

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

PROJETO DE PESQUISA

**AVALIAÇÃO DA VASCULARIZAÇÃO CEREBRAL DE RATOS *WISTAR*
SUBMETIDOS À ANÓXIA NEONATAL**

Projeto de Iniciação Científica submetido para avaliação no Edital: 04/2022

Modalidade: voluntário

SÃO BERNARDO DO CAMPO

2022

RESUMO

Introdução: A asfixia perinatal aguda é a principal causa de morte e de lesões neurológicas em recém-nascidos. Ela é comumente acarreta por um quadro de hipóxia, a qual é definida como uma diminuição da concentração de O₂ tecidual e a isquemia com uma diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido que, por sua vez, impede a distribuição adequada de O₂, glicose e outros nutrientes. Tais insultos podem ser ocasionados por parto prematuro ou por injúrias que ocorrem durante o nascimento (como a asfixia perinatal). **Objetivo:** O presente estudo tem o objetivo de avaliar a vascularização cerebral de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de anóxia neonatal, que mimetiza a condição de asfixia perinatal que ocorre em humanos. **Métodos:** Os ratos neonatos com 1-2 dias de vida pós-natal (PN1-2), serão submetidos ao modelo descrito por Takada e colaboradores (Takada *et al.*, 2011) onde serão colocados em uma câmara de policarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5 L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente. Os encéfalos dos filhotes machos serão dissecados com PN7 e encaminhados para o estudo imuno-histoquímico e de Western Blotting para análise da proteína VEGF. Todos os dados obtidos neste estudo resultarão em contribuições científicas relevantes para a compreensão dos reais efeitos da anóxia sobre o desenvolvimento cerebral dos filhotes.

Palavras-chave: anóxia, vascularização, desenvolvimento, neuroproteção.

Área do conhecimento do projeto: Doenças do neurodesenvolvimento.

1. INTRODUÇÃO

A hipóxia é definida como uma diminuição da concentração de O₂ tecidual e a isquemia com uma diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido que, por sua vez, impede a distribuição adequada de O₂, glicose e outros nutrientes. Tais insultos podem ser ocasionados por parto prematuro ou por injúrias que ocorrem durante o nascimento, como asfixia, trabalho de parto prolongado, ressuscitação e oclusão do cordão umbilical e/ou da placenta acarretando numa redução da circulação e oxigenação sanguínea no cérebro. O resultado da diminuição da circulação sanguínea e do transporte de O₂ ao cérebro inclui uma queda nos níveis de glicose, um prejuízo no metabolismo energético normal e uma dependência de glicólise anaeróbica como forma exclusiva de produção de energia. Consequentemente há uma queda nos níveis de adenosina-trifosfato (ATP) que desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares, como despolarização da membrana, acúmulo de aminoácidos excitatórios, aumento do cálcio intracelular, geração de radicais livres, inflamação, ativação de caspases, citocinas, fosfolipases, proteases e nucleases, que levam à injúria neuronal, à neurodegeneração e à morte celular (Choi e Rothman, 1990; Martin *et al.*, 1997; Johnston, 2001; Volpe, 2001, Takada *et al.*, 2011,2015,2016).

A hipóxia pré-natal, frequentemente, ocorre durante as convulsões maternas em condições de pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Diversas asfixias podem ocorrer no bebê, por volta do nascimento, por distintas razões, incluindo a compressão do cordão umbilical (Lima *et al.*, 2010), a ruptura da placenta, as contrações uterinas anormais e a falha do neonato em respirar. Outro risco para o

desenvolvimento do embrião/feto são os agentes estressores que levam a geração excessiva de radicais livres. A asfixia perinatal aguda é a principal causa de morte e de lesões neurológicas em recém-nascidos.

A hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Shweiki *et al.*, 1992; Aiello *et al.*, 1994; Sharkey *et al.*, 2000). O VEGF, também conhecido como VEGF-A, foi inicialmente descrito por Senger *et al.*, em 1983, como um fator de permeabilidade tumoral. Anos depois, foi isolado, clonado e identificado como um fator mitógeno específico do endotélio por Leung *et al.*, (1989).

Sendo uma molécula multifuncional, a ligação de VEGF com seus receptores estimula a angiogênese (Ferrara e Davis-Smyth, 1997) e induz a permeabilidade vascular (Dvorak *et al.*, 1995), a manutenção e a formação de novos vasos sanguíneos (Alon *et al.*, 1995) e a estimulação de células endoteliais e a migração de monócitos (Clauss *et al.*, 1990; Dvorak *et al.*, 1995) regulado por diferentes fatores, como citocinas (Ferrara, 2004).

Dentro da família do VEGF, estão compreendidas sete glicoproteínas, denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PLGF (fator de crescimento placentário) (Ferrara *et al.*, 2003) e VEGF-F, encontrada em veneno de cobra (Suto *et al.*, 2005). Essas variações ligam-se, a determinados receptores e ativam uma cascata de eventos posteriores, dependendo da forma variante do gene e do receptor de membrana onde este gene está ligado.

O VEGF age por meio dos receptores VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. São receptores tirosina-quinase caracterizados por possuírem sete domínios semelhantes à imunoglobulina em sua porção extracelular, uma região

transmembrânica única e uma sequência tirosina-quinase interrompida pelo domínio de inserção a quinase em sua porção intracelular (Shibuya *et al.*, 1990; De Vries *et al.*, 1992; Terman *et al.*, 1992; Kaipainen *et al.*, 1995; Karkkainen *et al.*, 2002; Fátima e Papa, 2010).

O VEGF é considerado uma proteína pró-angiogênica estimulando a formação e o crescimento das células endoteliais dos vasos (Ferrara *et al.*, 2003). É também um potente fator para sobrevivência das células endoteliais por induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas nessas células (Benjamin e Keshet, 1997; Gerber *et al.*, 1998). Além disso, o VEGF tem efeito direto sobre os tipos celulares neuronais. Em culturas do gânglio da raiz dorsal, o VEGF estimula o crescimento axonal e promove a sobrevivência neuronal (Sondell *et al.*, 1999), enquanto que a sua inibição pelo receptor VEGFR-1 bloqueia o crescimento axonal (Sondell *et al.*, 2000).

O VEGF também tem efeito neurotrófico em culturas de neurônios do sistema nervoso central, e em muitos casos, ele exerce esse efeito via sinalização por meio do receptor VEGFR-2, PI3-quinase e Akt. No mesencéfalo ventral, o VEGF promove o crescimento e a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos e astrócitos (Silverman *et al.*, 1999) (Figura 1).

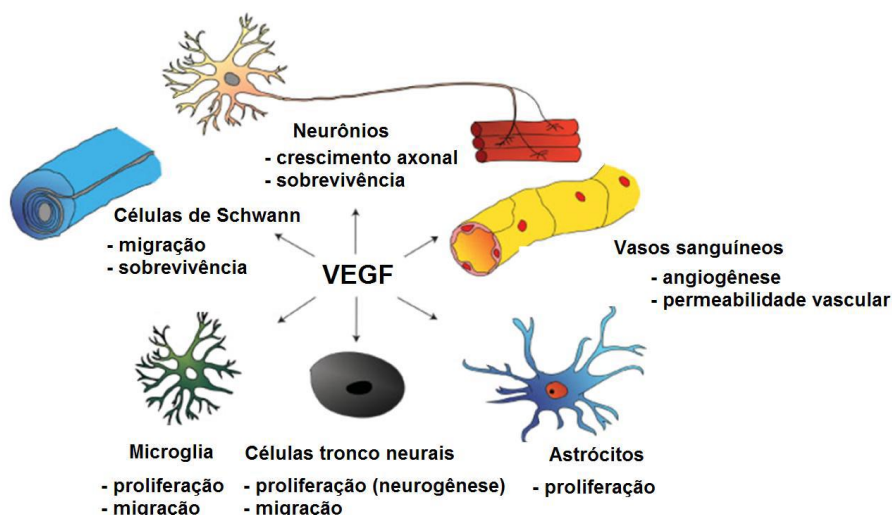


Figura 1 – Tipos celulares de atuação do VEGF. Originalmente considerado como um fator de crescimento endotelial, o VEGF também atua em diversos tipos celulares neuronais, incluindo neurônios, células de Schwann, astrócitos, células-tronco neurais e microglias. Figura adaptada: (Storkebaum *et al.*, 2004).

A sinalização via VEGFR-2, PI3-quinase e Akt protege células HN33 (uma fusão de células somáticas de neurônios do hipocampo e células de neuroblastoma) contra a morte provocada pela retirada de soro fetal bovino da amostra (Jin *et al.*, 2000,a) ou de O₂ e glicose (Jin *et al.*, 2000,b). Protege também, cultura de neurônios do hipocampo contra a toxicidade induzida pelo glutamato (Matsuzaki *et al.*, 2001) ou lesão hipóxica, provavelmente, mediante a inibição dos processos de excitotoxicidade (Svensson *et al.*, 2002) e estimula a sobrevivência de neurônios granulares cerebelares do pré-condicionamento hipóxico (Wick *et al.*, 2002). A sinalização do VEGF/VEGFR-2, ainda, protege culturas de neurônios corticais submetidos à hipóxia (Jin *et al.*, 2002; Ogunshola *et al.*, 2002) e estimula a sobrevivência neuronal por meio da regulação da corrente de potássio, mas, esse efeito depende da via de sinalização VEGFR-1, não da via VEGFR-2 (Xu *et al.*, 2003).

A formação de novos vasos sanguíneos (ou neovascularização) após uma lesão cerebral tem ganhado cada vez mais interesse. Está bem documentado que após uma injúria ocorrem dois mecanismos primários, angiogênese e vasculogênese. Embora tanto a angiogênese quanto a vasculogênese sejam ativas durante o desenvolvimento embrionário e levem à formação de uma rede vascular primitiva, elas também desempenham um papel no reparo vascular após uma lesão. Compreender a participação e função de um dos inúmeros mecanismos neuroprotetores e/ou reparadores após um insulto, torna-se essencial para investigar possíveis intervenções terapêuticas na perspectiva de minimizar os efeitos devastadores ocasionados pelos insultos hipóxicos-isquêmicos.

2. OBJETIVO

Analisar a vascularização cerebral de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de anóxia neonatal, que mimetiza a asfixia perinatal em humanos.

2.1. Objetivo específico:

- Analisar a manifestação do fator de crescimento vascular (VEGF) nas regiões do hipocampo e córtex cerebral, as duas regiões mais susceptíveis a lesões devido a privação de oxigênio, mediante as técnicas de Imuno-histoquímica e Western Blotting.

3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Em 12 meses	Realização das atividades a serem desenvolvidas.
-1° ao 3° mês	Formação de todos os grupos que serão estudados e processamento do material biológico
-4° ao 6° mês	Análise proteica por imuno-histoquímica e Western Blotting
-7° ao 9° mês	Análise dos dados e relatórios
-10° mês 12° mês	Execução do artigo relacionado ao estudo

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Serão utilizadas ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, virgens, pesando entre 200 e 250g, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal do ABC - câmpus São Bernardo do Campo. Durante todo o experimento esses animais terão acesso livre a água e ração e permanecerão em ciclo claro-escuro de 12 horas (7-19 horas) a uma temperatura constante de 22-24°C. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e que foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA – UFABC, Protocolo nº 3980261118).

4.2 Verificação do Ciclo Estral

Todas as ratas serão submetidas à análise do padrão do ciclo estral através do estudo colpocitológico do esfregaço vaginal que será realizado diariamente entre 8:00 e 10:00 da manhã. Cada fase do ciclo estral é facilmente determinada pela análise do tipo de células que descama do epitélio vaginal, tecido altamente responsivo ao estradiol e progesterona.

O conteúdo vaginal será coletado por meio de conta-gotas atraumático, com solução salina e observado em microscópio comum. Apenas as ratas que apresentarem ciclo estral regular com o aparecimento da fase de estro a intervalos de 3 a 4 dias serão acasaladas e acompanhadas durante todo período gestacional.

4.3 Acasalamento e confirmação da prenhez

O esfregaço vaginal será realizado pela manhã, após o acasalamento; a confirmação da prenhez será verificada pela presença de espermatozoides no epitélio vaginal da rata quando analisado em microscópio óptico. A constatação de espermatozoides determinará o início da prenhez (dia zero) e a retirada do macho da gaiola.

4.4 Formação dos grupos

O estudo será desenvolvido apenas com filhotes machos com a finalidade de se obterem menor variabilidade dos dados, sem o possível condicionamento de

aspectos hormonais inerentes ao sexo. Para o estudo serão necessário um número de 5 filhotes para o grupo experimental e 5 filhotes para o grupo controle.

4.5 Anóxia Neonatal

Utilizaremos a adaptação do modelo de anóxia neonatal previamente padronizado e validado em ratos com 1 a 2 dias de vida (Takada *et al.*, 2011), idade cujo desenvolvimento encefálico corresponde a um prematuro humano (Semple *et al.*, 2013). As vantagens deste modelo em relação aos demais, são que ele permite a asfixia global, não invasiva, provocando hipoxemia e hipercapnia similar à condição da anóxia neonatal em humanos (Takada *et al.*, 2011). Além disso, promove morte celular em estruturas susceptíveis, como o hipocampo, com posterior diminuição de volume desta estrutura e da neurogênese hipocampal, resultando em déficits de memória de referência espacial, aprendizagem e déficits na memória operacional, com aumento da ansiedade (Takada *et al.*, 2015a, Takada *et al.*, 2015b).

Deste modo, os neonatos com 1 a 2 dias de vida (PN1-2), serão colocados em uma câmara de polycarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C (Takada *et al.*, 2011). Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), eles serão devolvidos para a mãe e em PN7 serão decapitados e seus encéfalos removidos para análises, ou então perfundidos transcárdicamente para obtenção dos encéfalos fixados para a técnica de imunoistoquímica.

O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente.

4.6 Análise Proteica: Imuno-histoquímica

Os encéfalos serão fixados por perfusão transcardíaca e dissecados. Na sequência, os tecidos serão colocados em álcool, xilol e banhados em parafina, sendo posteriormente emblocados. Os cortes serão feitos no micrótomo com uma espessura de 10 µm e fixados em lâminas silanizadas. Para o início da imuno-histoquímica os cortes serão desparafinizados e em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena, com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% durante 15 minutos, será efetuado. Os cortes serão lavados com água destilada e submetidos à recuperação antigênica, onde as lâminas serão incubadas em tampão Tris-HCl (50mM pH 9,5), no micro-ondas, na potência máxima (700 Watts), durante um período de 7 minutos. Na sequência, as lâminas serão incubadas em um tampão Tris-Glicina (0,1 glicina, pH 7,4), durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de bloqueio com uma solução contendo 20mM tampão fosfato de sódio, pH 7,4; 0,45M NaCl; 0,3% Triton X-100 e albumina 5% por 90 minutos à temperatura ambiente.

Os cortes serão incubados por 48 horas com o anticorpo monoclonal primário anti-VEGF (1:1000 - abcam) diluído em albumina 2%. Após o período de incubação, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (IgG, Heavy and Light Chain, Biotin Conjugate)

(1:200, Calbiochem) diluído em albumina 2% por 90 minutos. Passado o tempo de incubação do anticorpo secundário, as fatias serão lavadas com PBS (3x5 min) e incubadas por 90 minutos em estreptavidina peroxidase – Kit ABC (Vector). O complexo antígeno-anticorpo será revelado com DAB, contendo H₂O₂ 1 µl/mL. A seguir, os cortes serão desidratados e cobertos com lamínula. A marcação da será analisada em microscopia óptica.

4.7 Análise Proteica: Western Blotting

A técnica de WB será utilizada para a quantificação da proteína VEGF por densitometria óptica nos hipocampus e córtices dos filhotes em PN7. As regiões serão removidas, pesadas e sonicadas por ultrassom (Virsonic 60, Virtis) em tampão de lise contendo Cloreto de sódio (NaCl) 0,1 M, Tris Hidroclorato (Tris-HCl) 0,01 M pH 7,6, Ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) 0,001 M pH 8,0, Nonidet P-40 (NP-40) 1%, glicerol 10%, Fenilmetilsulfonilflorídeo (PMSF) 10 µM, metavanadato de sódio 1 mM, Fluoreto de sódio (NaF) 0,05 M, ácido ocadáico 2 nM, (aprotinina 0,08 mM, leupeptina 2 mM, pepstatina A 1,5 mM, bestatina 4 mM e E64 1,4 mM. Foram então, armazenadas a -80°C e a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951). Logo após a análise da concentração de proteínas, os tecidos homogeneizados foram diluídos em tampão Laemmli (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%, pH 8,3), fervidos por 5 minutos e armazenados a -20°C.

4.7.1 Gel de poliacrilamida e curva padrão

Uma curva padrão será realizada para verificar o peso molecular da proteína que será estudada no trabalho. Esse dado será necessário para verificarmos a concentração do gel, o tipo de membrana e o tampão de corrida e de transferência a ser utilizado.

5. Análise dos resultados

Para a análise estatística, será empregado o teste T-Student, em caso de amostragem normal, do contrário serão substituídos por testes não paramétricos. Será considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

6. Descrição da viabilidade da execução do projeto

O presente projeto é parte de um projeto maior do grupo de pesquisa e é totalmente exequível dentro do prazo proposto e com o material adquirido.

7. Referências Bibliográficas

AIELLO, L.P.; AVERY, R.L.; ARRIGG, P.G.; KEYT, B.A.; JAMPEL, H.D.; SHAH, S.T.; PASQUALE, L.R.; THIEME, H.; IWAMOTO, M.A.; PARK, J.E.; NGUYEN, H.V.; AIELLO, L.M.; FERRARA, N.; KING, G.L. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 331(22):1480-7, 1994.

ALON, T.; HEMO, I.; ITIN, A.; PE'ER, J.; STONE, J.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1(10):1024-8, 1995.

BENJAMIN, L.E.; KESHET, E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(16):8761-6, 1997.

BHAT, M.; GRIZENKO, N.; BEN-AMOR, L.; JOOBER, R. Obstetric complications in children with attention deficit/hyperactivity disorder and learning disability. *McGill Journal of Medicine* 8(2):109-113, 2005.

BRIDGETTE, D.S. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species, 284, p. 247-259, 2015.

BRUNORI, M. Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem. Sci.* 26(4):209-10, 2001.

BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKELN, T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 407(6803):520-3, 2000.

CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:171-82, 1990.

CLAUSS, M.; GERLACH, M.; GERLACH, H.; BRETT, J.; WANG, F.; FAMILLETTI, P.C.; PAN, Y.C.; OLANDER, J.V.; CONNOLLY, D.T.; STERN, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 172(6):1535-45, 1990.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L.T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255(5047):989-91, 1992.

DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M.; DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146(5):1029-39, 1995.

FÁTIMA, L.A.; PAPA, P.C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. *Revista da Biologia*, 4:22-27, 2010.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18(1):4-25, 1997.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9(6):669-76, 2003.

FLÖGEL, U.; MERX, M.W.; GODECKE, A.; DECKING, U.K.; SCHRADER, J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(2):735-40, 2001.

GERBER, H.P.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 273(21):13313-6, 1998.

GOLAN, H.; KASHTUTSKY, I.; HALLAK, M.; SOROKIN, Y.; HULEIHEL, M. Maternal hypoxia during pregnancy delays the development of motor reflexes in newborn mice. *Dev Neurosci.* 26(1):24-9, 2004.

HARDISON, R.C. A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(12):5675-9, 1996.

HARDISON, R.C. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *J. Exp. Biol.* 201(8):1099-117, 1998.

KAIPAINEN, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERGH, V.W.; FANG, G.H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(8):3566-70, 1995.

KARKKAINEN, M.J.; MÄKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell. Biol.* 4(1):2-5, 2002.

JIN, K.; ZHU, Y.; SUN, Y.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(18):11946-50, 2002.

JIN, K.L.; MAO, X.O.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal. *J. Mol. Neurosci.* 14(3):197-203, 2000,a.

JIN, K.L.; MAO, X.O.; GREENBERG, D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(18):10242-7, 2000,b.

JOHNSTON, M.V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 7(4):229-34, 2001.

LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 246(4935):1306-9, 1989.

LIMA, D.C.; VALE, T.G.; ARGANÑARAZ, G.A.; VARELLA, P.P.; FRUSSA-FILHO, R.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, MDA. G.; AMADO, D. Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. *Epilepsy Behav.* 18(1-2):45-9, 2010.

LIMA, D.C.; COSSA, A.C.; PEROSA, S.R.; DE OLIVEIRA, E.M.; DA SILVA JÚNIOR, J.A.; FERNANDES, M.J.S.; DA SILVA, I.R.; HIGA, E.M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, MDA. G.; CAVALHEIRO, E.A.; AMADO, D. Neuroglobin is up-regulated in the cerebellum of offspring exposed to maternal epileptic seizures. *Submitted to International Journal Developmental Neuroscience*, 2011.

MATSUZAKI, H.; TAMATANI, M.; YAMAGUCHI, A.; NAMIKAWA, K.; KIYAMA, H.; KIYAMA H, VITEK MP, MITSUDA N, TOHYAMA M. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* 15:1218-1220, 2001.

MACH, M.; DUBOVICKÝ, M.; NAVAROVÁ, J.; BRUCKNEROVÁ, I.; UJHÁZY, E. Experimental modeling of hypoxia in pregnancy and early postnatal life. *Interdiscip. Toxicol.* 2(1):28-32, 2009.

MAMMEN, P.P.A., SHELTON, J.M., GOCTSCH, S.C., WILLIAMS, S.C., RICHARDSON, J.A., GARRY, M.G., GARRY, D.J. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in local regions of the brain. *J. Histochem. Cytochem.* 50:1591-1598, 2002.

MARTIN, L.J.; BRAMBRINK, A.; KOEHLER, R.C.; TRAYSTMAN, R.J. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. *J. Comp. Neurol.* 377(2):262-85, 1997.

MOENS, L.; DEWILDE, S. Globins in the brain. *Nature*. 407(6803):461-2, 2000.

NYAKAS, C.; BUWALDA, B.; LUITEN, P.G. Hypoxia and brain development. *Prog Neurobiol.* 49(1):1-51, 1996.

OGUNSHOLA, O.O.; ANTIC, A.; DONOGHUE, M.J.; FAN, S.Y.; KIM, H.; STEWART, W.B.; MADRI, J.A.; MENT, L.R. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 277(13):11410-5, 2002.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; PERRUZZI, C.A.; HARVEY, V.S.; DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 219(4587):983-5, 1983.

SHARKEY, A.M.; DAY, K.; MCPHERSON, A.; MALIK, S.; LICENCE, D.; SMITH, S.K.; CHARNOCK-JONES, D.S. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(1):402-9, 2000.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5(4):519-24, 1990.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359(6398):843-5, 1992.

SILVERMAN, W.F.; KRUM, J.M.; MANI, N.; ROSENSTEIN, J.M. Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures. *Neuroscience*, 90(4):1529-41, 1999.

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J. Neurosci.* 19(14):5731-40, 1999.

SONDELL, M.; SUNDLER, F.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur. J. Neurosci.* 12(12):4243-54, 2000.

STORKEBAUM, E.; LAMBRECHTS, D.; CARMELIET, P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, 26(9):943-54, 2004.

SUN, Y.; JIN, K.; MAO, X.O.; ZHU, Y.; GREENBERG, D.A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(26):15306-11, 2001.

SUN, Y.; JIN, K.; PEEL, A.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D.A. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(6):3497-500, 2003a.

SVENSSON, B.; PETERS, M.; KÖNIG, H.G.; POPPE, M.; LEVKAU, B.; ROTHERMUNDT, M.; AROLT, V.; KÖGEL, D.; PREHN, J.H. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 22(10):1170-5, 2002.

TAKADA, S. H.; SAMPAIO, C. A.; ALLEMANDI, W.; ITO, P. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods*, 198, n. 1, p. 62-69, May 15 2011.

TAKADA, S. H.; DOS SANTOS HAEMMERLE, C. A.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V. et al. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience*, 284, p. 247-259, Jan 22 2015.

TAKADA, S. H.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V.; LEE, V. Y. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. *Behav Brain Res*, 296, p. 331-338, Jan 1 2016.

TERMAN, B.I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M.E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D.C.; GOSPODAROWICZ, D.; BÖHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 187(3):1579-86, 1992.

TRENT, J.T.; 3RD, HARGROVE MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem*. 277(22):19538-45, 2002

VOLPE J.J. Hypoxic-ischemic encephalopathy; in *Neurology of the Newborn*, Volpe, J.J., ed., Philadelphia, Saunders, pp.211-369, 1995.

VOLPE, J.J. *Neurology of the newborn*. Philadelphia: *Saunders*, 912 p., 2001.

WICK, A.; WICK, W.; WALTENBERGER, J.; WELLER, M.; DICHGANS, J.; SCHULZ, J.B. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J. Neurosci.* 22(15):6401-7, 2002.

XU, J.Y.; ZHENG, P.; SHEN, D.H.; YANG, S.Z.; ZHANG, L.M.; HUANG, Y.L.; SUN, F.Y. Vascular endothelial growth factor inhibits outward delayed-rectifier potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons. *Neuroscience*, 118(1):59-67, 2003.

ZHANG, C.; WANG, C.; DENG, M.; LI, L.; WANG, H.; FAN, M.; XU, W.; MENG, F.; QIAN, L.; HE, F. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(5):1411-9, 2002.