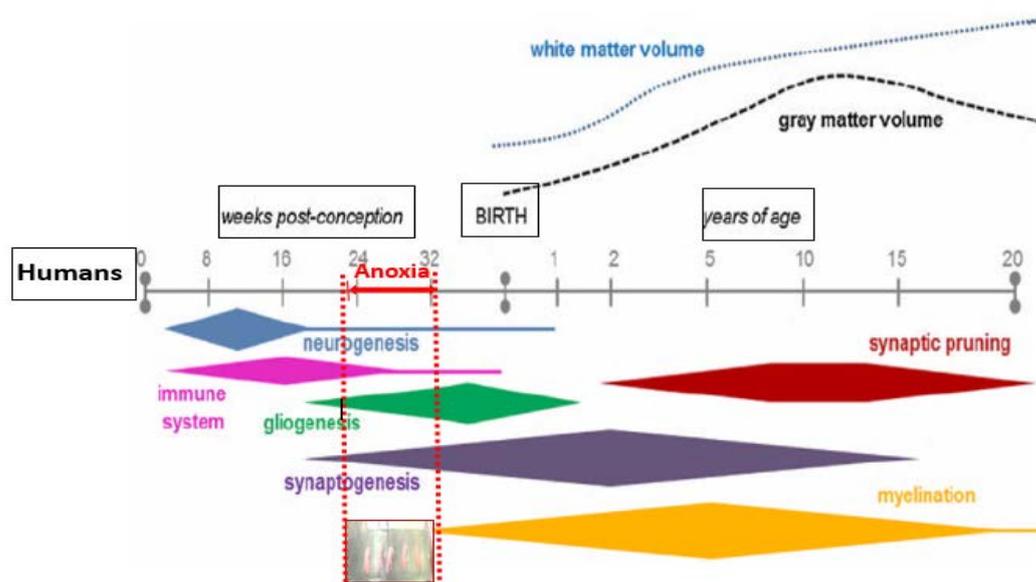


Figura 3 . *Processos do desenvolvimento neural em humanos de 0 a 20 anos.*

Linha do tempo de processos chave do desenvolvimento neural em humanos, durante a gestação até 20 anos de idade (esquema fora de escala), com as mudanças associadas no volume de substância branca e cinzenta ao longo do tempo. 23-32 semanas após a concepção em humanos é igual a 1 semana de dias pós-natal em rhodents. Fonte: Lenroot and Giedd (2006).

Na segunda semana do desenvolvimento gestacional de ratos e no primeiro mês de gestação em humanos, áreas específicas do SNC começam a se formar com a neurogênese e a migração de células no encéfalo, então, seguem a sequência apresentada de processos do desenvolvimento, que inclui proliferação, migração, diferenciação, surgimento das sinapses, apoptose e mielinização (figura 2). Durante a última parte da gravidez e o primeiro mês pós-natal, oligodendrócitos devem desenvolver sua bainha de mielina ao redor dos axônios. A maturação dos axônios e o surgimento das sinapses, em humanos, ocorre durante o terceiro trimestre do primeiro ano após o nascimento (Mason et al., 1984).

Estudos prévios em anóxia neonatal, deste laboratório, evidenciou os efeitos prejudiciais desse estímulo, tanto em populações gliais quanto neurais

do hipocampo, de forma dependente da região e do seu período de desenvolvimento considerado (Allemandi W., 2011). Em populações neuronais do hipocampo (corno de Amom e giro dentado) foi observado efeito longitudinal desse estímulo a 2, 14, 21 e 60 dias após o nascimento, com evidência de morte celular e alterações em organelas condizentes com processos degenerativos. (Takada et al., 2014). Esses resultados foram obtidos por diferentes técnicas histológicas (TUNEL, Fluorojade B), imunohistoquímica, microscopia eletrônica de transmissão, estereologia e ressonância magnética. Foi, também, observada diminuição da neurogênese e alterações de volume do hipocampo no animal anoxiado em comparação ao animal controle. Ainda, foram encontrados déficits cognitivos, na aquisição e performance de memória espacial e de referência pelo labirinto aquático de Morris (Takada et al., 2015), além de aumento de ansiedade nos animais anóxia em relação aos controles, com testes de labirinto em cruz elevado em P90 (Takada et al. 2015).

1.5 Diferenças de gênero no Sistema Nervoso

Aas diferenças na organização neuronal existentes entre o cérebro do homem e da mulher decorrem de diversos fatores biológicos, que estão sujeitos a importante regulação hormonal, atribuídas ao dimorfismo sexual .

Os hormônios sexuais influenciam o modelamento das diferenças hemisféricas até a função cognitiva humana (Witelson et al., 1976). Diferenças sexuais, em humanos, advindas de lesão cerebral, unilateral relacionadas à inteligência, apresentaram associação neurológica ipsilateral no cérebro masculino lesado, sendo que no cérebro feminino o déficit cognitivo é menos assimétrico (Inglis et al., 1981).

A diferenciação sexual do sistema nervoso masculino depende do gene determinante dos testículos localizado no cromossomo Y (gene SRY), que é responsável pelo desenvolvimento das gônadas e é regulado pelo hormônio gonadal. Esse hormônio tem efeitos regulatórios sobre o tecido nervoso, dependendo do estágio do desenvolvimento (Andersson et al., 1986). Esse

gene se expressa especificamente nos neurônios que expressam a enzima tirosina hidroxilase da substância negra mesencefálica. Em estudo experimental com ratos machos, a supressão do gene SRY resulta em déficit motor, embora o número de neurônios permaneça o mesmo (Dewing et al., 2006), o que sugere o envolvimento desse gene com os neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestrial no sexo masculino. As células cerebrais da mulher e do homem apresentam diferenças nos padrões de expressão de outros genes que são específicos para o cérebro em desenvolvimento, os quais determinam funções e habilidades específicas para cada gênero (McCarthy et al., 2009).

Diferenças de gênero têm sido relatadas em atividade locomotora (Bucci et al., 1995). Ratos machos apresentam melhor desempenho em tarefas que exigem habilidades espaciais em relação às fêmeas (Roof et al., 1993). Entretanto, curiosamente, o cérebro dos machos é mais vulnerável a agressões que o de fêmeas no período crítico do desenvolvimento (Venderhus et al., 2010). A testosterona circulante, no macho recém-nascido, ao não se ligar à α fetoproteína, pode entrar no sistema nervoso pela barreira hematoencefálica e ser convertida em estrógeno. A ação organizadora estrogênica ocorre precocemente, já entre os dias 16 e 19 pós-concepção, imediatamente anterior ao período crítico de desenvolvimento neural, onde exerce efeitos irreversíveis constituindo assim substrato para variações de gênero. Esse dado aliado à elevada expressão do receptor OBRb na tireóide de animais com dieta calórica e proteica restrita, sugere inibição da liberação dos hormônios tireoideanos e relação com parâmetros somáticos e de desenvolvimento alterados (Valenzuela et al., 2014).

Na gênese celular as diferenças de gênero apareceram no volume hipocampal e no comportamento conforme revelou estudo com modelo de hipóxia-isquemia neonatal em ratos. Nesse trabalho, foi demonstrado aumento significativo na neurogênese em fêmeas em relação a machos (Waddell et al., 2015).

1.6 Epigenética da diferença do sexo

Cuidados materno são experiências do início da vida que têm sido consistentemente relacionadas com alterações na expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos, entre eles a metilação do DNA (Glase et al., 2003).

As alterações epigenéticas são processos que induzem mudanças na expressão do gene e que são herdadas sem alterar a sequência das bases nitrogenadas do DNA (ácido desoxirribonucleico). A epigenética constitui, portanto, uma área de conhecimento que investiga questões sobre como modificações químicas (por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação, entre outras) nos nucleotídeos e histonas do DNA ocorrem ao longo do tempo em função de experiências ambientais e como são transmitidas para gerações seguintes (Forger et al., 2004).

O hormônio esteróide determina as diferenças sexuais durante o período crítico que altera as respostas hormonais e não hormonais ao longo da vida, as quais culminam em diferença de sexo no cérebro adulto e no comportamento. Essa ação é considerada como componente crítico em mudanças epigenéticas no sistema nervoso que podem ser induzidas por trauma pós-natal (*Figura 3* de McCarthy et al., 2009). A evidência sugere que as diferenças de sexo ocorrem em pelo menos quatro parâmetros relacionados: (1) padrões de metilação do DNA, (2) metiltransferases, (3) proteínas de ligação a radical metil e (4) proteínas de corepressor.

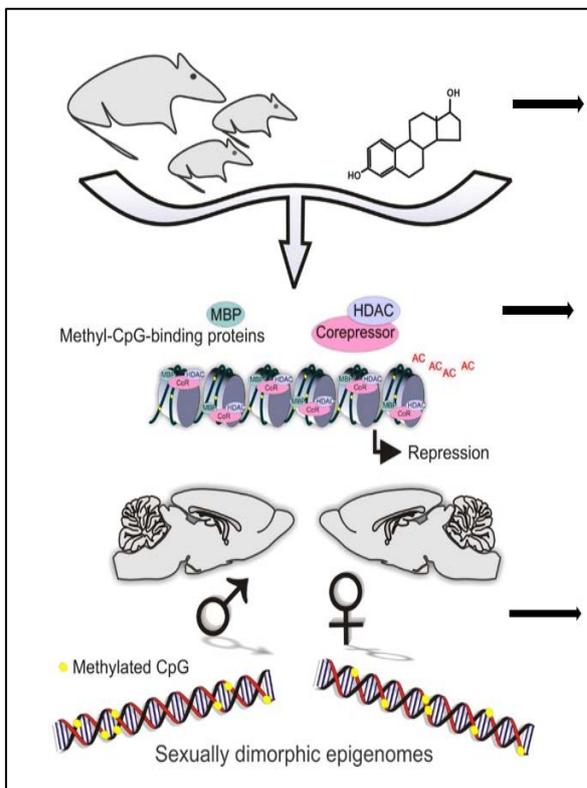
A literatura tem indicado a importância de estudar a epigenética das diferenças sexuais nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebral, uma vez que lesões cerebrais, provocam alterações nas ligações metil de proteínas e no receptor de esteróides onde foram observadas alterações nas ações de compostos endócrinos (Auger et al., 2011). As diferenças cerebrais entre os sexos e a organização do comportamento social juvenil coaduna com a

epigênese permanente e plástica nos sistemas neuroendócrinos (Auger et al., 2009;2013).

No cérebro do mamífero, a importância da epigenética está nas diferenças sexuais que começam cedo no desenvolvimento com processo crítico do cromosoma X e inativação em fêmeas. Um dos cromossomos X é recessivo devido à combinação de modificação da Histona e metilação do DNA (Avner et al., 2001)

Estudos recentes reportam um dimorfismo sexual no número de microglias e expressão de marcadores ativados em cérebros neonatais sob condições normais (Lenz et al., 2013). Diferenças sexuais nos mecanismos de morte neuronal têm começado a ilustrar a dinâmica e os processos de diferenciação ocorrendo em cérebros neonatos após injúria e enfatizando a necessidade de estudos que incluam ambos os sexos.

A influência da epigenética nas diferenças de sexo no cérebro.(Fatores emergentes podem causar diferenças persistentes no cérebro e no comportamento por quatro mecanismos).



(1) padrões de metilação do DNA por regulação hormonal de enzimas que controlam acetilação e metilação;

(2) metiltransferases, as proteínas coregulatórias;

(3) proteínas de ligação a radical metil que pode atuar por padrões de metilação do DNA de forma transitória versus forma estável;

(4) proteínas de corepressor que determinam diferenças sexuais por ação do epigenoma.

Figura 3. Mecanismos epigenéticos relacionados a diferenças de sexo na estrutura e comportamento. Adaptado (McCarthy et al., 2009).

II - Justificativa

Para ampliar o conhecimento dos mecanismos da anóxia neonatal, o uso de modelos animais é imprescindível a fim de explorar a natureza e o alcance das anormalidades decorrentes desse insulto e para que se possa desenvolver intervenções e estratégias terapêuticas.

Interessados em explorar essa condição procuramos, adaptamos e validamos no laboratório de Neurociências, ICB-USP, um modelo de anóxia neonatal. Com este modelo evidenciamos ativação neuronal por FOS em áreas respiratórias do sistema nervoso central; alterações na oximetria de pulso e na coloração da pele frente a anóxia, dados estes indicativos da privação de oxigênio e consequente aumento de gás carbônico nos tecidos. Característica importante desse modelo é que promove anóxia global, isto é afeta todo o corpo além disso, não é procedimento invasivo (Takada et al., 2011), o que o aproxima das condições clínicas de anóxia neonatal. Takada et al., (2014), com esse modelo foram identificadas alterações celulares e subcelulares no hipocampo além de efeitos negativos na memória de trabalho. Ratos submetidos à anóxia neonatal irão exibir perturbações no aprendizado espacial e memória no labirinto aquático de Morris (MWM) (Takada et al., 2015), uma tarefa comportamental conhecida que pode ser sensível à função do hipocampo (Morris et al., 1982; Xavier et al., 1999).

Essas alterações foram observadas em ratos machos, em função das diferenças de suscetibilidade à lesão entre machos e fêmeas, este estudo preve avaliar os parâmetros somáticos e sensorio motores de desenvolvimento no período de aleitamento após insulto anóxico neonatal a fim de contribuir para a elaboração de estratégias para essa condição clínica que deixa efeitos negativos persistentes .

III - OBJETIVOS

III-OBJETIVO GERAL

O presente estudo busca avaliar a hipótese de que machos e fêmeas respondem de forma diferente aos efeitos da anóxia neonatal pela avaliação de parâmetros quanto de desenvolvimento sensório-motor , maturação e o aparecimento de reflexos ontogenéticos utilizando modelo não invasivo de anóxia global.

Objetivos Específicos

1. Avaliar o eventual impacto da anóxia neonatal no desenvolvimento de características físicas tais como: a abertura dos olhos, desdobramento do pavilhão auricular, abertura do conduto auditivo e irrupção dos incisivos inferiores e superiores;
2. Avaliar o eventual impacto da anóxia neonatal no desenvolvimento somático, pela aferição do peso corporal e dos eixos longitudinal e latero-lateral do crânio, assim como do comprimento naso-anal (rosto-caudal), por medições com paquímetro.
3. Avaliar o eventual impacto da anóxia neonatal no aparecimento dos reflexos ontogenéticos de desenvolvimento, quais sejam: recuperação de decúbito, aceleração e resposta ao susto; colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício e geotaxia negativa, por observação diária.
4. Avaliar o eventual impacto da anóxia neonatal na quantidade de células dos córtices motor e sensorial primário e secundário dos membros anteriores e posteriores por estereologia.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 Animais

Neste estudo foram utilizados Ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, obtidos do Biotério Central de Ratos do Instituto de Biociências (IB-USP) e alocados no biotério do Laboratório de Neurociências desse Instituto onde a temperatura é mantida a $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro-escuro 12/12 h, com início às 6 h e término às 18 h, sendo que ração (Labina) e água foram fornecidos *ad libitum*. Foi observado período de 10 dias de adaptação dos animais antes do início dos experimentos. Todos os procedimentos descritos neste projeto estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), os quais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) (Protocolo nº 190, fls. 139 do livro 02 para uso de animais em experimentação).

IV.2 Condições experimentais de anóxia

Para a anóxia, primeiramente a câmara foi saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo contínuo (3 L/min) e pressão próxima a pressão atmosférica (aproximadamente 101,7 kPa), determinados de acordo com literatura (Coq et al., 2007). Os filhotes no dia pos-natal Pos natal dia ,(PND)-2, com 6 a 8 g de peso corporal, foram colocados na câmara, permanecendo durante 25 minutos nestas condições, considerado o tempo máximo para não ocorrer morte massiva dos neonatos – DL50) (Dell'anna et al., 1995b). Testes prévios realizados neste laboratório mostraram que períodos levemente maiores causaram alto índice de mortalidade, nas condições utilizados esse índice foi de 9,43%, semelhante ao observado em literatura com modelos parecidos (Takada et al., 2011). Após a recuperação dos filhotes, estes foram devolvidos para a mãe até o desmame (21 dias).

O modelo é constituído por câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 x 14,0 x 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a manômetro,

fluxômetro e a um cilindro de nitrogênio gasoso. Com o objetivo de evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara foi mantida entre 35 e 37°C pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica (a temperatura basal do neonato é ao redor 33°C, considerada neuroprotetora).

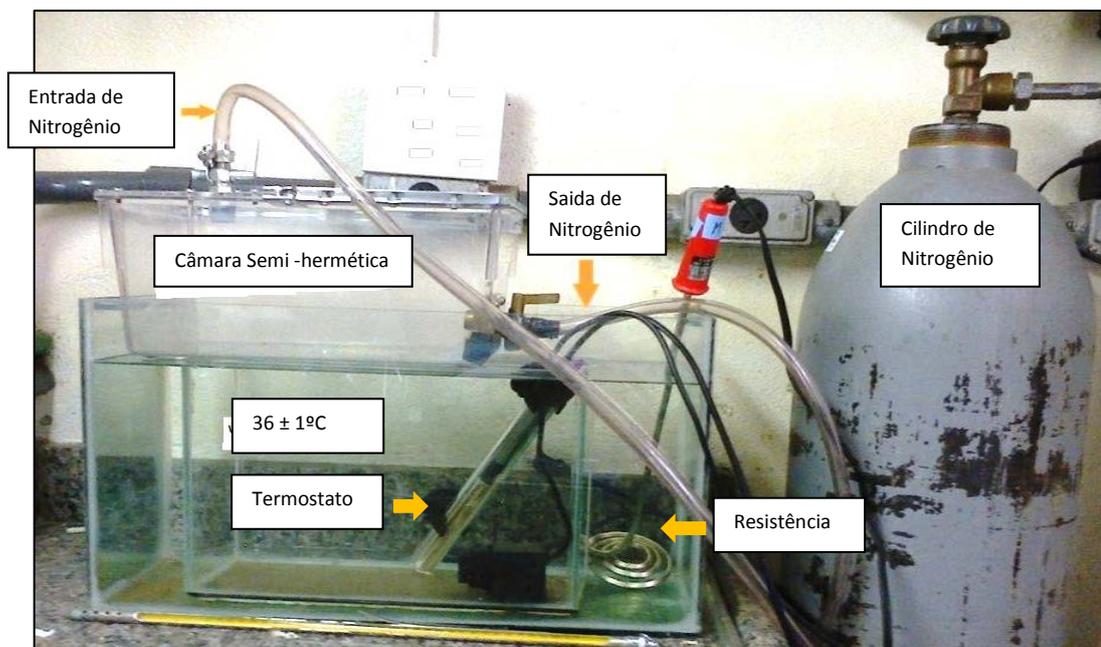


Figura 4. Sistema de anóxia Câmara de anóxia composta de caixa semi-hermética com abertura para entrada e saída de nitrogênio; imersa em banho maria aquecido por termostato a $36 \pm 1^\circ\text{C}$; cilindro de Nitrogênio, local onde o nitrogênio é armazenado e de onde é drenado para a câmara; termostato e resistência para aquecimento (Takada et al., 2011).

IV.3 Formação dos grupos e delineamento experimental

Foram utilizados machos e fêmeas *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, obtidos do Biotério Central do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por acasalamento de diferentes casais para evitar efeitos de ninhagem,. Os grupos Anóxia Macho (AM) e Anóxia Fêmea (AF) foram submetidos à anóxia neonatal em P2 (peso entre 6 e 8 g), por 25 minutos. Os grupos CM e CF passaram pelas mesmas condições, porém sem alteração na composição atmosférica. Após a avaliação do desenvolvimento até o desmame no dia pós-em P21, quanto a parâmetros físicos e de instalação de reflexos ontogéticos, foi aguardado o dia 41 (P41), após anestesia profunda por injeção intraperitoneal de hidrato de cloral (33%), os animais foram

perfundidos transcárdiacamente com salina 0,9% (pH 7,4, a temperatura ambiente, seguido de solução de formaldeído (4% em tampão fosfato, pH 7,4, a 4 °C), conforme delineamento experimental (Figura 5).

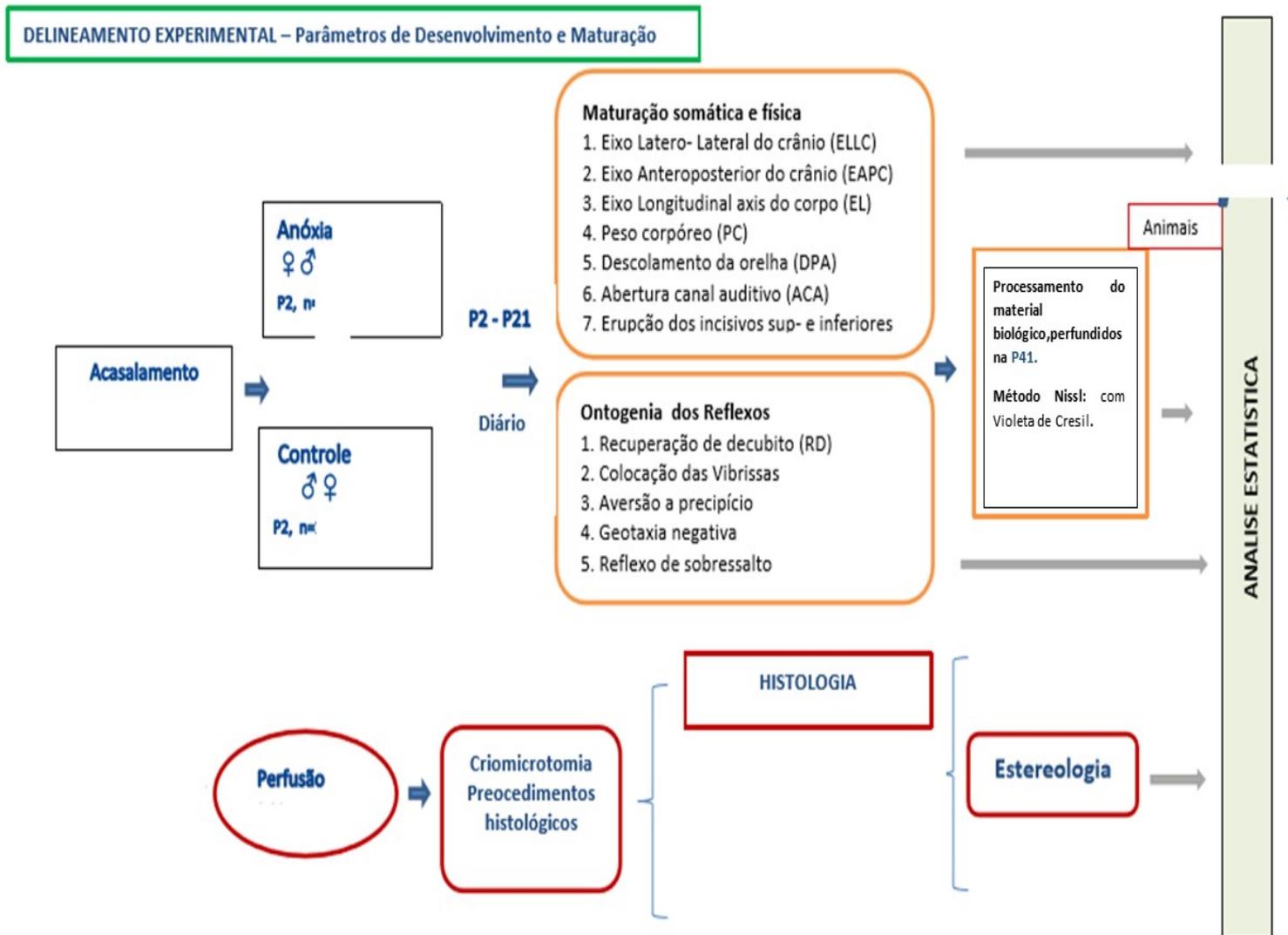


Figura 5- Delineamento experimental do estudo dos efeitos da anoxia neonatal.

O diagrama descreve os procedimentos e os métodos que utilizados, desde o acasalamento à adolescência; os vários parâmetros, os reflexos e os testes comportamentais realizados. Ratos Wistar machos e fêmeas obtidos de diferentes mães e no máximo 8 por gaiola. Os filhotes foram submetidos à anoxia no PND 2, cada grupo

com 14 filhotes. Os parâmetros de desenvolvimento e reflexos foram acompanhados durante o período de amamentação, do P2-P21.

IV.4 Processamento do material biológico

Após a perfusão os encéfalos foram dissecados, pós-fixados na mesma solução fixadora por 24 h e crioprotetidos em solução tampão (PBS 0,1 M, pH 7,4) mais sacarose 30%, por 8 a 12 h. Os cérebros foram então imersos em solução de glicóis solúveis em água e resina (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura, Chuo-Ku, Tokyo, Japão). Depois os encéfalos foram cortados em secções de 40 µm de espessura em micrótomo (Leica SM2000R), dividindo-se os cortes em 12 séries, preservados em solução antifreeze.

As secções histológicas foram montadas em lâminas gelatinizadas e deixadas secando por 24 horas em estufa a 40°C, após o que foram coradas pelo método Nissl, com Violeta de Cresil, para facilitar a visualização dos corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar a contagem das células na região hipocampal. O processo de coloração consistiu em imergir as secções primeiramente em soluções de álcool com concentrações crescentes para desidratar e depois diafanizar em duas soluções de Xilol. Em seguida, foram submersas em sequência decrescente de soluções alcoólicas (100%, 100%, 95%, 70%, 50%), água destilada, por 2 minutos em cada solução, para reidratação, imersas no corante Violeta de Cresil por 30 s e logo depois em água destilada e novamente submetidas à série crescente de alcoóis e xilol para desidratação por 1 minuto em cada solução, após o que foram montadas com DPX e cobertos com lamínulas.

IV.5 Quantificação estereológica de células

A quantificação estereológica das células do córtex sensório-motor foi realizada com o software Stereo Investigator¹ versão 10, a análise quantitativa em laboratório multi-usuário do Departamento de Anatomia no ICB-USP, colaboração com o Professor Doutor Jackson Cioni Bittencourt.

Foram utilizadas 4 secções por animal, n=4/grupo, foi analisada uma secção a cada 320 µm, unilateralmente no córtex motor das regiões: M2 (secundário), M1 (Córtex motor primário), S1HL (Patas traseiras), S1FL (Patas dianteiras). Correspondentes estas às coordenadas bregma: -1.60mm bregma; -1.88mm bregma; -2.30 mm bregma respectivamente (PAXINOS & WATSON, 2004). As secções coradas com violeta de cresil, permitiram a delimitação das estruturas em microscópio óptico acoplado a sistema de estereologia constituído por uma platina motorizada (LudlElectronicProducts, Hawthorne, NY), câmara para captura (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e o software StereoInvestigator (MBF Biosciences, Williston, VT). Para a delimitação das estruturas corticais foi utilizada a objetiva de 4x. A delimitação das regiões M2 (Córtex Motor Secundário), M1(Córtex motor Primário), S1HL (Patas traseiras), S1FL (Patas dianteiras) foi realizada de forma a padronizar as regiões nos diferentes níveis ao longo do eixo rostro-caudal conforme figuras 6 e 7.

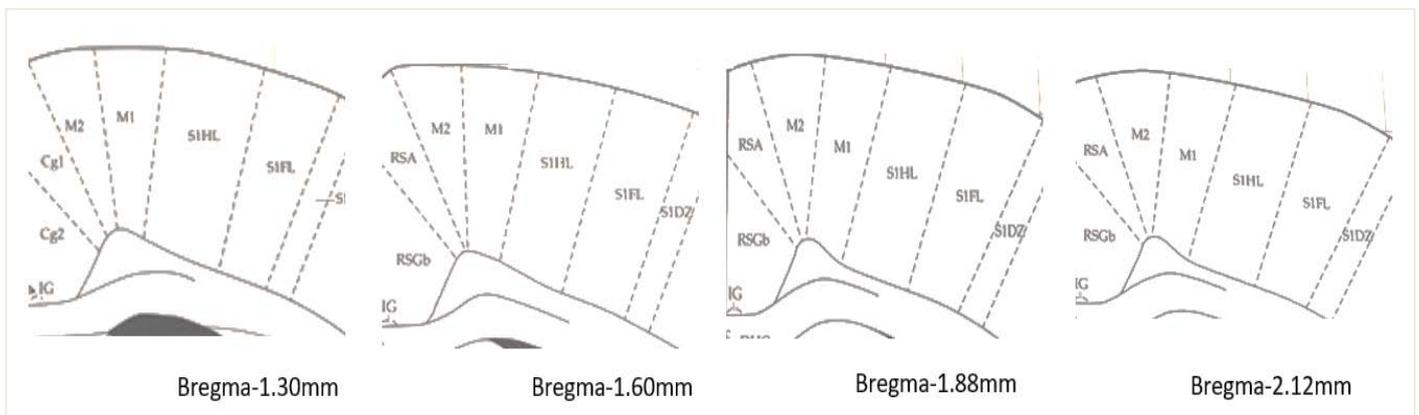


Figura 6. Esquema dos níveis das secções utilizadas para as reações de Nissl e a contagem por estereologia. O nível da secção está indicado no canto inferior direito de cada imagem. Córtex motor secundário (**M2**); Córtex motor Primário (**M1**); Patas traseiras (**S1HL**); Patas dianteiras (**S1FL**). Fonte: adaptado de Paxinos e Watson (1997).

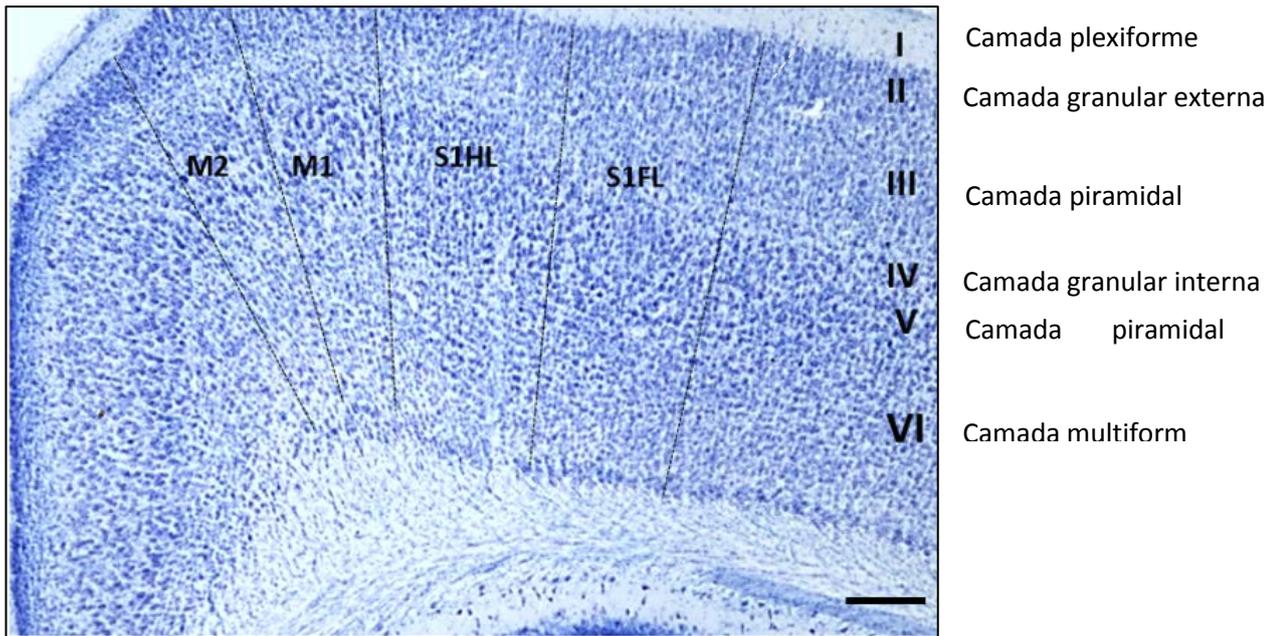


Figura 7. Fotomicroscopia de campo claro de corte coronal do encéfalo de rato (41 dias) com representação das delimitações no córtex motor para realização da análise estereológica das regiões M2 (Córtex Motor Secundário), M1 (Córtex motor primário), S1HL (Patas traseiras), S1FL (Patas dianteiras) utilizadas. Coordenadas bregma; -1.60 mm bregma; -1.88 mm bregma; -2.30 mm a respectivamente (PAXINOS & WATSON, 2004). Secção processada por técnica de coloração de Nissl. Aumento de 4x. Barra 500 μ m.

IV.6 Medidas de crescimento somático

O acompanhamento do crescimento somático foi realizado de P2 a P21, entre 9h e 11h. Os parâmetros avaliados foram:

- a) eixo látero-lateral do crânio (ELLC): Para obtenção desta medida, o pesquisador segurou o filhote na mão e mediu a distância entre as suas duas orelhas com um paquímetro (Fig. 4);

Figura 4 – Medição do eixo látero-lateral da cabeça (ELLC).



Fonte: Vasconcelos (2013).

- b) eixo ântero-posterior do crânio (EAPC): Para obtenção desta medida, o pesquisador segurou o filhote na mão e mediu a distância entre o focinho e a articulação atlantoccipital com um paquímetro (Fig. 5);

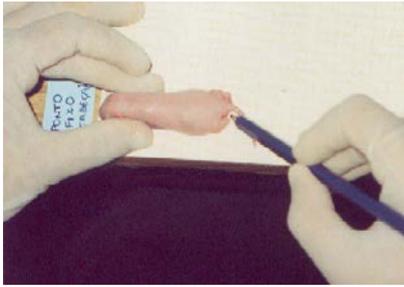
Figura 5 – Medição do eixo ântero-posterior da cabeça (EAPC).



. Fonte: Vasconcelos (2013).

- c) eixo longitudinal do corpo (EL): Para obtenção desta medida, o pesquisador imobilizou o filhote estendido, prensando-o delicadamente a uma superfície plana com a mão, e fez duas marcas na superfície; uma rente ao focinho e outra rente à base da cauda. Então ele mediu a distância das duas marcas com um paquímetro (Fig. 6);

Figura 6 – Medição do eixo longitudinal do corpo (EL).



Fonte: Vasconcelos (2013).

- d) peso corporal (PC): Obtido com uma balança digital.

Todos os dados foram avaliados com ANOVA de medidas repetidas com teste post-hoc de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

2.5 Avaliação da maturação de características físicas

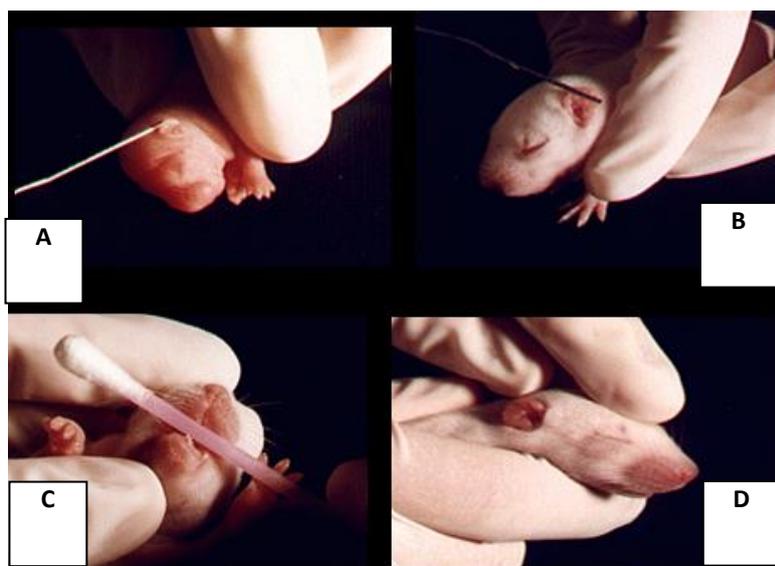
O registro da maturação das características físicas seguiu os critérios estabelecidos por Fox (1965) e Deiró et al. (2004; 2006). Foi anotado o dia em que a característica surgiu em cada animal. As características avaliadas foram:

- a) desdobramento do pavilhão auricular (DPA): Ao nascer, o pavilhão auditivo do rato está fletido sobre a abertura que irá apresentar no desenvolvimento ou, após o desenvolvimento completo, sobre o óstio acústico externo. O DPA foi considerado no dia em que a dobra, uma vez desfeita, tornou o pavilhão livre (Fig. 7^a);
- b) abertura do conduto auditivo (ACA): A abertura do conduto auditivo foi considerada no dia em que o óstio acústico externo pôde ser visualizado (Fig. 7B);

- c) irrupção dos incisivos superiores (IIS) e inferiores (III): Considerou-se o dia da irrupção dos incisivos superiores e inferiores quando houve o rompimento da gengiva com exposição incisal (Fig. 7C);
- d) abertura ocular (AO): Durante algum tempo após o nascimento, os olhos do rato permanecem fechados, totalmente encobertos pelas pálpebras. Considerou-se que os olhos se abriram no dia em que eles foram expostos (Fig. 7D).

Todos os dados foram avaliados com ANOVA multifatorial com teste post-hoc de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

Figura 7 – Verificação do aparecimento das características físicas.



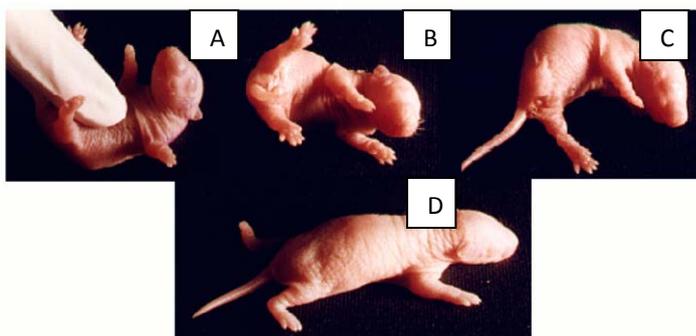
A: desdobramento do pavilhão auditivo (DPA). B: abertura do conduto auditivo (ACA). C: irrupção do incisivo inferior (III) e superior (IIS). D: abertura dos olhos (AO). Fonte: Vasconcelos (2013).

2.6 Avaliação da ontogênese de reflexos

A maturação de reflexos foi realizada com parâmetros anteriormente descritos por Deiró et al. (2004; 2006):

- a) recuperação do decúbito (RD): O rato foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Considerou-se resposta positiva quando o animal girou o corpo e assumiu o decúbito ventral apoiado nas quatro patas dentro de um período de 10 s (Fig. 8);

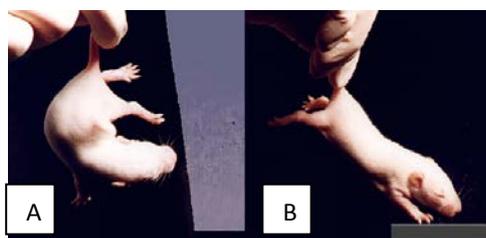
Figura 8 – Avaliação da recuperação do decúbito (RD).



De A a D: sequência do movimento de RD. Fonte: Vasconcelos (2013).

- b) colocação pelas vibrissas (CV): O rato foi suspenso pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocassem levemente a borda de uma mesa. Considerou-se resposta positiva quando o animal colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar dentro de um período de 10 s (Fig. 9);

Figura 9 – Avaliação da colocação pelas vibrissas (CV).

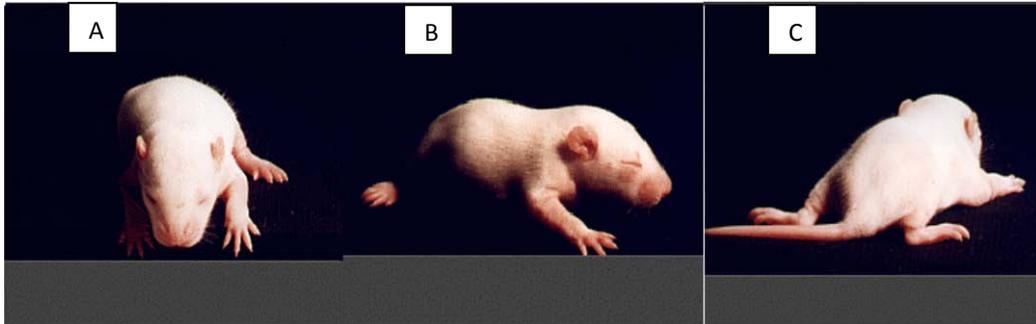


A: contato das vibrissas com o estímulo. B: resposta do indivíduo ao contato. Fonte: Vasconcelos (2013).

- c) aversão ao precipício (AP): O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta de maneira a detectar o

precipício. Considerou-se resposta positiva quando o animal deslocava-se pelo menos 45° para um dos lados em 10 s (Fig. 10);

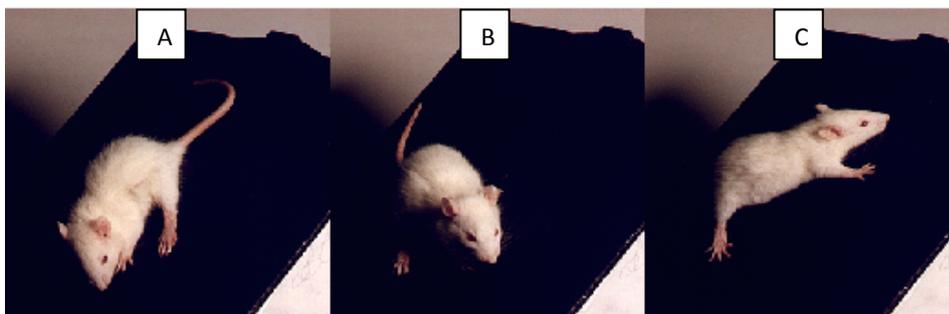
Figura 10 – Avaliação da aversão ao precipício (AP).



A: indivíduo com as patas sobre a borda de uma superfície plana. B e C: movimento de resposta à AP. Fonte: Vasconcelos (2013).

- d) geotaxia negativa (GN): O animal foi colocado no centro de uma rampa com 45° de inclinação, com a cabeça no sentido descendente. Considerou-se resposta positiva quando o animal foi capaz de girar o corpo posicionando a cabeça no sentido ascendente dentro de 10 s (Fig. 11):

Figura 11 – Avaliação da geotaxia negativa (GN).



De A a C: movimento de resposta à geotaxia negativa em uma superfície inclinada. Fonte: Vasconcelos (2013).

- e) resposta ao susto (RS): O rato foi exposto a um estampido agudo produzido pela percussão de duas estruturas metálicas a uma distância aproximada de 10 cm. Considerou-se resposta positiva quando ocorreu uma retração

simultânea com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal, característica do susto (Fig. 12);

Figura 12 – Avaliação da resposta ao susto (RS).



Fonte: Vasconcelos (2013).

- f) aceleração (A): O rato foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo a uma distância de 30 cm de um leito de espuma sintética (30 x 12 cm). Então o animal foi solto e observou-se a sua queda livre. Considerou-se resposta positiva quando, durante a queda, o animal girou completamente o corpo, apoiando-se sobre as quatro patas na espuma;

- g) preensão palmar (PP): Colocou-se uma haste fina em contato com a palma das patas anteriores do rato. Considerou-se resposta positiva quando ele realizou um movimento de preensão na haste.

Os dados foram avaliados com ANOVA multifatorial com teste post-hoc de Tukey-Kramer ($p \leq 0,05$).

V. RESULTADOS

V.1 Considerações metodológicas:

Neste item, as dificuldades inerentes ao modelo adotado e aos procedimentos utilizados são identificadas. A anóxia em ratos Wistar neonatos no segundo dia pós-natal (P2), é modelo que foi desenvolvido e validado em nosso laboratório (Takada et al., 2011), é considerado um modelo de anóxia global, porque afeta todo o corpo do animal, não é invasivo pois nenhuma cirurgia é realizada assim ele simula as condições clínicas. O rato neonato de P1-3 corresponde ao feto de 23 a 32 semanas, condição dos nascidos prematuros em geral.

Takada et al (2011) investigou que a mortalidade dos ratos quando utilizado esse modelo de anóxia por tempo superior a 25 minutos é igual ou maior que 50%. Estabelecido o tempo de 25 minutos, conforme protocolo, a mortalidade é de apenas 9,43%. O estímulo muitas vezes exigiu manobra de ressuscitação.

Após o estímulo de anóxia, todos os animais foram retornados às suas mães até o momento do desmame, durante os 21 dias de vida. Outro ponto de dificuldade a ser mencionado é o manuseio desses animais quanto a necessidade de manter 8 animais por caixa, uma vez que a mãe tem oito mamas e consegue amamentar com eficiência apenas essa quantidade por ninhada, o excedente foi remanejado para outros fins. Após o período de amamentação, eles foram remanejados em caixas com cinco animais cada, facilitando o acompanhamento.

Durante a amamentação foi observada hiperatividade dos animais do grupo anóxia em relação aos controles, em ambos os gêneros: macho e fêmea. Característica esta que exigiu atenção maior nas tarefas comportamentais, pois os animais apresentaram maior risco de queda e maior exploração aleatória do ambiente.

V.2 Desenvolvimento somático

A avaliação do crescimento somático foi realizada nos parâmetros: peso corporal e no comprimento dos eixos: látero-lateral do crânio, ântero-posterior do

crânio, longitudinal do corpo e, nos animais de cada grupo entre P2 e P21, entre 10 e 12 h da manhã. Como esperado, nesse período todos esses parâmetros apresentaram evolução positiva. O peso corporal foi avaliado em balança digital (0,01 g de precisão) e as medidas de comprimento dos eixos foram aferidas com auxílio de paquímetro (0,5 mm de precisão), Prancha I- figuras A a D. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade da variância para determinar se os testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos devem ser utilizados. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 7 (Tulsa, Oklahoma: Stat Soft Inc.)

Para análise estatística, os dados relacionados ao crescimento somático foram analisados por ANOVA de medidas repetidas bidirecionais, considerando-se grupo e sexo como fatores entre sujeitos, foi utilizado o teste post hoc de Tukey-Kramer. ANOVA considerando os grupos como fator entre sujeitos eo Cortex (ANOVA), considerando os grupos como fator entre sujeitos e o Cortex (Tukey-Kramer post-hoc). (M2, M1, S1HL e S1FL) dentro dos factores da região do sujeito (Tukey-Kramer post-hoc). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

V.2.1 Peso corporal

A análise estatística revelou diferença significativa entre os gêneros M e F, e entre os grupos anóxia e seus controles, Prancha I- figura A. Houve diferença significativa entre os grupos controle e anóxia de fêmeas em P8, P9, P13, P14, P15 e P16 (●); os grupos de machos foram significativamente diferentes a partir de P7 (*). Diferença significativa de gênero foi observada nos grupos controles a partir de P6 (+).

Nas fêmeas a anoxia promoveu aumento significativo de apenas 24% em relação ao controle (CF 583% e AF 607%). Já no grupo dos machos a anóxia promoveu diferença significativa de aumento no peso de 107% maior em relação ao seu controle (CM 496% e AM 603%). Quanto ao gênero no grupo controle a diferença de aumento de peso corporal nos controles foi de 87%, a maior para as femeas (CM 496% e CF 583%) enquanto a anóxia promoveu diferença de apenas

4%, para as fêmeas (AM 603% e AF 607%). Portanto, o estímulo anóxia teve efeito mais pronunciado nos machos apresentaram maior ganho de peso que as fêmeas. Nos machos controles, o comportamento de parâmetro foi similar em relação as fêmeas. Pesquisas adicionais sobre o teor de ingesta ou de diferenças metabólicas poderão contribuir para a compreensão desses resultados.

V.2.3. Eixo látero-lateral do crânio (ELLC)

Quanto ao desenvolvimento do eixo látero-lateral do crânio, diferenças significativas foram observadas entre machos e fêmeas em todos os dias, independente do grupo, seja controle ou anóxia. Os grupos anóxia apresentam diferença significativa em relação aos seus controles em P2, P3, P4, P5, P6, P19, P20 e P21, independente do gênero (Prancha I – figura B).

No grupo macho a anóxia induziu efeito 21% a maior que o controle (CM 246% e AM 267%) relação similar se observou nas fêmeas, mas a diferença foi de 10% apenas maior no grupo anóxia em relação ao controle (CF 272% e AF 282%).

V.2.4. Eixo ântero-posterior do crânio

Todos os animais apresentaram aumento no eixo ântero-posterior do crânio no decorrer dos dias P2 a P21, mas não houve diferenças significativas entre os grupos quanto ao estímulo nem quanto ao gênero (Prancha I - Figura C). O grupo Macho Controle apresentou aumento nesse parâmetro de 191%, sendo que os grupos anóxia de machos e fêmeas e controle fêmea apresentaram aumento similar ao redor de 187%.

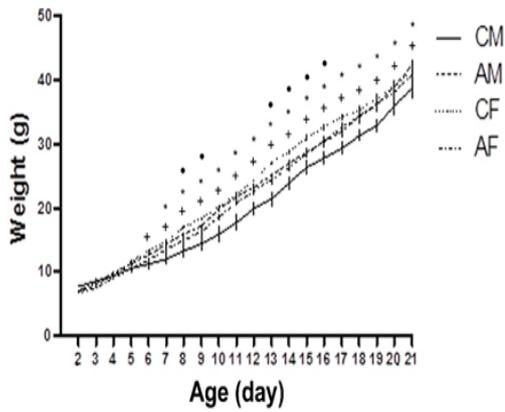
V.2.5. Eixo longitudinal do corpo

A análise estatística evidenciou diferenças significativas na comparação do comprimento do eixo longitudinal do corpo entre os grupos de estudo: controle e

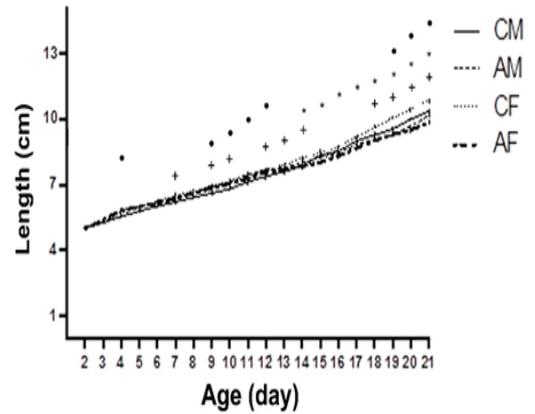
anóxia de machos que oscila entre os dias P4 a P20. No grupos das fêmeas essa diferença foi consistente a partir de P14. Quanto ao gênero os grupos controle macho e fêmea apresentam diferença significativa que oscila entre P7 e P21, mas no grupo anóxia ela aparece apenas em P21 (Prancha I - Figura D).

I- PRANCHA DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

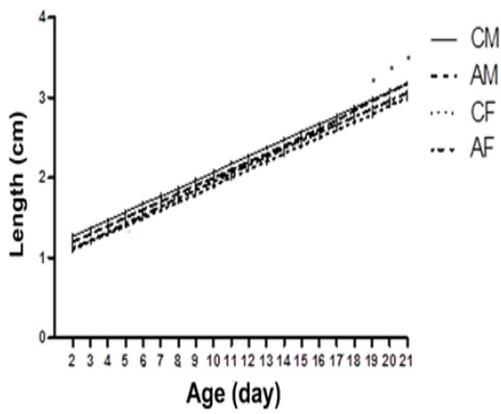
Peso corporal



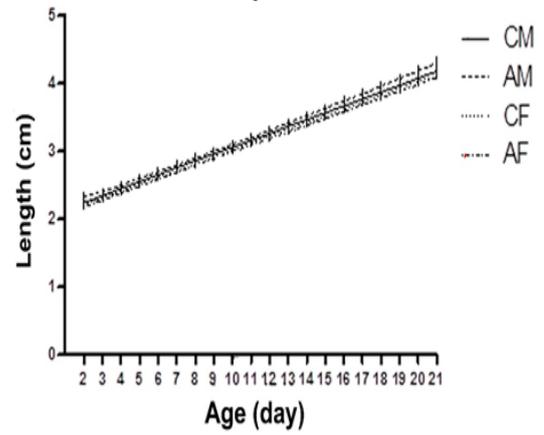
Eixo longitudinal do corpo



Eixo látero-lateral do crânio



Eixo ântero-posterior do crânio



Prancha I – Desenvolvimento somático dos parâmetros indicados, aferidos diariamente durante a amamentação (P2-P21) nos grupos Controle e Anóxia de ratos Wistar machos e fêmeas.

Em relação ao ganho de peso, eixo médio-lateral, eixo ântero-posterior e comprimento corporal, uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou sexo ($F(3,92) = 11,62$; $p \leq 0,00$), grupo ($F(1, 19) = 189.xx$; $p \leq 0,00$) e tempo ($F(1, 19) = 1897,018$; $p \leq 0,00$). E também revelou efeitos significativos de interação para o grupo * gênero * tempo. A análise post hoc revelou que o peso corporal médio do macho anóxico era mais elevado no PND 7 ao PND21 ($p < 0,05$) e era mais do que o do sexo masculino controle e do sexo feminino anóxico. A análise post hoc revelou que as fêmeas do grupo controle PND 8, PND9, PND13, PND14 e PND15 pesavam significativamente mais do que fêmeas anóxicas ($p < 0,05$).

Em relação ao comprimento corporal do 2º ao 20º dia de vida o comprimento corporal dos filhotes anóxicos foi menor que o do controle, houve diferenças significativas entre os PND4, PND9, PND10, PND11, PND12, PND19 e PND20 ($p < 0,05$) nos machos e entre fêmeas de PND14 e entre os grupos anóxica machos e fêmeas houve diferença significativa no último dia de amamentação.

No eixo médio-lateral (Fig. 1B) os filhotes do grupo anoxia apresentaram diferença significativamente maior que o controle de P2-P6 e de P19-P21, no eixo ântero-posterior não houve diferença entre os grupos anóxica e controle.,

V.3. Desenvolvimento ontogenético

Foi realizado o estudo do efeito da anóxia em filhotes no segundo dia de lactação sobre aparecimento de características ontogéticas consideradas marcos de desenvolvimento. O estímulo anóxia alterou a maturação de desses parâmetros físicos de forma que sugerem que a privação de oxigênio desencadeou mecanismos fisiológicos que culminaram em alterações persistentes (Prancha II- Figuras A a E). Avaliação estatística realizada com ANOVA de medidas repetidas e teste post-hoc de Tukey-Kramer, indicou nos grupos Anóxia e Controle, de machos e fêmeas; (M+EP; n=14 em cada grupo) $p \leq 0,05$. A apresentação desses parâmetros a seguir é feita por sequência de aparecimento, tanto quanto possível.

V.3.1 Desdobramento do pavilhão auricular

Neste estudo não foram observadas diferenças entre os animais controle e anóxia, sejam machos ou fêmeas, nem tampouco diferença de gênero quanto ao desdobramento do pavilhão auricular que ocorreu em P4, 2 dias após o estímulo.

V.3.2 Abertura do Canal Auditivo

No grupo anóxia macho não houve diferença entre os grupos controle e anóxia no aparecimento da ACA que ocorreu ao redor do 14º (de vida), porém no grupo das fêmeas houve diferença significativa, com atraso no grupo anóxia em 1 dia do aparecimento da ACA em relação ao seu controle a $p=0,03$. Não foi detectada diferença de gênero (Prancha I – Figura B)

V.3.3. Erupção dos incisivos inferiores

Não houve diferença entre o grupo anóxia e controle de ambos os gêneros quanto à erupção dos incisivos inferiores que ocorreu ao redor do 10º dia pós-natal. Porém, o grupo anóxia macho apresentou retardo a $p=0,06$: CM $9,43 \pm 0,85$ e AM $9,14 \pm 0,95$; e CF $8,50 \pm 1,22$ e AF $9,43 \pm 1,60$. Portanto, não significativo conforme o padrão adotado neste estudo (Prancha I- Figura D).

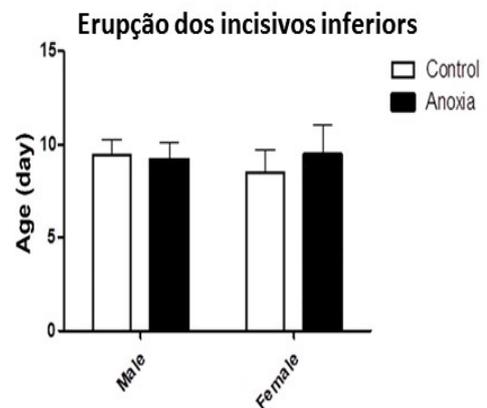
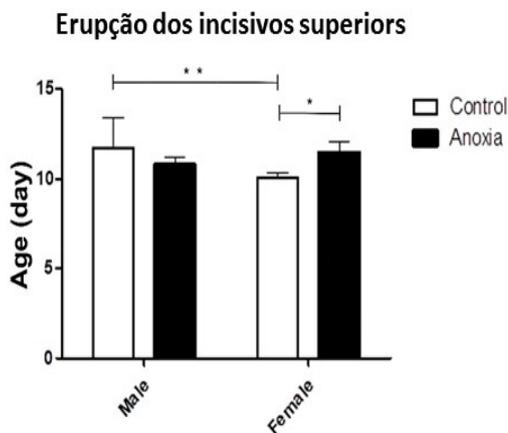
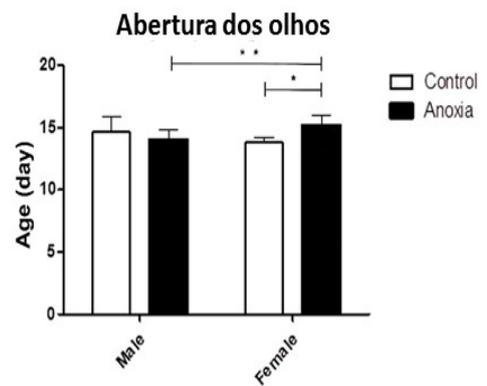
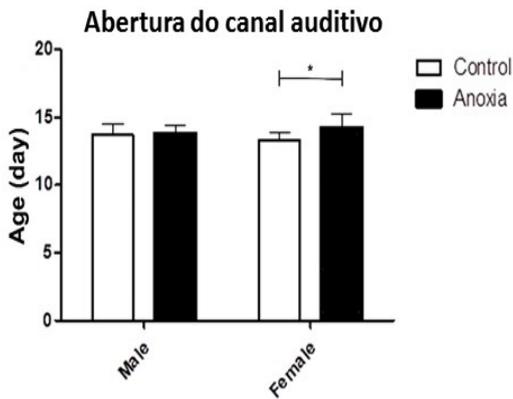
V.3.4. Erupção dos incisivos superiores

A erupção dos incisivos superiores apresentou no grupo anoxia fêmea, atraso significativo, 1 dia em relação ao seu controle, que ocorreu ao redor do 10^o pós natal (CM 11,71±1,68, AM 10,79±0,43; CF 10,07±0,27, AF 11,43±0,65 em dias). Em relação à maturação desse parâmetro nos grupos controle houve atraso significativo de 1 dia do grupo de fêmeas em relação aos machos (Prancha I- Figura E).

V.3.5 Abertura dos olhos

Quando comparados os grupos anóxia e controle fêmea evidenciam atraso de dois dias na abertura dos olhos que ocorreu ao redor do 14^o dia, porém no grupo dos machos não houve diferença significativa (CM 14,64±1,28 e AM 14,00±0,88).. No grupo das fêmeas houve diferença significativa (CF 13,79±0,43 e AF 15,14±0,86). Quanto ao gênero houve diferença significativa apenas entre os grupos anóxia macho e fêmea. (Prancha I - Figura C). Contrariamente, a esses resultados Fan et al (2005) observaram em machos submetidos à hipóxia atraso na abertura dos olhos, não menciona quantos dias, porém esses utilizaram metodologia diferente de estímulo isto é, oclusão bilateral da carótida, com animal em P4, e exposição a condição de hipóxia (8% oxigênio por 10 minutos) o que portanto deve ter causado a diferença de resultados. Esses autores não trabalharam com fêmeas.

II- Desenvolvimento ontogenético



22

Prancha II - Desenvolvimento ontogenético dos parâmetros indicados, aferidos diariamente durante a amamentação (P2-P21) nos grupos Controle e Anóxia de ratos Wistar machos e fêmeas.

Não foram encontrados efeitos de grupo para a erupção do incisivo superior para o grupo ($F(1,52) = 0,73$; $p = 0,39$), a ANOVA revelou uma tendência para o sexo ($F(1,52) = 3,99$; $p = 0,05$) ($F(1,52) = 5,09$, $p \leq 0,02$), falta de efeitos para o sexo ($F(1,52) = 20,86$; $p = 0,0003$). ($F(1,52) = 0,30$, $p = 0,86$).

($F(1,52) = 2,14$; $p = 0,14$) e gênero ($F(1,52) = 0,34$; $p = 0,56$) Análise pontual indica que as fêmeas de Anoxia atrasaram o aparecimento destes marcos físicos daqueles medidos em fêmeas de controle ($p < 0,05$) = $16,818$; $p = 0,0001$).

V.4 Avaliação Reflexos sensório-motores

O conjunto de reflexos escolhidos para este estudo foi baseado em duas considerações: (1) a idade em que o reflexo se instala e (2) esses reflexos serem independentes de sexo ou espécie. A recuperação de decúbito, a aversão ao precipício e a geotaxia negativa foram escolhidos por representarem alguns dos primeiros marcos do desenvolvimento (Fox., 1965). Uma variedade de reflexos sensório-motores previamente foi demonstrada para avaliar o desenvolvimento comportamental e funcional em ratos neonatos (Roy, 1999; Singh, 1998 e Yin., 1997). Neste item, eles são considerados na sequência de aparecimento em dias.

V.4.1 Recuperação de decúbito

Em relação a recuperação de decúbito não houve diferenças entre os grupos e gêneros, esse reflexo se instalou no 4º dia de vida. Avaliação estatística realizada com ANOVA de medidas repetidas e teste post-hoc de Tukey-Kramer, nos grupos Anóxia e Controle, de machos e fêmea; ($M \pm EP$; $n=14$ em cada grupo) $p \leq 0,05$.

V.4.2 Aceleração

No reflexo de aceleração observado em P4, não houve diferença significativa entre os grupos controle e anóxia de machos ou fêmeas, nem diferença de gênero.

V.3.4 Preensão palmar

O estímulo de anóxia neonatal atrasou significativamente o reflexo de preensão palmar que aparece ao redor do 5º dia de vida nos animais controle de ambos nos grupos de ambos os sexos. Houve atraso entre os animais controle e anóxia de ambos os sexos; em machos a anóxia induziu atraso de 2 dias e nas fêmeas o atraso foi de 6 dias, o que indica diferença significativa de gênero, sendo que as fêmeas foram mais afetadas (Prancha III - Figura C).

V.4.5 Colocação pelas vibrissas

A colocação pelas vibrissas nos ratos ocorreu ao redor do 10º dia pós-natal nos grupos controle, sendo que nos machos ocorreu no dia 9 e nas fêmeas no dia

10, significativamente diferente. Neste parâmetro, houve diferença significativa entre os grupos controle e anóxia, tanto em machos como em fêmeas, $p < 0,049$. Também foi significativa a diferença de gênero para a anóxia: nas fêmeas anóxia a CV ocorreu no dia 9 e no macho anóxia (dia 8), $p < 0,002$ (Prancha III - Figura D).

V.4.6 Resposta ao susto

A resposta ao susto se instalou ao redor do dia 12 pós-natal. Este reflexo se instalou um dia antes no grupo de fêmeas, em relação aos machos, de maneira significativamente diferente, $p < 0,001$. O estímulo de anóxia atrasou o reflexo nos grupos de machos de um dia, e em fêmeas de dois dias em relação aos respectivos controles (Prancha III – Figura E).

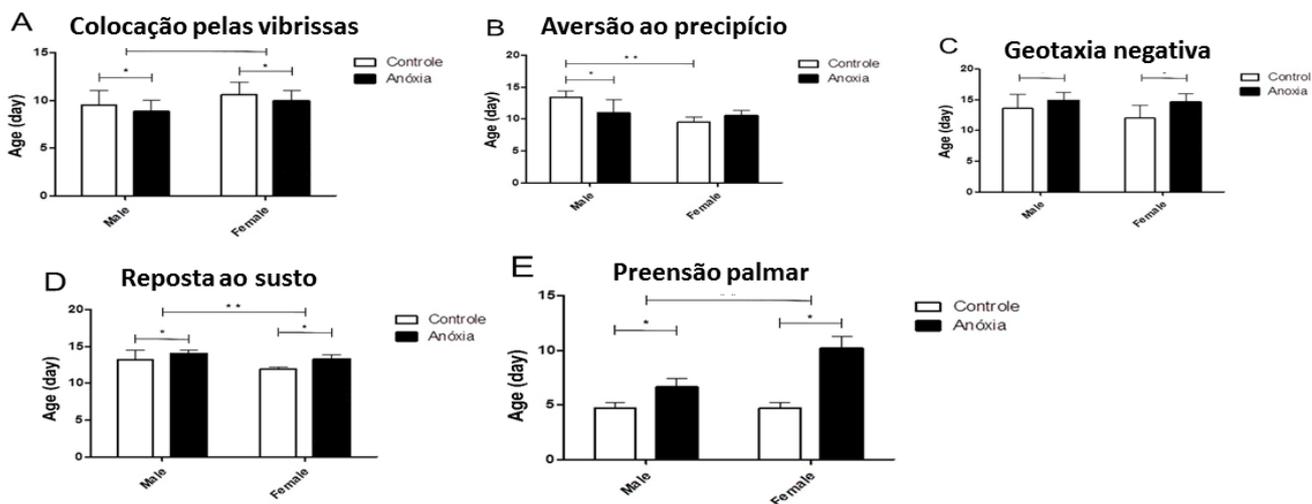
V.4.7 Geotaxia negativa

O estímulo de anóxia atrasou significativamente a geotaxia negativa que nos controles aparece ao redor do 12^o pós-natal. No grupo de machos o atraso foi de 1 dia e no grupo das fêmeas esse atraso foi em 2 dias em relação aos respectivos controles. Porém não houve diferença significativa no atraso entre os gêneros, mas sim no grupo controle, sendo que as fêmeas apresentaram o reflexo antes dos machos (Prancha III - Figura F).

V.4.8 Aversão ao precipício

A aversão ao precipício aparece primeiro nas fêmeas controle ao redor do décimo dia pós-natal, seguida do grupo anóxia não sendo significativamente diferentes. No grupo dos machos controle este reflexo apareceu em torno do décimo terceiro dia e no grupo anóxia macho ao redor décimo primeiro dia de vida – sendo significativamente diferentes (Prancha III - Figura G). Poranto houve diferença significativa quanto ao gênero no grupo controle, onde os machos atrasaram em 4 dias o aparecimento do reflexo quando comparados as fêmeas

III - Reflexos sensório-motores

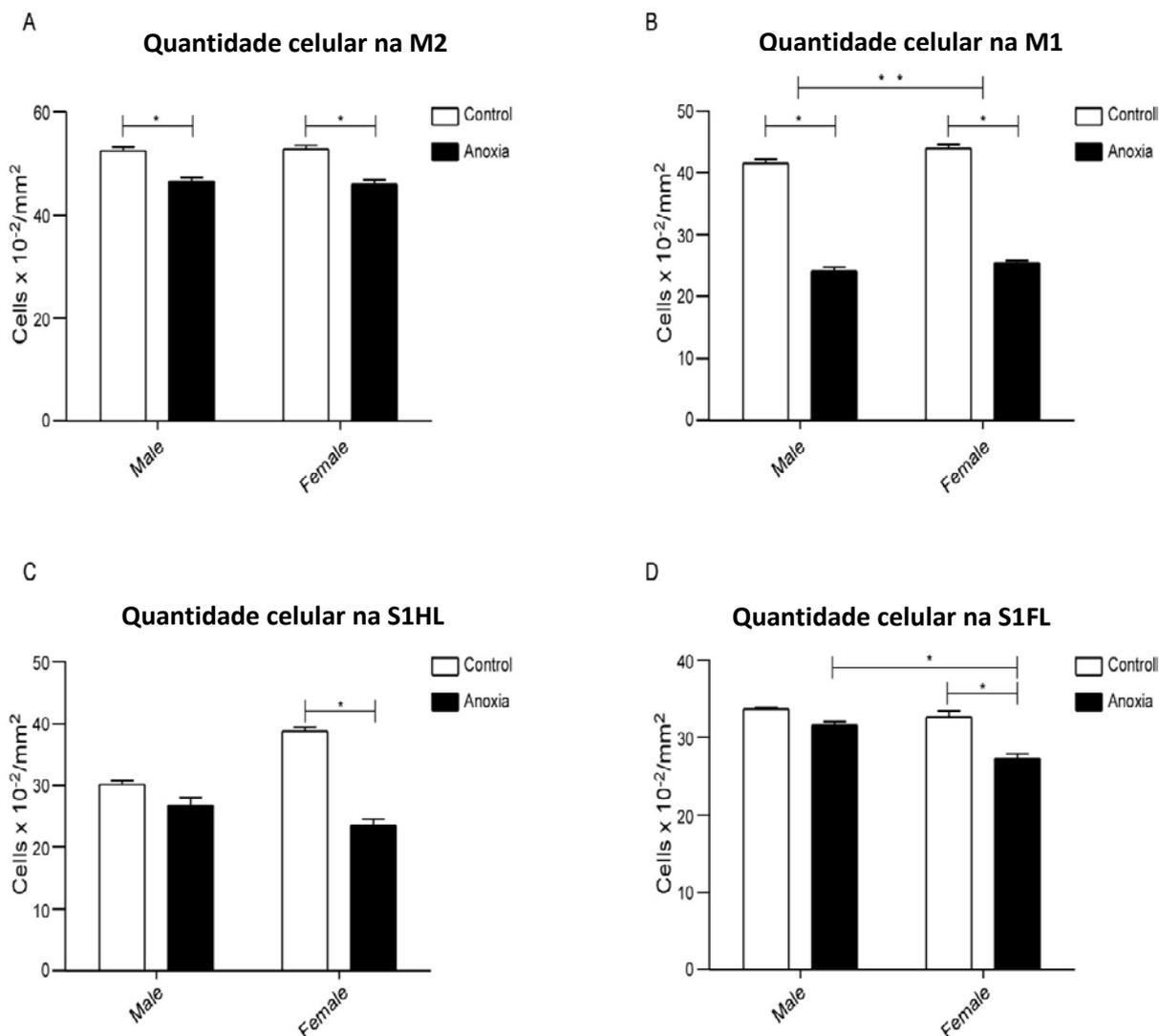


27

Prancha III - Comparação da Ontogênese do Aparecimento dos Reflexos Sensório Motores dos parâmetros indicados, aferidos diariamente durante a amamentação (P2-P21) nos grupos Controle e Anóxia de ratos Wistar machos e fêmeas.

Não foram encontrados efeitos de grupo para a erupção do incisivo superior para o grupo ($F(1,52) = 0,73$; $p = 0,39$), a ANOVA revelou uma tendência para o sexo ($F(1,52) = 3,99$; $p = 0,05$) ($F(1,52) = 5,09$, $p \leq 0,02$), falta de efeitos para o sexo ($F(1,52) = 20,86$; $p = 0,0003$). ($F(1,52) = 0,30$, $p = 0,86$). ($F(1,52) = 2,14$; $p = 0,14$) e gênero ($F(1,52) = 0,34$; $p = 0,56$) Análise pontual indica que as fêmeas de Anoxia atrasaram o aparecimento destes marcos físicos daqueles medidos em fêmeas de controle ($p < 0,05$) = $16,818$; $p = 0,0001$. A análise post hoc indica que a fêmea de Anoxia atrasou o aparecimento desses marcos físicos daquela medida em fêmeas de CTL ($p < 0,05$) e indica que o macho de etanol acelera a maturação da evitação de penhasco em relação ao macho de controle ($p = 0,05$).

V - Densidade da células no córtex sensório motor



Prancha IV Avaliação estatística realizada com ANOVA de medidas repetidas e teste post-hoc de Tukey-Kramer, $p \leq 0,05$. Os valores representam $M \pm EP$, $n=5$ em cada grupo:

M2: AM (46.84 ± 1.72), CM (52 ± 1.66), AF (45.55 ± 1.80), CF (52 ± 1.55)

M1: AM (23.70 ± 1.33), CM (41.89 ± 1.49), AF (25.69 ± 0.83), CF (43.88 ± 1.46)

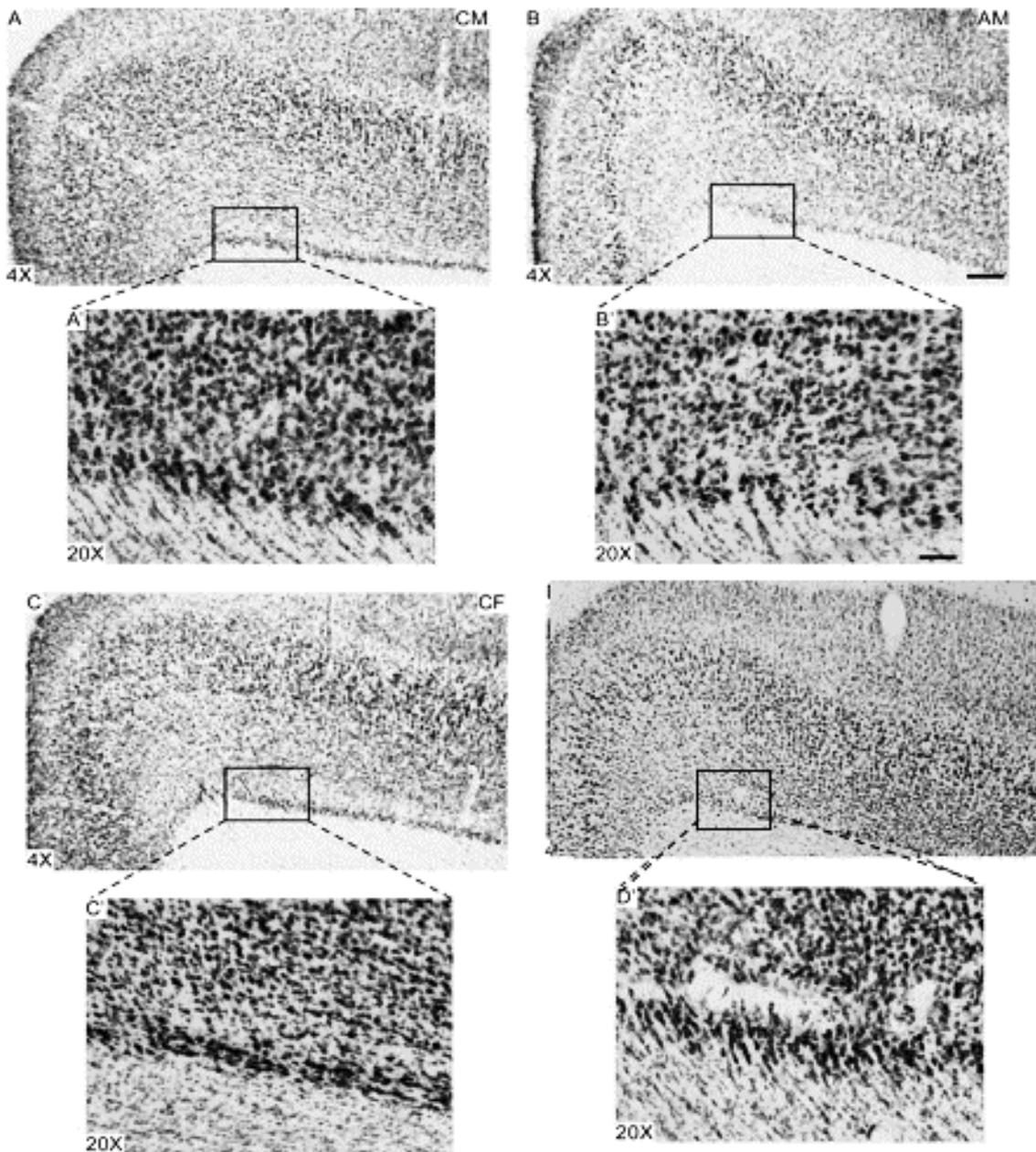
S1HL: AM (27.93 ± 2.69), CM (30.19 ± 1.31), AF (23.42 ± 2.38), CF (38.88 ± 1.48)

S1FL: AM (31.85 ± 1.09), CM (33.88 ± 0.48), AF (27.66 ± 1.36), CF (32.28 ± 1.70)

VI- Histologia para quantificação de neuronios no córtex sensório motor primário de ratos

As fatias coronais do córtex sensório motor primário de ratos, corados em Nissl, mesmo em 200x de ampliação (10 ocular x 20 objetiva) evidenciam o dano que a anóxia neonatal promove no tecido, onde tanto em machos quanto em fêmeas é possível observar diminuição do número de células, redução da espessura das camadas corticais e consequente espalhamento celular. Desde o giro do cíngulo aos córtices sensorial e motor, nas camadas I a VI. As áreas motoras do córtex estão localizadas no giro indicado para mostrar sua divisão em camadas (I-VI) e regiões funcionais (SI, córtex somatossensorial primário, MI, córtex motor primário), região do córtex cerebral definida com base nas suas estruturas citoarquitônicas e organização de suas células. O Córtex motor é uma área anterior ao sulco central do cérebro, ocupando o terço anterior dos lobos frontais, está o córtex motor. Localizado posteriormente ao sulco central se encontra o córtex somatossensorial. As camadas supragranulares consistem em camadas I a III. As camadas supragranulares são a origem primária e a terminação das ligações intracorticais, que são associativas (ou seja, com outras áreas do mesmo hemisfério), ou comissurais (isto é, conexões com o hemisfério oposto, principalmente através do corpo caloso). A camada granular interna, camada IV, recebe conexões talamocorticais, especialmente a partir de núcleos talâmicos específicos. Isto é mais proeminente nos córtices sensoriais primários. As camadas infragranulares, camadas V e VI, ligam principalmente o córtex cerebral com regiões subcorticais. Estas camadas são mais desenvolvidas em áreas motoras corticais. As áreas motoras têm camadas granulares extremamente pequenas ou inexistentes e são muitas vezes chamadas de "córtex agranular". A camada V dá origem a todas as principais projeções eferentes corticais aos gânglios da base, tronco cerebral e medula espinhal. A camada VI, a camada multiform ou fusiform, projeta-se primeiramente ao thalamus. Os efeitos são observados. Já o aumento de 40x (objetiva 4 e ocular 10) é claro que esse efeito é mais pronunciado nas fêmeas como é demonstrado pelas lacunas e tecido mais friável, nas camadas (I-VI) o que ilustra os valores obtidos na estereologia, item V e prancha V de histologia coloração em Nissl.

VI- Histologia para quantificação de neuronios no córtex sensório-motor primário de ratos



Prancha V . Microfotografia do Córtex Motor Primário em corte coronal, ratos em P41, Ilustra o padrão da das diferentes camadas coloração de Nissl de animais dos grupos controle e anóxia, de ambos os sexos, ao redor do bregma -2,12 mm. Aumento de 20x. Barra 100 μm, utilizados para estereologia.

VI - DISCUSSÃO

O estímulo de anóxia neonatal em P2, utilizado neste estudo com modelo de anóxia global, não invasiva, por 25 minutos, afetou o desenvolvimento físico, sensório-motor e a ontogênese de reflexos animais anoxiados em relação aos controles de forma diferenciada em machos e fêmeas. Essas alterações sugerem que a privação de oxigênio desencadeou mecanismos fisiológicos que alteraram o sistema nervoso central dos neonatos de forma persistente.

Nossos filhotes de anoxia quando crescem e se tornam pais são mais vulneráveis à epigenética e seu cuidado materno precoce pode programar sua prole para mudanças fisiopatológicas levando a diabetes, hipertensão e autismo.

A literatura evidencia que ratos que sofreram hipóxia possuem menor peso corporal em comparação com seu controle (Wagner et al, 2002; Cai et al, 2005). Para tal estudo foram utilizados ratos de sete dias de vida (P7), com modelo baseado na oclusão da carótida e colocação do animal em ambiente contendo 8% de oxigênio e 92% de nitrogênio por período de 30 minutos a 3 horas. O presente estudo contrariamente evidenciou aumento significativo de peso dos animais machos em relação aos controles, contudo as fêmeas anoxiadas diminuem de peso, mostrando diferença de gênero em relação aos efeitos. Ainda, estes resultados sugerem que o estímulo mais agressivo pela cirurgia de procedimento invasivo em fase precoce do desenvolvimento afetou de forma diferente do modelo aqui empregado. Nos experimentos deste estudo o estímulo, anóxia, foi maior e ocorreu em fase ainda mais precoce, isto é em PND2. Nesse estudo, anoxia leva a considerar o aumento de peso corporal e do eixo antero-posterior do corpo durante a adolescência. Para o crescimento do tamanho corporal, um dos fatores que influenciam nesse parâmetro é o resultado dos processos dinâmicos envolvendo o desenvolvimento, a liberação de cálcio e a reabsorção óssea. São vários os fatores envolvidos nesse processo, desde a expressão do hormônio do crescimento, que é reduzido em indivíduos expostos a privação de oxigênio em período neonatal (Raff et al., 2001; Zhang et al., 2000).

No que concerne ao crescimento somático, eixo antero-posterior do crânio não é afetado pela anóxia em relação ao grupo controle, mas sim o látero-lateral.

Resultado que reitera pesquisa que evidencia alteração crânio-encefálica em ratos que sofreram hipóxia em P7 (Balduini et al., 2000). Ainda, alterações nas dimensões e crescimento do crânio de ratos foram observadas após hipóxia neonatal (Ikeda et al., 2002). Estudos posteriores com asfixia perinatal evidenciaram alterações nos eixos látero-lateral e ântero-posterior do crânio os quais foram atribuídos a possível edema encefálico ou a algum tipo de hidrocefalia resultantes do modelo em que a rata prenha é decaptada ou anestesiada imediatamente antes do parto, seu útero contendo os filhotes é removido e imerso em solução salina por 16-25 minutos (Venerosi et al., 2004; Mao et al., 2014). Estes dados evidenciam que as alterações diferem conforme o modelo utilizado e o seu grau de estresse no sistema nervoso em desenvolvimento. Por volta do decimo dia de gestação, a serotonina (5-HT) é envolvida ativamente no desenvolvimento das interações crânio faciais modulando a interação do epitélio mesenquimal, essencial para o desenvolvimento normal dessa região do rato (Shuey et al., 1992). Este estudo adiciona a comparação com fêmeas, estas sempre apresentaram valores menores nos parâmetros observados em relação ao grupo controle fêmea menor que controle macho, pôr a anóxia os irá afetar de forma diferente conforme o parâmetro avaliado. No eixo latero-lateral as fêmeas a anóxia não afeta significativamente os dois grupos.

Quanto ao eixo longitudinal do corpo, este estudo indicou que a anóxia o diminui em machos em relação ao controle, mas na fêmea a diminuição é maior. Neste parâmetro a literatura reporta que hipóxia provoca retardo (Lubics et. al 2005) confirmando nosso estudo. Resultado similar foi observado quanto ao peso corpóreo nos grupos controle e anóxia de fêmea. Avaliações desses parâmetros em fases posteriores do desenvolvimento serão importantes para avaliar a persistência das alterações bem como sua evolução corporal.

Nos parâmetros de desenvolvimento ontogenético houve atraso na anóxia fêmea em relação ao grupo controle para a abertura do canal auditivo, e para a abertura do olho. Quanto a erupção dos incisivos, apenas nos superiores houve diferença siginificante em que a anóxia promoveu atraso nos machos mas adiantamento nas fêmeas. Diferença de gênero foi observada apenas na erupção

dos incisivos e na abertura dos olhos. Contudo, confirmando alguns desses dados a literatura indica que estímulos de asfixia perinatal (P4 e P7) provocam atraso no descolamento da orelha e no aparecimento da abertura do canal auditivo, na abertura dos olhos e erupção dos incisivos inferiores e superiores (Fan et al., 2005 e Kiss et al., 2009; Bustamante et al., 2007). Esses resultados são reprodutíveis ao longo do período de amamentação, independente de gênero e espécie animal (ratos e camundongos), esses resultados têm sido utilizados como referência dos marcos do desenvolvimento neurológico de acordo com a especificidade dos modelos utilizados (Roy et al., 1999; Meck et al., 2000; Singh et al., 1988). Ressalva a que os resultados deste estudos diferiram em alguns aspectos, evienciando que talvez o modelo utilizado seja relevante na observação dos efeitos produzidos.

Importante objetivo deste estudo é contribuir para a melhoria das condições de sobrevivencia de humanos que passam por anóxia perinatal. O modelo utilizado simula as principais alterações metabólicas e fisiológicas a que estão sujeitos recém-nascidos humanos, quando expostos à privação de oxigênio, pois é anóxia global, não invasiva sendo que o cérebro do rato neonato, em P2, idade que corresponde a aquela do feto de 24 semanas, enquanto que o cérebro de um rato de dez dias é comparavel ao de um humano recém nascido (Nyakas et al., 1996; Takada et al., 2011).

O recém-nascido prematuro apresenta alto risco de lesão cerebral onde a anóxia neonatal atinge de 0,1 a 0,3% das crianças nascidas a termo (Kurinczuk et al., 2010) e aproximadamente 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascer (Vannucci., 2000; Volpe., 1998, 2009). A prematuridade, é, portanto, o principal fator de risco associado à anóxia neonatal (Macdonald et al., 1980, Vannuccl., 2000; Volpe., 1998). Há uma variedade de encefalopatias que limitam a função motora em crianças pequenas, sendo a paralisia cerebral a mais prevalente,acompanhada por prejuízo sensorial e limitação cognitiva (Sanchez et al., 2013).

As conseqüências anatômicas e funcionais da privação de oxigênio, refletidas nos resultados apresentados, decorrem de morte celular a prejuízos na diferenciação de neurônios em desenvolvimento e variam de terminais nervosos a

axônios e dendritos. Neurônios imaturos que sobrevivem ao insulto hipóxico agudo podem ainda ter comprometimento da formação de sinapses e crescimento de neuritos (Nyakas et al., 1996).

Na hipóxia, células ciliadas da cóclea e neurônios do gânglio espiral são as principais regiões periféricas afetadas ao lado da retina (Lin et al., 2011). A geração de espécies de oxigênio reativas induz à perda do potencial de membrana mitocondrial, a liberação de cálcio e morte celular por apoptose, dependente da caspase, durante a interação da hipóxia e ototoxicidade in vitro, eventos que contribuem para a perda auditiva (Lin et al., 2011a). A falta de oxigenação em neonatos induz morte celular por apoptose, autofagia, excitotoxicidade e necrose em neurônios, astrócitos e células progenitoras de oligodendrócitos (pre-OLs) na formação hipocampal e em outras estruturas corticais (Rosenberg et al., 2014; Takada et al., 2015).

No presente estudo, houve atraso na maturação da maioria dos reflexos nos filhotes, com excessão da colocação pelas vibrissas em que machos e fêmeas apresentaram adiantamento, e na aversão ao precipício apenas machos apresentaram adiantamento. Interessante é que na preensão palmar as fêmeas apresentaram um atraso muito maior que o dos machos. Esses dados sugerem que a anóxia causou prejuízo motor, já vizível nas fases precoces conforme alguns autores coloquem (Jansen et al., 1996). Embora a literatura, relate atraso na maturação da recuperação de decúbito em ratos machos após hipóxia (Mooreb et al., 2003,), neste estudo não houve diferença no parâmetro nos grupos de machos e de fêmeas nem diferença de gênero

Alta evidência de paralisia cerebral e retardo mental tem sido associada a déficits na preensão palmar e colocação pelas vibrissas, decorrentes de asfixia grave neonatal (Futagi et al., 1999; 2002; Bona et al., 1997).

A inativação de hormônio tireoideano em ratos em células que expressam endogenamente D3 confirma que a hipóxia afeta a morfologia do desenvolvimento de vários tecidos, inclusive o do ouvido, e, portanto, poderia explicar a influência negativa da privação de oxigênio no desempenho do reflexo de resposta ao susto

como observado neste estudo (Warner et al., 2016). Correlação entre o atraso na geotaxia negativa com o sistema locomotor e a habilidade de aprendizado foi descrita em animais que passaram por hipóxia, o que também pode se aplicar ao retardo observado tanto em machos quanto em fêmeas neste estudo (Jansen et al., 1996). Esse reflexo afetado também mostrou relação com desempenho de memória em testes de navegação relacionados à perda de tecido cerebral (Felt et al., 2002).

Experimentos de ligadura unilateral da artéria carótida em P7 seguido hipóxia severa causou atraso no aparecimento da aversão ao precipício em ratos machos (Ten et al., 2003), diferentemente deste estudo que observou adiantamento em machos mas nenhuma diferença no grupo das fêmeas. Estudos relacionaram os efeitos nesse reflexo a danos na integridade neurológica (Moore et al., 2003).

A análise neurofuncional de curto prazo destes reflexos, avaliados em 24 horas após indução da hipóxia, demonstrou correlação significativa entre a gravidade da lesão hipóxico-isquêmica, o desenvolvimento neurológico e o aparecimento dos reflexos (Jansen et al., 1996). Estas experiências de curto prazo destacam a importância da padronização do momento em que os reflexos são avaliados, pois, em cada reflexo há o envolvimento de várias estruturas específicas, cujo aparecimento ontogenético pode não ter ocorrido em plenitude ou ter sido afetado (Fox, 1965).

Em relação à geotaxia negativa à recuperação do decúbito e à aceleração é importante observar a existência de três sistemas periféricos envolvidos na regulação e na correção postural: sistema vestibular, exteroceptivo e proprioceptivo (Altman et al., 1975). A anóxia atrasou o aparecimento das respostas de correção de posição na GN, o que está relacionado aos danos que ela provoca no sistema auditivo e vestibular (Koyama et al., 2005). A preensão palmar e a aversão ao precipício, que também dependem do desenvolvimento sensoriomotor para a sua execução, sofreram as mesmas influências que a geotaxia negativa apresentando atraso no aparecimento. Van de Berg e colaboradores (2003) mostraram atraso sensório-motor em preensão palmar nos

filhotes que passaram por hipóxia, o que corrobora estes experimentos, com a novidade que as fêmeas foram sensivelmente mais afetadas que os machos.

No reflexo de aceleração, a anoxia neonatal não apresentou diferenças. Contudo, modelos de hipóxia isquêmica indicaram pequenos déficits na coordenação motora afetando a aceleração (Ishikawa et al., 1987).

As vibrissas estão intimamente relacionadas com o córtex somatossensorial primário, o córtex em barril e a formação hipocampal em roedores, pois elas auxiliam a navegação espacial, principalmente subterrânea, e no forrageamento (Polley et al., 2004). Tanto a estimulação das vibrissas quanto aplicações de BDNF estimulam a plasticidade nessas estruturas, o que, por sua vez, sensibiliza e acentua a resposta das próprias vibrissas (Gomez-Pinilla et al., 2011).

Os resultados da estereologia evidenciam que o insulto anóxico neonatal foi capaz de diminuir o teor de neurônios em regiões do córtex motor e somestésico nas suas várias camadas, na região das patas traseiras e patas dianteiras houve diferença significativa de grupo e de gênero. O grupo das fêmeas anoxiadas apresenta menor quantidade de neurônios nessa região que os machos anoxiados. Estudos mostram que, além de estarem presentes a apoptose no córtex motor em massa, o decréscimo pode causar epilepsia e causar déficits neurológicos e déficits motor incluindo spasticity (Jansen et al., 1997). Após lesão isquêmica neonatal degeneração das áreas corticais e subcorticais do cérebro e está associada com déficits. Corroborando esses estudos foi mostrado que hipóxia em animais adultos causa atrofia em regiões específicas do hemisfério lesado, por exemplo: há redução no estriado de 29%, 26% na área do córtex sensoriomotor e de 6% na região dorsal do hipocampo em relação ao tamanho normal dessas regiões, esses danos cerebrais e atrofia cerebral, resultam em prejuízos sensoriomotores em longo prazo (Jansen and Low 1995).

Com exceção do reflexo de geotaxia negativa todos os demais apresentaram diferença de gênero, que podem ser devidas a ação da anóxia

sobre o sistema endócrino e neuroquímico. De fato, essa diferença pode contribuir para resultados que demonstram que machos são mais vulneráveis aos danos cerebrais precoces (Renolleau et al., 2007). Diferenças sexuais nos mecanismos de morte neuronal tem começado a ilustrar a dinâmica e os processos de diferenciação ocorrendo em cérebros neonatos após injúria e enfatizando a necessidade de estudos que incluam ambos os sexos. Isto sugere níveis substancialmente elevados de testosterona presente em fetos humanos do sexo masculino durante a gestação no primeiro ano de vida (Carthy et al., 2008), que pode elevar a excitotoxicidade neuronal que segue a HI (Yang et al., 2002) e que pode contribuir para os déficits exacerbados em homens (Hill et al., 2011). Isto sugere que após este tipo de injúria, células de machos e fêmeas diferem quanto a ativação proporcional de cascatas dependentes e independentes de caspase, levando à morte por apoptose (Zhang et al., 2006).

1. Os efeitos da anóxia foram diferentes em machos e fêmeas, nos grupos controle e anóxia. evidenciando influência de gênero, eventual impacto da anóxia neonatal no desenvolvimento somático,
2. A anoxia neonatal afetou o crescimento somático, a ontogênese do desenvolvimento físico, evidenciando influência de gênero.
3. A anoxia neonatal afetou no desenvolvimento de início dos reflexos neurológicos em relação aos animais controle, anóxia fêmeas mais vulneráveis às conseqüências prejudiciais da anoxia que as machos submetidas às mesmas condições
4. Avaliar o eventual impacto da anóxia neonatal na quantidade de células dos córtices motor e sensorial primário e secundário dos membros anteriores e posteriores por estereologia. Ratos machos são mais vulneráveis às conseqüências prejudiciais em motor região e as fêmeas na sensorio região.
5. Foi evidenciado o efeito diferente de anoxia são vistos em homens e mulheres, portanto, eles precisam de estratégias diferentes.

Referências

- Allemandi W. Estudo da imunorreatividade da proteína S100 β no sistema nervoso central de ratos neonatos submetidos à anóxia. Dissertação de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.
- Andersson M., X Chromosome Y specific DNA is transferred to the short arm of X Chromosome in human XX males. *Science* 233:786-788, 1986.
- Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet*;2:59–67, 2001.
- Auger, A. P., and Olesen, K. M. Brain sex differences and the organisation of juvenile social play behavior. *J. Neuroendocrinol.* 21, 519–525. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01871.x (2009).
- Auger, A. P., Jessen, H. M., and Edelman, M. N Epigenetic organization of brain sex differences and juvenile social play behavior. *Horm. Behav.* 59, 358–363. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.017. (2011).
- Auger, C. J., and Auger, A. P. Permanent and plastic epigenesis in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 34, 190–197. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.05.003(2013).
- Babai, N., Atlasz, T., Tamas, A., Reglodi, D., Kiss, P., Gabriel, R., Degree of damage compensation by various PACAP treatments in monosodium glutamate-induced retina degeneration. *Neurotox. Res.* 8, 227-233 (2005).
- Balduini W, V. De Angelis, E. Mazzoni, M. Cimino Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury *Stroke*, 32, pp. 2185–2191, 2001.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X (1993). Timelines of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* 1993; 14:83–144.
- Bennet L, JSLT Quaedackers, AJ Gunn. The effect of asphyxia on superior mesenteric artery blood flow in the premature sheep fetus. *Journal of pediatric*, 2000.
- Boksa, P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia. *Brain Research Reviews*:45, 1–17, 2004.
- Bona E, Hagberg H Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. *Pediatr Res* ;43(6):738–45, 1998.

- Bona E, Johansson BB. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatr Res* 42(5):678– 83,1997.
- Bucci Federica, Gemma Calamandrei, Aldina Venerosi, Igor Branchi, Flavia Chiarotti, Alessandra Verdina, And Enrico Alleva Effects of Prenatal AZT on Mouse Neurobehavioral Development and Passive Avoidance Learning. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 21, No. 1, pp. 29–40 (1995).
- Bustamante D, P. Morales, J.T. Pereyra, M. Goiny, M. Herrera-Marschitz Nicotinamide prevents the effect of perinatal asphyxia on dopamine release evaluated with in vivo microdialysis 3 months after birth *Exp. Brain Res.*, 177 , pp. 358–369,2007.
- Buwalda B., Nyakas C., Vosselman H. J. And Luitmen P.G., Vasopressin prolongs behavioural and cardiac responses to mild stress in young but not in aged rats, *physiol. Behav.*, 1127-1131 (1992)
- Cai, Z., Pang, Y., Xiao, F. & Rhodes, P.G. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain* (2001).Res. 898, 126–135.
- Carthy mc Shannon L. DEAN1 & MARGARET M. Steroids, sex and the cerebellar cortex: implications for human disease *The Cerebellum*– 38 47, 2008.
- Calamandrei G , Alleva E Epidermal growth factor has both growth-promoting and growth-inhibiting effects on physical and neurobehavioral development of neonatal mice. *Brain Res* 1989; **477**:1-6.
- Cirulli F , Alleva E Effects of repeated administrations of EGF and TGF-alpha on mouse neurobehavioral development. *Neurotoxicology* 1994; **15**:819-25.
- Dell'Anna, M. E., Calzolari, S., Molinari, M., Iuvone, L., & Calimici, R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behavioural Brain Research*, 45(2), 125-134. doi:10.1016/S0166-4328(05)80078-6, 1991.
- Dewing P., CWK Chiang, K Sinchak, H Sim. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Current Biology*, 2006 .
- Dobbing J, Smart JL. Vulnerability of developing brain and behaviour. *Br Med Bull*. 1974; 30(2):164-8, 1971.
- Fan L.W; PanY, Lin S, Tien L, T. Ma, P.G. Rhodes, Z. Cai Minocycline reduces lipopolysaccharide-induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat *J Neurosci Res*, 82 , pp. 71–82, 2005.
- Felt BT, Schallert T , Shoo J, Lin Y Early appearance of functional deficits after Neonatal Excitotoxic & Hypoxic-Ischemic injury : Fragile recovery after development and role of the NMDA receptor. *Development Neuroscience*; 24:418-25, 2002.
- Ferrara.A., Atakent Y., Bhogal M., Klupsteen M ., Impact of intermittent prolonged asphyxia in rat sucklings on growth and development, *Growth*, 48 120-133 (1984).

- Flandreau EI Kerry J. Ressler, , Michael J. Owensd, , Charles B.Nemeroffe). Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus *psychoendocrinology* 37,27-30,2012.
- Forger NG, Rosen GJ, Waters EM, Jacob D, Simerly RB, de Vries GJ. Deletion of eliminates sex differences in the mouse forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13666–13671, 2004.
- Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*; 13(2):234-41., 1965.
- Futagi Y, Suzuki Y. Clinical significance of plantar grasp response in infants. *Pediatr Neurol*;20(2):111–5, 1999.
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer* 2:151–163, 2003.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, agoncillo T, Frostig R. The influence of naturalistic experience on plasticity markers in somatosensory cortex and hippocampus: effects of whisker use. *Brain Res.*;1388:39-47, 2011.
- Herrera Marschitz M. Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. *Front Neurosci* 8:47, 2014.
- Hill CA, S.W.Threlkeld and R.H.Fitch. “Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats,” *International Journal of Developmental Neuroscience*, vol. 29, no. 4, pp. 381– 388, 2011.
- Hoeger H, Mario Engelmann, Guenther Bernert, Rainer Seidl, Hermann Bubna-Littitz, Wilhelm Mosgoeller, Gert Lubec), Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat .Long term neurological and behavioural effects of graded perinatal asphyxia in rats. *Life sciences* vol 66, Issue 10, pg 947-962,2000.
- Hovdad.A M.L. Prins, Developing experimental models to address traumatic brain injury in children *Journal of Neurotrauma*, 20 pp. 123–137, 2003.
- Inglis W., Sex differences in the effects of unilateral brain damage on intelligence. *Science* 212:693-695,1981.
- IshikawaM., Takayuki Ohira, ., Jun Namiki,, Masato Kobayashi, Electrophysiological investigation of hemifacial spasm after microvascular decompression: F waves of the facial muscles, blink reflexes, and abnormal muscle responses. *Journal of Neurosurgery* 1/ Vol. 86 / No. 4 / Pages 654-661, 1997.
- Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemichypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res*;78(2):189–94, 1996.

- Jourdane P Irina Nikonenko, Stefano Alberi, and Dominique Muller). Remodeling of Hippocampal Synaptic Networks by a Brief Anoxia–Hypoglycemia. *The Journal of Neuroscience*, April 15, 22(8):3108–3116, 2002.
- Kaur, C., Sivakumar, (KAUR and YOU. 2000; Kaur, C., You, Y., Ultrastructure and function of the amoeboid microglial cells in the periventricular white matter in postnatal rat brain following a hypoxic exposure. (2006a) *Neurosci. Lett.* 290, 17–20. 2000.
- Kiss p, D. Hauser, A. Tamas, A. Lubics, B. Racz, Z. Horvath, J. Farkas, F. Zimmermann, A. Stepien, I. Lengvari, D. Reglodi. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Neurotox. Res.*, 12 pp. 85–93, 2007.
- Kostović I, Lukinović N, Judas M, Bogdanović N, Mrzljak L,. Structural basis of the developmental plasticity in the human cerebral cortex: the role of the transient subplate zone. *Metabolic Brain Disease.* 4:17–23, 1989.
- Koyama S, Kaga K, Sakata H, Iino Y, Kodera K). Pathological findings in the temporal bone of newborn infants with neonatal asphyxia, 1989.
- Krishnan .V, M.H. Han, M. Mazei-Robison, S.D. Iniguez, J.L. Ables, V. Vialou, O. Berton, S. Ghose, H.E. Covington III, M.D. Wiley, R.P. Henderson, R.L. Neve, A.J. Eisch, C.A. Tamminga, S.J. Russo, C.A. Bolanos, E.J. Nestler. AKT signaling within the ventral tegmental area regulates cellular and behavioral responses to stressful stimuli. *Biol. Psychiatry*, 64 (8) pp. 691–700, 2008.
- Kurinczuk JJ .White Koning M, Badawin N. Epidemiology of neonatal encephalopathy. *Early human development.* 86; 329-338, 2010.
- Kurinczuk JJ., White Koning M, Badawin N. Epidemiology of neonatal encephalopathy. *Early human development.* 86; 329-338, 2010.
- Lawn JE, Cousens S, Zupan J, Team LNSS. 4 million neonatal deaths: When? Where? Why? *Lancet.* 365:891–900, 2005.
- Lenz K., Bridget M. Nugent, Rachana Haliyur, and Margaret M. McCarthy . Lin TW, Chen SJ, Huang TY, Chang CY, Chuang JI, Wu FS, Kuo YM, Jen CJ. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiol Learn Mem.*; 97 (1):140-7, 2012.
- Lubics A, Dora R. Neurological Reflexes and early motor. Perinatal brain damage behaviour in rats subjected to neonatal hypoxic Ischaemia. *Behavior Brain Research* 157:157-165, 2005.
- Lynch JK, Epidemiology and classification of perinatal stroke. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.*; 14:245–249, 2009.
- Marschitz H; Tanya N, Edgardo R M, Pablo E M, Daniela E, Ronald P, Valentina M, Manuel. G-H, Benjamin R, Nicola S, Diego B, Paola M and Peter J.

- Gebicke-Perinatal asphyxia: CNS development and deficits with delayed onset. *Frontiers in Neuroscience*, 2014.
- Mason CA, Gregory E.J Maturation and synaptogenesis *Neurosci. Jul;4(7):1715-35*, 1984.
- McCarthy Margaret M., Anthony P., Tracy L., Geert J. De Vries., Gregory A., Dunn, The Epigenetics of Sex Differences in the Brain, *J Neurosci*. 2009.
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev;88:91–124*, 2008.
- McCarthy MM., DeVries, GJ.; Forger, NG. Sexual differentiation of the brain: mode, mechanisms, and meaning. In: Pfaff, DW, editor. *Hormones, Brain and Behavior*. 2009.
- McDonald W, M.V. Johnston Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development *Brain Research Review*, 15 pp. 41–70, 1980.
- Moore-Bradley V.S. Ten, M., J.A. Gingrich, R.I. Stark, D.J. Pinsky .Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic–ischemic encephalopathy .*Behav Brain Res*, 145 pp. 209–219, 2003.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, Keefe, O. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 297(5868):681-33, 1982
- Nyakas C., Buwalda, B., & Luiten, P.G. Hypoxia and brain development.. *Progress in Neurobiology*, 49, 1–51, 1996.
- Nyakas, C., Buwalda, B. Markel, E., Korte, S.M., & Luiten, P.G. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction Effect of prenatal hypoxia on brain development induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist .*European Journal of Neuroscience*, 6, 746–753, 1994.
- Nyakas, C., Buwalda, B. Markel, E., Korte, S.M., & Luiten, P.G. Life-spanning behavioural and adrenal dysfunction Effect of prenatal hypoxia on brain development induced by prenatal hypoxia in the rat is prevented by the calcium antagonist .*European Journal of Neuroscience*, 6, 746–753, 1994.
- Okoshi, Y., Itoh, M., Takashima, S.,. Characteristic neuropathology and plasticity in periventricular leukomalacia. *Pediatr. Neurol.* (2001) 25, 221–226.
- Paxinos G. *The Rat Nervous System*. 3. Ed. London: Elsevier Academic Press,. 2004; 1280.
- Perrin D, Mamet J, Scan H, Roux JC, Berod A, Dalmaz Y. Long term prenatal hypoxia alters maturation of brain catecholaminergic system and motor behaviors in rats synapses 54:92-101, 2004.
- Polley DB, Kvasnák E, Frostig Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. *Nature*.;429 (6987):67-71, 2004.

- Raff H, Bruder ED, Jankowski BM, Colman RJ, Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. *Horm Metab Res.*;33 (3):151-5. (2001).
- Renolleau S, S. Fau, C. Goyenvalle .“Specific caspase inhibitor Rice D., Barone S Jr, Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environment Health Perspective*; 108:511–533, 2000.
- Roof L.R, The dentate gyrus is sexually dimorphic in prepubescent rats: testosterone plays a significant role. *Brain Res.* 610, 148–151, 1993.
- Rosenberg PA, Aizenman E. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. - *Neuroscience letters*, 2014.
- Roy V, Chapillon P. Further evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behav Brain Res.* 154:439-448,2004.
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Nicola, F., Boisserand, L., Willborn, S., & Netto, C. A. Early hypoxia–ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience*, 237, 208-215, 2013.
- Simola, N., Bustamente, D., Pinna, A., Pontis., Morales, P., Morelli, M., Herrera-Marschitz, M.,. Acute perinatal asphyxia impairs non spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp. Brain Res* 185, 595-601 (2008).
- Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E.A., Kaur, C.,. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide production in response to hypoxia in the choroid plexus in neonatal brain. *Brain Pathol.* 18, 71–85 (2008).
- Shuey, D.L.; Sadler, T.W.; Tamir, H.; Lauder, J.M. Serotonin as a regulator of morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology*, v. 46, p. 367–378, 1992.
- Singh J., Nitrogen dioxide exposure alters neonatal development. *Neurotoxicology*;9(3):545–9, 1988.
- Sloper P, C Cunningham, S Turner. Factors related to the academic attainments of children with Down's syndrome , 1990.
- Takada SH, Dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, Machado-Nils AV, Lee VY, Takase LF, Cruz-Rizzolo RJ, Kihara AH, Xavier GF, Watanabe IS, Nogueira MI. Neonatal anoxia in rats. Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience.* 284:247-59, 2015.
- Takada SH, Sampaio CA, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MIA modified rat model of neonatal anoxia : Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fosimmunoreactivity. *J Neurosci Methods.* 198(1):62- 9, 2011.

- Tamas , A., Gabriel, R., Racz B., Denes, V., Kiss, P., Lubics, A., Lengvari, I., Reglodi, D., Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in retinal degeneration induced by monosodium glutamate. *Neuroscience. Lett.* 372,110-113 (2004).
- Ten VS,Bradley Moore M, Gingrich JA. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal rat with Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Behaviour Brain Reserve* 145:209-19.
- Tuor, U.I., Del Bigio, M.R., & Chumas, P.D. (1996). Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovascular & Brain Metabolism Review*, 8, 159–193.
- Tuor UI, Qiao M, MorgunovM, et al. Magnetization transfer and diffusion images of acute and axonal damage in the cerebral peduncle following hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 73(3):325-31, 2012.
- Valenzuela C.; CRUZ G. Sistema endocanabinoide y tratamiento de la obesidad: perspectivas farmacológicas. *Rev. Farmacol. Chile* 7(1): 26.,2014.
- Van de Berg , W.D.,Kwaijtaal., M., Impact of perinatal asphyxia on GABA ergic & locomotor system ,*Neuroscience* 117,83-96, 2003.
- Van de Berg, W,D., Blockland, A., Cuello, A.C., Schimtz, C., Vreuls W., . Perinatal asphyxia results in changes in GABAergic and locomotor syste. *Neuroscience* 117, 83-96 (2003).
- Vannucci RC., Experimental models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage, *APMIS*, 40: 8995,1999.
- Venderhus, Markestad, A Martin, L Johnson, P Coker-Bolt A Case Exploration of Early Motor Delays in an Extremely Premature Infant*Journal of Pediatrics*, 159(1): 79– 85. 2010.
- 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 rat. *Behavioural Brain Research* 168 (1), 56-63, ISSN 0166-4328, 2006.
- Vexler ZS Van Velthoven CT, Sheldon RA, Kavelaars A, Derugin N. Molecular and biochemical mechanism of Post anoxic Brain Injury ; *Epub* 44(5):1426-32. 2013.
- Vexler ZS, Ferriero DM (2001) Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *SeminNeonol*6: 99–108.
- Vidal-Sanz, M., Lafuente, M., Sobrado-Calvo, P., Selles-Navorro, I., Rodriguez, E., Mayor-Torroglosa, S., Villegas-Perez, M.P.,2000. Death and neuroprotection of retinal ganglion cell after different types of injuries. *Neurotox. Res.*2,215- 227.
- Volpe JJ. Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol.* 5(3):135-51, 1998.
- Volpe JJ., Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think.*Pediatrics.*; 112:176–180, 2003.

- Waddell J., Marie Hanscom, Sex differences in cell genesis, hippocampal volume and behavioural outcomes in a rat model of neonatal HI. *Experimental Neurology* 275, 2016.
- Wagner F ;Evelin L; Schaeffer ; Franziska ; Angelika Schmitt ; Gattaz ; Oliver Gruber ;Thomas Schneider-Axmann ; Peter Falkai ; Andrea SchmittIncreased cell proliferation in the rat anterior cingulate cortex following neonatal hypoxia: relevance to schizophrenia *J Neural Transm* 120:187–195, 2013.
- Warner S. Simonides, Michelle A. Mulcahey.Hypoxia-inducible factor induces local thyroid hormone inactivation during hypoxic-ischemic disease in rats. *Neuro Endocrinology*; 10.1172/JCI32824 ,2016.
- Witelson DF.,Sex and the single hemisphere: Specialization of the right hemisphere for spatial processing.*Science*, 1976 .
- Xavier Gilberto F., Francisco J.B. Oliveira-Filho, and André´aM.G.Santo Dentate Gyrus-Selective Colchicine Lesion and Disruption of Performance in Spatial Tasks: Difficulties in “Place Strategy” Because of a Lack of Flexibility in the Use of Environmental Cues? *HIPPOCAMPUS* 9:668–681,1999.
- Yang S. H., E. Perez, J. Cutright .Testosterone increases neurotoxicity of glutamate in vitro and ischemia-reperfusion injury in an animal model,” *Journal of Applied Physiology*, vol. 92, no. 1, pp. 195–201, 2002.
- Zhang Z,W, (2006) Postnatal development of the mammalian neocortex: Role of activity revisited.*Canadian Journal of Neurological Science*, 33), pp. 158–169.