



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

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

Modalidade: bolsista

Título do projeto: Análise transcriptômica em modelo de inflamação e asfixia perinatal em ratos: definição da metodologia de coleta e integridade do RNA.

Palavras-chave do projeto: RNAseq, anóxia neonatal, mielinização, neurodesenvolvimento

Área do conhecimento do projeto: neurobiologia de sistemas

Sumário

1. Resumo.....	3
2. Introdução e Justificativa	4
3. Objetivos	6
4. Metodologia	7
4.1. Animais.....	7
4.2. Manipulação da molécula de RNA	8
5. Viabilidade.....	8
6 Cronograma de atividades	9
Referências.....	10

1. Resumo

A prematuridade extrema é caracterizada por nascimentos anteriores as 28 semanas de gestação e, quando sobrevivem, os neonatos são expostos a diversos cuidados em UTI neonatal que os expõem a agentes infecciosos. Devido a imaturidade do sistema imunológico e respiratório nesta idade, os prematuros extremos são uma população com alta incidência de infecções e asfixia neonatais que podem comprometer o neurodesenvolvimento do indivíduo. Quando conjugadas, estas intercorrências perinatais podem potencializar as lesões cerebrais e exacerbar os prejuízos motores, cognitivos e comportamentais causados pela asfixia neonatal de forma isolada. Entre as lesões agravadas, o comprometimento da maturação das células da linhagem dos oligodendrócitos e consequente prejuízos na mielinização estão entre os principais eventos do neurodesenvolvimento perturbados em indivíduos prematuros. Entretanto, as alterações moleculares que as propiciam são complexas e necessitam de maiores elucidações a fim de possibilitar futuras propostas terapêuticas. Com os recentes avanços metodológicos e moleculares, o desenvolvimento e refinamento da análise transcriptômica, RNAseq, demonstra ser uma ferramenta interessante para auxiliar na compreensão das alterações moleculares ocasionadas pela inflamação e asfixia neonatal aos oligodendrócitos. Entretanto, por se tratar de uma técnica laboriosa, as etapas iniciais que garantirão a qualidade da amostra em que o RNAseq será realizado devem ser bem estabelecidas. Logo, propusemos neste projeto a definição da metodologia de extração e purificação de RNA, molécula de instável e de difícil manipulação, inicialmente utilizando técnica convencional e econômica com fenol/clorofórmio. Após eficiente manipulação da molécula de RNA, a extração e purificação utilizando kit comercial dedicado as análises d RNAseq. Ambos os processamentos serão seguidos de etapas de controle de qualidade do procedimento. Deste modo, este projeto certamente corroborará com o desenvolvimento do aluno na manipulação de RNA e preparo das amostras de ratos submetidos a inflamação e asfixia neonatal que serão encaminhadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo para serem sequenciados e catalogados.

2. Introdução e Justificativa

O desenvolvimento do sistema nervoso é composto de diferentes processos cruciais para que as habilidades físicas e intelectuais de um indivíduo sejam expressas de forma típica. Podemos dividir o neurodesenvolvimento em eventos que ocorrem durante a gestação, como a neurulação, proliferação e migração neuronal, e eventos que perduram nos primeiros meses e até anos da vida de um indivíduo, como a apoptose, sinaptogênese e mielinização (Semple, Blomgren, Gimlin, Ferriero, & Noble-Haeusslein, 2013). Todos estes eventos são dependentes de uma delicada regulação de vias de sinalização que envolve a transcrição e posterior tradução de proteínas e fatores de transcrição que regem e direcionam o destino celular e equilibram o microambiente de forma propícia para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Logo, devida intensa atividade durante o neurodesenvolvimento, a ocorrência de eventos adversos, como a prematuridade, as infecções perinatais e a asfixia neonatal, pode comprometer os eventos do neurodesenvolvimento anteriormente citados e propiciarem sequelas permanentes como a paralisia cerebral, déficits intelectuais, desordens do espectro autista e transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (Blumberg, 2017).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que anualmente aproximadamente 15 milhões, ou seja, 1 a cada 10 recém-nascidos vivos são prematuros, e o Brasil está entre os 10 países com maior número de nascimentos prematuros (WHO, 2018). Quando o nascimento ocorre antes das 28 semanas de gestação, estes neonatos são classificados como prematuros extremos e apresentam alto risco de vida, baixo peso corporal e são expostos a múltiplos cuidados em UTI neonatal (Blencowe et al., 2012). Devido a imaturidade imunológica nesta idade, ou seja, resposta imunológica celular imatura e humilde produção de anticorpos e fatores do sistema complemento, os prematuros extremos são uma população de risco para os agentes infecciosos presentes no ambiente hospitalar que podem ocasionar a inflamação neonatal (Stoll et al., 2004; Wynn & Levy, 2010). Embora a sepse seja a maior preocupação, processos inflamatórios leves são fatores de risco para o prematuro, pois podem ocasionar a sensibilização imunológica, evento que predispõe as células do sistema imunológico do neonato a uma resposta que, a depender do estímulo, pode ser exacerbada ou atenuada a um segundo evento adverso.

Entre as intercorrências neonatais comumente associados a inflamação em prematuros extremos encontramos a asfixia perinatal que é caracterizada pela interrupção do aporte de oxigênio parcial associado ou não à isquemia (hipóxia ou hipóxia-isquemia), ou total (anóxia), como será mimetizada neste projeto. A asfixia perinatal é considerada um importante problema de saúde pública, pois sua principal sequela, a lesão encefálica hipóxico-isquêmica, afeta de 0,1 a 0,3% das crianças nascidas a termo (Kurinczuk, White-Koning, & Badawi, 2010) e aproximadamente 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascimento (Gluckman, Pinal, & Gunn, 2001; Vannucci, 2000). Cerca de 20 a 50% dos neonatos que sofrem asfixia perinatal não sobrevivem e, daqueles que sobrevivem, 25% apresentam alguma sequela neurológica permanente (Wilson-Costello, Friedman, Minich, Fanaroff, & Hack, 2005), como paralisia cerebral, déficits cognitivos, auditivos e visuais (Back, 2017; Vannucci, 2000).

No sistema nervoso central, a privação de oxigênio inicialmente promove a fase primária caracterizada pela disfunção mitocondrial, excitotoxicidade e ativação de vias apoptóticas; seguida da fase latente, marcada pela recuperação relativa de processos metabólicos; por fim, cerca de 6 horas após a privação de oxigênio, inicia-se a fase secundária, em que há a produção

de citocinas pró-inflamatórias e morte celular massiva de células neuronais e gliais, astrócitos e células progenitoras de oligodendrócitos (pre-OLs) em regiões mais vulneráveis, como o córtex cerebral, substância branca e hipocampo (Inder & Volpe, 2000; Northington, Chavez-Valdez, & Martin, 2011; Peterson, Larson, Buffenstein, Park, & Fall, 2012). Quando a asfixia perinatal é associada a outro evento adverso perinatal, como a sepse, as alterações celulares e inflamatórias citadas acima são potencializadas e as sequelas aos indivíduos exacerbadas.

Entre os eventos do neurodesenvolvimento que são perturbados por insultos perinatais, encontra-se a mielinização. Este processo se inicia no período gestacional pela proliferação e diferenciação das células progenitoras dos oligodendrócitos, em um processo chamado oligodendrogênese (Poitelon, Kopec, & Belin, 2020). Em casos de privação de oxigênio em prematuros extremos, a lesão encefálica acomete principalmente a substância branca, pois neste período 90% das células que futuramente irão dar origem aos oligodendrócitos maduros estão no estágio de pré-oligodendrócitos (pre-OLs) (Choi et al., 2011; Craig et al., 2003). Neste estágio, os pre-OLs são particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo e ambiente citotóxico propiciado pela privação de oxigênio. O prejuízo a linhagem dos oligodendrócitos é caracterizado pela inibição da maturação dos pre-OLs e consequente déficit de oligodendrócitos maduros e mielinizantes (Back et al., 2002; Ness, Romanko, Rothstein, Wood, & Levison, 2001; Wellmann, Buhner, & Schmitz, 2014; Ziemka-Nalecz et al., 2018). Alterações anatômicas e microscópicas como cavitações e cistos na substância branca, alargamento dos ventrículos, diminuição da espessura do corpo caloso, diminuição da espessura da bainha de mielina dos axônios são achados que configuram casos de lesão a substância branca neste período, chamada de leucomalácia periventricular (Kaur, Sivakumar, Ang, & Sundaresan, 2006; Skoff et al., 2001). Entretanto, embora lesões na substância branca sejam comuns em crianças que sobreviveram a episódios de asfixia perinatal, as alterações moleculares que as propiciam são complexas.

As dificuldades acerca da elucidação das razões e possibilidades terapêuticas para a leucomalácia periventricular são em parte explicadas pela infinidade de sinais moleculares que são necessários para que a célula precursora de oligodendrócito se diferencie e atue como oligodendrócito mielinizante. Vias de sinalização complexas como a *sonic hedgehog* (SHH), *bone morphogenic protein* (BMP) e Notch são recrutadas, e fatores de crescimento e transcrição como Olig1, Olig2, SOX10 e Nkx2.2 são necessários (Adams, Dahl, Gallo, & Macklin, 2021; Hashimoto et al., 2018; Liu et al., 2007; Winkler & Franco, 2019; Zhou & Anderson, 2002; Zhu, Zhao, Young, Franklin, & Song, 2014). Além disso, os níveis de mRNA de IGF-1 - um dos potenciais fatores de crescimento envolvidos na maturação dos OLs através da interação com as vias PI3K/mTOR/Akt, MEK/ERK e JAK/STAT - demonstrou ser negativamente regulado em crianças sobreviventes e em modelos animais de hipóxia isquemia (Bibollet-Bahena & Almazan, 2009; Ness et al., 2001; Palacios, Sanchez-Franco, Fernandez, Sanchez, & Cacicedo, 2005; Subramaniam et al., 2005). Ademais, análises transcriptômicas revelaram que a hipóxia regula negativamente a expressão de genes relacionados a linhagem dos oligodendrócitos, como PLP, PDGF α R, CNPase e MAG (Curristin et al., 2002). Isto posto, análises transcriptômicas recentemente desenvolvidas e em crescente aperfeiçoamento demonstram ser uma ferramenta poderosa na busca por conhecimento dos aspectos moleculares da lesão a substância branca ocasionada por eventos perinatais.

A análise transcriptômica, ou RNAseq, se caracteriza pela identificação e quantificação completa dos transcritos celulares em etapas do desenvolvimento e/ou condições experimentais ou patofisiológicas específicas. Através do RNAseq é possível catalogar e quantificar todos os transcritos de uma amostra, incluindo RNAm, RNA não codificante, RNAs

pequenos, alterações transcricionais e padrões de *splicing* alternativo. De modo sucinto, a amostra de interesse contendo sequências longas de RNA é fragmentada e adaptadores que auxiliaram na identificação dos transcritos são acoplados ao início e fim do fragmento. Os fragmentos, chamados de *reads*, são então sequenciados e apresentam entre 30 a 400 bp. A identificação dos *reads* é feita através do alinhamento dos mesmos a uma biblioteca de transcritos de referência para a espécie (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).

Embora o RNAseq seja uma ferramenta poderosa, a realização do mesmo é laboriosa. O primeiro dos obstáculos para a realização da técnica é a manipulação eficiente da molécula de RNA, que por ser facilmente degradada por proteases se torna instável. Adicionado a isto, as análises bioinformáticas necessárias para a posterior interpretação dos dados é demandante e dependente do processamento correto das amostras nas etapas iniciais do experimento. Logo, o profissional que realizará este procedimento deve ser tecnicamente capacitado e pronto para solucionar problemáticas a fim de obter um material íntegro e em quantidade suficiente para posterior análise. Ademais, apesar do custo dos sequenciadores e insumos para a realização dos testes estar diminuindo, se comparado com outras técnicas, ele ainda é elevado. Fato este que limita a disposição de *facilities* e grupos de pesquisa que realizam a técnica. Dito isto, o presente projeto tem como objetivo estabelecer o método de coleta, extração e conservação do RNA de amostras de córtex e corpo caloso de ratos submetidos a inflamação e asfixia neonatal e que serão posteriormente encaminhados ao Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo para serem sequenciados e catalogados.

Com isso, visto que o RNAseq é uma metodologia poderosa e que até o momento não foi utilizada para identificar alterações de transcritos no córtex e corpo caloso de ratos neonatos submetidos a sensibilização inflamatória seguida de asfixia neonatal, o projeto proposto certamente contribuirá para o estabelecimento da metodologia de extração ideal com o objetivo de reduzir o viés e possíveis intercorrências indesejáveis nas futuras análises que serão realizadas pelo grupo de pesquisa.

3. Objetivos

Visto que o RNA é uma molécula de difícil manipulação e que a realização da análise transcriptômica é laboriosa, o objetivo deste projeto será o estabelecimento do método de extração e conservação do RNA e capacitação do aluno na manipulação da molécula de RNA para posterior processamento de amostras de encéfalos de ratos submetidos a sensibilização inflamatória e asfixia neonatal.

De modo específico, o projeto tem como objetivos:

- 1) Realizar a extração do RNA de modo convencional, utilizando reagentes como fenol e clorofórmio. Esta metodologia é mais econômica e capacitará o aluno na manipulação das amostras instáveis;
- 2) Verificar a qualidade da extração convencional através da submissão das amostras à corrida em gel de agarose para verificar integridade, a quantificação do RNA total e verificação de pureza por espectrofotometria realizada em NanoDrop e análise da concentração de RNA por análise fluorométrica com Qubit;
- 3) Mediante a realização da extração e conservação do material utilizando o método convencional de modo satisfatório, o aluno irá realizar a extração das amostras que

serão submetidas ao RNAseq utilizando o kit comercial indicado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo;

- 4) Verificar a qualidade e integridade das amostras pela corrida em gel de agarose, análise espectrofotométrica por NanoDrop e fluorométrica por Qubit, como solicitado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo.

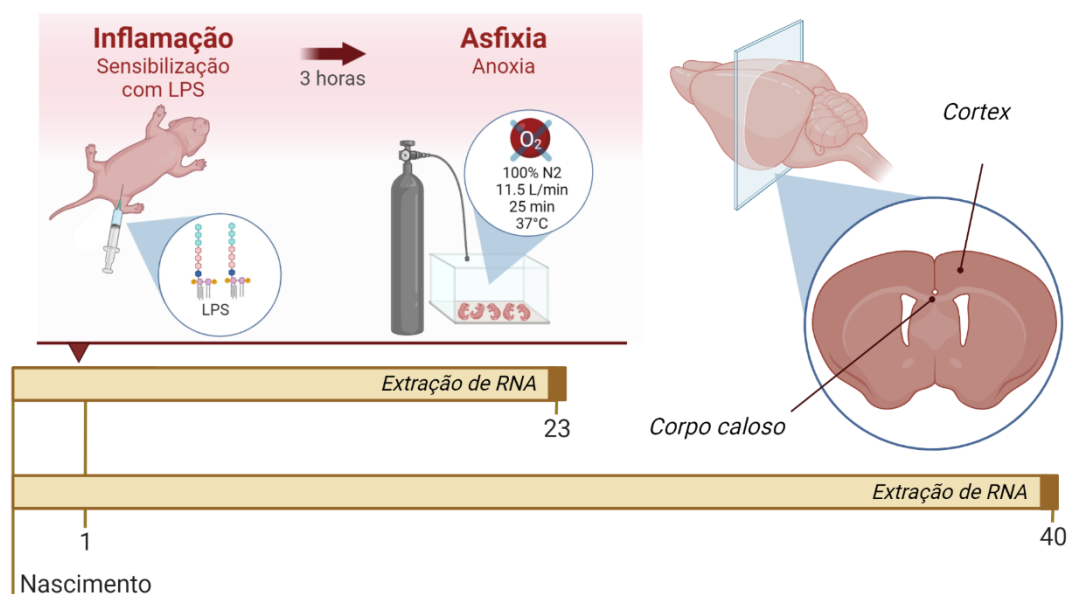
4. Metodologia

4.1. Animais

Serão utilizados neonatos provenientes de casais de ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar), mantidos no biotério da Universidade Federal do ABC - câmpus São Bernardo do Campo, com temperatura constante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12h, início do claro às 7:00h, e água e comida ad libitum. Para as etapas 1 e 2 serão utilizadas neonatos fêmeas que não poderiam ser utilizadas na formação dos grupos experimentais que envolvem inflamação e asfixia neonatal, e neonatos machos excedentes.

Para a etapa 3, neonatos machos com peso corporal entre 6 e 8 g, que corresponde a um neonato de aproximadamente 30h de vida (P1), serão submetidos ao protocolo de sensibilização inflamatório seguido de asfixia neonatal.

Para a sensibilização inflamatória será realizado o modelo de sensibilização pela aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) em baixa dose, conforme descrito por Wang e colaboradores. Brevemente, neonatos de ratos machos serão submetidos a injeção intraperitoneal de LPS (*E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, Cat#L2880) 0,05 mg/kg ou tampão fosfato como veículo e devolvidos a mãe para evitar alterações de temperatura. 3 horas após a sensibilização, os neonatos serão submetidos ao modelo de anóxia neonatal padronizado por Takada e colaboradores em ratos [26], a fim de mimetizarmos a asfixia perinatal. Brevemente, ratos neonatos Wistar com aproximadamente 30 horas de vida (6 a 8g) – idade cujo desenvolvimento encefálico corresponde a um prematuro humano (Bolan et al.) – 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. O córtex e corpo caloso dos animais serão coletados em 21 e 40 dias de vida (P23 e P40, respectivamente).



	VN	VA	IN	IA
Inflamação neonatal (injeção de LPS)	×	×	✓	✓
Asfixia perinatal (anóxia)	×	✓	×	✓

Figure 1: Delineamento experimental contendo um diagrama ilustrando os modelos de inflamação e asfixia neonatal associados e as regiões que serão analisadas. Tabela contendo os grupos experimentais formados. VN: veículo + normoxia, VA: veículo + asfixia, IN: inflamação + normoxia e IA: inflamação + asfixia. Criado no Biorender.

4.2. Manipulação da molécula de RNA

Para a extração utilizando a metodologia convencional com fenol/clorofórmio, o córtex e o corpo caloso dos animais com 21 ou 40 dias de idade (P21 ou P40) serão coletados em reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e o RNA total será extraído em clorofórmio, precipitado em isopropanol e o pellet será lavado em etanol 70%. Após secagem, a amostra de RNA será suspensa em água livre de RNases. Para a extração e purificação das amostras utilizando kit comercial, serão seguidas as orientações do fabricante. O controle de qualidade das amostras será feito através de (1) espectrofotometria utilizando NanoDrop para quantificação de RNA e análise de pureza ($A_{260/280}$ e $A_{260/230}$); (2) fluorimetria utilizando Qubit, este método irá quantificar o RNA de modo a evitar a superestimação da concentração de RNA devido a contaminação de DNA; (3) corrida em gel de agarose para verificar a integridade do material extraído.

5. Viabilidade

Esta proposta está vinculada ao projeto de pesquisa regular submetido e aprovado pela FAPESP sob responsabilidade do orientador(a). Entre os itens aprovados no projeto regular aprovado encontra-se verba destinada para a aquisição do QuBit e do kit comercial dedicado a extração do RNA. Os demais equipamentos e reagentes dedicados a extração, corrida de agarose e o NanoDrop que serão utilizados nas demais etapas do projeto já estão disponíveis e alocados em locais adequados para a execução do projeto. Ressaltamos também que o projeto aqui proposto já preparado para ser enviado à comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFABC.

6 Cronograma de atividades

1. Etapa 1

- Coleta do material biológico (córtex cerebral de ratos) para extração de RNA convencional. Dado o caráter de aprendizado da metodologia e manipulação de molécula de RNA instável, as amostras utilizadas nesta etapa serão de animais sham, ou seja, que não foram submetidos a nenhuma manipulação como inflamação e/ou asfixia neonatal;
- Extração e verificação da qualidade e integridade do material extraído pela metodologia convencional.

Observação: esta etapa será replicada até o material seja coletado e forma integra.

2. Etapa 2

- a. Coleta do material biológico (córtex cerebral de ratos) para extração de RNA utilizando kit comercial. Dado o caráter de aprendizado e familiarização com o kit comercial, as amostras utilizadas nesta etapa serão de animais sham, ou seja, que não foram submetidos a nenhuma manipulação como inflamação e/ou asfixia neonatal;
- b. Extração e verificação da qualidade e integridade do material extraído utilizando kit comercial.

Observação: esta etapa será replicada até o material seja coletado e forma integra utilizando o kit.

3. Etapa 3

- Formação dos grupos destinados a análise de RNAseq no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco. Serão coletados 7 animais por grupo, sendo eles: veículo+normoxia, inflamação+normoxia, veículo+asfixia e inflamação+asfixia;
- Extração do RNA utilizando kit comercial e verificação da qualidade por corrida de gel de agarose, análise em NanoDrop e Qubit.

[illegible]

Referências

- Adams, K. L., Dahl, K. D., Gallo, V., & Macklin, W. B. (2021). Intrinsic and extrinsic regulators of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 116, 16-24. doi:10.1016/j.semcdb.2020.10.002
- Back, S. A. (2017). White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol*, 134(3), 331-349. doi:10.1007/s00401-017-1718-6
- Back, S. A., Han, B. H., Luo, N. L., Chrichton, C. A., Xanthoudakis, S., Tam, J., . . . Holtzman, D. M. (2002). Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*, 22(2), 455-463.
- Bibollet-Bahena, O., & Almazan, G. (2009). IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. *J Neurochem*, 109(5), 1440-1451. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06071.x
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A. B., Narwal, R., . . . Lawn, J. E. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*, 379(9832), 2162-2172. doi:10.1016/S0140-6736(12)60820-4
- Blumberg, M. S. (2017). Development evolving: the origins and meanings of instinct. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 8(1-2). doi:10.1002/wcs.1371
- Bolan, P. J., Kim, E., Herman, B. A., Newstead, G. M., Rosen, M. A., Schnall, M. D., . . . Investigators, A. T. t. I.-. (2017). MR spectroscopy of breast cancer for assessing early treatment response: Results from the ACRIN 6657 MRS trial. *J Magn Reson Imaging*, 46(1), 290-302. doi:10.1002/jmri.25560
- Choi, E. K., Park, D., Kim, T. K., Lee, S. H., Bae, D. K., Yang, G., . . . Kim, Y. B. (2011). Animal models of periventricular leukomalacia. *Lab Anim Res*, 27(2), 77-84. doi:10.5625/lar.2011.27.2.77
- Craig, A., Ling Luo, N., Beardsley, D. J., Wingate-Pearse, N., Walker, D. W., Hohimer, A. R., & Back, S. A. (2003). Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol*, 181(2), 231-240. doi:10.1016/s0014-4886(03)00032-3
- Currstin, S. M., Cao, A., Stewart, W. B., Zhang, H., Madri, J. A., Morrow, J. S., & Ment, L. R. (2002). Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(24), 15729-15734. doi:10.1073/pnas.232568799
- Gluckman, P. D., Pinal, C. S., & Gunn, A. J. (2001). Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. *Semin Neonatol*, 6(2), 109-120. doi:10.1053/siny.2001.0042
- Hashimoto, H., Jiang, W., Yoshimura, T., Moon, K. H., Bok, J., & Ikenaka, K. (2018). Strong sonic hedgehog signaling in the mouse ventral spinal cord is not required for oligodendrocyte precursor cell (OPC) generation but is necessary for correct timing of its generation. *Neurochem Int*, 119, 178-183. doi:10.1016/j.neuint.2017.11.003
- Inder, T. E., & Volpe, J. J. (2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*, 5(1), 3-16. doi:10.1053/siny.1999.0112
- Kaur, C., Sivakumar, V., Ang, L. S., & Sundaresan, A. (2006). Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. *J Neurochem*, 98(4), 1200-1216. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03964.x
- Kurinczuk, J. J., White-Koning, M., & Badawi, N. (2010). Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev*, 86(6), 329-338. doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.05.010

- Liu, Z., Hu, X., Cai, J., Liu, B., Peng, X., Wegner, M., & Qiu, M. (2007). Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. *Dev Biol*, 302(2), 683-693. doi:10.1016/j.ydbio.2006.10.007
- Ness, J. K., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., Wood, T. L., & Levison, S. W. (2001). Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors. *Dev Neurosci*, 23(3), 203-208. doi:10.1159/000046144
- Northington, F. J., Chavez-Valdez, R., & Martin, L. J. (2011). Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Ann Neurol*, 69(5), 743-758. doi:10.1002/ana.22419
- Palacios, N., Sanchez-Franco, F., Fernandez, M., Sanchez, I., & Cacicedo, L. (2005). Intracellular events mediating insulin-like growth factor I-induced oligodendrocyte development: modulation by cyclic AMP. *J Neurochem*, 95(4), 1091-1107. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03419.x
- Peterson, B. L., Larson, J., Buffenstein, R., Park, T. J., & Fall, C. P. (2012). Blunted neuronal calcium response to hypoxia in naked mole-rat hippocampus. *PLoS One*, 7(2), e31568. doi:10.1371/journal.pone.0031568
- Poitelon, Y., Kopec, A. M., & Belin, S. (2020). Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*, 9(4). doi:10.3390/cells9040812
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Skoff, R. P., Bessert, D. A., Barks, J. D., Song, D., Cerghet, M., & Silverstein, F. S. (2001). Hypoxic-ischemic injury results in acute disruption of myelin gene expression and death of oligodendroglial precursors in neonatal mice. *Int J Dev Neurosci*, 19(2), 197-208. doi:10.1016/s0736-5748(00)00075-7
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A. A., Hintz, S. R., Vohr, B., . . . Human Development Neonatal Research, N. (2004). Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA*, 292(19), 2357-2365. doi:10.1001/jama.292.19.2357
- Subramaniam, S., Shahani, N., Strelau, J., Laliberte, C., Brandt, R., Kaplan, D., & Unsicker, K. (2005). Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway. *J Neurosci*, 25(11), 2838-2852. doi:10.1523/JNEUROSCI.5060-04.2005
- Vannucci, R. C. (2000). Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol*, 17(3), 113-120. doi:10.1055/s-2000-9293
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10(1), 57-63. doi:10.1038/nrg2484
- Wellmann, S., Buhrer, C., & Schmitz, T. (2014). Focal necrosis and disturbed myelination in the white matter of newborn infants: a tale of too much or too little oxygen. *Front Pediatr*, 2, 143. doi:10.3389/fped.2014.00143
- WHO, W. H. O. (2018). Preterm Birth. Retrieved from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth#:~:text=Preterm%20is%20defined%20as%20babies,weeks%20of%20pregnancy%20are%20completed.&text=extremely%20preterm%20\(less%20than%2028,\(32%20to%2037%20weeks\).](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth#:~:text=Preterm%20is%20defined%20as%20babies,weeks%20of%20pregnancy%20are%20completed.&text=extremely%20preterm%20(less%20than%2028,(32%20to%2037%20weeks).)
- Wilson-Costello, D., Friedman, H., Minich, N., Fanaroff, A. A., & Hack, M. (2005). Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. *Pediatrics*, 115(4), 997-1003. doi:10.1542/peds.2004-0221
- Winkler, C. C., & Franco, S. J. (2019). Loss of Shh signaling in the neocortex reveals heterogeneous cell recovery responses from distinct oligodendrocyte populations. *Dev Biol*, 452(1), 55-65. doi:10.1016/j.ydbio.2019.04.016

- Wynn, J. L., & Levy, O. (2010). Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol*, 37(2), 307-337. doi:10.1016/j.clp.2010.04.001
- Zhou, Q., & Anderson, D. J. (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*, 109(1), 61-73. doi:10.1016/s0092-8674(02)00677-3
- Zhu, B., Zhao, C., Young, F. I., Franklin, R. J., & Song, B. (2014). Isolation and long-term expansion of functional, myelinating oligodendrocyte progenitor cells from neonatal rat brain. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 31, 2D 17 11-15. doi:10.1002/9780470151808.sc02d17s31
- Ziemka-Nalecz, M., Janowska, J., Strojek, L., Jaworska, J., Zalewska, T., Frontczak-Baniewicz, M., & Sypecka, J. (2018). Impact of neonatal hypoxia-ischaemia on oligodendrocyte survival, maturation and myelinating potential. *J Cell Mol Med*, 22(1), 207-222. doi:10.1111/jcmm.13309