

JESSICA DE OLIVEIRA BARBOSA RIBEIRO

**Análise estereológica de populações neuronais e
astrocitárias do córtex pré-frontal de ratos
submetidos a anóxia neonatal**

Araçatuba-SP

2016

JESSICA DE OLIVEIRA BARBOSA RIBEIRO

**Análise estereológica do córtex pré-frontal de
ratos submetidos a anóxia neonatal**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Araçatuba-SP

2016

DEDICATÓRIA

À minha querida e amada mãe **Eliene**,

que com muita paciência, amor, carinho e compreensão me acompanhou até aqui e me deu toda a força possível, se desdobrou, desfez e se desmontou para tornar um sonho em realidade. Sonho este que parecia distante e abstrato, mas diante de todas as dificuldades, juntas tornamos real e concreto. Palavras não existem para expressar a gratidão e o amor, desde a primeira despedida ao sair de casa, a primeira “Boa Viagem!” sem saber quando seria o próximo encontro, momentos que partiram nossos corações, mas que foram necessários para concluir essa etapa tão esperada. Agradeço a dedicação, o apoio e o incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Muito obrigada.

Ao meu bondoso e amado pai **Sebastião**,

que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, me aconselhou a seguir o melhor caminho e com a sua inteligência e cuidado me orientava sobre a vida, os riscos e os perigos que me esperavam, se possível, ele livrava toda a negatividade desse caminho, só para me ver feliz e realizada. “Pai” é a palavra que pouco define esse homem, pois é o ser que mais admiro, aos meus olhos, desde pequena, um grande herói que ganhei como pai nessa passagem terrestre. Independente da minha crença e dos meus *hobbies me ensinou* que o essencial é o caráter, a honestidade, a simplicidade, e acima disso, a dedicação aos estudos. Pai, por você esse sonho se tornou possível, pois eu sei que esse sonho também é seu. Muito obrigada.

Ao meu padrasto **Kiyomi Morimoto**,

que durante toda essa jornada esteve presente incentivando e ajudando em todos os aspectos para tornar esse sonho possível. Agradeço profundamente por toda a dedicação e a responsabilidade que manteve comigo até hoje, seu apoio nessa conquista foi imprescindível. Em meio a tantos tropeços, obstáculos e problemas, a vida foi justa em colocar no meu caminho alguém como você, que durante essa caminhada me proporcionou tantos ensinamentos e tomou lugar com franca

responsabilidade de um pai extremamente extrovertido, sensato e admirável por levar a vida com tanta leveza e tranquilidade. Obrigada! Eternamente grata.

Ao meu irmão **Bruno**,

que foi marcado eternamente com a sua forma de amar e de torcer com tanta sinceridade e garra para a realização e conclusão deste curso. Agradeço profundamente ter nessa vida um amigo em forma de irmão, um cuidado extremo em forma de preocupação e um exagero emotivo em forma de amor. Sou grata em me ver nos seus olhos e me alegrar no seu sorriso. Todas as intrigas e problemas entre irmãos se transformaram completamente em amor, carinho e proteção. Muito obrigada!

Às minhas amigas **Isabela, Laís e Taís**,

que foram fundamentais em cada etapa e por fim, a conclusão deste sonho. Quero agradecer pela colaboração, o respeito, a responsabilidade e a dedicação dessa equipe, sempre tornando o ambiente de trabalho divertido, alegre e aconchegante. Identifiquei-me com cada uma desde o primeiro instante, com vocês aprendi que na vida devemos valorizar em cada momento as coisas mais simples e que tudo é possível concluir, quando existe esforço e amor. Obrigada, família!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**,

pela vida e a oportunidade de estudar e me dedicar a um sonho que tornou possível quando parecia impossível. Agradeço por todas as experiências e provações que surgiram no meu caminho, colaboraram muito para o meu amadurecimento.

Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo**,

por ser essa pessoa incrível, se destaca pela sua humildade, seu coração, a sua simpatia e principalmente, a sua admirável inteligência. Quero agradecer pela oportunidade de ser sua orientada e juntos poder trabalhar para tornar possível essa etapa. Pelo conhecimento e dedicação com que passava todas as orientações, que não acrescentaram somente na minha vida acadêmica, mas grandemente na minha vida pessoal, moral, ética. A você devo todo o meu respeito e a minha admiração, pois além de professor se tornou um grande pai durante essa jornada. Hoje me sinto imensamente honrada por ter confiado e acreditado no meu trabalho e muito orgulhosa em ter o senhor como meu orientador. Se existe um espelho para cada um se basear, saiba que o meu espelho é você, pois é e sempre será o meu exemplo. Muito obrigada.

À minha amiga **Isabela Rogério de Paiva**,

que desde o primeiro momento me identifiquei de uma forma muito especial, pois não parecia uma simples amiga, mas alguém que transmitia tantas coisas boas que pude acalmar meu coração em acabar de conhecer uma irmã. Foi assim que ela permaneceu na minha vida durante esses longos anos, cada dia nossa convivência se tornava melhor e com toda a certeza e tranquilidade fui presenteada com essa irmã que tanto me alegrava e me ajudava em todos tropeços, obstáculos e desânimos. Agradeço e peço a Deus para colocar mais pessoas como você na minha vida, e que a nossa amizade não seja, e não vai ser, somente aqui na universidade, mas a vida inteira. Obrigada pela amizade, irmandade e confiança.

À minha amiga **Laís Leal Limieri**,

que me ajudou e me ensinou tanto durante todas as etapas desse projeto, com muita paciência, amor e dedicação transmitia todo o seu conhecimento, sempre com muita alegria e humildade, ensinamentos que colaboraram imensamente para a minha formação acadêmica. Agradeço pelos laços que criamos e a naturalidade em se comportar como uma irmã mais velha, que quando precisava dava broncas, conselhos e com esse coração incrível, sempre me ajudava a solucionar problemas, por mais difíceis que seja. Aprendi que é possível levar a vida de maneira leve, tranquila e feliz quando existe esforço, dedicação e responsabilidade, aprendi e amadureci, existem momentos para fazer tudo, basta querer. Obrigada por tudo. Sou muito grata a você.

À minha amiga **Taís Fernandes Pimenta**,

que participou em grande parte na elaboração desse projeto, com muita dedicação e responsabilidade você fez parte da realização do meu sonho. A sua companhia alegrava todos os momentos e aos poucos nos tornamos amigas. Juntas compartilhamos muitos momentos, entre eles, de alegria e cansaço, dias longos, intermináveis que você me deu força, pois sempre parecia mais leve quando lembrava que você estava comigo e juntas vencemos. Agradeço por fazer parte deste sonho e saiba que aprendi muito com você. Que essa amizade não tenha fim. Obrigada.

Ao meu amigo **Gestter Willian Lattari Tessarin**,

que colaborou para a realização desse trabalho, sempre com muito amor e dedicação estava disposto a ajudar e ensinar. Admiro muito a sua pessoa, de cara percebi o quanto você é especial, uma pessoa do coração bom e muito humilde, por essas e por todas as suas qualidades você venceu muitos obstáculos e está aí se esforçando para chegar onde quer. Desejo que alcance todos os seus objetivos, e com essa garra e esse caráter sem dúvidas será muito bem sucedido. Agradeço por ter aceitado o convite de ser parte da minha Banca Avaliadora e pela amizade. Muito obrigada.

À minha amiga **Isabela Vieira**,

que sempre foi tão receptiva, amiga e amorosa em todos os momentos, uma pessoa cheia de luz e alegria. Desde o primeiro momento você modificou a minha vida, transformou os meus pensamentos e conquistou um lugar muito especial no meu coração. Agradeço por compartilhar comigo a sua luz, a razão e o amor. Continue espalhando flores e paz por onde anda, o universo precisa de mais humanos como você. Sou eternamente grata a você. Obrigada

Ao meu amigo **Guilherme Rodrigues Bizelli**,

que durante o caminho apareceu na minha vida e se tornou tão importante em instantes. Pode ter sido devido à sua pessoa cheia de qualidades, uma mente sem igual, uma inteligência incrível e uma alma cheia de luz e coisas boas. Chegou de repente e preencheu um lugar muito especial, sou segura em dizer que ganhei um irmão na universidade. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – **UNESP**, ao seu corpo docente e especialmente ao **Diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi** pelo espírito acolhedor e receptivo, que diariamente trabalha por todos nós, não somente como diretor, mas como um pai atencioso e dedicado. Ao **Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho**, pelos ensinamentos e a oportunidade de te conhecer e trabalhar com você, mesmo que pouco, mas suficiente para ver a sua seriedade, respeito e carinho pelo que faz. Enfim, agradeço por realizar este curso e esta pesquisa.

À **Biblioteca** da Universidade, que me proporcionou o suporte ideal para concluir essa etapa, de forma direta contribuiu para minha formação profissional.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa do Chefe de Departamento **Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti**, sempre divertido e receptivo, que possibilitou a execução de toda parte experimental, por fim, colaborou para a conclusão desse trabalho.

À **Prof. Ass. Dra. Alaíde Gonçalves**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, com muito carinho proporcionou ensinamentos que colaboraram para o meu conhecimento acadêmico. Mostrou claramente a pessoa honesta, humilde e feliz, o que reflete diretamente na minha formação profissional e pessoal.

Ao **Prof Tit. Dr. José Américo de Oliveira**, da **Disciplina de Anatomia**, que me identifiquei desde o início pela sua simplicidade, uma tranquilidade e paz sem igual. Agradeço grandemente pela paciência que nos transmite os inúmeros ensinamentos de Anatomia e Cidadão. Junto a ele aprendi o respeito ao próximo, desde os animais até seres humanos, aprendi que podemos viver em harmonia sem prejudicar ninguém e ser ético em qualquer procedimento, seja na vida profissional ou pessoal. Levarei os seus ensinamentos comigo para sempre. Muito obrigada.

Ao **Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin**, da **Disciplina de Anatomia**, pela responsabilidade e seriedade com a Anatomia, me proporcionou ensinamentos

fundamentais para a minha formação profissional, a sua rigidez junto ao carinho e dedicação em transmitir o conteúdo programático foi responsável pelo meu esforço e sucesso, não somente na Anatomia, mas na minha formação acadêmica. Muito obrigada.

À **Prof. Ass. Dr. Roberta Okamoto**, da **Disciplina de Anatomia**, pela positividade e a alegria que carrega com você e acaba transmitindo por onde passa, infelizmente chegou na reta final, mas contribuiu com os meus conhecimentos com muita simpatia e carisma. Obrigada.

Ao **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, que contribuiu intensamente nas etapas laboratoriais, ajudava sempre com muita disposição, alegria e respeito. Muito obrigada.

Aos **Servidores do Departamento de Ciências Básicas, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, Sandra Aparecida dos Santos Pinheiro, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega** pela simpatia e a humildade que colaboraram intensamente para a realização dessa pesquisa e com a minha formação.

Ao **Prof. José Ari Gualberto Junqueira**, que sempre esteve presente e disposto todas as vezes que precisei, pela humildade e a vontade de ajudar. Pela riqueza em cada detalhe nas peças, que com muito cuidado e carinho nos proporcionou o diferencial, ótimas imagens e peças admiráveis que contribuíram extremamente para o meu conhecimento na Anatomia. Admiro o seu respeito, o seu caráter e a responsabilidade pelo que faz. Admiro o seu trabalho e a sua pessoa. Agradeço intensamente pelos ensinamentos. Muito obrigada.

À minha querida e eterna **TURMA XIII**, que fizeram desses 6 anos os melhores da minha vida, uma sala acolhedora, amiga, amorosa, brincalhona e sempre ocupando aquele vazio presente, na ausência da família vocês souberam e muito descontrair e preencher esse espaço. Juntos, cada um com o seu respectivo problema, conseguimos driblar todos os obstáculos e vencer mais uma etapa. Sinto-me honrada em fazer parte desta sala, que tornou mais que amigos, nessa jornada durante esse período, juntos,

vocês foram uma família. Agradeço profundamente a cada um de vocês. Muito obrigada.

Ao meu amigo e companheiro **Gigante**,

durante esses longos anos tem sido o companheiro mais fiel e amoroso, nos dias vazios e de saudade você acalmou meu coração. Obrigada.

Aos **ratinhos**, que tornaram possível a realização desse projeto, foram alvos de uma pesquisa extremamente importante, proporcionaram informações científicas relevantes para a vida humana. Meu eterno respeito.

**“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais
preciosa que temos.”**

Albert Einstein

RIBEIRO, J.O.B. **Análise estereológica do córtex pré-frontal de ratos submetidos a anóxia neonatal**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

Os quadros de hipóxia (HN) ou anóxia (AN) neonatal, onde ocorre uma diminuição do teor de oxigênio nos tecidos orgânicos, representam um problema de saúde pública importante. Estudos recentes indicam que eventos hipóxicos/anóxicos durante o parto, além de outras sequelas imediatas, podem representar fatores de risco para o surgimento tardio de condições psiquiátricas onde o córtex pré-frontal desempenha uma atuação fundamental, como o Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), autismo, e esquizofrenia. Este estudo visa estabelecer se as alterações estruturais encontradas no córtex pré-frontal de pacientes com essas condições clínicas podem ser reproduzidas em modelos experimentais de AN. Para isto, em modelo de AN em ratos, analisamos mediante análise estereológica populações celulares da região do córtex pré-frontal, comumente afetadas nessas situações. Esta análise incluiu a quantificação da população neuronal geral evidenciada por imunohistoquímica para NeuN (proteína nuclear específica de neurônios), e a população astrocitária por imunohistoquímica para a proteína ligante de cálcio S100B.

Nossos resultados indicam uma diminuição significativa no número de neurônios na idade de 14 dias pós-natais nos animais anoxiados, com posterior normalização estatística. Já a população astrocitária S100B não apresentou diferenças significativas entre animais anoxiados e controle do mesmo período experimental.

Palavras chave: Anóxia. Córtex pré-frontal. NeuN. Esquizofrenia. S100B

RIBEIRO, J.O.B. **Stereological analysis of the prefrontal cortex of rats subjected to neonatal anoxia.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Hypoxic (NH) or anoxic (NA) neonatal events, where there is a decrease in the oxygen content of organic tissues, represent a major public health problem. Recent studies indicate that hypoxic / anoxic events during childbirth, besides other immediate consequences, may represent risk factors for late onset of psychiatric conditions in which the prefrontal cortex plays a key role, as the Deficit Disorder Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), autism, and schizophrenia. This study aims to establish whether the structural changes found in the prefrontal cortex of patients with these medical conditions can be reproduced in experimental models of NA. For this, using a model of NA in rats and stereological techniques, we analyzed cellular populations of the PFC commonly affected in these situations. This analysis included the quantification of the global neuronal population evidenced by NeuN immunohistochemistry (neuronal specific nuclear protein), and astrocyte populations by immunohistochemistry for the calcium binding protein S100B. Our results indicate a significant decrease in the neuron number at P14 in anoxic animals, with subsequent statistical recovery at P21 and P60. The S100B+ astrocytic population showed no significant differences between anoxic and control animals.

Keywords: anoxia. Prefrontal cortex. NeuN. Schizophrenia. S100B

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sistema utilizado para provocar anóxia em ratos neonatos. 23
- Figura 2** - Delimitação aproximada da ROI (Region of Interest). 28
- Figura 3** - Fotomicrografia de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P21 dias, submetidos a técnica imuno-histoquímica para a evidenciação de NeuN. 33
- Figura 4** - Fotomicrografia de cortes de encéfalo de ratos do grupo controle P21. Em **A** e **B**, imagens de imunofluorescência de astrócitos S100B+. Em **C** astrócitos GFAP+, e em **D** astrócitos S100B+ com técnica de imunoperoxidase. A barra de escala em **A** se aplica a **B** e **C**. 36

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Pesos corporais, em gramas, de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. | 30 |
| Tabela 2 - Pesos encefálicos, em gramas, de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. | 31 |
| Tabela 3 - Número de neurônios NeuN+ de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. | 34 |
| Tabela 4 - Número de astrócitos S100B de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. | 37 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica dos pesos corporais, em gramas, de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. 31

Gráfico 2 - Representação gráfica dos pesos encefálicos, em gramas, de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. 32

Gráfico 3 - Representação gráfica do número de neurônios NeuN+ de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. 35

Gráfico 4 - Representação gráfica do número de astrócitos S100B de ratos controles e anoxiados nas idades P14, P21 e P60. 38

LISTA DE ABREVIATURA

ACAd = anterior cingulate area, dorsal part
ACx = Anterior Cingular cortex
AN = Anóxia Neonatal
Cg1 = cingulate cortex, area 1
Cg2 = cingulate cortex, area 2
CPF = Córtex pré-frontal
CPfm = Córtex pré-frontal medial
DMSO = Dimetil-Sulfóxide
HN = Hipóxia Neonatal
IL = infralimbic cortex
MO = medial orbital cortex
Mos = secondary motor area.
NeuN = Proteína Nuclear Específica de Neurônios
PrL = prelimbic cortex
ROI = Region of Interest (Região de interesse)
SNC = Sistema Nervoso Central
SVZ = Zona subventricular
TDAH = Transtorno do déficit de atenção/hiperatividade

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--------------------|-----------|
| 1 | Introdução | 19 |
| 2 | Objetivos | 22 |
| 3 | Metodologia | 22 |
| 4 | Resultados | 30 |
| 5 | Discussão | 39 |
| 6 | Conclusão | 44 |
| 7 | Referências | 45 |

1 INTRODUÇÃO

Complicações obstétricas durante o parto podem determinar quadros de hipóxia neonatal (HN), situação em que ocorre uma diminuição do teor de oxigênio nos tecidos orgânicos, ou mesmo casos de anóxia (AN), onde a concentração de oxigênio no sangue fetal circulante é praticamente nula. Os quadros de HN representam um problema de saúde pública importante já que dois a quatro ocorrências dessa natureza são descritas para cada 1000 nascimentos a termo, e em aproximadamente 60% dos nascimentos prematuros (VANNUCCI et al., 1999; SUGUIHARA; LESSA, 2005; KURINCZUK et al., 2010).

Em casos de hipóxia, o organismo do neonato utiliza mecanismos destinados a diminuir a possibilidade de isquemia cerebral. De fato, Shankaran (1991) demonstraram que em uma grande quantidade de casos onde foi verificada HN com comprometimento de vários sistemas orgânicos, a função cerebral permaneceu basicamente preservada.

Apesar dessa resposta protetora do organismo fetal, vários estudos apontam que eventos hipóxicos durante o parto podem representar -além dos efeitos imediatos como paralisia cerebral e deficiências auditivas e visuais entre outras- fatores de risco para o surgimento posterior de várias alterações patológicas e comportamentais como Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), autismo, déficits no aprendizado e memória espacial, e esquizofrenia (HARTSOUGH; LAMBERT, 1985; NORMAN; MALLA, 1993; VERDOUX; BOURGEOIS, 1993; GUNTHER-GENTA et al., 1994; BUWALDA et al., 1995; MILBERGER et al., 1997; MCNEIL et al., 2000; CANNON et al., 2002; CAPUTA et al., 2005; ROGALSKA et al., 2006; LEUNER et al., 2006; WINOCUR et al., 2006).

Os mecanismos exatos mediante os quais a AN leva a essas alterações ainda não são bem conhecidos. Estudos clínicos e experimentais têm apontado aumento no índice apoptótico e ativação da resposta inflamatória no tecido cerebral, com aumento na expressão de citocinas, interleucina, fator de necrose tumoral e seus respectivos

receptores (SHELDON et al., 2001; GROJEAN et al., 2003; LIU et al., 2004; TAKADA et al., 2015).

Entre as sequelas estruturais relacionadas com o desenvolvimento neural foram documentadas alterações nos padrões arquitetônicos normais do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo, e alterações nos circuitos de transmissão dopaminérgica, noradrenérgica e glutamatérgica (BJELKE et al., 1991; EL-KHODOR e BOKSA, 1997; BRAKE et al., 1997, 2000; EL-KHODOR et al., 2004). Estas alterações parecem coincidir com aspectos patofisiológicos relacionados com a esquizofrenia e o TDAH.

Independente do mecanismo de ação, os dados epidemiológicos relacionados com a esquizofrenia apontam uma correlação entre esta doença e quadros de hipóxia/anóxia neonatal (CANNON et al., 1999, 2000; ROSSO et al., 2000; ZORNBERG et al., 2000; DALMAN et al., 2001; KOTLICKA-ANTCZAK M. et al., 2001).

Embora modelos animais estejam longe de reproduzir os complexos distúrbios cognitivos observados em pacientes esquizofrênicos, eles podem ser úteis para definir se algumas das alterações estruturais e comportamentais observadas nestes pacientes podem ser também verificadas em animais submetidos a episódios de AN.

Modelos experimentais de hipóxia perinatal incluem clampagem da artéria carótida combinada com a exposição a baixos níveis de oxigênio; anóxia global mediante a remoção e imersão do útero materno contendo os filhotes em solução salina a 37°C por alguns minutos; e exposição dos filhotes a atmosferas hipóxicas ou anóxicas em diversos períodos pós-natais, modelo este adotado no presente estudo (BOKSA, 2004; TAKADA et al., 2011).

Em modelos experimentais, o hipocampo tem sido alvo preferencial dessas investigações. Isto fundamentalmente devido a dois fatores, a participação dessa estrutura em processos relacionados com a memória e o aprendizado –funções cognitivas reconhecidamente alteradas em modelos de AN- e ao conhecimento satisfatório que existe sobre a arquitetura, conectividade e estrutura química dessa região, o que facilita análises comparativas entre grupos de animais normais e experimentais (BOKSA, 2004).

Recentemente, entretanto, foi constatado que outras estruturas límbicas como o córtex pré-frontal medial (CPfm) podem apresentar alterações estruturais em modelos de AN (JUAREZ et al., 2008).

Em síntese, existem dados experimentais e clínicos que indicam que quadros de HN ou AN estão associados a alterações em processos cognitivos ou condições psiquiátricas onde o CPF desempenha uma atuação fundamental.

Ante esses dados e ante a evidente importância que o estudo das consequências AN adquire, resulta pertinente analisar alguns parâmetros estruturais do CPF em modelos experimentais.

Considerando que quadros de hipóxia perinatal estão associados a diversos níveis de comprometimento cognitivo e a um aumento no risco de posterior aparecimento das doenças acima citadas, nós iniciamos este estudo tentando responder se algumas das alterações estruturais nelas observadas podem ser também encontradas em modelos de AN.

Esta análise incluiu a quantificação da população neuronal geral evidenciada por imuno-histoquímica para NeuN (proteína nuclear específica de neurônios) assim como a análise do número de astrócitos mediante a utilização de anticorpo contra a proteína ligante de cálcio S100B, a qual no córtex cerebral evidencia fundamentalmente populações astrocitárias.

Estudos recentes sugerem que a densidade desta célula glial é afetada no SNC de ratos submetidos a modelos de isquemia hipóxica (PIMENTEL et al., 2009), de forma que não pode ser descartada a possibilidade que algumas das alterações cognitivas e doenças psiquiátricas associadas à HN estejam também relacionadas a alterações nessa população celular.

2 OBJETIVOS

Usando modelo de anóxia neonatal desenvolvido e padronizado pelo nosso grupo e utilizando métodos estereológicos sem viés, quantificar a população neuronal geral do CPF de ratos controle e submetidos a AN, mediante a contagem de neurônios evidenciados pela técnica imuno-histoquímica para NeuN (proteína nuclear específica de neurônios), e da população astrocitária imunorreativa para a proteína ligante de cálcio S100B.

3 METODOLOGIA

Para este estudo foi utilizado o modelo de anóxia neonatal não invasivo descrito por Takada et al., (2011), coautores deste projeto.

Animais

Foram utilizados filhotes de 12 casais de ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), criados no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III – USP, com temperatura constante ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12h, início do claro às 7:00h, e água e comida. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA).

Condições experimentais

Foram utilizados 36 neonatos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), com aproximadamente 30 horas de vida, pesando entre 6 e 8 g. O insulto anóxico (ver abaixo) foi realizado no segundo dia pós-natal (P2). Os animais foram divididos em grupos conforme a idade: P14, P21 e P60. Os períodos experimentais obedecem a dados obtidos na literatura relacionados com fases críticas de desenvolvimento cerebral (WINICK; NOBLE, 1966) e alterações descritas em parâmetros estruturais neste modelo experimental (JUAREZ et al, 2008). Cada grupo foi subdividido nos subgrupos Anóxia (n=6) e Sham (n=6, denominados Controle no restante deste texto).

Modelo de AN

Para a exposição dos animais à anóxia, foi utilizado sistema construído e validado no laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, constituído por câmara semi-hermética de

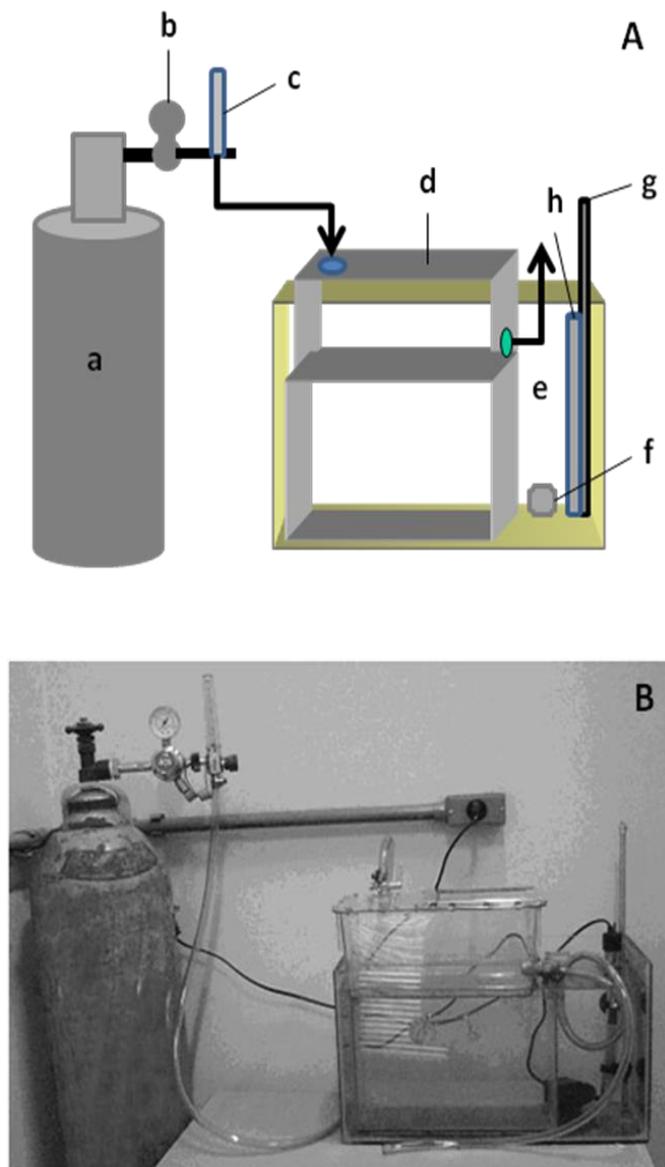


Figura 1. Sistema utilizado para provocar anóxia em ratos neonatos. A) Desenho esquemático mostrando: a) cilindro de nitrogênio gasoso (concentração de 100%); b) manômetro; c) fluxômetro; d) bomba difusora de água (para homogeneizar a temperatura

da água); e) câmara em policarbonato parcialmente imersa na água; f) termômetro; g) resistência para aquecimento da água; setas pretas indicam entrada e saída do gás. B) Câmara semi-hermética conectada a cilindro de gás nitrogênio e parcialmente imersa em água aquecida.

policarbonato (31,0 × 14,0 × 19,5 cm), com entrada e saída de gás, acoplada a manômetro, fluxômetro e a cilindro de nitrogênio gasoso. Com o objetivo de evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara é mantida entre 35 e 37 °C pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica. Esta faixa de temperatura é importante uma vez que a temperatura basal dos neonatos é de 33 °C, constituindo por si só fator de neuroproteção (CAPUTA et al., 2005; ROGALSKA et al., 2006).

Os pais foram mantidos juntos até o nascimento dos filhotes, quando então o macho foi transferido para outra gaiola, permanecendo na mesma apenas a mãe e os neonatos. O desmame ocorreu em 21 dias.

Para a anóxia, primeiramente a câmara é saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 3 L/minuto e pressão de 101,7 kPa, determinados de acordo com a literatura (TANG; NAKAZAWA, 2005; ROGALSKA et al., 2006; COQ et al., 2007). Os animais são então colocados rapidamente na câmara, permanecendo durante 25 minutos nestas condições, considerado o tempo máximo para evitar sua morte (DELL'ANNA et al., 1995). Testes prévios mostraram que períodos ligeiramente maiores causaram alto índice de mortalidade (DL50=30 minutos). Para o período considerado, o índice de mortalidade foi de 12,5%, semelhante ao observado em literatura (DELL'ANNA et al., 1991; IUVONE et al., 1996).

Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), que ocorre em média 5 minutos após a retirada da câmara, estes foram devolvidos para a mãe até o momento da perfusão transcardíaca ou até o desmame (21 dias).

O grupo Controle foi exposto às mesmas condições experimentais, mas sem a troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecendo ao ar ambiente.

Após a realização do insulto anóxico e finalizados os períodos experimentais (P14, P21 e P60), 12 animais em cada grupo etário (seis controle e seis anoxiados) foram pesados, anestesiados e perfundidos por via intracardíaca mediante a utilização de bomba perfusora peristáltica, com a seguinte sequência de soluções:

- a) Soro salino, a temperatura ambiente e em uma quantidade suficiente para permitir um retorno vascular quase transparente (0,5ml/g de peso corporal aproximadamente).
- b) Solução fixadora composta de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 a 4° (mínimo de 1ml/g de peso corporal).

Finalizada a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos, pesados, mantidos por duas horas na mesma solução fixadora a 4°C, e finalmente crioprotetidos com uma solução composta de glicerol 10% e DMSO 2% dissolvidos em tampão fosfato 0,1M; pH 7,3; a 4°C, por 24 horas, e mais 48 horas em solução de glicerol 20% e DMSO 2% dissolvidos no mesmo tampão, a 4°C.

Após a crioproteção, os encéfalos foram congelados com gelo seco e seccionados no plano frontal em micrótomo de congelação, com espessura de corte de 50 µm.

Os cortes foram recolhidos em recipientes contendo solução anticongelante, e separados em seis séries, resultando em distâncias de 300 µm entre cortes de uma mesma série.

Para a realização das técnicas imuno-histoquímicas os cortes foram lavados em TBS 0,05M (Tris Base (Amresco, EUA) + NaCl) (3 x 10 minutos) e depois incubados durante 30 minutos em H₂O₂ 0,3% diluída em TBS-TX 0,05 M (TBS + 0,5% de Triton X-100, Amresco, EUA), pH 7,6. Em seguida os cortes foram lavados novamente em TBS-TX (3 x 10 minutos) e subsequentemente incubados com soro fetal bovino a 3% (Vector Laboratories, EUA) em TBS-TX durante 1 hora. Após três lavagens em TBS-TX, os cortes foram incubados durante 48 horas com o anticorpo primário correspondente

(monoclonal anti-NeuN (rato), Millipore, A60 clone, 1:2000; monoclonal anti-S100B (coelho), Abcam, 1:1000) diluído em TBS-TX e sob suave agitação a 4 ° C. ¹

Para a imuno-histoquímica de NeuN, os cortes foram subsequentemente lavados com TBS-TX, durante 30 minutos e posteriormente incubados durante 2 horas com anticorpo biotilado secundário anti rato (feito em cabra, 1: 200, Vector Laboratories). Em seguida, os cortes foram novamente lavados (3 × 10 minutos com TBS-TX), e tratados com complexo avidina-biotina-peroxidase (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories; diluição 1: 100 em TBS-TX) à temperatura ambiente durante 90 minutos. Sítios antigénicos foram visualizados utilizando 0,02-0,05% tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, EUA) e sulfato de amónio a 0,1% de níquel. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados através de uma série crescente de álcool (70, 90, 100, e 100%; 1 min cada), desengordurados com xilol (5, 10, e 30 min), e cobertos com lamínulas utilizando DPX como meio de montagem.

Para imunofluorescência anti S100B, após a incubação dos cortes no anticorpo primário, eles foram lavados, incubados durante 2 h anticorpo anti coelho marcado com Texas Red (Vector Laboratories), posteriormente montados em lâminas gelatinizadas, e cobertos com lamínula utilizando meio de montagem aquoso.

Todas as baterias de imuno-histoquímica para uma mesma técnica (incluindo os seis animais controle e os seis desnutridos nos grupos de 14, 21 e 60 dias foram realizadas simultaneamente, de forma que todos os cortes foram expostos às mesmas soluções e tempos de incubação e revelação, o que evita que os resultados sejam influenciados por eventuais variações de temperatura, concentração, tempos de revelação, etc. Em virtude disto, como os animais dos grupos de 14, 21 e 60 dias não foram processados simultaneamente, optamos por não realizar comparações longitudinais.

¹ Com o objetivo de encontrar a técnica que melhor se adaptasse à contagem estereológica, foi tentada também a técnica imuno-histoquímica para evidenciação de GFAP para evidenciação da população astrocitária (polyclonal anti-GFAP (coelho), Millipore, 1:2000), assim como a técnica para evidenciação de S100B via imunoperoxidase. Os resultados podem ser visualizados, apenas com finalidade ilustrativa, na Figura 4.

Delimitação do CPF

Uma das condições necessárias para uma correta análise estereológica é que a região a ser analisada seja bem delimitada. Além dos aspectos matemáticos envolvidos, isto é fundamental para que os experimentos sejam reproduzíveis por outros pesquisadores. Infelizmente, em relação ao CPF do rato (e de roedores em geral) os limites entre as áreas dessa região não são bem definidos. Prova disso são as diversas nomenclaturas e limites propostos nos principais atlas. Provavelmente o único consenso é que uma região homóloga ao CPF observado em primatas pode ser localizada apenas na fase medial do lobo frontal. No atlas de Paxinos e Watson (2006), esta região inclui as áreas MO (medial orbital córtex), PrL (prelimbic cortex), IL (infralimbic cortex) e Cg1 (cingulate cortex, area 1). PrL e IL não ultrapassam no sentido posterior a decussação do corpo caloso, já Cg1 e a mais ventral Cg2 (cingulate cortex, area 2) se estendem em direção posterior, mas na realidade fazem parte do giro do cíngulo, e não do CPF. Já no atlas de Swanson (1992), a parede medial do lobo frontal é ocupada pelas áreas ILA, PL, ACAd (anterior cingulate área, dorsal part) e MOs (secondary motor área). Além das diferentes nomenclaturas (apenas IL - ILA e PrL - PL apresentam nomenclatura similar), os limites entre as áreas diferem (UYLINGS et al., 2003). Já outros autores (KRETTEK; PRICE, 1977; PEREZ-CRUZ et al., 2007) mantem as áreas PL e IL e acrescentam dorsalmente a área ACx (Anterior Cingular córtex, denominada Fr2 por Zilles (1985)). Isto posto, resulta difícil delimitar por critérios puramente arquitetônicos a região que será utilizada para a quantificação estereológica já que não existe consenso em relação aos limites. Isto se torna ainda mais difícil em algumas técnicas imuno-histoquímicas onde apenas uma população neuronal específica é evidenciada. A opção mais viável foi utilizar também critérios de delimitação “geométricos”, facilmente reproduzíveis entre os diversos autores, mas que ao mesmo tempo incorporassem as regiões de interesse. Neste sentido, nossa região de interesse (ROI) passou a ocupar quase que completamente a face medial do lobo frontal (ver figura abaixo), estendendo-se posteriormente até o início do corpo caloso. Esta ROI incorpora completamente as áreas IL e PL (sobre as quais existe consenso como pertencentes ao CPF), assim como as extensões frontais das áreas cingulares nas suas mais diversas denominações. Esta delimitação é praticamente a mesma utilizada

recentemente por Perez-Cruz et al. (2007), que limitam o CPF do rato às áreas PL, IL, e ACx.

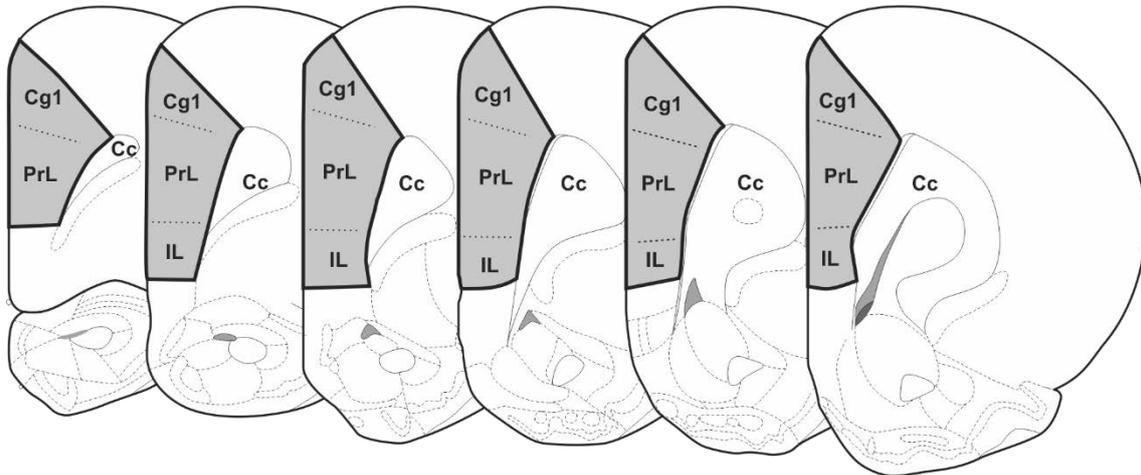


Figura 2. A área sombreada indica a delimitação aproximada da ROI (Region of Interest) utilizada neste estudo. Ela coincide superiormente com os ângulos dorsomediais, tanto na superfície cerebral como no limite entre a camada VI e a substância branca. Inferiormente se estende até o (alo)córtex peduncular dorsal, de fácil identificação. Assim, a ROI inclui as áreas pré-frontais mediais ACx, IL e PL, conforme parcelação de Krettek e Price (1977) e Perez-Cruz e cols. (2007) e pode ser facilmente reproduzida utilizando referências do próprio corte.

Análise microscópica e técnicas de contagem.

Lâminas contendo os cortes histológicos reagidos de acordo com as diversas técnicas foram analisadas em um microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com platina motorizada e câmera digital conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator (Microbrightfield, EUA). Para a visualização da imunofluorescência (S100B) foi utilizado o filtro para rhodamina, enquanto para a análise de NeuN foi utilizada microscopia de campo claro.

Para a quantificação estereológica foi utilizado o método do fracionador óptico (WEST et al., 1991). Foram utilizados todos os cortes desde o primeiro aparecimento até a

decussação do corpo caloso, gerando entre 6 a 8 cortes com intervalos de 6 para cada técnica e cada animal.

Dependendo da técnica, as caixas de contagem variaram entre 50 a 150 μm^2 , e seu número entre 15 ou 20 em cada ROI, de forma a incluir um mínimo de 300 células contadas em cada animal.

O dissector óptico foi ajustado de acordo com a espessura real do corte, que podia variar dependendo da contração produzida por cada técnica. Foi adotado um índice de erro (Gundersen) $< 0,07$.

Para determinar a estimativa do número de células dentro da ROI (N) o programa utiliza a fórmula:

$$N = (\Sigma Q) (1/ssf) (1/asf) (1/tsf)$$

Onde:

N = número total de células

ΣQ = número de células efetivamente contadas

ssf = “section sampling fraction” (número de secções contadas/total de secções)

asf = “area sampling fraction” (área bloco de contagem/área da grade)

tsf = “tissue sampling fraction” (altura bloco/média da espessura da secção)

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os animais controle (C) e anoxiados (A) em cada período experimental (P14, P21 e P60) foram analisadas pelo teste t de Student não pareado. Para todos os testes estatísticos, $p < 0,05$ indica uma diferença significativa entre os grupos C e A.

4 RESULTADOS

Dados ponderais

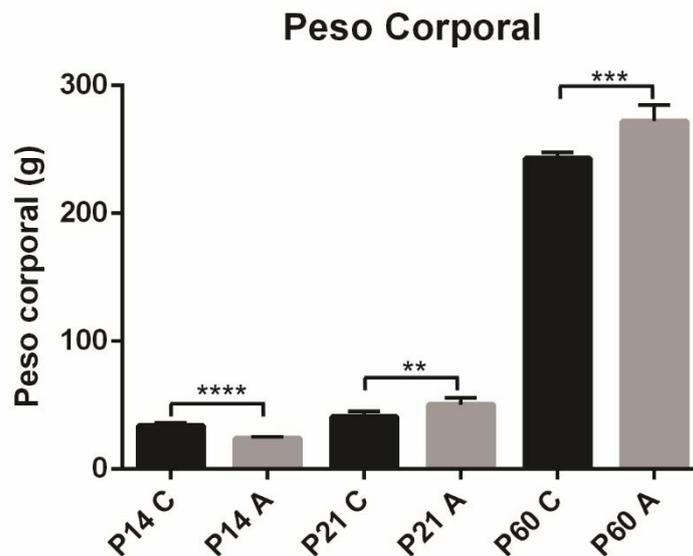
Peso corporal

Nossos resultados ponderais indicam que animais anoxiados apresentaram um peso corporal significativamente menor que os animais controle aos 14 dias, ocorrendo posteriormente uma inversão aos 21 e 60 dias (Tabela e gráfico 1).

Já em relação aos pesos encefálicos este mesmo fenômeno (inversão) ocorre com animais do grupo de 14 e 21 dias, sem diferenças estatísticas no grupo de 60 dias (Tabela e gráfico 2).

Tabela e gráfico 1. Pesos corporais, em gramas, de ratos controles e anoxiados.

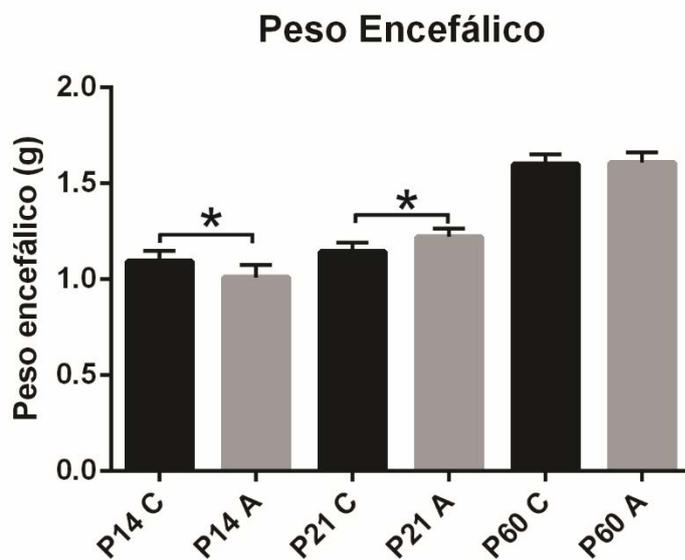
| | P14 C | P14 A | P21 C | P21 A | P60 C | P60 A |
|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Animal 1 | 1,01 | 1,10 | 1,09 | 1,20 | 1,60 | 1,61 |
| Animal 2 | 1,18 | 0,94 | 1,14 | 1,21 | 1,69 | 1,67 |
| Animal 3 | 1,12 | 0,93 | 1,10 | 1,20 | 1,60 | 1,51 |
| Animal 4 | 1,07 | 1,04 | 1,20 | 1,31 | 1,53 | 1,64 |
| Animal 5 | 1,09 | 1,04 | 1,20 | 1,22 | 1,59 | 1,61 |
| Animal 6 | 1,08 | 1,01 | 1,14 | 1,18 | 1,58 | 1,60 |
| Média ± Desvio padrão | 1,09 ± 0,06 | 1,01 ± 0,06 | 1,14 ± 0,05 | 1,22 ± 0,05 | 1,60 ± 0,05 | 1,61 ± 0,05 |



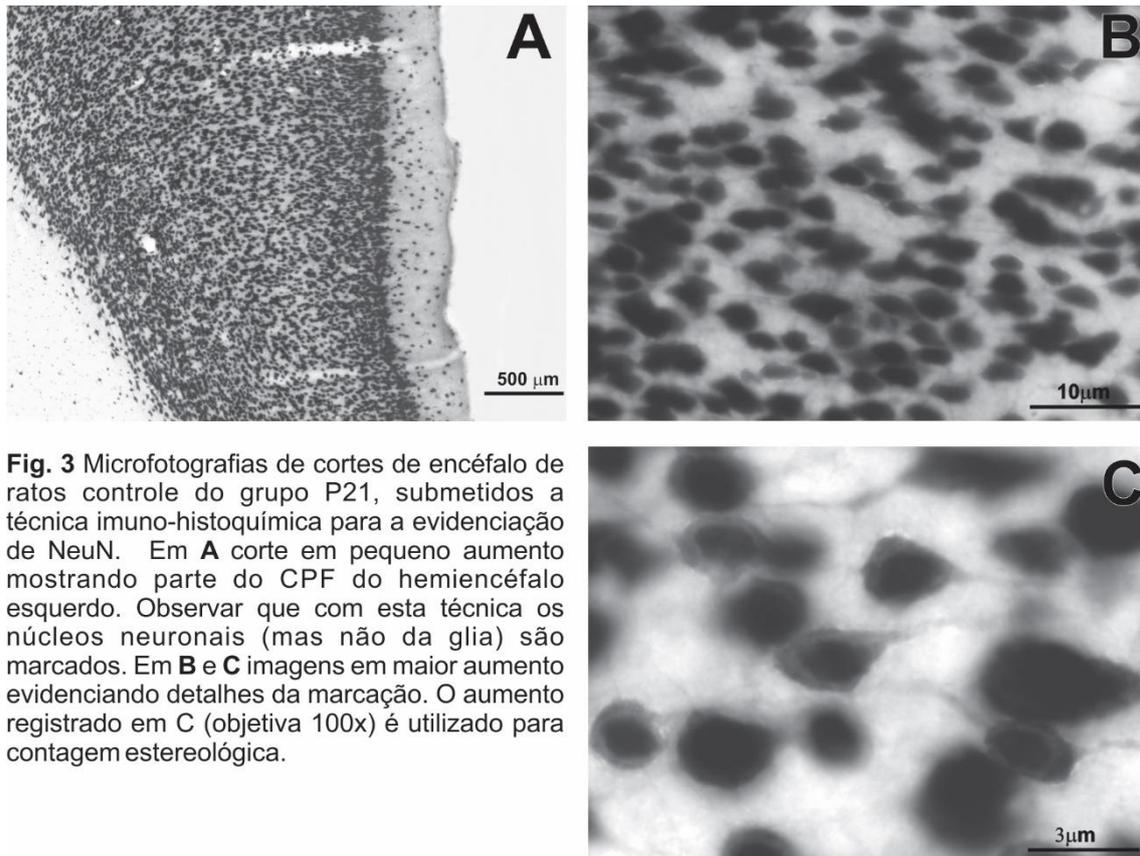
Representação gráfica dos dados relativos ao peso corporal dos animais controle (C) e anoxiados (A) nos diversos períodos experimentais. Foram observadas diferenças significativas em todos os grupos etários (****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$).

Tabela e gráfico 2. Pesos encefálicos, em gramas, de ratos controles e anoxiados.

| | P14 C | P14 A | P21 C | P21 A | P60 C | P60 A |
|------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| Animal 1 | 23,62 | 37,62 | 38,54 | 42,44 | 235,6 | 268,6 |
| Animal 2 | 24,47 | 33,83 | 35,50 | 47,93 | 248,7 | 279,0 |
| Animal 3 | 21,31 | 34,27 | 47,40 | 47,40 | 244,8 | 258,1 |
| Animal 4 | 25,10 | 31,26 | 39,80 | 56,70 | 240,0 | 271,9 |
| Animal 5 | 24,40 | 34,28 | 39,90 | 53,30 | 247,5 | 293,0 |
| Animal 6 | 23,60 | 32,12 | 44,70 | 54,90 | 241,7 | 262,5 |
| Média ± Desvio padrão | 23,75 ± 1,3 | 33,9 ± 2,2 | 40,97 ± 4,33 | 50,45 ± 5,42 | 243,05 ± 4,93 | 272,18 ± 12,53 |



Representação gráfica dos dados relativos ao peso encefálico dos animais controle (C) e anoxiados (A) nos diversos períodos experimentais. Foram observadas diferenças significativas nos grupos com 14 e 21 dias pós-natais (*, $p < 0,05$).

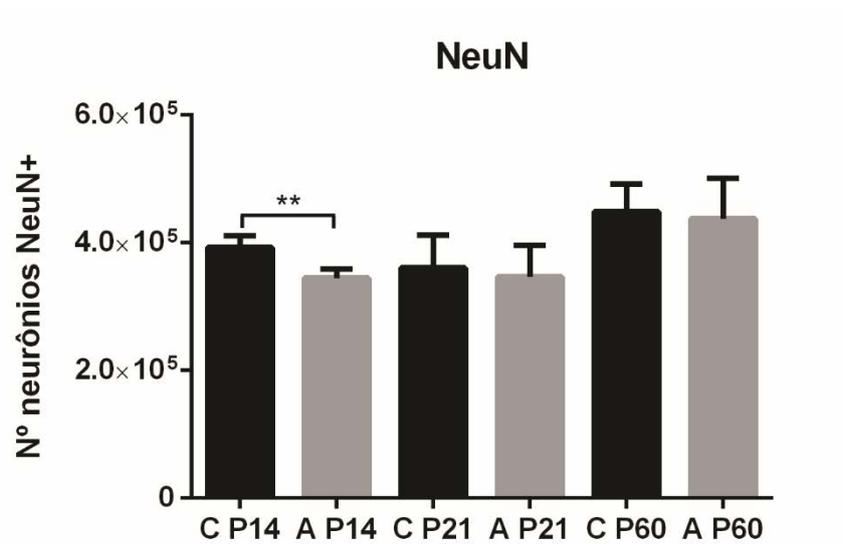
NeuN*Aspectos morfológicos*

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a anóxia alterou significativamente o número de neurônios NeuN+ no CPF no grupo de 14 dias, com uma normalização estatística em P21 e P60, conforme pode ser observado nos dados abaixo apresentados (Tabela e gráfico 3).

Tabela e gráfico 3. Número de neurônios NeuN+ de ratos controle e anoxiados.

| | P14 A | P14 C | P21 A | P21 C | P60 A | P60 C |
|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Animal 1 | 349779, | 399044, | 347290, | 350111, | 388421, | 388806, |
| Animal 2 | 337092, | 419483, | 421452, | 275036, | 383709, | 454208, |
| Animal 3 | 338481, | 373635, | 368004, | 376377, | 480200, | 426203, |
| Animal 4 | 330649, | 380402, | 284812, | 342055, | 545374, | 467227, |
| Animal 5 | * | 392120, | 302201, | 397594, | 403931, | 439812, |
| Animal 6 | 366673, | * | 357473, | 422844, | 424300, | 517347, |
| Média ± | 344500 ± | 392900 ± | 346872 | 360669 | 437655 | 448933 |
| Desvio padrão | 14160 | 17830 | ± 48924 | ± 51510 | ± 63345 | ± 43030 |



Representação gráfica dos dados relativos ao número de neurônios NeuN+ nos diversos períodos experimentais (C, grupo controle; A, grupo anóxia). Foram observadas diferenças muito significativas na idade P14 (**, $p < 0,01$).

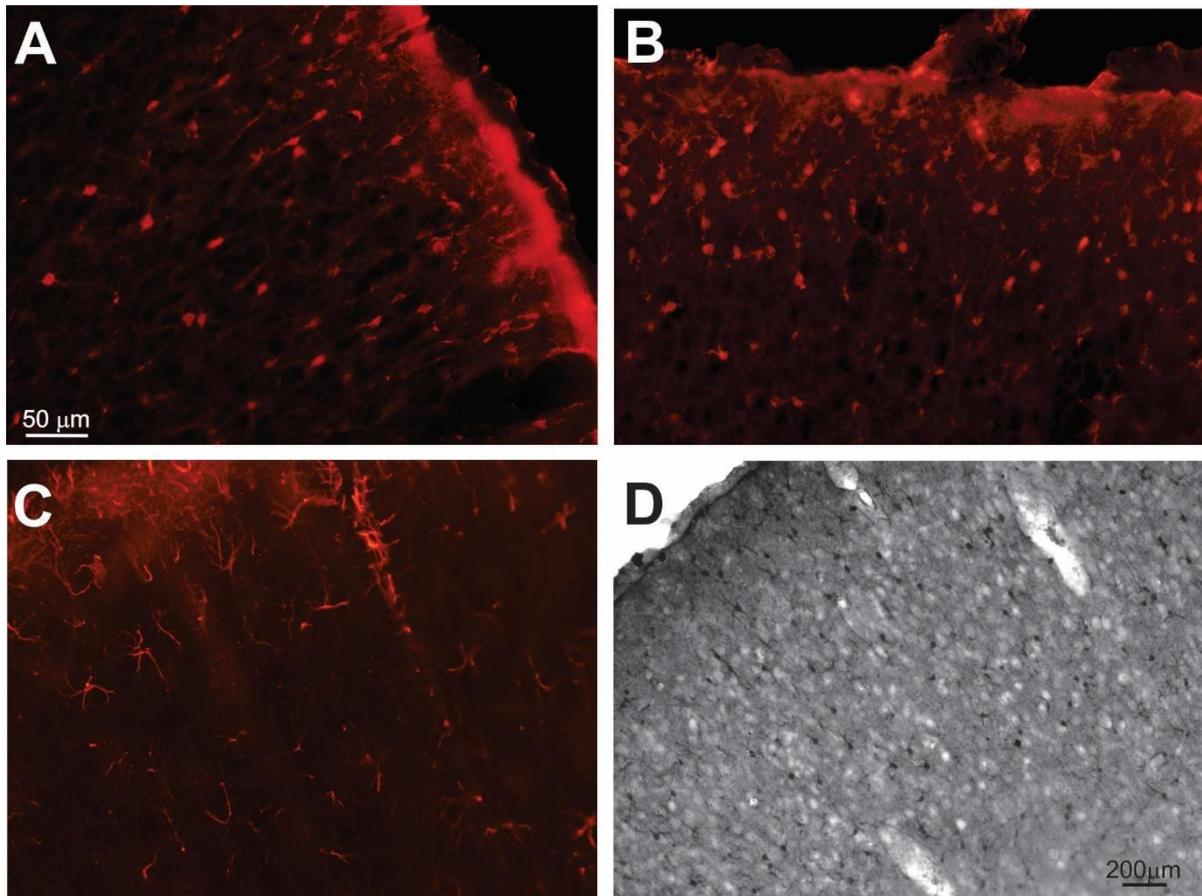
S100B*Aspectos morfológicos*

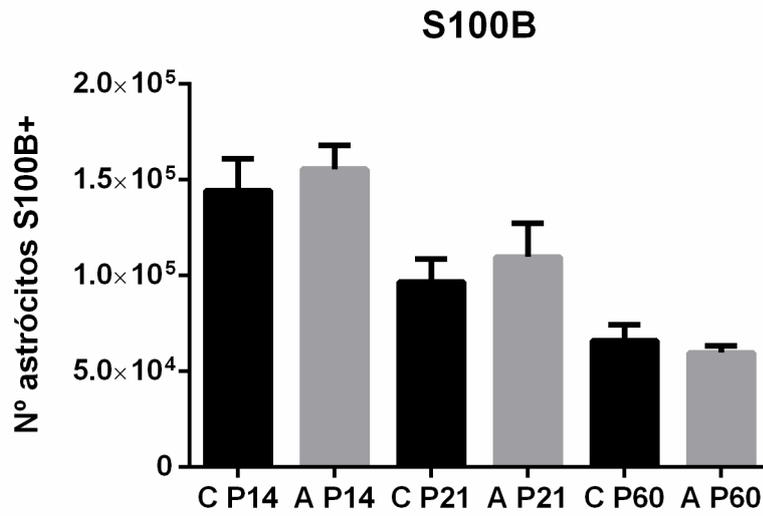
Figura 4. Microfotografias de cortes de encéfalo de ratos do grupo controle P21. Em **A** e **B**, imagens de imunofluorescência de astrócitos S100B+, técnica que foi escolhida para a contagem estereológica. Em **C** astrócitos GFAP+, e em **D** astrócitos S100B+ com técnica de imunoperoxidase. A barra de escala e **A** se aplica a **B** e **C**.

Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a anóxia não alterou significativamente o número de astrócitos imunorreativos para S100B no córtex pré-frontal em nenhum dos períodos experimentais, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados (Tabela e gráfico 4).

Tabela e gráfico 4. Número de astrócitos S100B+ de ratos controle e anoxiados.

| | P14 A | P14 C | P21 A | P21 C | P60 A | P60 C |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Animal 1 | 168854 | 125749 | 96236 | 94064 | 62399 | 72264 |
| Animal 2 | 162071 | 127026 | 86887 | 102264 | 58524 | 58869 |
| Animal 3 | 155339, | * | 99876 | 104169 | 54071 | 78125 |
| Animal 4 | 134298 | 158897 | 123359 | 90612 | 64258 | 65263 |
| Animal 5 | 163967 | 154872 | 127020 | 77713 | 57228 | 66502 |
| Animal 6 | 148650 | 155220 | 125377 | 111933 | 61657 | 54982 |
| Média ± | 155530 ± | 144353 ± | 109793 ± | 96793 ± | 59690 ± | 66001 ± |
| Desvio padrão | 12567 | 16482 | 17496 | 12027 | 3770 | 8477 |



Representação gráfica dos dados relativos ao número de astrócitos S100B nas idades de 14, 21 e 60 dias pós-natais P14 (C, grupo controle; A, grupo anóxia). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

De acordo com nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a analisar estereologicamente eventuais alterações estruturais no CPF de roedores, utilizando o modelo de insulto anóxico recentemente desenvolvido por Takada et al. (2011). Recentemente nosso grupo publicou resultados relacionados com o hipocampo (TAKADA et al., 2015). Nesse estudo observamos maiores índices de fragmentação de DNA (mediante a técnica TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferasemediated dUTP Nick End Labeling), e aumento na morte celular (técnica de Fluoro-Jade). Agora, incluímos dados relacionados com o CPF, uma região conectiva e funcionalmente relacionada com a formação hipocampal.

Analisando nossos resultados observamos que o insulto anóxico neonatal provoca uma diminuição significativa no peso corporal dos animais anoxiados em P14, e que esta diferença inverte significativamente nas idades de P21 e P60 (Tabela e gráfico 1). Por outra parte, observamos uma diminuição significativa do número total de neurônios revelados pela técnica de NeuN nos animais anoxiados de 14 dias, com normalização estatística em P21 e P60 (Tabela e gráfico 3).

O número de astrócitos reativos para S100B (Tabela e gráfico 4) não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre animais controle e anóxicos em nenhum dos períodos experimentais estudados.

Em média, o peso corporal dos animais anoxiados na idade de P14 é 30% menor que os do grupo controle (Tabela e gráfico 1). A inversão que observamos em P21 e P60 (Tabela e gráfico 1) é notável, embora pareça apresentar uma tendência à normalização. De fato, em P21 o peso corporal dos animais anóxicos é 18% maior, caindo para 11% em P60.

Na surpreendentemente escassa literatura que encontramos sobre a relação entre anóxia ou hipóxia neonatal e peso corporal, os resultados são bastante divergentes, o que pode refletir os diferentes modelos experimentais de anóxia neonatal adotados e brevemente descritos na Introdução deste texto. Assim, Fathali et al. (2010) em

modelo de hipóxia neonatal provocada por clampagem unilateral de artéria carótida, descrevem uma diminuição de peso corporal em todas as idades do experimento (P3, P14, P42), um resultado que claramente contrasta com o nosso.

A diminuição do peso corporal observada nos animais anóxicos em P14 (Tabela e gráfico 1) em nosso estudo poderia estar ainda influenciada pela resposta ao insulto anóxico. A resposta mais imediata ao insulto anóxico agudo em mamíferos recém-nascidos é a hiperventilação (MORTOLA, 1999). De forma diferente ao observado em adultos, entretanto, esta hiperventilação é frequentemente alcançada por uma acentuada redução da taxa metabólica (hipometabolismo), e não por um aumento na ventilação (hiperpneia; para revisão ver MORTOLA, 1999). Assim, seria possível especular que resquícios do hipometabolismo tenham afetado negativamente o peso corporal em P14. Infelizmente, não existem dados na literatura para explicar o ganho de peso observado posteriormente neste modelo experimental.

Nossos resultados indicam que a anóxia neonatal diminui de forma significativa o número de neurônios positivos para NeuN na idade de P14 (Tabela e gráfico 3), mas este número se normaliza posteriormente, não havendo diferenças na fase pré-púbere tardia P21, nem nos animais púberes P60 (Tabela e gráfico 3).

Estes dados numéricos devem ser sempre analisados levando em consideração as fases críticas do desenvolvimento cerebral e o momento dentro deste período no qual a agressão (o insulto anóxico neste caso) ocorre.

Em ratos o pico de crescimento encefálico ocorre aproximadamente entre P7 e P14, que corresponde ao período de nascimento em humanos (para revisão, ver MORGANE et al., 2002). Mas este pico máximo de crescimento cerebral (Brain Growth Curve) não coincide necessariamente com o auge dos diversos eventos proliferativos das diferentes populações celulares encefálicas. Em termos de neurogênese, em ratos são descritos dois picos proliferativos: a macroneurogênese, com a formação dos neurônios piramidais, ocorre ao redor de E18, bem antes então do nosso insulto anóxico. Já a microneurogênese, com a formação de neurônios granulares, ocorre fundamentalmente em períodos pós-natais. A diminuição numérica de neurônios

NeuN+ que observamos em P14 (Tabela e gráfico 3) poderia estar relacionada a processos de morte celular na população neuronal já existente, ou uma diminuição na microneurogênese em períodos pós-natais, o que poderia afetar a formação de interneurônios corticais, entre os quais se encontram os neurônios inibitórios gabaérgicos.

Já foi reiteradamente descrita a suscetibilidade do cérebro à falta de oxigênio (ENGIDAWORK et al., 1997; VEXLER; FERRIERO, 2001; LUTZ; PRENTICE, 2002). Episódios anóxicos-hipóxicos são capazes de desencadear reações bioquímicas em cascata, alterando os padrões metabólicos normais, o equilíbrio acidobásico, o acúmulo de radicais livres e aminoácidos excitatórios no meio extracelular, entre outros, podendo levar à morte celular (PIMENTEL et al., 2009). Resultados do nosso grupo revelaram estas alterações no hipocampo, utilizando ferramentas focadas na análise da alteração de DNA e morte celular (TUNEL, Fluoro-Jade e caspase-3; TAKADA et al., 2015).

Estes resultados corroboraram estudos clínicos e experimentais que apontam um aumento no nível de morte celular e ativação de resposta inflamatória no hipocampo após hipóxia pré-natal e perinatal (SHELDON et al., 2001; GROJEAN et al., 2003; LIU et al., 2004; HAVA GOLAN et al., 2009). Ante os resultados que observamos agora no CPF, estas ferramentas deverão ser utilizadas em projetos futuros para tentar elucidar os mecanismos por trás das alterações quantitativas agora observadas.

Em relação à população neuronal revelada pela técnica de NeuN, entre P21 e P60, período no qual observamos uma normalização estatística entre os animais anóxicos e controles (Tabela e gráfico 3) e a neurogênese já está muito diminuída, é óbvio que o número de neurônios deve ter aumentado nos animais anoxiados para se equiparar ao número observado nos animais controle. Ainda não existe consenso sobre a origem desta população neuronal formada pós-lesão. Em modelos onde é provocada lesão cerebral isquêmica, Kreuzberg et al. (2010) observaram uma migração de neuroblastos desde a zona sub-ventricular (SVZ) em direção à região afetada no córtex cerebral, onde se diferenciaram em neurônios maduros. Assim, a lesão isquêmica teria estimulado uma nova onda neurogênica desde SVZ em direção à região afetada do

córtex cerebral. Já Gu et al. (2000) em modelo similar destacam que os neurônios recém formados na região lesada seriam originados a partir de células tronco já existentes no isocortex. Para estes autores, uma migração de neuroblastos desde SVZ seria improvável já que o aparecimento destes novos neurônios nas camadas II e III teria ocorrido 72 horas após a lesão, um período demasiado curto como para ser explicado por uma onda migratória desde SVZ.

Mesmo havendo uma normalização estatística como a observada em nosso estudo em P21 e P60 (Tabela e gráfico 3), não pode ser excluída a possibilidade de esta alteração no número de neurônios nas fases iniciais de desenvolvimento ter o potencial de acarretar alterações duradouras nas redes e na circuitaria cortical em formação. Estudos clínicos têm apontado para o fato de indivíduos com esquizofrenia apresentarem uma probabilidade maior de ter atravessado complicações obstétrico-hipóxicas que indivíduos normais. Clarke et al. (2006) descreveram que um histórico de hipóxia fetal está associado a maiores anomalias em estruturas cerebrais, anomalias estas condizentes com aquelas observadas em pacientes esquizofrênicos. Assim, caberia a possibilidade que a diminuição da espessura cortical e do hipocampo observada nestes pacientes, derivariam, pelo menos em parte das interações entre a hipóxia agindo sobre um genótipo propenso para esta doença.

Já o aparecimento tardio de sequelas após a exposição a agentes potencialmente nocivos durante as fases críticas de desenvolvimento cerebral –mesmo não existindo a posterior exposição ao agente, tem sido registrado em estudos clínicos e experimentais (para revisão, ver RISE; BARONE, 2000).

Estas alterações morfológicas e/ou funcionais posteriores podem se tornar evidentes em virtude de algumas situações. A ontogenia de uma função cognitiva ou comportamental específica pode ocorrer tardiamente no desenvolvimento do animal, sendo que só nesse momento o dano ocorrido nessas fases iniciais se torna perceptível. Poderíamos assim especular que os episódios esquizofrênicos que costumam ter início na adolescência poderiam ser desencadeados por déficits nos sistemas inibitórios gabaérgicos eventualmente afetados durante os eventos

hipóxicos, e que só se tornam evidentes em virtude de alterações adicionais que ocorrem durante essa fase de desenvolvimento.

Por outra parte, alterações estruturais causadas precocemente com potencial de desencadear alterações cognitivas ou comportamentais podem ser mascaradas mediante mecanismos compensatórios e de plasticidade. Com o desenvolvimento ou envelhecimento, quando estes mecanismos já não são tão eficientes ou são exigidos mais intensamente, essas alterações podem se tornar mais evidentes levando ao surgimento de patologias. Fenômenos semelhantes têm sido descritos em modelos experimentais com roedores e primatas (RISE; BARONE, 2000), e foi verificado em populações humanas expostas a contaminantes como o metil-mercúrio, como nos episódios acontecidos em Japão na década de 1970 e relacionados com a doença de Minamata (RISE; BARONE, 2000).

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo permite concluir que, de acordo com a metodologia adotada:

- a) Os animais anoxiados conforme nosso modelo apresentam um peso corporal significativamente menor que os animais controle aos 14 dias, ocorrendo posteriormente uma inversão aos 21 e 60 dias.
- b) Foi observada uma diminuição significativa no número de neurônios NeuN+ no CPF no grupo de anóxicos 14 dias, com uma normalização estatística em P21 e P60.
- c) A anóxia não alterou significativamente o número de astrócitos imunorreativos para S100B no córtex pré-frontal em nenhum dos períodos experimentais.

7 REFERÊNCIAS

BJELKE B, ANDERSSON K, OGREN SO, OLME P. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. **Brain Res.**, v. 543, p. 1–9, 1991.

BOKSA P. Et al. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia. **Brain Research Reviews.**, v. 45, p. 1– 17, 2004.

BRAKE WG, BOKSA P, GRATTON A. Effects of perinatal anoxia on the acute locomotor response to repeated amphetamine administration in adult rats. **Psychopharmacology (Berl)**., v. 133, p. 389–395, 1997.

BRAKE WG, NOEL MB, BOKSA P, GRATTON A. Influence of perinatal factors on the nucleus accumbens dopamine response to repeated stress during adulthood: an electrochemical study in rat. **Neuroscience.**, v. 77, p. 1067–1076, 1997.

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.**, v. 163, p. 246–56, 2005.

CANNON M, JONES PB, MURRAY RM. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. **Am J Psychiatry.**, v. 159, p. 1080–1092, 2002.

CANNON TD, ROSSO IM, BEARDEN CE, SANCHEZ LE, HADLEY T. A prospective cohort study of neurodevelopmental processes in the genesis and epigenesis of schizophrenia. **Dev. Psychopathol.**, v. 11, p. 467 – 485, 1999.

CANNON TD, ROSSO IM, HOLLISTER JM, BEARDEN CE, SANCHEZ LE, HADLEY T. A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia. **Schizophr. Bull.**, v. 26, p. 351 – 366, 2000.

CLARKE MC, HARLEY M, CANNON M. The role of obstetric events in schizophrenia. **Schizophr Bull.**, v. 32, p. 3-8, 2006.

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.**, v. 210, p. 95–108, 2008.

DALMAN C, THOMAS HV, DAVID AS, GENTZ J, LEWIS G, ALLEBECK P. Signs of asphyxia at birth and risk of schizophrenia. Population-based case-control study. **Br. J. Psychiatry.**, v. 179, p. 403 – 408, 2001.

DELL'ANNA E1, CHEN Y, ENGIDAWORK E, ANDERSSON K, LUBEC G, LUTHMAN J, HERRERA-MARSCHITZ M. Delayed neuronal death following perinatal asphyxia in rat. **Exp Brain Res.**, v. 115, p. 105-15, 1997.

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.**, v. 131, p. 144–56, 1995.

DELL'ANNA ME, CALZOLARI S, MOLINARI M, IUVONE L, CALMICI R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behav Brain Res.**, v. 45, p. 125–34, 1991.

EL-KHODOR BF, BOKSA P. Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by caesarean section compared to vaginal birth. **Exp Neurol.**, v. 145, p. 118–129, 1997.

EL-KHODOR BF, FLORES G, SRIVASTAVA LK, BOKSA P. Effects of birth insult and stress at adulthood on excitatory amino acid receptors in adult rat brain. **Synapse.**, v. 54, p. 138–146, 2004.

ENGIDAWORK E, CHEN Y, DELL'ANNA E, GOINY M, LUBEC G, UNGERSTEDT U, ANDERSSON K, HERRERAMARSCHITZ M. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. **Exp Neurol.**, v. 145, p. 390-6, 1997.

FATHALI N1, OSTROWSKI RP, LEKIC T, JADHAV V, TONG W, TANG J, ZHANG JH. Cyclooxygenase- 2 inhibition provides lasting protection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Crit Care Med. Feb.**, v. 38(2), p. 572-8, 2010.

GOLAN HM, MANE R, MOLCZADZKI G, ZUCKERMAN M, KAPLAN- LOUSON V, HULEIHEL M, PEREZ-POLO JR. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. **Neuropharmacology.**, v. 57, p. 511-522, 2009.

GROJEAN S, POURIE G, VERT P, DAVAL JL. Differential neuronal fates in the CA1 hippocampus after hypoxia in newborn and 7-day-old rats: effects of pretreatment with MK- 801. **Hippocampus.**, v. 13, p. 970–977, 2003.

GUNTHER-GENTA F, BOVET P, HOHLFELD P. Obstetric complications and schizophrenia. A case-control study. **Br J Psychiatry.**, v. 164, p. 165–170, 1994.

GU W1, BRÄNNSTRÖM T, WESTER P. Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 20, p. 1166-73, 2000.

HARTSOUGH CS, LAMBERT NM. Medical factors in hyperactive and normal children: prenatal, developmental, and health history findings. **Am J Orthopsychiatry.**, v. 55, p. 190–201, 1985.

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.**, v. 139, p. 25–33, 1996.

JUAREZ I, GRATTON A, FLORES G. Ontogeny of altered dendritic morphology in the rat prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens following cesarean delivery and birth anoxia. **The Journal of Comparative Neurology.**, v. 507, p. 1734–1747, 2008.

KOTLICKA-ANTCZAK M, GMITROWICZ A, SOBOW TM, RABE-JABLONSKA J. Obstetric complications and apgar score in early-onset schizophrenic patients with prominent positive and prominent negative symptoms. **J. Psychiatr. Res** v. 35, p. 249 –257, 2001.

KRETTEK JE, PRICE JL. Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. **J Comp Neurol.**, v. 172, p. 687-722, 1997.

KREUZBERG M1, KANOV E, TIMOFEEV O, SCHWANINGER M, MONYER H, KHODOSEVICH K. Increased subventricular zone-derived cortical neurogenesis after ischemic lesion. **Exp Neurol.**, v. 226, p. 90-9, 2010.

LIU CL, SIESJO BK, HU BR. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxiaischemia changes during brain development. **Neuroscience.**, v. 127, p. 113–123, 2004.

LUTZ PL1, PRENTICE HM. Sensing and responding to hypoxia, molecular and physiological mechanisms. **Integr Comp Biol.**, v. 42, p. 463-8, 2002.

MCNEIL TF, CANTOR-GRAAE E, ISMAIL B. Obstetric complications and congenital malformation in schizophrenia. **Brain Res Rev.**, v. 31, p. 166–178, 2000.

MILBERGER S, BIEDERMAN J, FARAONE SV, GUTE J, TSUANG MT. Pregnancy, delivery and infancy complications and attention deficit hyperactivity disorder: issues of gene - environment interaction. **Biol Psychiatry.**, v. 41, p. 65–75, 1997.

MORGANE JP, MOKLER DJ, GALLER JR. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 26, p. 471-83, 2002.

MORTOLA JP. How newborn mammals cope with hypoxia. **Respir Physiol.**, v. 116, p. 95- 103, 1999.

NORMAN RM, MALLA AK. Stressful life events and schizophrenia. I. A Review of the research. **Br J Psychiatry.**, v. 162, p. 161–166, 1993.

PEREZ-CRUZ C, MÜLLER-KEUKER JI, HEILBRONNER U, FUCHS E, FLÜGGE G. Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. **Neural Plast.**, v. 2007, p. 46276, 2007.

PIMENTEL VC, BELLÉ LP, PINHEIRO FV, DE BONA KS, DA LUZ SC, MORETTO MB. Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia. **Int J Dev Neurosci.**, v. 27, p. 857-62, 2009.

RICE D, BARONE S JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect.** Jun;108 Suppl v. 3, p. 511-33, 2000.

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.**, v. 57, p. 17–34, 2006.

ROSSO IM, CANNON TD, HUTTUNEN T, HUTTUNEN MO, LONNQVIST J, GASPERONI TL. Obstetric risk factors for early-onset schizophrenia in a finnish birth cohort. **Am. J. Psychiatry.**, v. 157, p. 801 – 807, 2000.

SHANKARAN S, WOLDT E, KOEPKE T, BEDARD MP, NANDYAL R. Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants. **Early Hum Dev.**, v. 25, p. 135–148, 1991.

SHELDON RA, HALL JJ, NOBLE LJ, FERRIERO DM. Delayed cell death in neonatal mouse hippocampus from hypoxia-ischemia is neither apoptotic nor necrotic. **Neuroscience Letters.**, v. 304, p. 165–168, 2001.

TANG AC, NAKAZAWA M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. **Behav Brain Res.**, v. 163, p. 1–9, 2005.

S. H. TAKADA, SH; A. DOS SANTOS HAEMMERLE, A.; MOTTA-TEIXEIRA, L.C.; LEE, VY; TAKASE, LF; MACHADO-NILS, AV; XAVIER, GF; CRUZ-RIZZOLO, RJ; WATANABE, I; NOGUEIRA, MI. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience** v. 284, p. 247–259, 2015.

TAKADA SH, SAMPAIO CAG, ALLEMANDI W, ITO PH, TAKASE LF, NOGUEIRA MI. A modified rat model of neonatal anoxia: development and evaluation pulseoximetry,

arterial gasometry and fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods** v. 198, p. 62–69, 2011

UYLINGS HB, GROENEWEGEN HJ, KOLB B. Do rats have a prefrontal cortex? **Behav Brain Res.**, v. 146, p. 3-17, 2003.

VERDOUX H, BOURGEOIS M. A comparative study of obstetric history in schizophrenics, bipolar patients and normal subjects. **Schizophr Res.**, v. 9, p. 67–69, 1993.

VEXLER ZS1, FERRIERO DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. **Semin Neonatol.**, v. 6, p. 99-108, 2001.

WEST MJ, SLOMIANKA L, GUNDERSEN HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec.**, v. 231, p. 482-97, 1991.

WINICK M, NOBLE A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **J Nutr.**, v. 89, p. 300-6, 1966.

ZORNBERG GL, BUKA SL, TSUANG MT. Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other nonaffective psychoses: a 19-year longitudinal study. **Am. J. Psychiatry.**, v. 157, p. 196 – 202, 2000.