

TAÍS FERNANDES PIMENTA

“Quantificação estereológica de neurônios reativos às proteínas ligantes de cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina no 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 obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

Araçatuba – SP

2016

*Ao meu pai, **Oliveira Ari Pimenta**, que é o meu exemplo de vida. Obrigada por ser sempre a minha parte forte, meu escudo e proteção e por sempre acreditar em mim com todas as suas forças.*

*À minha mãe, **Carmen Lúcia F. S. Pimenta**, por estar ao meu lado todos os dias. Eu sempre te senti presente em pensamento em todos os momentos difíceis da minha vida; e seu amor, paciência e cuidado que me fizeram caminhar até aqui.*

Agradecimentos Especiais

À *Deus*,

por minha vida e pela oportunidade de realizar um sonho. Por colocar as pessoas certas na hora certa no meu caminho e me fazer aprender tanto com cada um que passou comigo por essa caminhada. Por me ajudar em minhas escolhas, fazendo que tudo que não parecia possível se tornasse, hoje, realidade. Obrigada por atender meus incansáveis pedidos e por me permitir e ajudar a ser sempre uma pessoa melhor.

À minha mãe, *Carmen Lúcia Fernandes Sevilha Pimenta*,

você foi fundamental durante todo o tempo. Mesmo distante tinha o dom de conseguir me guiar nos momentos mais difíceis. Me ensinou a ser uma pessoa boa, e buscar sempre o meu melhor e o melhor das pessoas. Obrigada por sua paciência inacabável, por sua bondade e fé, e por sempre acreditar em mim e me apoiar nesse ciclo em todos os momentos. Obrigada por todo amor que sempre me deu.

Ao meu pai, *Oliveira Ari Pimenta*,

obrigada por ser meu exemplo de vida. Sempre me espelhei na sua força para nunca desistir dos meus sonhos. Você me ensinou a ter responsabilidade e a ser uma pessoa honesta e justa. Você é a minha parte forte e meu lado racional. Eu cheguei aqui com uma base muito bem consolidada que me foi ensinada desde cedo por você. Jamais conseguiria agradecer com palavras a oportunidade que me proporcionou de fazer o curso que sempre quis. Obrigada por ter sonhado esse sonho junto comigo e por me permitir realiza-lo.

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

por ter me acolhido tão bem. Sempre que assistia suas aulas na anatomia me admirava com sua inteligência e humildade. Agradeço ao senhor por ter me mostrado que a faculdade vai muito além do que eu conhecia, que existe uma beleza extraordinária em fazer ciência. Eu sempre me inspirei na sua dedicação e talento para fazer o que faz com tanta maestria. Você me ensinou que coisas difíceis podem se tornar as mais fáceis do mundo se tivermos com quem contar. Obrigada por estar sempre disponível, por ser tão atencioso e por me ensinar coisas que vou carregar além do curso da faculdade. Sou muito feliz e grata de poder ter partilhado tantas coisas boas com você. Meu muito obrigada por me fazer crescer, amadurecer e ter responsabilidades. Vou sempre levar seus ensinamentos de ciência e vida comigo. Você é brilhante.

Às minhas amigas, *Isabela Rogério de Paiva*, *Jéssica de Oliveira Barbosa Ribeiro* e *Lais Leal Limieri*,

Meninas, sem você nada disso teria sido possível. Obrigada por terem acreditado em mim quando eu precisei de um estágio, por me indicarem e por confiarem na minha capacidade para fazer parte desse grupo. Por terem me acolhido de braços abertos no laboratório e não medirem esforços em nenhum momento para me ensinar tudo que vocês sabiam com a maior paciência do mundo. Vocês se tornaram irmãs, e eu jamais seria capaz de agradecer com palavras por todas as vezes que ajudaram, que se preocuparam comigo, que me ampararam, seguraram, confiaram e me fizeram crescer. Vocês iluminam todos a sua volta e eu sou eternamente grata por poder ter partilhado tudo isso ao lado de vocês. Obrigada por tudo.

Ao meu irmão de alma, *Vinícius Escórsio Silva*,

por ter compartilhado toda a graduação comigo. Por ter sido minha dupla em praticamente todas as disciplinas e me aturado por tanto tempo. Por estar presente em todos os momentos dessa caminhada de forma ímpar. E incontestável. Sua amizade me tornou uma pessoa melhor, pois sempre me espelhei da sua grandiosa forma de ser. Você se tornou meu irmão e seria impossível de agradecer apenas com palavras. Obrigada pela paciência, por me ouvir, por ser presente e prestativo e por se importar tanto comigo. Vou carregar você comigo por toda vida. Muito obrigada.

À minha amada sala, *Turma Treze,*

por terem feito dessa jornada mais leve e divertida. Conhecer cada um de vocês, me fez crescer e aprender mais. Obrigada por tantas vezes terem sido meus pais e minhas mães durante essa caminhada. Levarei vocês comigo e sentirei muita saudade todos os dias quando me lembrar de tudo que passamos para chegar até aqui. Vocês são especiais.

Aos meus *Amigos,*

Brunno Augusto Souza Valim Silveira; obrigada por caminhar comigo até aqui e estar do meu lado me apoiando em tudo. Você foi fundamental nos meus dias para que eu conseguisse chegar até aqui, sou muito grata por ter conhecido você. *Amanda Passarinho, Nádia Biage Cândido*; obrigada por todos os dias juntas e por tudo que me ensinaram. Vocês tornaram meus dias mais agradáveis e gostosos. Aprendi muito com vocês e quero que nossa amizade perdure para além da faculdade. Obrigada por tudo que fizeram por mim nesse ciclo. *Henrique Rinaldi Matheus, Leonardo Sacchi Bordignon*, vocês se tornaram irmãos para mim e quero agradecê-los por tornarem a minha caminhada mais leve e tranquila. Obrigada!

Agradecimentos

Agradeço à *Faculdade de Odontologia do Campus de Aracatuba* da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Wilson Roberto Poi e Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao *Departamento de Ciências Básicas*, na pessoa do Chefe de Departamento Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti que possibilitou a execução de toda parte experimental do presente trabalho com adendo especial à disciplina de Anatomia.

Ao *Prof. Ass. Dr. Cláudio Aparecido Casatti*, da Disciplina de Histologia e Embriologia, que colaborou intensamente com o desenvolvimento deste projeto, tornando assim possível a realização deste.

Ao *Prof. Ass. Dr. Edison Ervelino*, da Disciplina de Histologia e Embriologia, pela sabedoria e paciência em ajudar na realização desse trabalho. Pelas dúvidas esclarecidas nas reações imuno-histoquímicas e pelas perfusões dos animais. Muito obrigada.

Aos *Animais* desse experimento, meu profundo respeito e agradecimento por tornarem isso possível.

*“A ciência serve para
nos dar uma ideia de quão extensa é
a nossa ignorância”. (Félicité Robert de
Lamennais)*

PIMENTA, T **Quantificação estereológica de neurônios reativos às proteínas ligantes de cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina no córtex pré-frontal de ratos submetidos a anóxia neonatal. 2016.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

Hipóxia ou anóxia neonatais (HN e AN respectivamente) são situações em que o teor de oxigênio no organismo -por diferentes motivos- diminui (chegando a níveis não detectáveis na anóxia), representando um grave problema de saúde pública devido a sua elevada incidência.

Estudos epidemiológicos indicam também que a hipóxia/anóxia ocorridas durante o parto podem representar fatores de risco para o surgimento tardio de condições psiquiátricas, como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), autismo e fundamentalmente, esquizofrenia; condições psiquiátricas onde o córtex pré-frontal (CPF) desempenha um papel fundamental.

Assim, este estudo visou estabelecer se as alterações estruturais encontradas no CPF de pacientes com essas condições podem ser reproduzidas em modelos experimentais de AN.

Para isto, em modelo de AN em ratos, quantificamos mediante análise estereológica sem viés a população neuronal sintetizadora de proteínas ligantes do cálcio, evidenciada por técnicas imuno-histoquímicas para parvalbumina (Pv), calbindina (Cb) e calretinina (Cr) que, representando mais de 90% dos neurônios gabaérgicos do córtex cerebral, nos permitem analisar indiretamente eventuais modificações na distribuição desse neurotransmissor.

Nossos resultados indicam que a anóxia neonatal diminuiu de forma muito significativa o número de neurônios Pv+ no CPF nos animais anoxiados de 21 dias (P21), com uma normalização estatística na idade de 60 dias (P60). Já o número de neurônios imunopositivos para calretinina e calbindina não alterou significativamente neste modelo experimental.

Palavras-chave: Anóxia, Córtex pré-frontal, Proteínas ligantes de cálcio, Parvalbumina, Calretinina, Calbindina, Estereologia.

PIMENTA, T **Stereological quantification of calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactive neurons in the prefrontal cortex of rats submitted to neonatal anoxia. 2016.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – 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 concern. 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 fundamental role, as the Deficit Disorder Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD), autism, and schizophrenia. This study aims to establish if the structural changes observed 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 unbiased stereological techniques, we analyzed cellular populations of the PFC commonly affected in these situations. This analysis included the quantification of the Calcium Binding Proteins calbindin, calretinin and parvalbumin. Our results indicate a significant decrease in the parvalbumin positive neurons at P21 in anoxic animals, with subsequent statistical normalization at P60. Calbindin and calretinin populations showed no significant differences between anoxic and control animals.

Keywords: Anoxia. Prefrontal cortex. NeuN. Schizophrenia. S100B. Calcium Binding Proteins. Stereology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sistema utilizado para provocar anóxia em ratos neonatos.

FIGURA 2 – Delimitação aproximada da área de interesse (ROI) utilizada nesse estudo.

FIGURA 3 – Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P21, submetidos a técnica imuno-histoquímica para evidênciação de NeuN.

FIGURA 4 – Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P60, com técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de calbindina (Cb).

FIGURA 5 – Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P21, com técnica imuno-histoquímica para evidênciação de calretinina (Cr).

FIGURA 6 – Fotomicrografias de corte de encéfalo de ratos controle do grupo P60, com técnica imuno-histoquímica para evidênciação de parvalbumina (Pv).

FIGURA 7 - Imagem em pequeno aumento do CPF de um rato controle do grupo P14.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -- Número de neurônios NeuN+ de ratos controle e anoxiados

TABELA 2 -- Número de neurônios Cb+ de ratos controle e anoxiados.

TABELA 3 -- Número de neurônios Cr+ de ratos controle e anoxiados.

TABELA 4 -- Número de neurônios Pv+ de ratos controle e anoxiados.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Representação dos dados relativos ao número de neurônios NeuN+ nos diversos períodos experimentais.

GRÁFICO 2 – Número de neurônios Cb+ de ratos controle e anoxiados.

GRÁFICO 3 -- Número de neurônios Cr+ de ratos controle e anoxiados.

GRÁFICO 4 -- Número de neurônios Pv+ de ratos controle e anoxiados.

LISTA DE ABREVIATURAS

HN – Hipóxia neonatal

AN – Anóxia neonatal

TDAH - Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade

CPF – Córtex Pré-Frontal

PLCs – Proteínas Ligantes de Cálcio

Pv – Parvalbumina

Cb – Calbindina

Cr – Calretinina

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CEEA – Comissão de Ética de Experimentação Animal

P(X) – Dias pós-natais

ROI – Região de Interesse

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
3 METODOLOGIA	22
3.1 Animais	22
3.2 Modelo de AN	22
3.3 Delimitação do CPF	26
3.4 Análise microscópica e técnicas de contagem	28
4 RESULTADOS	30
4.1 NeuN	30
4.1.1 Aspectos morfológicos	30
4.1.2 Aspectos quantitativos	31
4.2 Calbindina	32
4.2.1 Aspectos morfológicos	32
4.2.2 Aspectos quantitativos	32
4.3 Calretinina	34
4.3.1 Aspectos morfológicos	34
4.3.2 Aspectos quantitativos	34
4.4 Parvalbumina	36
4.4.1 Aspectos morfológicos	36
4.4.2 Aspectos quantitativos	36
4.5 Considerações técnicas	38
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	54

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Hipóxia neonatal (HN) representa um evento onde o sangue circulante do neonato tem seu nível de oxigênio diminuído. Já na anóxia neonatal (AN), o teor de oxigênio no organismo é praticamente nulo, sendo difícil, entretanto delimitar quando a hipóxia alcança limites de anóxia. Segundo Vanucci et al., 1999; Suguihara and Lessa, 2005; Kurinczuk et al., 2010; de dois a quatro ocorrências de quadros de hipóxia são descritos para cada 1000 nascimentos a termo, sendo observada também em até 60% dos nascimentos prematuros, o que transforma a HN numa situação de saúde pública preocupante.

Para resguardar a integridade do tecido nervoso durante essas situações, o organismo do neonato utiliza mecanismos destinados a diminuir a possibilidade de isquemia cerebral, incluindo aqui a vasodilatação de artérias que irrigam o cérebro (Morrison, 2008). De fato, Shankaran e cols. (1991) demonstraram que a função cerebral permaneceu basicamente preservada em uma grande quantidade de casos onde foi verificada HN, mesmo sendo observado comprometimento de outros sistemas orgânicos.

De acordo com os dados existentes na literatura, é possível constatar que esquizofrenia, Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), autismo e déficits no aprendizado e memória espacial podem ser desenvolvidos tardiamente como consequência de eventos hipóxicos durante o parto, sendo este assim fator de risco, mesmo com a já mencionada resposta protetora do organismo fetal. (Hartsough e Lambert, 1985; Norman e Malla, 1993; Verdoux e Bourgeois, 1993; Gunther-Genta e cols., 1994; Buwalda et al., 1995; Milberger e cols., 1997; McNeil e cols., 2000; Cannon e cols., 2002; Caputa et al., 2005; Rogalska et al., 2006; Leuner et al., 2006; Winocur et al., 2006).

Infelizmente, apesar das graves implicações dos quadros de HN ou AN, ainda não conhecemos os mecanismos exatos mediante os quais estes eventos provocam dano tecidual.

Estudos clínicos e experimentais indicam um 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 e cols., 2001; Grojean e cols., 2003; Liu e cols., 2004; Takada e cols., 2015).

Alterações nos padrões arquitetônicos normais do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo, e alterações nos circuitos relacionados com os neurotransmissores dopamina, noradrenalina e glutamato estão inclusas entre as sequelas estruturais relacionadas com o desenvolvimento neural (Bjelke e cols., 1991; El-Khodir e Boksa, 1997; Brake e cols., 1997, 2000; El-Khodir e cols., 2004). Estas alterações foram também descritas por alguns pesquisadores em material proveniente de pacientes com distúrbios como esquizofrenia e TDAH (Cannon e cols., 1999).

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 e cols., 1999, 2000; Rosso e cols., 2000; Zornberg e cols., 2000; Dalman e cols., 2001; Kotlicka-Antczak M. e cols., 2001).

A utilização de modelos experimentais de HN e AN, mesmo estando longe de reproduzir os distúrbios cognitivos observados em pacientes esquizofrênicos, é necessária para confirmar se algumas das alterações estruturais e comportamentais nestes observadas podem ser também verificadas em animais submetidos a insultos anóxicos experimentais.

Recentemente, foi constatado que estruturas límbicas como o córtex pré-frontal (CPF) podem apresentar alterações estruturais em modelos de AN (Juarez e cols., 2008).

Todos estes dados reforçam a ideia 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 sobre as consequências da privação de oxigênio no cérebro adquire, acreditamos que seja pertinente analisar alguns parâmetros estruturais do CPF em modelos experimentais.

Assim, nós iniciamos este estudo tentando responder se algumas das alterações estruturais observadas em pacientes esquizofrênicos podem ser também encontradas em modelos experimentais de AN. Entre estas alterações, estudos post-mortem em humanos indicam que o sistema gabaérgico – o principal sistema inibitório do córtex cerebral- é afetado em condições psiquiátricas como a esquizofrenia, seja pela redução na densidade celular dos neurônios gabaérgicos, das estruturas sinápticas, ou das proteínas sintetizadas (para revisão, ver Lewis

2010). Por outra parte, este sistema também é afetado em modelos de HN (Gerstein e cols, 2005).

Os neurônios afetados incluem subgrupos neuronais que expressam também proteínas ligantes de cálcio (PLCs) como a parvalbumina (Pv), calbindina (Cb) e calretinina (Cr). Coletivamente, as PLCs correspondem a mais de 90% de todos os neurônios gabaérgicos do córtex cerebral, motivo pelo qual sua análise serve para avaliar eventuais alterações da transmissão gabaérgica nesta região (Eyles e cols., 2002).

As diversas PLCs são expressas fundamentalmente em tipos específicos de interneurônios corticais. Pv é observada em neurônios tipo candelabro e neurônios em cesto; Cb fundamentalmente em neurônios *double-bouquet*, e Cr em neurônios bipolares e *bitufted* (Lund e Lewis, 1993; Conde e cols., 1994; Lewis, 1998). Cada tipo neuronal apresenta uma arborização dendrítica que permite contatos sinápticos específicos com os neurônios de projeção cortical.

Alguns estudos indicam alterações na contagem de neurônios que expressam PLCs em indivíduos esquizofrênicos, mas os resultados não são unânimes (Daviss e Lewis, 1995; Beasley e Reynolds, 1997; Kalus e cols., 1997; Woo e cols., 1997; Danos e cols., 1998; Woo e cols., 1998; Iritani e cols., 1999; Reynolds e Beasley, 2001). Geralmente esses estudos não utilizam técnicas estereológicas, mas apenas contagens bidimensionais de perfis neuronais. Raramente é incluída uma contagem do número total de neurônios na região analisada, de forma que fica difícil determinar se a diminuição ou aumento no número de determinada população é real ou reflete uma alteração da população geral, ou mesmo alterações de densidade celular provocadas artificialmente pela contração dos tecidos durante o preparo histológico.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Usando modelo de anóxia neonatal desenvolvido e padronizado pelo nosso grupo e utilizando métodos estereológicos sem viés, quantificar as populações neuronais sintetizadoras das proteínas ligantes do cálcio calbindina, calretinina e parvalbumina do CPF de ratos controle e submetidos a insulto anóxico, mediante a contagem de neurônios evidenciados por técnicas imuno-histoquímicas.

Metodologia

3. METODOLOGIA

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

3.1 Animais

Foram utilizados 36 filhotes machos originados 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 *ad libitum*. 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).

Com aproximadamente 30 horas de vida (segundo dia pós-natal - P2) e pesando entre 6 e 8 g realizamos o insulto anóxico (ver abaixo) em 18 desses filhotes. Os animais (anoxiados e controle) foram posteriormente 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 neuronal (WINICK e NOBLE, 1966) e alterações descritas em parâmetros estruturais neste modelo experimental (Juarez e cols, 2008).

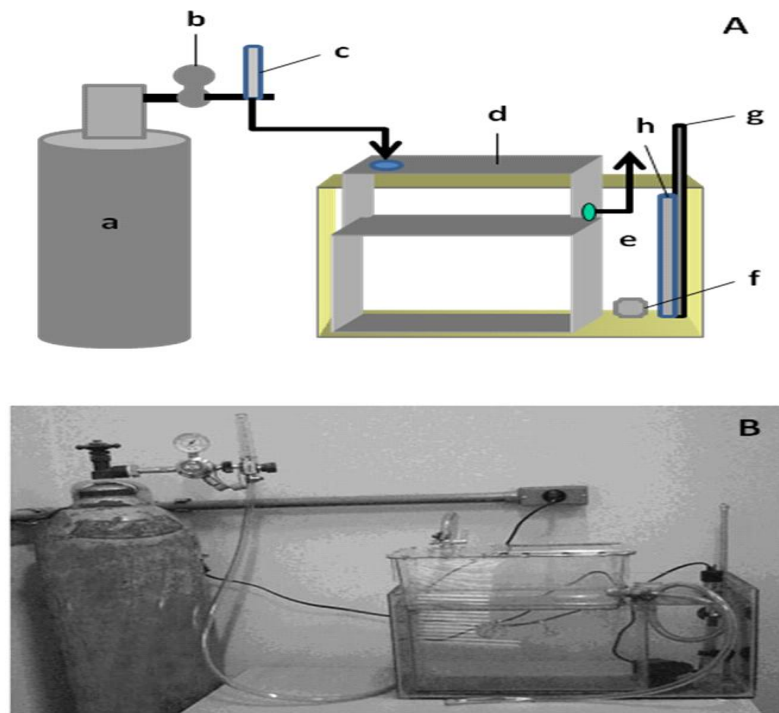
Cada grupo foi subdividido nos subgrupos Anóxia (n=6) e Controle (n=6).

3.2 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 policarbonato ($31,0 \times 14,0 \times 19,5\text{ cm}$), 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 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 e cols., 2005; Rogalska e cols., 2006).

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.

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 realização do insulto anóxico, 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 e Nakazawa, 2005; Rogalska e cols., 2006; Coq e cols., 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 e cols., 1995). Testes prévios realizados neste laboratório 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 e cols., 1991; Iuvone e cols., 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).

Os animais dos grupos Controle foram expostos 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 animais 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° (1ml/g de peso corporal aproximadamente).
- c)

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 cortados em micrótomo de congelação, com espessura de corte de 50 µm.

Os cortes foram recolhidos em recipientes contendo solução anti-freeze e separadas seis séries, resultando em distâncias de 300 μ m entre cortes de uma mesma série, com as seguintes finalidades:

- 1) Técnica imuno-histoquímica para calbindina.
- 2) Técnica imuno-histoquímica para NeuN.
- 3) Técnica imuno-histoquímica para parvalbumina.
- 4) Técnica imuno-histoquímica para s100B.
- 5) Técnica imuno-histoquímica para reelina.
- 6) Técnica imuno-histoquímica para calretinina.

Para a realização das técnicas imuno-histoquímicas (as técnicas e resultados para S100B e reelina não serão descritas neste TCC) 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 Calretinin 6B3 (camundongo), 1:5000, Swant; monoclonal anti Calbindin D-28k (camundongo), 1:5000, Swant; monoclonal anti parvalbumin PV 235 (camundongo), 1:5000, Swant) diluído em TBS-TX e sob suave agitação a 4 ° C.

Os cortes foram posteriormente lavados com TBS-TX, durante 30 minutos e incubados durante 2 horas com os respectivos anticorpos secundários biotinilados (1:200, Vector Laboratories). Posteriormente, após nova série de lavagens (3 x 10 minutos com TBS-TX), os cortes foram incubados com complexo avidina-biotina-peroxidase (kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories; diluição 1: 100 em TBS-TX) à temperatura ambiente durante 90 minutos. Os locais antigênicos foram visualizadas utilizando como cromógenos tetracloridrato de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, EUA) 0,02-0,05% e sulfato de amônio níquel a 0,1% ou VIP (Vector Laboratories). Os cortes foram posteriormente montados em lâminas

gelatinizadas, desidratados em série crescente de álcoois, desengordurados com xilol, e cobertos com lamínula utilizando DPX como meio de montagem.

Todas as baterias de imuno-histoquímicas para uma mesma técnica (incluindo os seis animais controle e os seis anoxiados 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, revelação, etc. Em virtude disto, como os animais dos grupos de P14, P21 e P60 não foram processados simultaneamente, optamos por não realizar comparações longitudinais.

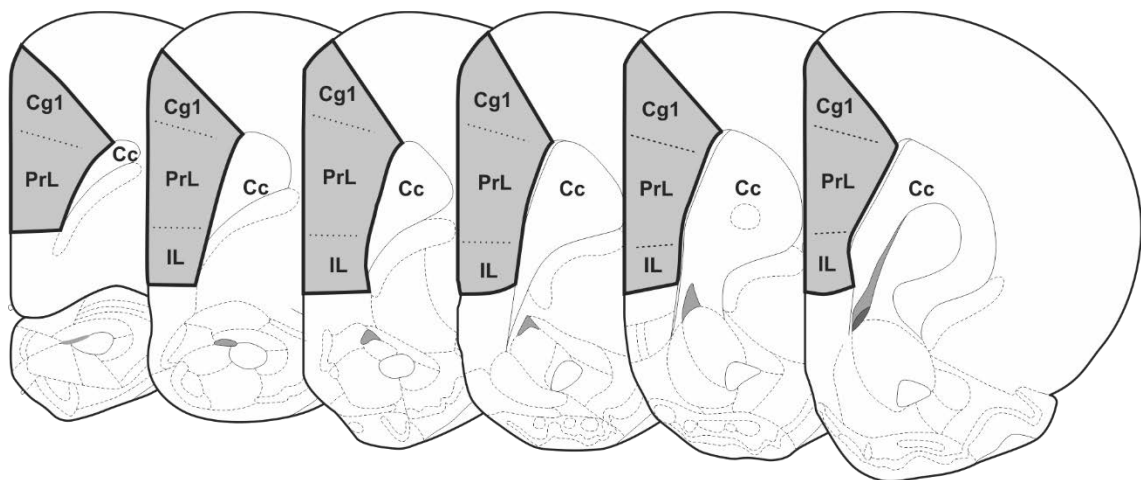
3.3 Delimitação do CPF

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 (córtex pré-límbico), IL (córtex infralímbico) e Cg1 (córtex cingular, área 1). PrL e IL não ultrapassam no sentido posterior a decussação do do corpo caloso, já Cg1 e a mais ventral Cg2 (córtex cingular, área 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, ACAAd (área cingular anterior, parte dorsal) e MOs (área motora secundária). Além das diferentes nomenclaturas (apenas IL - ILA e PrL - PL apresentam nomenclatura similar), os limites entre as áreas diferem (Uylings e cols., 2003). Já outros autores (Krettek e Price, 1977; Perez-Cruz e cols., 2007) mantem as áreas PL e IL e acrescentam dorsalmente a área ACx (córtex cingular anterior 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 e cols. (2007), que limitam o CPF do rato às áreas PL, IL, e ACx.

FIGURA 2 – Delimitação aproximada da área de interesse (ROI) utilizada nesse estudo.



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.

3.4 Análise microscópica e técnicas de contagem

Lâminas contendo os cortes histológicos reagidos foram analisadas em microscopia de campo claro utilizando 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 quantificação estereológica foi utilizado o método do fracionador óptico (West e cols., 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 disector 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:

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

Onde:

N = número total de células

$\sum Q$ = 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.

Resultados

4.1 NeuN (dados e figuras já apresentados em TCC anterior (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.) incluídos aqui a título de referência sobre o número total de neurônios.

4.1.1 Aspectos morfológicos

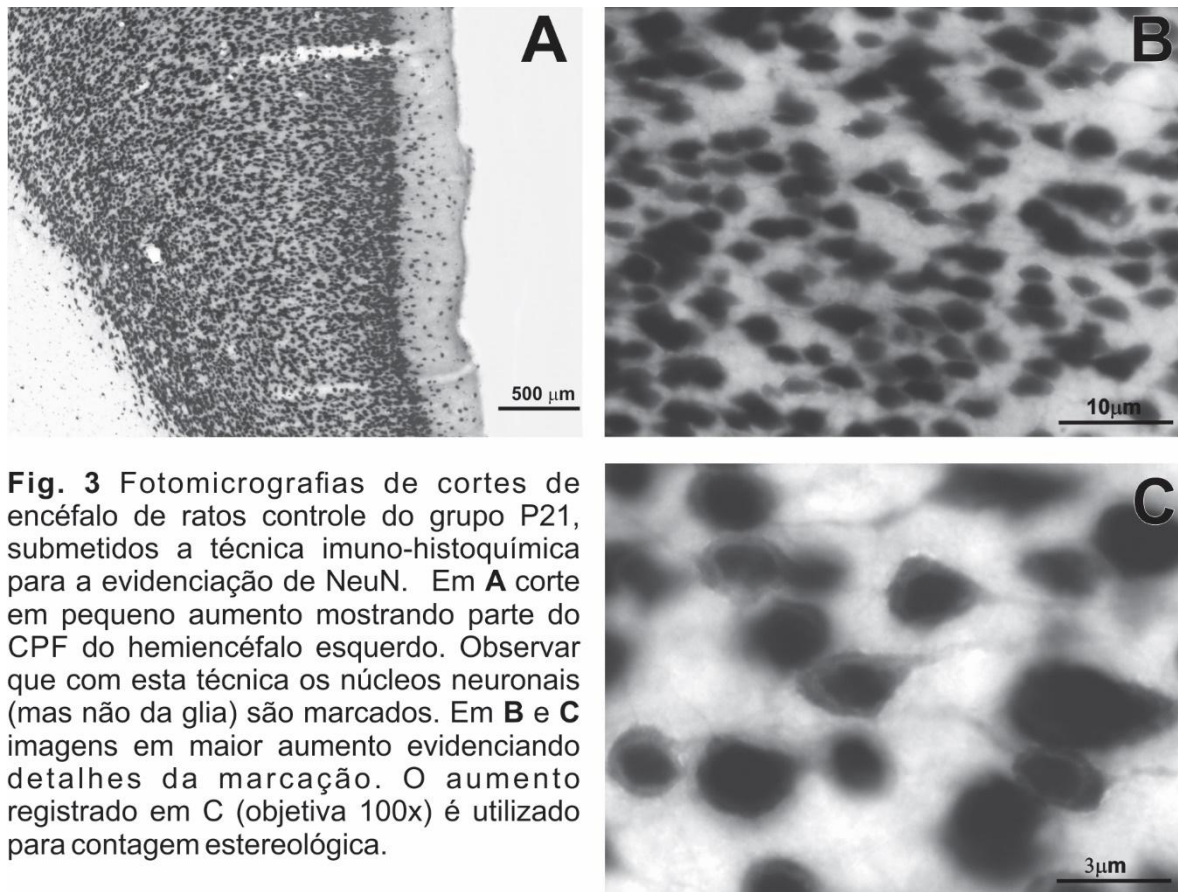


Fig. 3 Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P21, submetidos a técnica imuno-histoquímica para a evidênciação de NeuN. Em **A** corte em pequeno aumento mostrando parte do CPF do hemiencéfalo esquerdo. Observar que com esta técnica os núcleos neuronais (mas não da glia) são marcados. Em **B** e **C** imagens em maior aumento evidenciando detalhes da marcação. O aumento registrado em C (objetiva 100x) é utilizado para contagem estereológica.

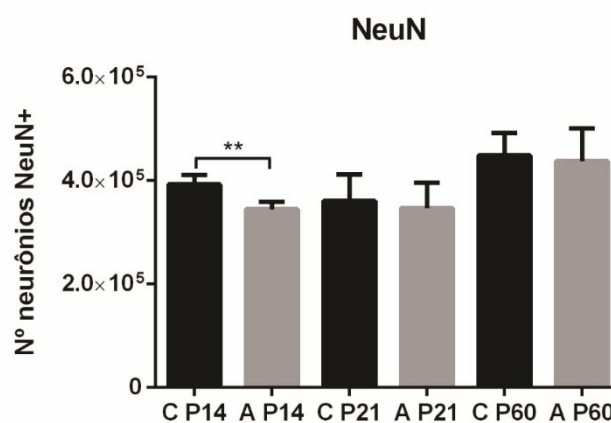
4.1.2 Aspectos quantitativos

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 1 -- 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 ± Desvio padrão	344500 ± 14160	392900 ± 17830	346872 ± 48924	360669 ± 51510	437655 ± 63345	448933 ± 43030

GRÁFICO 1 – Representação dos dados relativos ao número de neurônios NeuN+ nos diversos períodos experimentais.



Foram observadas diferenças muito significativas na idade P14 (**, $p < 0,01$). (C, grupo controle; A, grupo anóxia).

4.2 Calbindina

4.2.1 Aspectos morfológicos

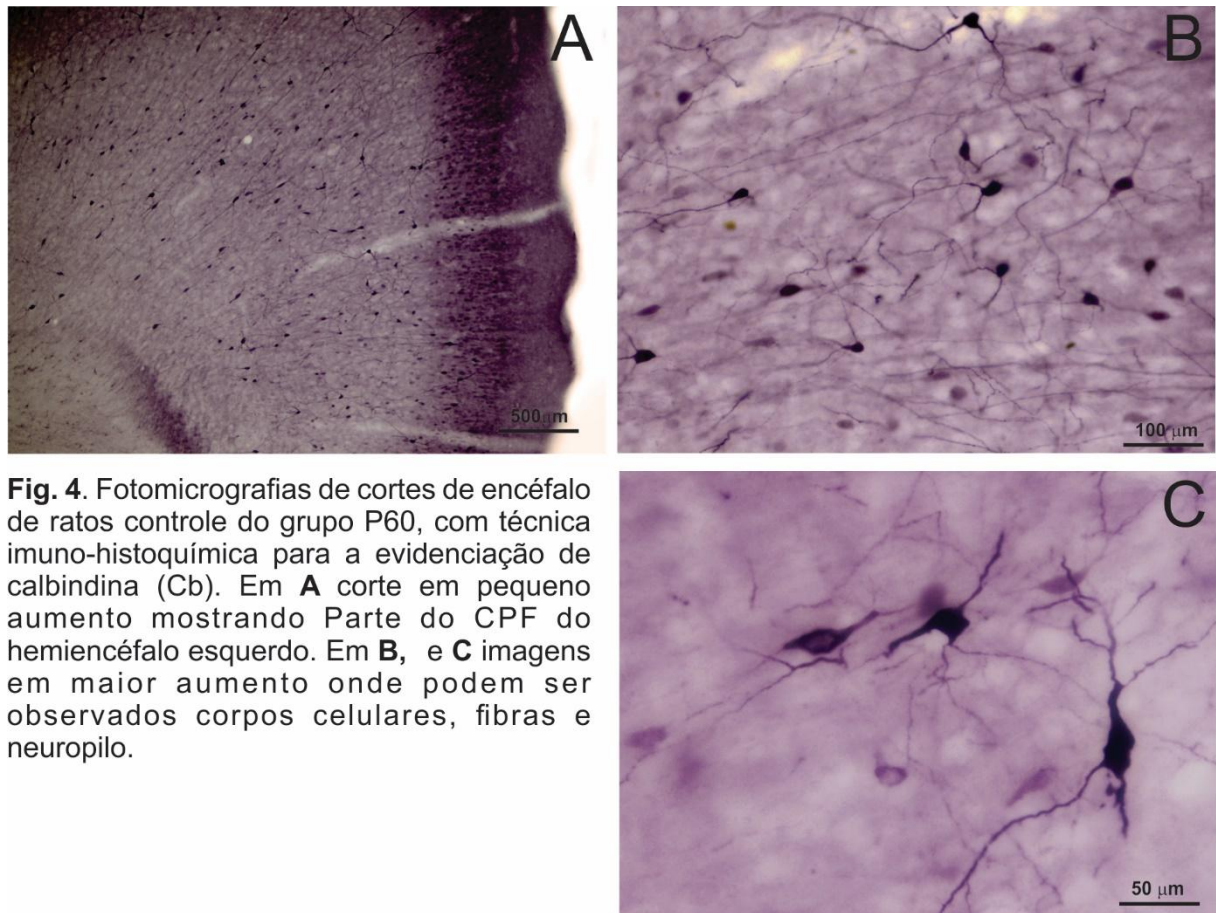


Fig. 4. Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P60, com técnica imuno-histoquímica para a evidência de calbindina (Cb). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando Parte do CPF do hemiencéfalo esquerdo. Em **B**, e **C** imagens em maior aumento onde podem ser observados corpos celulares, fibras e neuropilo.

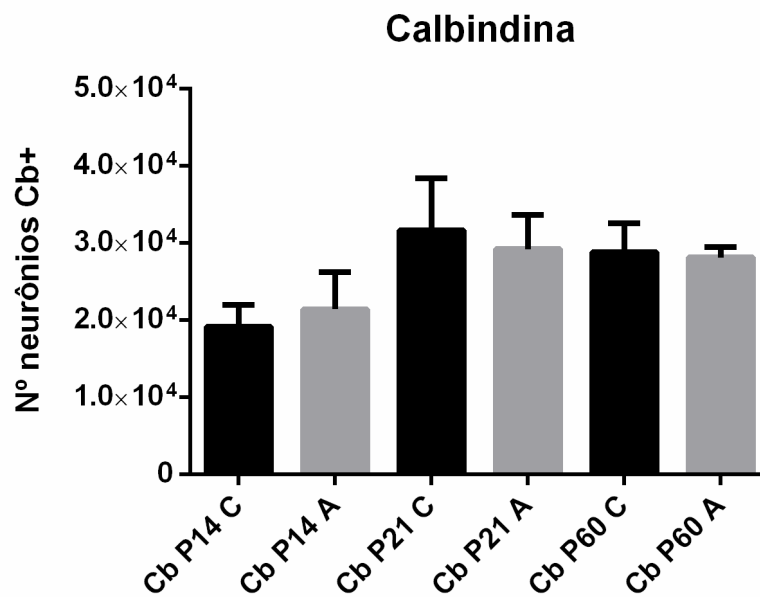
4.2.2 Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a anóxia neonatal não alterou significativamente o número de neurônios Cb+ no córtex pré-frontal medial em nenhum dos períodos experimentais, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados.

TABELA 2 -- Número de neurônios Cb+ de ratos controle e anoxiados.

	P14 A	P14 C	P21 A	P21 C	P60 A	P60 C
Animal 1	26333,	19313,	32511,	43348,	27458,	26599,
Animal 2	25371,		30260,	27186,	30009,	27013,
Animal 3	19683,	18981,	33907,	28109,	26349,	34679,
Animal 4	14439,	14586,			28432,	23951,
Animal 5	21173,	21283,	25995,	31408,		29103,
Animal 6		21573,	23303,	28070,	28311,	31268,
Média ±	21400	19147	29195	31624	28112	28769
Desvio	±	±	±	±	±	±
padrão	4784	2798	4452	6749	1349	3802

GRÁFICO 2 - Número de neurônios Cb+ de ratos controle e anoxiados.



4.3 Calretinina

4.3.1 Aspectos morfológicos

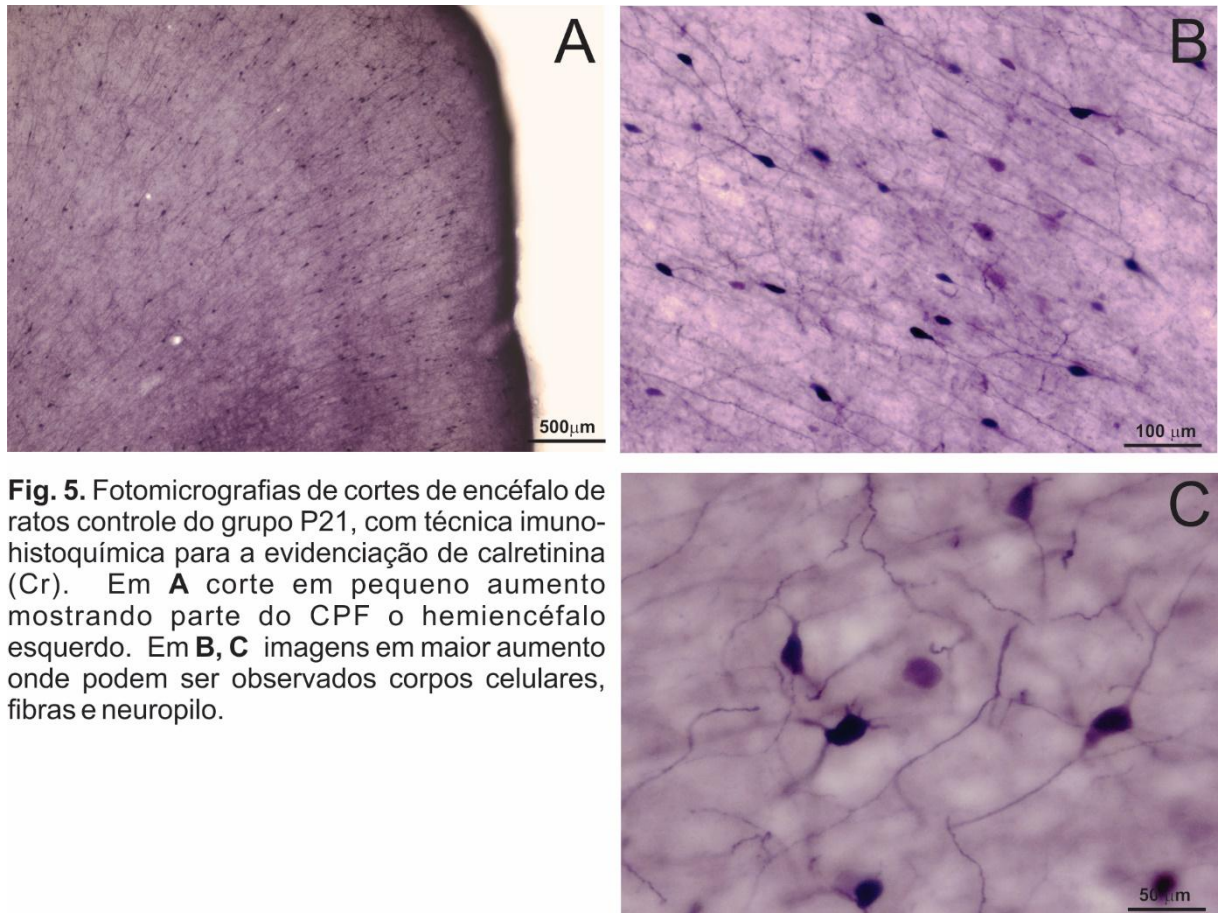


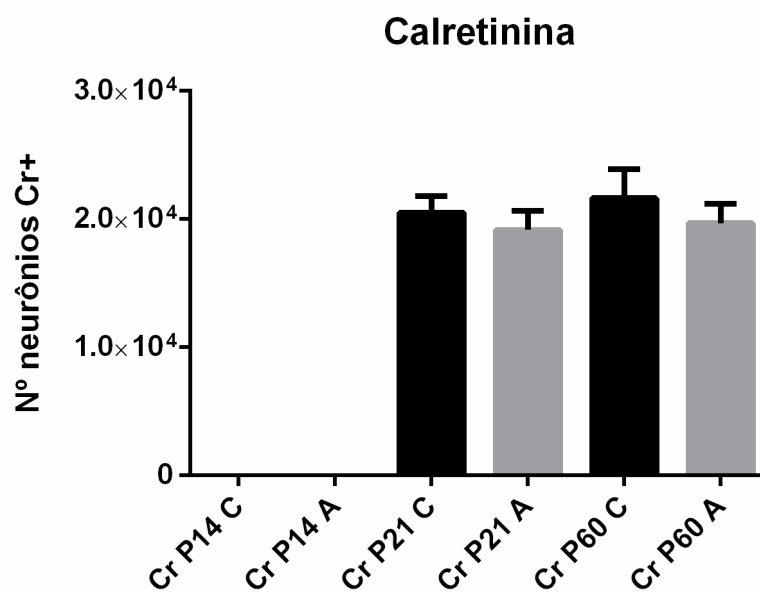
Fig. 5. Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P21, com técnica imuno-histoquímica para a evidência de calretinina (Cr). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando parte do CPF o hemiencéfalo esquerdo. Em **B, C** imagens em maior aumento onde podem ser observados corpos celulares, fibras e neuropilo.

4.3.2 Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a anóxia não alterou significativamente o número de neurônios Cr+ no córtex pré-frontal medial nos grupos de 21 e 60 dias, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados.

TABELA 3 -- Número de neurônios Cr+ de ratos controle e anoxiados.

	P14 A	P14 C	P21 A	P21 C	P60 A	P60 C
Animal 1			16667,	21507,	20953,	23512,
Animal 2			19179,	22069,	18996,	18122,
Animal 3			19724,	18369,	19855,	24518,
Animal 4			19574,	20620,	21170,	21309,
Animal 5				20688,	17024,	21839,
Animal 6			20612,	19879,	20065,	20460,
Média ±			19151	20522	19677	21627
Desvio			±	±	±	±
padrão			1484	1300	1519	2267

GRÁFICO 3 -- Número de neurônios Cr+ de ratos controle e anoxiados.

Na idade P14 não foi observada imunomarcacão consistente no CPF que nos permitisse realizar uma contagem estereológica dentro de margens de erro aceitáveis.

4.4 Parvalbumina

4.4.1 Aspectos morfológicos

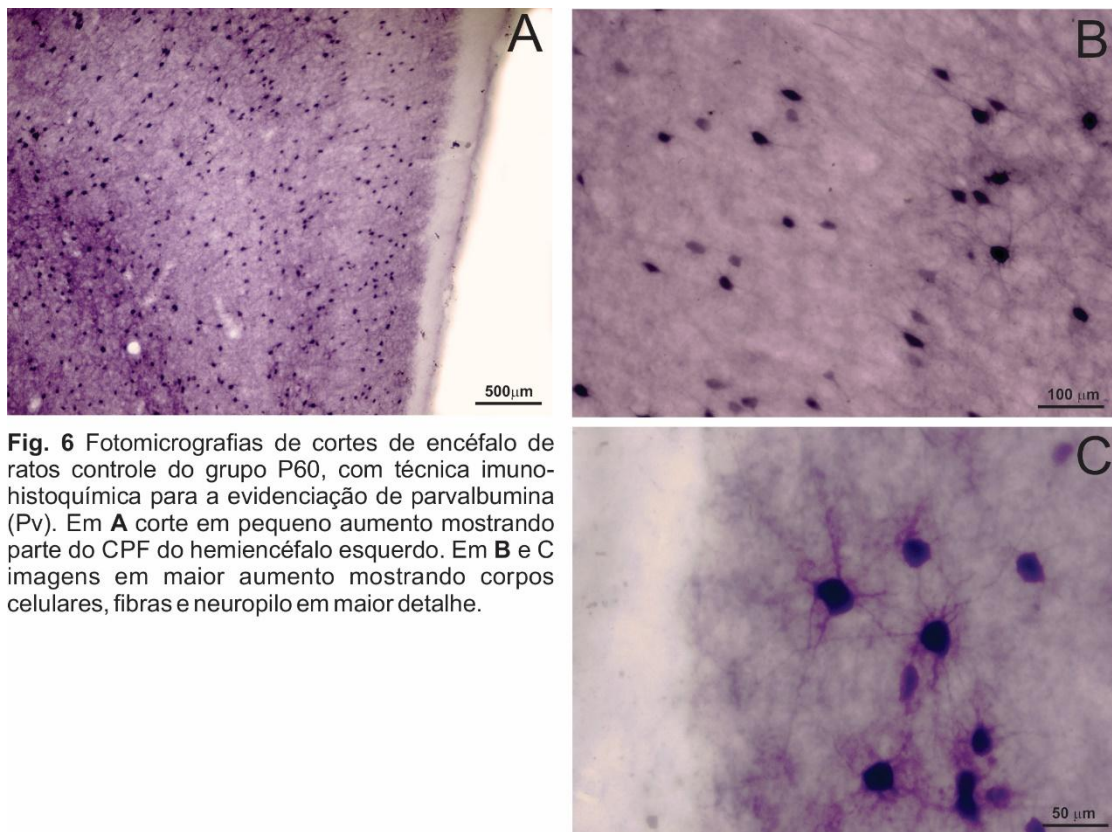


Fig. 6 Fotomicrografias de cortes de encéfalo de ratos controle do grupo P60, com técnica imuno-histoquímica para a evidenciación de parvalbumina (Pv). Em **A** corte em pequeno aumento mostrando parte do CPF do hemiencéfalo esquerdo. Em **B** e **C** imagens em maior aumento mostrando corpos celulares, fibras e neuropilo em maior detalhe.

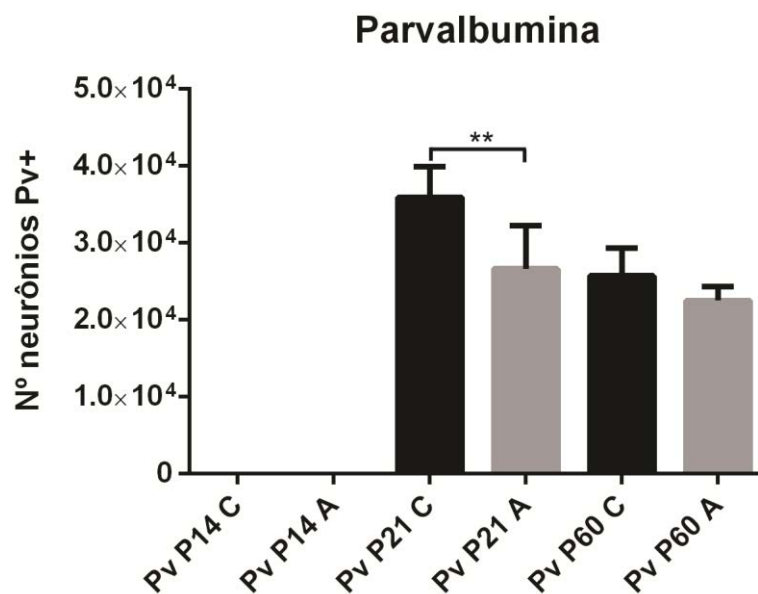
4.4.2 Aspectos quantitativos

Nossos resultados mostram que a anóxia neonatal diminuiu de forma muito significativa o número de neurônios Pv+ no córtex pré-frontal no grupo de 21 dias, com uma normalização na idade P60, conforme pode ser observado nos dados estatísticos abaixo apresentados.

Tabela 4 -- Número de neurônios Pv+ de ratos controle e anoxiados.

	P14 A	P14 C	P21 A	P21 C	P60 A	P60 C
Animal 1			25900,	37852,	19909,	29613,
Animal 2			28158,	36128,	23159,	29396,
Animal 3			31743,	28574,	25052,	23119,
Animal 4			16963,	36792,	23225,	20889,
Animal 5			32164,	40404,	20981,	24188,
Animal 6			24846,	35917,	22887,	27212,
Média ± Desvio padrão			26629 ± 5591	35945 ± 3965	22536 ± 1824	25736 ± 3559

GRÁFICO 4 – Número de neurônios Pv+ de ratos controle e anoxiados.



Na idade P14 não foi observada imunomarcacão consistente no CPF (ver figura abaixo).

FIGURA 7 -- Imagem em pequeno aumento do CPF de um rato controle do grupo P14.

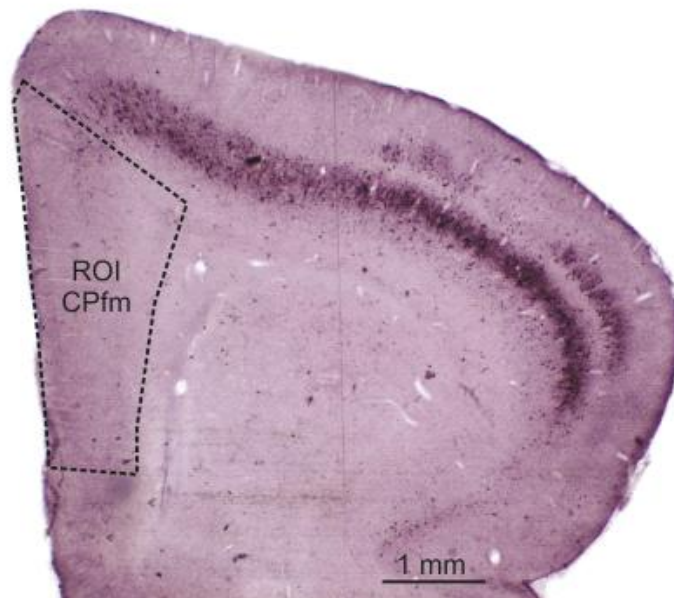


Fig. 7 Observar como na parede medial do hemisfério, correspondente à ROI, não há imunomarcacão para Pv. Comparar com a superfície dorsal.

4.5 Considerações técnicas

Pelo que foi apurado na literatura, nosso estudo é o primeiro a analisar estereologicamente eventuais alterações estruturais no CPF de roedores, utilizando o modelo de insulto anóxico recentemente desenvolvido por Takada e cols. (2011).

A opção pelo método estereológico torna os resultados quantitativos mais seguros já que de fato estamos contando células em uma estrutura tridimensional, e não perfis celulares em cortes bidimensionais. A eficiência do sistema do fracionador óptico tem sido amplamente reconhecida e tornou-se um método praticamente obrigatório para este tipo de estudo (West e cols., 1991).

Cada bateria imuno-histoquímica incluiu cortes de 12 animais (seis anoxiados e seis controles) de cada grupo etário, que foram reagidos simultaneamente, usando as mesmas soluções e tempos de lavagem e incubação.

Ainda, nossa contagem pode ter sido influenciada pelo limite visual que estabelecemos à imunorreatividade observada nas células. Em alguns casos, isto se torna bastante problemático mesmo tomando todos as precauções para diminuir o background nas reações imuno-histoquímicas. De forma geral, o limite entre o que considerávamos marcação ou fundo foi determinado *a priori* e depois estabelecido como “nota de corte” para as demais preparações. Esta é uma limitação que sempre ocorre quando temos que aliar contagem estereológica de populações celulares evidenciadas imuno-histoquicamente. Claro que os mesmos “critérios de corte” foram tomados tanto para animais controle quanto os anoxiados.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Analisando nossos resultados observamos que o insulto anóxico neonatal não alterou o número de neurônios reativos a Cr (tabela e gráfico 3) e Cb (tabela e gráfico 2), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais controle e anoxiados em nenhum dos períodos experimentais estudados

Já os animais do grupo anóxia apresentaram um número menor de neurônios reativos para Pv em P21, com normalização em P60.

A alteração numérica observada na população neuronal Pv+ parece ser relevante em virtude da ação moduladora que esse tipo celular exerce no córtex cerebral, e pelo fato de alterações semelhantes terem sido descritas também em doenças psiquiátricas como a esquizofrenia (Daviss e Lewis, 1995; Beasley e Reynolds, 1997; Kalus e cols., 1997; Woo e cols., 1997; Danos e cols., 1998; Woo e cols., 1998; Iritani e cols., 1999; Reynolds e Beasley, 2001).

Entre outras, a importância de analisar esta população neuronal radica no fato de, indiretamente, nos dar uma ideia do estado do sistema gabaérgico. No córtex cerebral, boa parte destes neurônios Pv+ está representada pelos neurônios em candelabro, os quais pela sua morfologia têm a capacidade de inibir o output de um grande número de neurônios corticais piramidais. A síntese desta proteína ligante de cálcio é sob demanda funcional, no caso, a ação inibitória dos neurônios gabaérgicos. Assim, sua diminuição pode estar relacionada a uma menor atividade do sistema gabaérgico, seja por falha deste ou por uma diminuição na atividade excitatória dos neurônios piramidais que os interneurônios Pv+ fisiologicamente inibem.

Se bem não foi possível fazer esta análise em P14 devido ao fato de nesta idade a população neuronal Pv+ ainda não estar plenamente desenvolvida no CPF, observamos uma diminuição acentuada desta população em P21 (tabela e gráfico 4). Isto pode significar que, pelo menos neste período experimental a diminuição de reatividade para Pv parece não estar relacionada com uma alteração no número de neurônios, já que o número total de neurônios revelado pela técnica imuno-histoquímica para NeuN não está alterado em P21; (tabela e gráfico 1) e sim com sua atividade sintetizadora. Em outras palavras, é provável que o número de

neurônios sintetizadores de Pv não esteja afetado mas a quantidade de Pv sintetizada seja muito pequena para ser detectada pelo método imuno-histoquímico (figura 7).

Nossos resultados coincidem com os obtidos por Komitova e colaboradores (2013), que observaram em um modelo de anóxia neonatal semelhante ao nosso (embora com insultos anóxicos repetidos entre P3 e P11) que o número de neurônios imunorreativos para Pv no córtex cerebral (algumas áreas do CPF foram excluídas desse estudo) era 59% menor em relação aos animais controle em P15, caindo essa diferença para 32 e 39% em P35 e P47 respectivamente. Os autores também notaram que a diminuição no número de interneurônios Pv+ não estava relacionada com uma diminuição no número total de interneurônios (evidenciados mediante a técnica de EGFP, enhanced green fluorescent protein), e sim por uma diminuição na síntese dessa proteína, com uma redução paralela do conteúdo gabaérgico no córtex cerebral.

Estudo de Dell'Anna e cols. (1996) analisando a expressão de Gaba e proteínas ligantes de cálcio no hipocampo, em modelo de anóxia neonatal semelhante ao nosso, mostrou resultados compatíveis com os do presente estudo. A população de neurônios Pv+ nos animais controle em P7 foi muito pequena, aumentando em P21, P30 e P60, o que comprova também no hipocampo a ontogênese tardia desta população celular. Nos animais anoxiados, o número de neurônios Pv+ foi significativamente menor em relação aos animais controle em P7 e P21, e sem alterações significantes estatisticamente em P30 e P60.

Mesmo havendo uma normalização estatística como a observada em nosso estudo em P60, não pode ser excluída a possibilidade de a falta desta proteína -e sua implicação sobre o sistema gabaérgico- 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 e cols. (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.

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 e Barone, 2000).

Estas alterações morfológicas e/ou funcionais a posteriori 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 e 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 e Barone, 2000).

Outra questão a ser abordada futuramente é como se processa a recuperação numérica que observamos entre P21 e P60 na população neuronal afetada. Em relação à Pv+, é provável que a capacidade de síntese desta proteína corra em paralelo com a atividade gabaérgica. Como esta também parece estar afetada, sua normalização em períodos posteriores poderia ser acompanhada pela normalização da população de Pv.

Como deve ocorrer nos trabalhos científicos, estes respondem algumas questões e geram novas e melhores perguntas. Quais os mecanismos que levaram às alterações numéricas agora observadas? Estas alterações estão acompanhadas por alterações comportamentais? Nosso modelo de anóxia neonatal altera também a

estrutura celular em termos de tamanho da sua árvore dendrítica e número de espinhas sinápticas? Estudos em andamento em nossos laboratórios já estão tentando elucidar estas novas questões.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

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

- a) Foi observada uma diminuição significativa no número de neurônios imunorreativos para parvalbumina no CPF no grupo de animais anoxiados de 21 dias, com uma normalização estatística em P60.
- b) A anóxia neonatal não alterou significativamente o número de neurônios imunorreativos para calbindina e calretinina no CPF em nenhum dos períodos experimentais estudados.

REFERÊNCIAS

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.

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.

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

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.

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

MILBERGER S, BIEDERMAN J, FARAONE SV, GUITE 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.

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

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

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

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.

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

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

LEWIS DA. The chandelier neuron in schizophrenia. **Dev Neurobiol.** V71 p.27—118, 2011.

GERSTEIN M, HULEIHEL M, MANE R, STILMAN M, KASHTUZKI I, HALLAK M, GOLAN H. Remodeling of hippocampal gabaergic system in adult offspring after maternal hypoxia and magnesium sulfate load: immunohistochemical study. **Exp Neurol.**, v. 196, p. 18-29, 2005.

EYLES DW, MCGRATH JJ, REYNOLDS GP. Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. **Schizophr Res.**, v. 57, p. 27-34, 2002.

LUND JS, LEWIS DA. Local circuit neurons of developing and mature macaque prefrontal cortex: golgi and immunocytochemical characteristics. **J. Comp. Neurol.**, v. 328, p. 282 – 312, 1993.

CONDE F, LUND JS, JACOBOWITZ DM, BAIMBRIDGE KG, LEWIS DA. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. **J. Comp. Neurol.**, v. 341, p. 95 –116, 1994.

LEWIS DA. Chandelier cells: shedding light on altered cortical circuitry in schizophrenia. **Mol. Psychiatry**., v. 3, p. 468–471, 1998.

DAVISS SR, LEWIS DA. Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. **Psychiatry Res.**, v. 59, p. 81 – 96, 1995.

BEASLEY CL, REYNOLDS GP. Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. **Schizophr. Res.**, v. 24, p. 349 –355, 1997.

KALUS P, SENITZ D, BECKMANN H. Altered distribution of parvalbumin - immunoreactive local circuit neurons in the anterior cingulate cortex of schizophrenic patients. **Psychiatry Res.**, v. 75, p. 49–59, 1997.

WOO TU, MILLER JL, LEWIS DA. Schizophrenia and the parvalbumin-containing class of cortical local circuit neurons. **Am. J. Psychiatry**., v. 154, p. 1013– 1015, 1997.

DANOS P, BAUMANN B, BERNSTEIN HG, FRANZ M, STAUCH R, NORTHOFF G. Schizophrenia and anteroventral thalamic nucleus: selective decrease of parvalbumin-immunoreactive thalamocortical projection neurons. **Psychiatry Res.**, v. 82, p. 1 –10, 1998.

WOO TU, WHITEHEAD RE, MELCHITZKY DS, LEWIS DA. A subclass of prefrontal gama-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 5341–5346, 1998.

IRITANI S, KUROKI N, IKEDA K, KAZAMATSURI H. Calbindin immunoreactivity in the hippocampal formation and neocortex of schizophrenics. **Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 23, p. 409 – 421, 1999.

REYNOLDS GP, BEASLEY CL. Gabaergic neuronal subtypes in the human frontal cortex – development and deficits in schizophrenia. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 22, p. 95 –100, 2001.

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.

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.

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.

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

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.

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, IUZONE 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.

IUZONE 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.

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, 1977.

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.

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.

KOMITOVA M1, XENOS D, SALMASO N, TRAN KM, BRAND T, SCHWARTZ ML, MENT L, VACCARINO FM. Hypoxia-induced developmental delays of inhibitory interneurons are reversed by environmental enrichment in the postnatal mouse forebrain. **J Neurosci.**, v. 33, p. 87-133, 2013.

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