

SILVIA HONDA TAKADA

**MORTE NEURAL E NEUROGÊNESE
NO HIPOCAMPO DE RATOS
APÓS ANÓXIA NEONATAL**

Tese apresentada ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Versão Original

São Paulo
2013

RESUMO

Takada SH. Morte neural e neurogênese no hipocampo de ratos após anóxia neonatal. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

A anóxia neonatal, considerada problema clínico mundial, é uma das mais importantes causas de lesão encefálica em neonatos que pode apresentar consequências graves e permanentes na vida adulta, como déficits cognitivos e comportamentais, paralisia cerebral, epilepsia, deficiências auditivas e visuais. O presente estudo tem como objetivo analisar longitudinalmente possíveis alterações na morte, proliferação e diferenciação neuronais no hipocampo de ratos submetidos à anóxia neonatal. Para tanto, utilizamos modelo adaptado e validado em nosso laboratório (TAKADA et al., 2011), o qual foi efetivo em ocasionar alterações neuronais, gliais e comportamentais em ratos. Para o estudo da morte neuronal, foram utilizados anticorpos contra Caspase-3 ativada, TUNEL, Fluoro-Jade B® (FJB) e microscopia eletrônica. A metodologia escolhida para o estudo da proliferação e neurogênese consistiu na análise do volume das subregiões hipocâmpais por análise estereológica, nas técnicas de imunoreatividade para Ki-67, marcadora de proliferação celular e dupla imunofluorescência para BrdU e NeuN, para estudo da neurogênese hipocâmpal adulta. Os seguintes resultados foram observados: 24 horas após a anóxia (P3), ocorreu maior marcação TUNEL+ em CA1 e CA2-3, enquanto houve maior marcação FJB+ em CA3; a análise estereológica da densidade da Caspase-3 ativada, porém, não mostrou diferenças entre os grupos anóxia e controle em nenhuma das idades estudadas (P3, P14, P21 e P60). Também não foram encontradas diferenças na proliferação celular da camada subgranular do hipocampo nestas idades. A análise da diferenciação neuronal, contudo, mostrou estar diminuída nos animais adultos (P60) submetidos à anóxia neonatal. Em relação ao volume das subregiões hipocâmpais, houve aumento de volume na região CA1 de ratos P14 submetidos à anóxia neonatal. A análise por microscopia eletrônica de transmissão evidenciou ainda neurônios com características de morte por necrose e *continuum* em CA1 e GD de animais P3 submetidos à anóxia, além de indícios que outros tipos de morte, como autofagia, necroptose e morte por excitotoxicidade estavam também presentes nestes animais. Portanto, estes resultados mostraram que o presente modelo de anóxia neonatal causa morte neural em CA1 e CA2-3, além de diferentes tipos de morte neuronal nas subregiões do hipocampo de ratos 24 horas após a anóxia, levando ao aumento de volume em P14 na região CA1, retornando ao seu volume original em seguida e, apesar de não alterar o padrão de proliferação celular na zona subgranular nas idades estudadas, a anóxia neonatal promove a diminuição da neurogênese no giro denteado de ratos adultos.

Palavras-chave: Anóxia neonatal. Hipocampo. Morte neuronal. Neurodegeneração. Neurogênese.

ABSTRACT

Takada SH. Cell death and neurogenesis in rat hippocampus following neonatal anoxia.[Ph. D. thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Neonatal anoxia, considered a worldwide clinical problem, is one of the most important causes of brain injury in neonates; it may present serious and permanent consequences in adulthood, such as cognitive and behavioral deficits, cerebral palsy, epilepsy, hearing and visual impairment. The present study aims to analyze possible longitudinal changes in neural death, cell proliferation and neuronal differentiation in the hippocampus of rats submitted to neonatal anoxia. We used an adapted model that was validated in our laboratory (TAKADA et al., 2011), which is effective to cause neuronal, glial and behavioral sequelae in rats. For the study of neural death, we used antibodies against cleaved Caspase-3, TUNEL, Fluoro-Jade ® B (FJB) and electron microscopy. The methodology chosen for the study of proliferation and volume of subregions were stereological analysis and immunoreactivity for Ki-67, a marker of cell proliferation; to study hippocampal neurogenesis, immunofluorescence for BrdU and NeuN was used. The following results were observed: 24 hours after anoxia (P3), there was higher quantity of TUNEL+ cells in CA1 and CA2-3 and a higher quantity of FJB+ cells in CA2-3; otherwise, the stereological analysis of cleaved caspase-3 density showed no difference between groups anoxia and control in any of the studied ages (P3, P14, P21 and P60). Analysis by electron microscopy showed neurons with features of death by necrosis and continuum in CA1 and DG of P3 animals subjected to anoxia, as well as evidence that other types of death, such as autophagy, necroptosis and death by excitotoxicity were also present in these animals. We also found no differences in cell proliferation of subgranular layer of the hippocampus in these ages. The analysis of neuronal differentiation, however, proved to be reduced in adult animals. Therefore, these results showed that this model of neonatal anoxia promotes cell death in CA1 and CA2-3, and different types of neuronal death in subregions of the hippocampus of rats 24 hours after anoxia, leading to the volume increase in P14 in the CA1 region, returning to its original size and then, despite do not alter cell proliferation pattern in subgranular zone of studied ages, neonatal anoxia promotes decreased neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats.

Keywords: Neonatal anoxia. Hippocampus. Neuronal death. Neurodegeneration. Neurogenesis.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Anóxia Neonatal

O termo “anóxia neonatal” é utilizado, na prática clínica, para definir a condição de diminuição da oxigenação fetal ao nascimento. Historicamente, de acordo com Courville (1950), outros termos foram utilizados para descrever a mesma condição, como “sufocação do recém-nascido”, descrito por Roederer em 1760, “asfixia neofitorum”, por Erhart em 1785 e “asfixia neonatorum”, em 1789, por Regnier.

Contudo, a definição de asfixia ao nascimento é imprecisa. O processo ocorre durante o primeiro e segundo estágios do trabalho de parto, geralmente secundária à interrupção de fluxo sanguíneo placentário. Uma descrição bastante consistente é aquela de uma condição de troca gasosa prejudicada que leva, se persistente, à hipoxemia e hipercapnia (Low et al., 1995).

A anóxia neonatal, considerada problema clínico mundial (Majeed et al., 2007), é uma das mais importantes causas de lesão encefálica em neonatos que pode apresentar consequências graves e permanentes na vida adulta, como déficits cognitivos e comportamentais, paralisia cerebral, epilepsia, deficiências auditivas e visuais (Cannon et al., 2002; Caputa et al., 2005; Casolini et al., 2005; Dell’anna et al., 1995a; Dell’anna et al., 1997; Hedner, Lundborg, 1980; Rogalska et al., 2006; Vannucci et al., 1999; Volpe, 1992; Wainwright et al., 2004).

Estatísticas sugerem incidência de anóxia neonatal em 1-3/1000 crianças nascidas a termo (Graham et al., 2008; Kurinczuk et al., 2010), porém nível de incidência bastante alto, aproximadamente 60%, em neonatos prematuros com baixo peso, constituindo grande preocupação para a saúde pública (Laviola et al., 2004; Vannucci, 2000;). Atualmente, devido aos avanços tecnológicos e novos conhecimentos e estratégias terapêuticas, as taxas de sobrevivência de prematuros de 24 a 26 semanas tem aumentado em comparação com períodos anteriores (Sugihara et al., 2005), sendo que a taxa de sequelas associadas à prematuridade, dentre elas a da anóxia neonatal, também tornou-se crescente.

O nascimento prematuro é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como partos que ocorrem anteriormente às 37 semanas completas de gestação ou menos que 259 dias desde o primeiro dia do último período menstrual da mulher (OMS, 1977). Pode ser subdividido de acordo com a idade gestacional

em: prematuro extremo (<28 semanas), muito prematuro (28-<32 semanas) e prematuro moderado (32-<37 semanas).

Segundo Lawn e colaboradores (2005), as principais causas de mortalidade infantil mundial (em crianças menores de 5 anos) estão relacionadas à prematuridade, asfixia perinatal e infecções. Em 1996, as causas perinatais eram responsáveis por 49,7% dos óbitos infantis no Brasil, tendo aumentado para 53,6% e 55,4% nos anos de 2002 e 2003, respectivamente.

Entre as causas perinatais de mortalidade infantil, 61,4% estão associadas com a prematuridade (Victora, 2001). Mais de 1 em cada 10 bebês nascidos no mundo em 2010 eram prematuros, sendo que mais de 1 milhão não sobreviveu em decorrência à prematuridade (Blencowe et al., 2012). Atualmente, a prematuridade é a segunda causa de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade e a principal causa de morte no primeiro mês de vida (Liu et al., 2012). Segundo projeto da Organização Mundial da Saúde, "Born too soon", publicado em 2012, o Brasil era, em 2010, um dos 10 países que mais apresentavam nascimentos prematuros no mundo.

Brenelli-Vitali e colaboradores, em 2005, atribuíram à asfixia perinatal a causa da maioria das mortes nesse período. Especificamente no estado de São Paulo, em estudo recente realizado por Daripa e colaboradores (2013), a asfixia perinatal contribuiu para a morte de 1,71 recém-nascidos a cada 1000 nascidos vivos e 22% dos óbitos neonatais precoces no estado de São Paulo no período de 2001 a 2003.

Trabalhos da literatura evidenciam que apesar do sistema nervoso central imaturo apresentar maior tolerância a eventos hipóxicos (Dell'anna et al., 1993; Nakajima et al., 1996; Nakajima, 1999; Volpe, 1992), há períodos críticos, onde o encéfalo está mais vulnerável e os neurônios em desenvolvimento são particularmente mais susceptíveis ao insulto hipóxico ou a outros fatores ambientais nocivos, influenciando negativamente sua maturação (Nyakas et al., 1996).

Segundo a teoria de Dobbing (1968), o encéfalo está mais vulnerável a insultos nas fases de grande e rápida proliferação e maturação celular. O primeiro período crítico ocorre durante a multiplicação e organização iniciais de neuroblastos que, nos mamíferos, acontece no período pré-natal (Morgane et al., 1993). O segundo período crítico ocorre na fase de aleitamento do rato (Winick, Noble, 1966), quando há rápido crescimento do encéfalo, com migração e diferenciação neuronais,

sinaptogênese, multiplicação glial e mielinização evidentes (Dobbing, 1970; Manhães de Castro et al., 2001; Morgane et al., 1993).

A vulnerabilidade do encéfalo em desenvolvimento é dependente do agente agressor, do tempo de exposição a este agente e da capacidade dos metabólitos originados por esta agressão de atingirem o sistema nervoso em desenvolvimento. Exposição a agentes agressores no período de ontogenia de qualquer sistema orgânico pode levar a efeitos adversos mais graves que ao término deste período, quando o órgão ou sistema já estiver completamente desenvolvido. O desenvolvimento do sistema nervoso central em mamíferos compreende fases, a partir da indução da placa neural, proliferação neural, migração, diferenciação, crescimento axonal, sinaptogênese, gliogênese, apoptose e mielinização (Rice, Barone Jr., 2000); uma agressão como o insulto anóxico, incidindo em qualquer uma destas fases, pode acarretar prejuízos com sequelas permanentes.

O encéfalo é extremamente sensível a reduções no suprimento de oxigênio; esta vulnerabilidade decorre do seu alto consumo energético que, quando comprometido, dispara cascata de eventos bioquímicos que simultaneamente induzem lesão ou morte das células mais vulneráveis do sistema nervoso central, primariamente localizadas no hipocampo, uma das regiões cerebrais mais sensíveis à anóxia (Buwalda, 1995; Lutz e Prentice, 002 Vexler, Ferriero, 2001), no córtex cerebral e núcleos basais, estes últimos mais susceptíveis a lesões no último trimestre de gestação em humanos (Cirulli, 2003; Loidl et al., 2000).

O hipocampo possui elevada capacidade plástica e alta demanda metabólica. A plasticidade da circuitaria hipocampal, essencial para sua função na aprendizagem e memória, pode aumentar sua vulnerabilidade a insultos (Shors et al., 1989), em especial a privação de oxigênio, como descrito em trabalhos com o modelo de hipóxia-isquemia e outros modelos de privação de oxigênio (Daval et al., 2004; Johnston, 2001; Liu et al., 2008; Peterson et al., 2012; Yang et al., 2011;).

O modelo de privação de oxigênio utilizado neste trabalho, denominado modelo de anóxia neonatal, foi adaptado e validado em nosso laboratório (Takada et al., 2011), evidenciando, além de alterações neuronais (Takada, 2009) e gliais (Allemandi, 2012) agudas, déficits na memória espacial e aprendizagem em ratos adultos submetidos ao estímulo anóxico neonatal (Ito, 2010). Tais resultados, aliados ao fato de que estudos em animais mostraram que a neurogênese hipocampal é crítica para alguns aspectos importantes da aprendizagem e memória

(Leuner et al., 2006; Shors et al., 2001; Winocur et al., 2006; Zhang et al., 2008), constituíram as bases para o desenvolvimento do presente trabalho.

Assim, as implicações da anóxia neonatal na morte e na proliferação e diferenciação neurais e no volume do hipocampo em diferentes períodos pós-natais correspondentes ao segundo período crítico citado (3 a 21 dias) e na vida adulta (60 dias) foram abordados.

1.2 Hipocampo

O hipocampo, ou *hippocampus*, em grego, significa cavalo marinho, justamente devido ao seu formato encurvado. Corresponde a estrutura bilateral no córtex cerebral, com características morfológicas peculiares, além de apresentar alto grau de plasticidades sináptica e fenotípica e de ter a capacidade de gerar novos neurônios até na vida adulta (neurogênese). Está envolvido em processos fisiológicos e patológicos, como o aprendizado e a memória, doença de Alzheimer e epilepsia (Taupin, 2007).

1.2.1 Características morfológicas do hipocampo

A formação hipocampal engloba os seguintes componentes: córtex entorrinal, subículo, pré-subículo e parassubículo e hipocampo propriamente dito, o qual se estende rostralmente entre o corpo caloso e a substância branca profunda do neocórtex (Paxinos, 2004).

O hipocampo (hipocampo propriamente dito), parte da formação hipocampal, é composto de subregiões anatomicamente distintas, com variada morfologia, forma e tamanho celular, conectividade, propriedades eletrofisiológicas e susceptibilidade a insultos (Amaral, Insausti, 1990; Storm-Mathisen et al., 1990): o giro denteado (GD) e o *Cornu Ammonis* (CA) ou corno de Amon. O GD possui a forma de “V” ou de “U”, enquanto o CA é estrutura de formato encurvado que se entrelaça com o GD. A porção interna do GD corresponde à região hilar ou hilo (Taupin, 2007).

Ambas as regiões são estruturadas em camadas ou *strata*. De dentro para fora, as camadas do GD são: camada polimórfica, camada granular (*stratum granulare*) e camada molecular (*stratum moleculare*); as camadas de CA, também

de dentro para fora, são: *stratum moleculare*, *stratum lacunosum* (or *lacunosum-moleculare*), *stratum radiatum*, *stratum lucidum*, camada piramidal (*stratum pyramidale*), *stratum oriens* e *alveus*. As principais camadas de GD e CA são, respectivamente, a camada granular e a camada piramidal, camadas densas que contém corpos de células granulares e piramidais. Outras camadas, como a polimórfica do GD, os *stratum oriens* e *radiatum* do CA contém vários tipos de interneurônios, células musgosas, células em cesto e bipolares (Altman e Bayer, 1973).

Os corpos celulares das células granulares presentes na camada granular do giro denteado tem diâmetro aproximado de 7 µm. A camada molecular do GD contém os dendritos proximais das células granulares; seus axônios, as fibras musgosas, projetam-se para as células piramidais de CA3 (Claiborne et al., 1986). No rato, o número aproximado de células granulares é de 1 milhão (Amaral et al., 1990; Boss et al., 1985).

A fissura hipocampal separa o giro denteado de CA1, adjacente ao subículo, enquanto CA3 está adjacente à fimbria, fórnix e plexo coróide. A região CA2 situa-se entre CA1 e CA3 e pode ser diferenciada das demais regiões utilizando-se a técnica de Golgi; já CA4 situa-se no hilo do GD (Lorente de No, 1934¹, apud Taupin, 2007).

Os corpos celulares das células piramidais possuem formato triangular e diferem em tamanho: em CA2 e CA3 medem 40 a 60 µm enquanto que em CA1 medem 20 a 40 µm. A camada molecular do corno de Amon contém os dendritos apicais das células piramidais, sendo os de CA3 mais espessos e curtos que de CA1.

No *stratum lucidum* é onde ocorrem os contatos sinápticos estabelecidos pelas fibras musgosas provenientes da camada granular com as células piramidais de CA3. Em ratos, estudos quantitativos estimam que CA3 é composto por cerca de 330.000 células piramidais enquanto CA1 contém 420.000 células piramidais; o número de interneurônios é desconhecido. A subregião CA2 corresponde à região que não elicia o mesmo padrão do *stratum lucidum* de CA3 com suas saliências espinhosas e, portanto, não recebe as aferências das fibras musgosas. Sua

¹: Lorente de No, R Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. J PsycholNeurol (Lpz);1934;46:113-77.

existência é questionada por vários pesquisadores (Amaral et al., 1990; Boss et al., 1985).

1.2.2 Hipocampo e a privação de oxigênio

Em modelos de privação de oxigênio, o hipocampo tem sido alvo de muitas pesquisas, tanto por sua susceptibilidade à privação de oxigênio como também devido à sua alta capacidade regenerativa (Bartley et al., 2005; Daval et al., 2004a).

Além disso, alterações no volume de estruturas encefálicas, dentre elas o hipocampo, tem sido descritas em literatura como resultantes da prematuridade em si ou decorrentes de lesões no encéfalo imaturo. Revisão de literatura realizada em 2012 por Keunen e colaboradores, mostrou que prematuros humanos apresentam alterações regionais e globais no tecido encefálico quando comparados aos nascidos a termo e saudáveis, sendo que tais alterações são mais proeminentes quanto menor a idade gestacional. Ainda, mostraram que fatores associados à prematuridade, como lesão da substância branca, hemorragia intraventricular, terapias pós-natais com corticosteróides, atraso do crescimento intra-uterino e doenças pulmonares crônicas são fatores frequentemente associados a alterações volumétricas destas estruturas encefálicas.

Em roedores neonatos, o grau de lesão hipocampal observado em diferentes modelos de privação de oxigênio é variável e depende de muitos fatores, dentre eles a idade em que o animal é submetido ao estímulo (Bartley et al., 2005; Daval et al., 2004a; Pourié et al., 2006; Scheepens et al., 2003).

Para o presente estudo, o rato foi o animal de escolha, uma vez que, quando comparado ao humano, o rato nasce prematuramente, ou seja, o estágio de maturação encefálica do rato neonato é comparável ao final do segundo trimestre em humanos. Assim, a idade em que é realizado o estímulo anóxico nos animais (aproximadamente 30 horas de vida) corresponde aos marcos de desenvolvimento de um bebê prematuro humano entre 23 e 32 semanas de gestação (Semple et al., 2013).

O estudo do hipocampo desperta ainda grande interesse em modelos de privação de oxigênio devido ao fato da memória e aprendizagem, ambas funções relacionadas primordialmente à estrutura hipocampal, frequentemente apresentarem

déficits em modelos animais e também em humanos que sofreram asfixia perinatal (Semple et al., 2013), com implicações cognitivas.

Desta forma, avaliar como a anóxia neonatal altera a dinâmica entre morte e proliferação neuronais e se promove alterações morfológicas no hipocampo de ratos é de suma importância para melhor compreender as causas das sequelas comportamentais relacionadas à memória espacial e aprendizagem observadas no modelo de anóxia neonatal utilizado.

1.3 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é analisar longitudinalmente a hipótese de que a anóxia neonatal promove alterações na dinâmica do desenvolvimento neural por morte, proliferação e diferenciação neuronais (neurogênese) no hipocampo de ratos, com consequentes alterações morfológicas.

1.4 Objetivos Específicos

- I - verificar longitudinalmente a morte neural decorrente da anóxia neonatal no hipocampo de ratos Wistar desde 24 horas após o insulto anóxico (P3) até a idade adulta (P60) com técnicas de imunistoquímica para Caspase-3 ativada, TUNEL e Fluoro-Jade B[®] e análise estereológica;
- II –avaliar, com técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, a ocorrência de alterações morfológicas indicativas de diferentes tipos de morte neuronal 24 horas após anóxia neonatal;
- III - estudar longitudinalmente os efeitos da anóxia neonatal na dinâmica de proliferação celular da zona subgranular do giro denteado do hipocampo dos ratos (P3, P14, P21 e P60) com técnica de imunistoquímica para Ki-67;

- IV –analisar, por dupla imunofluorescência, possíveis alterações na quantidade de células neuronais marcadas com BrdU na zona subgranular nos animais adultos (P60) que sofreram anóxia neonatal;
- V- verificar, por análise estereológica, se a anóxia neonatal causa alterações no volume hipocampal dos ratos ao longo das idades estudadas (P3, P14, P21 e P60)

Para facilitar o desencadeamento de ideias, a presente tese foi dividida em capítulos: CAPÍTULO 1: ESTUDO DAS IMPLICAÇÕES DA ANÓXIA NEONATAL À MORTE NEURONAL NO HIPOCAMPO DE RATOS (Objetivos específicos I e II); CAPÍTULO 2: ESTUDO DA DINÂMICA ESTRUTURAL DO HIPOCAMPO QUANTO AO VOLUME, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO NEURAIS NO GIRO DENTEADO DE RATOS APÓS ANÓXIA NEONATAL (Objetivos específicos III, IV e V).

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que:

a) a anóxia neonatal promove morte neural nas subregiões CA1 e CA3 do hipocampo de ratos 24 horas após o insulto anóxico, sendo que, nas demais idades, as técnicas metodológicas empregadas não evidenciaram alterações quanto à morte neural;

b) diferentes tipos de morte neuronal podem ser observados 24 horas após anóxia neonatal, dentre eles apoptose, necrose e características morfológicas atípicas sugestivas de continuum, necroptose e autofagia;

c) a anóxia neonatal não altera a proliferação neural na zona subgranular do giro denteado do hipocampo de ratos em P3, P14, P21 e P60;

d) animais adultos submetidos à anóxia neonatal têm diminuição da neurogênese no giro denteado do hipocampo;

e) a dinâmica de desenvolvimento do hipocampo de ratos submetidos à anóxia neonatal ao longo das idades estudadas altera o volume da subregião CA1 em P14, levando a seu aumento.

Portanto, é possível afirmar que a anóxia neonatal promove alterações morfológicas e estruturais agudamente ao estímulo anóxico que podem refletir em alterações na dinâmica do desenvolvimento neural a longo prazo, promovendo diminuição da neurogênese hipocampal, o que poderia explicar os déficits cognitivo-comportamentais apresentados por estes animais na vida adulta, conforme visto em outros trabalhos utilizando modelo de anóxia semelhante.

Desta forma, por mais que possa ter havido a tentativa de regeneração, esta não ocorreu satisfatoriamente, levando-nos a pensar que, talvez, medidas neuroprotetoras no sentido de se adequar o ambiente celular para uma maior sobrevivência neuronal, por exemplo, seriam interessantes, tanto em relação aos precursores neurais, como em relação aos novos neurônios formados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*. 2009;19(12):1222-31.

Allemandi W. Estudo da imunorreatividade da proteína S100 β no sistema nervoso central de ratos neonatos submetidos à anóxia. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Altman J, Bayer SA. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 1990a;301(3):365-81.

Altman J, Bayer SA. Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol*. 1990b;301(3):343-64.

Amaral DG, Dent JA. Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol*. 1981;195(1):51-86.

Amaral DG, Ishizuka N, Claiborne B. Neurons, numbers and the hippocampal network. *Prog Brain Res*. 1990;83:1-11. Review.

Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res*. 1998;797:295-304.

Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*. 2000;62(3):215-49. Review.

Barrett RD, Bennet L, Davidson J, Dean JM, George S, Emerald BS, Gunn AJ. Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain. *Birth Defects Res (Part C)*. 2007;81:163-76.

Bartley J, Soltau T, Wimborne H, Kim S, Martin-Studdard A, Hess D, Hill W, Waller J, Carroll J. BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury. *BMC Neurosci*. 2005;6:15.

Bayer AS. Cellular aspects of brain development. *Neurotoxicology*. 1989;10(3):307-320.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [2011 July 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2. ed. São Paulo: Artmed; 2006. 855 p.

Beilharz EJ, Williams CE, Dragunow M, Sirimanne ES, Gluckman PD. Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol Brain Res*. 1995;29(1):1-14.

Berg DA, Belnoue L, Song H, Simon A. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*. 2013;140(12):2548-61.

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

Blaise SA, Nédélec E, Alberto JM, Schroeder H, Audonnet S, Bossenmeyer-Pourié C, Guéant JL, Daval JL. Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis. *Exp Neurol*. 2009;216:231-238.

Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012;379(9832):2162-72.

Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H. Synergistic activation of caspase-3 by m-Calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*. 2001;276(13):10191-8.

Boss BD, Peterson GM, Cowan WM. On the number of neurons in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res*. 1985;338(1):144-50.

Bossenmeyer-Pourié C, Lièvre V, Grojean S, Koziel V, Pillot T, Daval JL. Sequential expression patterns of apoptosis- and cell cycle-related proteins in neuronal response to severe or mild transient hypoxia. *Neuroscience*. 2002;114(4):869-82.

Buwalda B, Nyakas C, Vosselman HJ, Luiten PGM. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res*. 1995;67:85-90.

Cameron HA, Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 1994;61:203-9.

Cannon M, Jones PB, Murray RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psych*. 2002;159:1080-92.

Caputa M, Rogalska J, Wentowska K, Nowakowska A. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: a rat model. *Behav Brain Res*. 2005;163:246-256.

Carlioni S, Carnevali A, Cimino M, Balduini W. Extended role of necrotic cell death after hypoxia-ischemia-induced neurodegeneration in the neonatal rat. *Neurobiol Dis.* 2007;27(3):354-61.

Carlioni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis.* 2008;32(3):329-39.

Casolini P, Zuena AR, Cinque C, Matteucci P, Alemà GS, Adriani W, Carpinelli G, Santoro F, Alleva E, Bosco P, Nicoletti F, Laviola G, Catalani A. Sub-neurotoxic neonatal anoxia induces subtle behavioural changes and specific abnormalities in brain group-I metabotropic glutamate receptors in rats. *J Neurochem.* 2005;95:137-45.

Chen WF, Chang H, Wong CS, Huang LT, Yang CH, Yang SN. Impaired expression of postsynaptic density proteins in the hippocampal CA1 region of rats following perinatal hypoxia. *Exp Neurol.* 2007;204:400-10.

Chiang MC, Ashraf QM, Ara J, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Mechanism of caspase-3 activation during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. *Neurosci Lett.* 2007;421:67-71.

Christie BR, Cameron HA. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus.* 2006;16:199-207.

Cirulli F, Bonsignore LT, Venerosi A, Valanzano A, Chiarotti F, Alleva E. *Neurotoxicol Teratol.* 2003;25(5):571-8.

Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986;246(4):435-58.

Coq JQ, Strata F, Russier M, Safadi FF, Maerzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and s1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2008;210:95-108.

Corcoran A, O'Connor JJ. Hypoxia inducible factor signalling mechanisms in the central nervous system. *Acta Physiol (Oxf).* 2013 May 21.

Courville, CB. Anoxemia and brain disease. *Calif Med.* 1953;79(3):214-7.

Daripa M, Caldas HM, Flores LP, Waldvogel BC, Guinsburg R, Almeida MF. Perinatal asphyxia associated with early neonatal mortality: populational study of avoidable deaths. *Rev Paul Ped.* 2013;(1):37-45.

Daval JL, Pourié G, Grojean S, Lièvre V, Strazielle C, Blaise S, Vert P. Neonatal hypoxia triggers transient apoptosis followed by neurogenesis in the rat CA1 hippocampus. *Ped Res.* 2004a;55:561-7.

Daval JL, Vert P. Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol.* 2004b;(4):257-63.

Dell'anna ME, 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. *Behav Brain Res.* 1991;45:125-34.

Dell'anna ME, Luthman J, Lindqvist E, Olson L. Development of monoamine systems after neonatal anoxia in rats. *Brain Res Bull.* 1993;32:159-70.

Dell'anna ME, Geloso MC, Draisci G, Luthman J. Transient changes in Fos and GFAP immunoreactivity precede neuronal loss in the rat hippocampus following neonatal anoxia. *Exp Neurol.* 1995a;131:144-56.

Dell'anna E, Chen Y, Loidl F, Andersson K, Luthman J, Goiny M, Rawal R, Lindgren T, Herrera-Marschitz M. Short-term effects of perinatal asphyxia studied with fos-immunocytochemistry and in vivo microdialysis in the rat. *Exp Neurol.* 1995b;131:279-87.

Dell'anna E, Iuvone L, Calzolari S, Geloso, MC. Effect of acetyl-L-carnitine on hyperactivity and spatial memory deficits of rats exposed to neonatal anoxia. *Neurosci Lett.* 1997;223:201-5.

Delivoria-Papadopoulou M, Ashraf QM, Ara J, Mishra OP. Nuclear mechanisms of hypoxic cerebral injury in the newborn: the role of caspases. *Semin Perinatol.* 2008;32(5):334-43.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:391-7.

Dobbing J. The development of the blood-brain barrier. *Prog Brain Res.* 1968;29:417-27.

Dobbing J. The effects of early growth retardation on the human brain: the usefulness of animal experiments. *J Pathol.* 1970;101:13.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 1998;4:1313-7.

Fagel DM, Ganat Y, Silbereis J, Ebbitt T, Stewart W, Zhang H, Ment LR, Vaccarino FM. Cortical neurogenesis enhanced by chronic perinatal hypoxia. *Exp Neurol.* 2006;99:77-91.

Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *P Natl Acad Sci USA.* 2002;99(17):11025-30.

Fernando P, Brunette S, Megeney LA. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J.* 2005;19(12):1671-3.

Festjens N, VandenBerghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell-demise: signaling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:1371-87.

Fornal CA, Stevens J, Barson JR, Blakley GG, Patterson-Buckendahl P, Jacobs BL. Delayed suppression of hippocampal cell proliferation in rats following inescapable shocks. *Brain Res.* 2007;1130:48-53.

Fuchs E, Gould E. Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci.* 2000;12:2211-4.

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol.* 1998;36:249-66.

Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature Reviews. Neuroscience.* 2009;10(7):481-94.

García-Verdugo JM, Ferrón S, Flames N, Collado L, Desfilis E, Font E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull.* 2002;57:765-75.

Geddes R, Vannucci RC, Vannucci SJ. Delayed cerebral atrophy following moderate hypoxia-ischemia in the immature rat. *Dev Neurosci.* 2001;23(3):180-5.

Geibig CS, Keiner S, Redecker C. Functional recruitment of newborn hippocampal neurons after experimental stroke. *Neurobiol Dis.* 2012;46(2):431-9.

Gill R, Soriano M, Blomgren K, Hagberg H, Wybrecht R, Miss MT, Hoefer S, Adam G, Niederhauser O, Kemp JA, Loetscher H. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonate brain. *J Cerebr Blood F Met.* 2002;22:420-30.

Golstein P, Kroemer G. A multiplicity of cell death pathways. Symposium on apoptotic and non-apoptotic cell death pathways. *EMBO Reports.* 2007;8(9):829-33.

Gould E, Mcewens BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 1997;17:2492-8.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *P Natl Acad Sci.* 1999;96:5263-7.

Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *American J Obstet Gynaecol.* 2008;199(6):587-95.

Hedner T, Lundborg P. Serotonin metabolism in neonatal rat brain during asphyxia and recovery. *Acta Physiol Scand.* 1980;109:163-8.

Herpfer I, Hezel H, Reichardt W, Clark K, Geiger J, Gross CM, Heyer A, Neagu V, Bhatia H, Atas HC, Fiebich BL, Bischofberger J, Haas CA, Lieb K, Normann C. Early life stress differentially modulates distinct forms of brain plasticity in young and adult mice. *PLoS One.* 2012;7(10):e46004.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008;135(7):1311-23.

Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, SiesjöBK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cerebr Blood F Metab*. 2000;20(9):1294-300.

Huffman SL, Zehner ER, VictoraC. Can improvements in breast-feeding practices reduce neonatal mortality in developing countries? *Midwifery*. 2001;17(2):80-92.

Isaacs EB, Edmonds CJ, Chong WK, Lucas A, Morley R, Gadian DG. Brain morphometry and IQ measurements in preterm children. *Brain*. 2004;127:2595-607.

Ito PH. Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal. [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo; 2010.

Iuvone L, Geloso MC, Dell'anna E. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp Neurol*. 1996;139:25-33.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *P Natl Acad Sci*. 2001;98:4710-5.

Johansen FF, Sørensen T, Tønder N, Zimmer J, Diemer NH. Ultrastructure of neurons containing somatostatin in the dentate hilus of the rat hippocampus after cerebral ischaemia, and a note on their commissural connections. *Neuropath Appl Neuro*. 1992;18(2):145-57.

Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of Hypoxic-Ischemic Injury in the Dev Brain. *Ped Res*. 2001;49(6):735-41.

Kadam SD, Mulholland JD, McDonald JW, Comi AM. Neurogenesis and neuronal commitment following ischemia in a new mouse model for neonatal stroke. *Brain Res*. 2008;1208:35-45.

Kee NJ, Preston E, Wojtowicz JM. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. *Exp Brain Res*. 2001;136:313-20.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997;386:493-95.

Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*. 1982 ;239(1):57-69.

Kirino T. Delayed neuronal death. *Neuropathology*. 2000 Sep;20 Suppl:S95-7. Review.

Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol.* 2003;13:127–32.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3-11.

Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996;384:368-72.

Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell R A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking Caspase-9 . *Cell.* 1998;94:325-37.

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.*1996;16:2027–33.

Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010;86(6):329-38.

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, VandenBerghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):44-55.

Larsson E, Lindvall O, Kokaia Z. Stereological assessment of vulnerability of immunocytochemically identified striatal and hippocampal neurons after global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2001;913(2):117-32.

Laviola G, Adriani W, Rea M, Aloe L, Alleva E. Social withdrawal, neophobia, and stereotyped behavior in developing rats exposed to neonatal asphyxia. *Psychopharmacology.* 2004;175:196-205.

Lee, VY. Identificação da degeneração neuronal no encéfalo de ratos após anóxia neonatal. Trabalho de Iniciação Científica. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Leuner B, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus.* 2006;16(3):216-24.

Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MJ, Meyers RL, Vannucci SJ. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci.* 2001;23(3):234-47.

Liu CL, Siësjo BK, Hu BR. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience.* 2004;127:113-23.

Liu JP, Chang LR, Gao XL, Wu Y. Different expression of caspase-3 in rat hippocampal subregions during postnatal development. *Microsc Res Techniq*. 2008;71(9):633-8.

Liu J, Solway K, Messing RO, and Sharp FR. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci*. 1998;18:7768-78.

Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. 2012;379(9832):2151-61.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:179-93.

Lloidl CF, Gavilanes AW, Van Dijk EH, Vreuls W, Blokland A, Vles JS, Steinbusch HW, Blanco CE. *Physiol Behav*. 2000;68(3):263-9.

Lutz PL, Prentice HM. Sensing and responding to hypoxia, molecular and physiological mechanisms. *Integr Comp Biol*. 2002;42:463-8.

MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO reports*. 2004;5(7):674-8.

Majeed R, Memon Y, Majeed F, Shaikh NP, Rajar UD. Risk factors of birth asphyxia. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad*. 2007;19:67-71.

Malik S, Vinukonda G, Vose LR, Diamond D, Bhimavarapu BB, Hu F, Zia MT, Hevner R, Zecevic N, Ballabh P. Neurogenesis continues in the third trimester of pregnancy and is suppressed by premature birth. *J Neurosci*. 2013;33(2):411-23.

Manhães De Castro R, Barreto Medeiros JM, Mendes Da Silva C, Ferreira LM, Guedes RC, Cabral Filho JE, Costa JA. Reduction of intraspecific aggression in adult rats by neonatal treatment with a selective serotonin reuptake inhibitor. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34:121-124.

McCabe BK, Silveira DC, Cilio MR, Cha BH, Liu X, Sogawa Y, Holmes GL. Reduced neurogenesis after neonatal seizures. *J Neurosci*. 2001;21:2094-103.

Miller MW, Kuhn PE. Neonatal transection of the infraorbital nerve increases the expression of proteins related to neuronal death in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve. *Brain Res*. 1997;769(2):233-44.

Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Intl J Biochem*. 2004;36(12):2491-502. Review.

Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17:91-128.

Nakajima W, Ishida A, Takada G. Effect of anoxia on striatal monoamine metabolism in immature rat brain compared with that of hypoxia: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 1996;740:316-22.

Nakajima W, Ishida A, Takada G. Anoxic and hypoxic immature rat model for measurement of monoamine using in vivo microdialysis. *Brain Res Protoc.* 1999;3: 252-56.

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

Namba T, Mochizuki H, Onodera M, Mizuno Y, Namiki H, Seki T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2005;22:1928-41.

Nitatori T, Sat N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, Kominami E, Uchiyama Y. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci.* 1995;15:1001-11.

Northington F, Ferriero D, Graham E, Traystman RJ, Martin LJ. Early neurodegeneration after hypoxia-ischemia in neonatal rat is necrosis while delayed neuronal death is apoptosis. *Neurobiol Dis.* 2001;8:207-19.

Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. Neuronal Cell Death in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Ann Neurol.* 2011;69(5):743-58.

Nyakas C, Buwalda B, Luiten PGM. Hypoxia and Brain Development. *Prog Neurobiol.* 1996;49:1-51.

Nowarowski RS, Hayes, NL. Numerology of Neurogenesis: Characterizing the Cell Cycle of Neurostem Cells. In: Gage FH, Kempermann G, Song H. *Adult Neurogenesis.* NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press;2008,673p.

Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, Chiorino G, Tagami H, Woo M, Dotto GP. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell.* 2004;6(4):551-62.

Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Ped Res.* 2005;58:600-606.

Orrenius S, Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Autophagy in toxicology: cause or consequence? *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:275-97.

Papadakis M, Hadley G, Xilouri M, Hoyte LC, Nagel S, McMenamin MM, Tsaknakis G, Watt SM, Drakesmith CW, Chen R, Wood MJ, Zhao Z, Kessler B, Vekrellis K, Buchan AM. Tsc1 (hamartin) confers neuroprotection against ischemia by inducing autophagy. *Nature Med.* 2013;19(3):351-7.

Parent JM. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.* 2002;50:179-89.

Peterson BL, Larson J, Buffenstein R, Park TJ, Fall CP. Blunted neuronal calcium response to hypoxia in naked mole-rat hippocampus. *PLoS One.* 2012;7(2).

Petito CK, Feldmann E, Pulsinelli WA, Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology.* 1987;37(8):1281-6.

Pettmann B, Henderson CE. Neuronal cell death. *Neuron.* 1998;20:633-47.

Pimentel VC, Pinheiro FV, De Bona KS, Maldonado PA, da Silva CR, de Oliveira SM, Ferreira J, Bertoncheli CM, Schetinger MR, Da Luz SC, Moretto MB. Hypoxic-ischemic brain injury stimulates inflammatory response and enzymatic activities in the hippocampus of neonatal rats. *Brain Res.* 2011 4;1388:134-40.

Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis.* 2004;16:585-95.

Paxinos G. The rat nervous system. 3rd ed. London: Elsevier Academic Press; 2004. 1280 p.

Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci.* 1995; 15:3775-87.

Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis.* 2008;29(1):132-41.

Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci.* 2006;26:12237-41.

Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208-12.

Ribe EM, Serrano-Saiz E, Akpan N, Troy CM. Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. *Biochem J.* 2008;415(2):165-82.

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

Rice D, Barone Jr S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Persp.* 2000; 108Suppl 3:511-33.

Rogalska J, Caputa M, Wentowska K, Nowakowska A. Stress-induced behaviour in adult and old rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57:17-34.

Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural stem cells in the subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *J Cerebr Blood FMet.* 2004; 24:814-25.

Roy M, Sapolsky R. Neuronal apoptosis in acute necrotic insults: why is this subject such a mess? *Trends Neurosci.* 1999;22(10):419-22.

Santambrogio L, Potolicchio I, Fessler SP, Wong SH, Raposo G, Strominger JL. Involvement of caspase-cleaved and intact adaptor protein 1 complex in endosomal remodeling in maturing dendritic cells. *Nature Immunol.* 2005 ;6(10):1020-8.

Schulz J, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 1999;45:421-9.

Scheepens A, Wassink G, Piersma MJ, Van de Berg WD, Blanco CE. A delayed increase in hippocampal proliferation following global asphyxia in the neonatal rat. *Brain Research Developmental Brain Res.* 2003;142(1):67-76.

Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000;874(2):123-30.

Schulz JB, Weller M, Matthews RT, Heneka MT, Groscurth P, Martinou JC, Lommatzsch J, von Coelln R, Wüllner U, Löschmann PA, Beal MF, Dichgans J, Klockgether T. Extended therapeutic window for caspase inhibition and synergy with MK-801 in the treatment of cerebral histotoxic hypoxia. *Cell Death Differ.* 1998;5(10):847-57.

Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* 2013;106-107:1-16.

Shors TJ, Miesegaes G, Bevlin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 2001;410(6826):372-6.

Silasi G, Colbourne F. Therapeutic hypothermia influences cell genesis and survival in the rat hippocampus following global ischemia. *J Cerebr Blood FMet.* 2011;31(8):1725-35.

Smale G, Nichols NR, Brady DR, Finch CE, Horton Jr WE. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 1995;133:225-30.

Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell*. 2013;153(6):1219-27.

Spasojevic SD, Stojanovic VD, Barisic NA, Doronjski AR, Zikic DR, Babovic SM. Neuroprotective effects of hypothermia and erythropoietin after perinatal asphyxia in newborn rats. *J Matern Fetal Neon Med*. 2013.[Epub ahead of print].

Stahl SM. *Psicofarmacologia: base neurocientífica e aplicações práticas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002. 617 p.

Storm-Mathisen J, Ottersen OP. Immunocytochemistry of glutamate at the synaptic level. *J Histochem Cytochem*. 1990;38(12):1733-43.

Suguihara C, Lessa AC. Strategies to minimize lung injury in extremely low birth weight infants. *J Ped*. 2005;81:69-78.

Takada SH. Efeitos da anóxia neonatal no encéfalo de ratos: estudo da distribuição de neurônios imunorreativos a Fos. [dissertação (Mestrado)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

Takada SH, Sampaio CA, Allemandi W, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: development and evaluation by pulse oximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Meth*. 2011;198(1):62-9.

Tang AC, Nakazawa M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. *Behav Brain Res*. 2005;163:1-9.

Taupin P, Gage FH. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J Neurosci Res*. 2002;69:745-9.

Towfighi J, Zec N, Yager J, Housman C, Vannucci RC. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol*. 1995;90(4):375-86.

Troy CM, Salvesen GS. Caspases on the brain. *J Neurosci Res*. 2002; 69: 145-150.
Uchiyama Y, Koike M, Shibata M. Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy*. 2008;4(4):404-8. Review.

Van Der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science*. 2000;287:1439-41.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999;2:266–70.

Vannucci RC. Hypoxia-ischemia: Clinical aspects. In: Fanaroff AA, Martin RJ, editors. *Neonatal perinatal medicine*. 4th ed. Philadelphia: Mosby-Yearbook; 1997. p. 877-91.

Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, Vannucci SJ. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*. 1999;55: 155-63.

Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 2004; 207:3149-54.

Vasileiadis GT, Gelman N, Han VK, Williams LA, Mann R, Bureau Y, Thompson RT. Uncomplicated intraventricular hemorrhage is followed by reduced cortical volume at near-term age. *Pediatrics.* 2004;114(3):e367-72.

Vexler Z, Ferriero D. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *SemNeonol.* 2001;6:99-108.

Volpe JJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: overview. In: Fukuyama Y, Suzuki Y, Kamoshita S, Casaer P, editors. *Fetal and perinatal neurology.* Tokyo: Joint Convention of the 5th International Child Neurology and the 3rd Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 1992. p. 232-52.

Wainwright MS, Craft JM, Griffin ST, Marks A, Pineda J, Padgett KR, Eldik V. Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol.* 2004;56:61-7.

Wang X, Karlsson JO, Zhu C, Bahr BA, Hagberg H, Blomgren K. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate.* 2001;79(3-4):172-9.

Wang Y, Han R, Liang ZQ, Wu JC, Zhang XD, Gu ZL, Qin ZH. An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy.* 2008;4(2):214-26.

Watanabe I, Yamada E. The fine structure of lamellated nerve endings found in the rat gingival. *ArchHistol Jap.* 1983; 46(2):173-82.

Watson JH. Electron microscopy, iron crystals and medicine. *Henry Ford Hosp Med Bull.* 1958;6(1):111-9.

Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutrition.* 1996;89:300-306.

Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus.* 2006;16(3):296-304.

Woo M, Hakem R, Furlonger C, Hakem A, Duncan GS, Sasaki T, Bouchard D, Lu L, Wu GE, Paige CJ, Mak TW. Caspase-3 regulates cell cycle in B cells: a consequence of substrate specificity. *Nat Immunol.* 2003;4(10):1016-22.

Yan XX, Najbauer J, Woo CC, Dashtipour K, Ribak CE, Leon M. Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol.* 2001;433(1):4-22.

Yang T, Zhuang L, Terrando N, Wu X, Johnson MR, Maze M, Ma D. A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. *Brain Res.* 2011;1383:317-23.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000;407:802-9.

Zecevic N, Chen Y, Filipovic R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 2005;491:109-22.

Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O. Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 2001;193(2):247-54.

Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist.* 2005;11(5):408-16. Review.

Zhang CL, Zou Y, He W, Gage FH, Evans RM. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature.* 2008;451(7181):1004-7.

Zhao YD, Ou S, Cheng SY, Xiao Z, He WJ, Zhang JH, Ruan HZ. Dendritic development of hippocampal CA1 pyramidal cells in a neonatal hypoxia-ischemia injury model. *J Neurosci Res.* 2013. [Epub ahead of print]

Zhu L, Wu L, Yel D, Fan M. Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol.* 2005;31(1-3):231-42.

Zhu C, Qiu L, Wang X, Xu F, Nilsson M, Cooper-Kuhn C, Kuhn HG, Blomgren K. Age-dependent regenerative responses in the striatum and cortex after hypoxia-ischemia. *J Cerebr Blood F Met.* 2009;29(2):342-54.