

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**HETEROTOPIA ENCEFÁLICA PULMONAR
EXPERIMENTAL**

Paulo Roberto Veiga Quemelo

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULO ROBERTO VEIGA QUEMELO

**HETEROTOPIA ENCEFÁLICA PULMONAR
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de Concentração: Patologia. Opção: Patologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Peres

Ribeirão Preto
2008

Dedicatória

A minha mãe, Sonia Veiga, que sacrificou seus sonhos em favor dos meus, mulher guerreira, batalhadora, que não media esforços para proporcionar uma condição melhor para os seus filhos. A você minha mãe, com o meu eterno amor, dedico este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Cesar Peres, amigo e Pai, que realmente me ensinou valores éticos e morais que certamente serviu de alicerce para a minha formação pessoal e profissional. Agradeço a você, exemplo de grande profissional, que me fez descobrir o gosto pelo ensino e pesquisa e ajudou a me tornar uma pessoa melhor, me conduzido com sabedoria e amizade durante esses anos de convivência. Agradeço especialmente por confiar no meu trabalho e pelo incentivo de transformação dos meus sonhos em realidade. Muito obrigado!

“O pessimista se queixa do vento, o otimista espera que ele mude e o realista ajusta as velas.”

William George Ward

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido fé, esperança e força durante a minha caminhada;

Ao meu Pai, Paulo Quemelo e meu irmão Ricardo Quemelo, pelos ensinamentos e pela oportunidade de crescimento;

À minha avó, Ana Veiga, pelo afeto e amor;

A todos os meus familiares, pelo carinho e incentivo;

À Andiará De Rossi, pela paciência, companheirismo e cumplicidade;

Ao amigo Alexandre Bachur e sua família, pela amizade, incentivo, convivência e por sempre estar com as portas abertas nos momentos difíceis;

À família De Rossi, Sylvio, Vera, Janaina, Moara e Tom, pela atenção, acolhimento e carinho;

À Deise Lúcia Chesca Simões, por toda sua dedicação com o trabalho, no auxílio com as cirurgias, no laboratório, no biotério e pela amizade e carinho de mãe que teve comigo durante esses anos;

Ao Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto, pela ajuda e por dispor seu laboratório à realização dos meus experimentos;

Aos meus amigos Carlos Leone, Fernando Camolesi, Marcos Rodrigues, Elvis Candido, Vanderlei Oliveira e Ricardo Beato, pela amizade, força e companheirismo;

Aos funcionários do departamento, Neide, Toninho, Rosângela, Edna, Daniel e Camila, pelo convívio, atenção e amizade;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Patologia;

Ao CNPq, FAEPA, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim."

Thico Xavier

Resumo

QUEMELO, P. R. V. **Heterotopia encefálica pulmonar experimental**. 2008. 102 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A heterotopia encefálica no pulmão é um achado raro, geralmente associado a defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN), cujos mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos. Desta maneira, o nosso primeiro objetivo foi tentar induzir a heterotopia em modelo de DFTN produzido por ácido retinóico, que se mostrou ineficiente para este propósito, apesar de os fetos apresentarem inúmeros defeitos. Assim, para contornar as dificuldades encontradas nesse método, foi desenvolvido um modelo experimental cirúrgico. Foram utilizados 24 camundongos prenhes, divididas nos grupos E17 e E18, indicativos do dia gestacional (DG) em que foi realizada a coleta dos fetos. A cirurgia foi realizada no 15º DG, sendo retirado um feto por histerectomia, cujo tecido encefálico foi removido, picotado e implantado no pulmão dos irmãos. O exame histológico dos troncos fetais mostrou que a Implantação Encefálica Pulmonar (IEP) foi efetiva com reação imuno-histoquímica (IHQ) positiva para GFAP em ambos os grupos (E17 e E18). Após a criação do modelo cirúrgico, foram investigados outros aspectos do desenvolvimento, maturação, proliferação e interação do tecido heterotópico encefálico no pulmão. Para tanto, foi utilizado o modelo cirúrgico citado anteriormente, com algumas modificações para a coleta do material, que ocorreu durante o período pré-natal (18ºDG) e 8º dia pós-natal, chamados de grupos experimentais E18 e P8, respectivamente. Como controle, foi utilizado o encéfalo de fetos normais que

foram coletados no mesmo período dos grupos experimentais, chamados de CE18 e CP8. Foi realizada a reação IHQ para NeuN, PCNA, Bcl2, Integrina β 1 e VEGF em todos os grupos. Os resultados indicam que o índice de marcação (IM) para NeuN foi maior em P8 do que E18, da mesma forma que o tecido encefálico dos animais controle (CP8 < CE18), indicando que a maturação neuronal continuou. No entanto, ocorreu redução da proporção dos neurônios em ambos os grupos IEP, que pode ser explicada pelo IM maior para o anticorpo Bcl2 encontrado em ambos os grupos experimentais E18 e P8, quando comparado com os grupos controles CE18 e CP8. Apesar do IM para Bcl2 indicar apoptose de uma parte desse tecido, os fragmentos pareciam bem preservados, com presença de mitoses e tecido em proliferação com reação IHQ positiva para PCNA, mesmo após doze dias do procedimento. Os fragmentos implantados eram vascularizados e com reação IHQ positiva para VEGF. A reação IHQ também se mostrou positiva para Integrina β 1 no tecido heterotópico encefálico, o que indica ancoragem e adesão desse tecido. Assim, o modelo experimental mostrou-se eficiente, de execução relativamente simples e total interação com o tecido pulmonar e pleural. A partir desse modelo podem-se desenvolver outros estudos para compreender melhor os mecanismos de implantação e interação celular.

Palavras-Chave: Heterotopia. Modelo experimental. DFTN. Maturação neural. Proliferação. Apoptose. Interação celular.

Abstract

QUEMELO, P. R. V. **Experimental brain tissue in the lung**. 2008. 102 f. Thesis (Doctoral) – School of Medicine Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Heterotopic brain tissue in the lung is a rare abnormality usually associated with neural tube defect (NTD) and its mechanisms are not fully understood, thus we aimed at the development of an experimental model to explore some aspects involved in this abnormality. As a first attempt, we have induced NTD using Retinoic Acid, but no brain tissue heterotopia was observed, in spite of the many anomalies found. Thus, the development of an experimental surgical model to overcome this difficulty was achieved. Twenty four pregnant mice were divided in groups E17 and E18 according to the gestational day when the fetuses were collected. The surgery was performed on the 15th GD. One fetus was removed by hysterectomy and its brain was minced and implanted in the lung of its litter mates. Histological examination of the fetal trunks showed brain tissue implantation with GFAP-positive cells in 85% of the fetuses of E17 group and in 100% of those of E18 group. After the development of the experimental model, other developmental aspects were investigated: cell maturation, proliferation and interaction with the lung. Using this experimental model fetuses were collected on the 18th gestational day (group E18) and on the 8th postnatal day (group P8). The brain of fetuses from dams not submitted to any experimental procedure was collected on the 18th gestational day (group CE18) and on the 8th postnatal day (group CP8) to serve as a control. Immunohistochemical (IHQ) study was performed for NeuN,

PCNA, Bcl2, Integrin β 1 and VEGF for all groups. The results showed that NeuN Labeling Index (LI) was greater in postnatal than fetal period both for the experimental and control groups (P8 > E18 and CP8 > CE18), indicating that neuronal maturation occurs, but with a proportional reduction in experimental groups that may be explained by greater LI with Bcl2 antibody. Although the LI for Bcl2 indicates apoptosis of some cells, the fragments of brain tissue were well preserved, at times showing mitoses as well as presentivity positivity for PCNA, even after 12 days of the procedure. The fragments implanted were vascularized and presented IHQ reaction for VEGF. IHQ staining for β 1 integrin was positive in heterotopic brain tissue, indicating integration with the lung. In conclusion, the experimental model proved to be efficient and of relatively simple execution, showing complete integration of brain tissue with pulmonary and pleural tissue and thus representing a model that will permit the study of different aspects of cell implantation and interaction.

Key Words: Heterotopia. Experimental model. NTD. Neuronal maturation. Proliferation. Apoptosis. Cell interaction.

Lista de Abreviaturas

ABC	Complexo Avidina-Biotina
AR	Ácido Retinóico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Controle
°C	Graus Celsius
CE18	Controle 18º dia gestacional
CO ₂	Dióxido de Carbono
CP8	Controle 8º dia pós-natal
DAB	3´3 - Diaminobenzidina
DFTN	Defeito de Fechamento do Tubo Neural
DG	Dia Gestacional
E17	17º dia gestacional
E18	18º dia gestacional
E7	7º dia gestacional
E8	8º dia gestacional
E9	9º dia gestacional
ECM	Matriz Extracelular
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	Gramas
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>

HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1	<i>Hypoxia-Inducible Factor - 1</i>
IEP	Implantação Encefálica Pulmonar
IHQQ	Imuno-Histoquímica
IM	Índice de Marcação
Kg	Kilogramas
LI	<i>Labelling Index</i>
mg	Miligramas
ml	Mililitros
n	Número
n.s.	não significativa
NaCl	Cloreto de Sódio
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
P.A.	Produto Analítico
P8	8º dia pós-natal
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
ZVS	Zona Subventricular
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Sumário

Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. Introdução	12
2. Revisão de Literatura	16
2.1. Desenvolvimento fetal	17
2.2. Proliferação, apoptose e maturação neural	18
2.3. Integrina e VEGF	19
2.4. Anomalias Congênitas	21
3. Objetivos	24
4. Material e Métodos	26
5. Análise Segmentada	29
5.1. Experimento I – Indução de DFTN	30
5.2. Experimento II – Desenvolvimento do modelo cirúrgico	42
5.3. Experimento III – Maturação neuronal na heterotopia encefálica experimental	54
5.4. Experimento IV – Proliferação e morte celular na heterotopia encefálica experimental	63
5.5. Experimento V – Expressão da Integrina β 1 e VEGF na heterotopia encefálica experimental	73
6. Considerações Finais	81
7. Conclusões	84
Referências	86
Apêndices	97
Anexo A	102

1. Introdução

A presença de tecido encefálico heterotópico no pulmão, ocasionalmente observado em seres humanos, é uma anormalidade rara e geralmente associada a Defeitos de Fechamento do Tubo Neural (DFTN), principalmente anencefalia, mielomeningocele e má formação craniofacial (CHEN et al., 1982; KANBOUR et al., 1979; PERES et al., 2003), existindo apenas um caso descrito na literatura de tecido heterotópico cerebral no pulmão de um indivíduo adulto, sem DFTN, que morreu após um acidente vascular cerebral (KING, 1938). A patogênese dessa anormalidade ainda é discutida, sendo as mais plausíveis a implantação pulmonar de fragmentos cerebrais aspirados do líquido amniótico (CHEN et al., 1982; KERSHISNIK et al., 1992; PERES et al., 2003), a embolização do tecido encefálico (BAERGEN et al., 1997; VALDES-DAPENA; AREY, 1967), a protrusão embrionária de estruturas cerebrais que são subsequentemente deslocadas de sua posição normal e os defeitos de migração neural (CAMPO; BOMBI, 1981; KANBOUR et al., 1979).

Muito embora o tecido neural heterotópico tenha sido descrito em locais como a mandíbula (OKEDA, 1978), região nasal (NISHIO et al., 1988) e peritônio (CHEN et al., 1982; ROBBOY; SCULLY, 1970), é no pulmão que ele aparece com maior frequência (BAERGEN et al., 1997; KERSHISNIK et al., 1992; MORGAN et al., 2003; PERES; BARBOSA, 2005). A implantação e crescimento de tecido glial no pulmão reflete um potencial proliferativo destas células, que ainda não está bem estabelecido (CHEN et al., 1982; KANBOUR et al., 1979). Assim, não existem estudos mais aprofundados relacionados com essa anormalidade, nem mesmo relatos na literatura de algum método para tentar reproduzi-la.

Desta maneira, o desenvolvimento de modelo experimental para induzir as heterotopias de tecido encefálico no pulmão e a investigação dos fenômenos decorrentes desse processo, bem como o estudo da expressão dos receptores celulares, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de migração, implantação e crescimento desses tecidos fora do seu local de origem e, talvez, esclarecer outros fenômenos patológicos, como os processos invasivos de neoplasias e a implantação de células e tecidos normais ou não, interação celular, angiogênese e desenvolvimento do tecido nervoso, entre outros.

Modelos experimentais de DFTN podem ser produzidos experimentalmente com a administração de etanol (GUTIERREZ et al., 2007), ácido retinóico (QUEMELO; LOURENÇO; PERES, 2007), vitamina A (MENDONÇA; GUTIERREZ; PERES, 2005) e deficiência de ácido fólico (YANAGUITA et al., 2007), entre outros. Esses modelos poderiam potencialmente produzir heterotopias encefálicas no pulmão, pois já se demonstrou a presença destes fragmentos no líquido amniótico em condições de serem aspirados (MENDONÇA; GUTIERREZ; PERES, 2005), porém não existem dados na literatura mostrando a implantação de tecido encefálico no pulmão em tais condições e resultados do laboratório de Patologia Pediátrica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo não encontraram evidências de que isso ocorra.

Assim, o desenvolvimento de um modelo experimental para induzir as heterotopias de tecido encefálico no pulmão, através de cirurgia fetal intra-útero, poderá contornar as dificuldades encontradas nos modelos de DFTN. Além disso, os modelos de DFTN e os casos de humanos relatados na literatura apresentam-se com pouco tempo de vida, principalmente por terem grave lesão

cerebral (PERES; BARBOSA, 2005), o que dificulta e até mesmo impossibilita o estudo e acompanhamento destas células após o nascimento. Assim, o modelo cirúrgico parece ser mais adequado, pois permitirá um melhor controle e acompanhamento deste tecido por diferentes períodos gestacionais e pós-natal, e será de grande utilidade não somente para o entendimento dos mecanismos de interação e desenvolvimento desse tecido, mas também poderá servir como modelo para outros tecidos ou células, como por exemplo, a implantação de células-tronco.

2. Revisão da literatura

2.1. Desenvolvimento fetal

O desenvolvimento fetal inicia-se com a fecundação do óvulo pelo espermatozóide, e, a partir dessa única célula chamado zigoto, começa todo o processo de divisão, migração e diferenciação das células em diferentes tipos de tecidos. Na terceira semana gestacional, período muito importante e crítico do desenvolvimento embrionário, ocorre a formação dos três folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. Estes três folhetos originam os diferentes tipos de tecidos. O ectoderma dá origem ao epitélio externo e ao sistema nervoso. O mesoderma dá origem aos tecidos conjuntivos, vasos e musculatura e o endoderma origina o epitélio de revestimento das vias respiratórias e trato digestivo, além das glândulas associadas a ela, como fígado e pâncreas (JUNQUEIRA; ZAGO, 1972).

O tecido pulmonar inicia o seu desenvolvimento por volta da quarta semana gestacional, a partir de um sulco mediano longitudinal, chamado de laringotraqueal. O pulmão sofre uma extensa proliferação celular, ramificações morfogênicas e a formação dos sacos alveolares, gerando uma área de superfície suficiente para os mecanismos de troca gasosa. As células pulmonares se diferenciam em pelo menos 40 tipos de linhagens distintas. Fatores transcricionais específicos, fatores de crescimento peptídicos mediados por receptores, componentes da matriz extracelular e a sinalização através das integrinas, interagem na morfogênese pulmonar e na diferenciação de linhagens de células pulmonares (WARBURTON et al., 1998).

O sistema nervoso (SN) inicia o seu desenvolvimento um pouco mais cedo, na fase de gastrulação, por volta da segunda semana gestacional quando são formados os folhetos embrionários e o nó de Hensen. O SN é derivado do tubo neural e das cristas neurais, que apresentam origem ectodérmica. Quando o tubo neural se fecha, as cristas neurais se destacam dele, formando vários componentes do SN (ACLOQUE et al., 2001; GIEHL, 2007; STERN, 2005).

2.2. Proliferação, apoptose e maturação neural

O desenvolvimento e a maturação do SN de roedores é sequencialmente semelhante ao de seres humanos, ocorrendo em uma escala de tempo de dias versus semanas/meses, respectivamente. Enquanto que a maturação neuronal em humanos é consideravelmente maior no período pré-natal, em roedores ela é maior no período pós-natal (RICE; BARONE, 2000). Este processo está diretamente relacionado com o crescimento e a morte celular durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) que envolve programas celulares intrínsecos e extrínsecos, determinantes para o destino da célula (BLASCHKE; STALEY; CHUN, 1996; MASHAYEKHI, 2008; OPPENHEIM, 1991).

O processo de proliferação e apoptose é essencial para a formação do SN, uma vez que durante o início da gestação ocorre uma produção excessiva de neurônios e que o seu ajuste de tamanho e quantidade ocorre com o passar da gestação e após o nascimento. Desta maneira, a relação entre o processo de crescimento e morte celular é fundamental para o desenvolvimento adequado do SN (GORDON, 1995; MASHAYEKHI, 2008; OPPENHEIM, 1991; RAFF, 1992).

2.3. Integrina e VEGF

Vários mecanismos de interação e sinalização celular são determinantes para o desenvolvimento e a formação das diversas partes do encéfalo (ACLOQUE et al., 2001; GIEHL, 2007; STERN, 2005).

Uma das principais classes de famílias de receptores celulares que promovem as interações celulares e a sinalização entre célula-célula e célula-matriz extracelular (ECM) são as integrinas. Elas estão localizadas na superfície das células e consistem de duas subunidades, α e β . A subunidade $\beta 1$ pode estar associada com pelo menos 10 diferentes subunidades α , constituindo a maior subfamília entre as integrinas. Estes receptores transmembrana pertencem a uma extensa família cátion-dependente e são constituídos por uma região N-terminal de domínio extracelular maior e uma pequena parte C-terminal de domínio intracelular, que promovem interações com uma variada quantidade de ligantes, incluindo proteínas e moléculas na superfície das células (ALBERTS et al., 2002). Elas promovem a interação das células com o meio extracelular, tendo um papel importante na ancoragem, interação e integridade das células (ARCANGELIS, 2000; HANASHI et al., 2003; RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987)

As integrinas também se mostram capazes de promover alterações na expressão gênica, o que determina diferentes respostas no processo de fertilização, embriogênese, implantação e placentação (DAMSKY; SUTHERLAND; FISHER, 1993; HANASHI et al., 2003; SIMON et al., 1999; ZHOU; DAMSKY; FISHER, 1997). Fatores transcricionais específicos, fatores de crescimento peptídicos mediados por receptores, componentes da matriz

extracelular e a sinalização através das integrinas, são fundamentais para a morfogênese dos tecidos (WARBURTON et al., 1998).

Estudos apontam que as integrinas, juntamente com outras moléculas de adesão, como a quinase de adesão focal (FAK, do inglês *focal adhesion kinase*), são determinantes para a ancoragem, interação, organização e manutenção da integridade dos tecidos (GUSMÃO et al., 2007; HANASHI et al., 2003; ROUGON; HOBERT, 2003).

Além destas moléculas, os fatores de crescimento, que são um conjunto de substâncias, a maioria de natureza protéica, também desempenham uma importante função no desenvolvimento e sobrevivência dos tecidos.

Dentre estas substâncias, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é uma glicoproteína homodimérica de 34-46kDa, natural do organismo, produzida por vários tipos celulares em resposta a inúmeros estímulos. O VEGF é uma proteína cujo papel básico é a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) para auxiliar o crescimento de tecidos e órgãos, bem como no processo de reparação e tumorigênese (SIEKMANN; COVASSIN; LAWSON, 2008).

Quase todas as células, em quase todos os tecidos de um vertebrado, estão localizadas próximas a um vaso capilar. Assim, a regulação de crescimento sanguíneo para corresponder às necessidades do tecido depende do controle da produção de VEGF, que é regulado pela concentração de oxigênio. Quando ocorre a falta de oxigênio, ativa-se uma proteína chamada fator I induzido por hipoxia (HIF-1, do inglês *Hypoxia-Inducible Factor I*), que estimula a transcrição do gene VEGF, o qual se difunde através do tecido e atua

sobre as células endoteliais próximas, fazendo-as proliferar e invadir o tecido pouco oxigenado para supri-lo com vasos sanguíneos novos (ALBERTS et al., 2002).

Assim, vários fatores genéticos, ambientais e aqueles relacionados com a expressão das integrinas e VEGF, bem como de outras moléculas sinalizadoras, podem influenciar o desenvolvimento e sobrevivência das células, bem como provocar alterações patológicas importantes, principalmente durante o início da gestação.

2.4. Anomalias Congênitas

As anomalias congênitas humanas são observadas em cerca de 2 a 3% dos recém-nascidos vivos, porcentagem que dobra quando são incluídas as anomalias diagnosticadas durante os primeiros anos de vida (BUYSE, 1990; CARLSON, 1994; SAXÉN; LAPOLA, 1969). Os DFTN são anomalias congênitas que resultam do não fechamento correto do tubo neural embrionário e estruturas suprajacentes no início do desenvolvimento. São classificados como anterior ou posterior, de acordo com a sua localização ao longo do comprimento do tubo neural (BARBER et al., 1999). Os DFTN são relativamente comuns, com uma frequência de 0,2 – 3,5 para cada 1000 mulheres grávidas, dependendo da etnicidade e localização geográfica (GREENE; COPP, 2005). Em Ribeirão Preto, elas são o segundo principal grupo de anomalia congênita isolada, superados apenas pelas cardiopatias congênitas (PERES, 2006).

A maior parte dos DFTN é multifatorial em sua patogênese, com ambos os fatores genético e ambiental contribuindo para seu desenvolvimento (BARBER et al., 1999). São particularmente importantes os decorrentes da deficiência de

ácido fólico materno (YANAGUITA et al., 2007), bem como aqueles associados à ingestão de etanol (GUTIERREZ et al., 2007) e a administração do ácido retinóico (QUEMELO; LOURENÇO; PERES, 2007), que é utilizado para tratamento de afecções cutâneas em mulheres jovens (KHOGA; OBATA, 1992), por exemplo.

A vitamina A e seus metabólitos, coletivamente chamados de retinóides, são essenciais ao desenvolvimento embrionário adequado. Os retinóides são importantes moléculas sinalizadoras na regulação da diferenciação celular, proliferação e morfogênese. Os níveis inadequados desses compostos (seu excesso ou deficiência) podem resultar em um conjunto de defeitos denominado embriopatia pelo ácido retinóico, que pode provocar DFTN (KUNO; KADOMATSU; MURAMATSU, 1999; MULDER et al., 2000; ROSS et al., 2000), além de anomalias congênitas de membros (ALI-KHAN; HALES, 2006) e de outras manifestações esqueléticas (QUEMELO; LOURENÇO; PERES, 2007; ZILE, 1998).

Os DFTN, muitas vezes, acompanham-se de outras alterações, tais como heterotopias ou ectopias de tecido cerebral e defeitos ósseos craniofaciais, tornando ainda mais complexos estes problemas. Os casos humanos de heterotopia encefálica no pulmão são raros e essencialmente limitados pela gravidade dos defeitos primários. No entanto, a sua existência implica na necessidade de se entender os mecanismos biológicos envolvidos com a implantação, proliferação, diferenciação e sinalização do tecido neural em um local diferente em termos morfológicos, estruturais e moleculares, justificando

assim, a criação de um modelo experimental para tentar reproduzir as heterotopias e estudar os fenômenos decorrentes desta anormalidade.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver um modelo experimental para a indução de heterotopia encefálica no pulmão e estudar o seu desenvolvimento.

3.2 Objetivos específicos

1- Analisar a presença de tecido encefálico heterotópico no pulmão de fetos de camundongos com DFTN induzidos pela administração de ácido retinóico.

2- Produzir um modelo experimental de tecido encefálico heterotópico no tórax através de cirurgia fetal intra-útero.

3- Analisar o processo de desenvolvimento e maturação neuronal em modelo experimental de tecido encefálico heterotópico no pulmão.

4- Estudar o comportamento proliferativo e apoptose do tecido ectópico encefálico.

5- Analisar a implantação, adesão, angiogênese e interação entre o tecido encefálico e o pulmonar.

4. Material e Métodos

Como o estudo constou de vários experimentos sequenciais, será primeiro feita a descrição geral e do que foi comum a todos eles e, subsequentemente, cada um separadamente, naquilo que foi específico.

Animais

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), protocolo número 018/2005 (Anexo A).

Todos os animais utilizados nos diferentes experimentos foram camundongos, linhagem *Swiss*, fêmeas e machos, numa proporção de 3/1 para acasalamento, originários da colônia do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais, adultos jovens, com peso médio de 40g para as fêmeas e 50g para os machos, receberam dieta apropriada e água fresca *ad libitum*. O ambiente no qual os animais permaneceram durante todo o experimento é equipado com proteção sonora, rigoroso controle de ciclos claro/escuro de 12 horas cada, baixa luminosidade, temperatura constante de 22°C e exaustão automática com várias trocas de ar ao longo do dia.

Após o período de adaptação, as fêmeas foram colocadas em contato diário com os machos para o acasalamento. Durante esse período, foi verificada a presença de tampão vaginal que, quando presente, determinava o dia zero da gestação. As fêmeas prenhes foram separadas e mantidas até o final do experimento em caixas plásticas individuais.

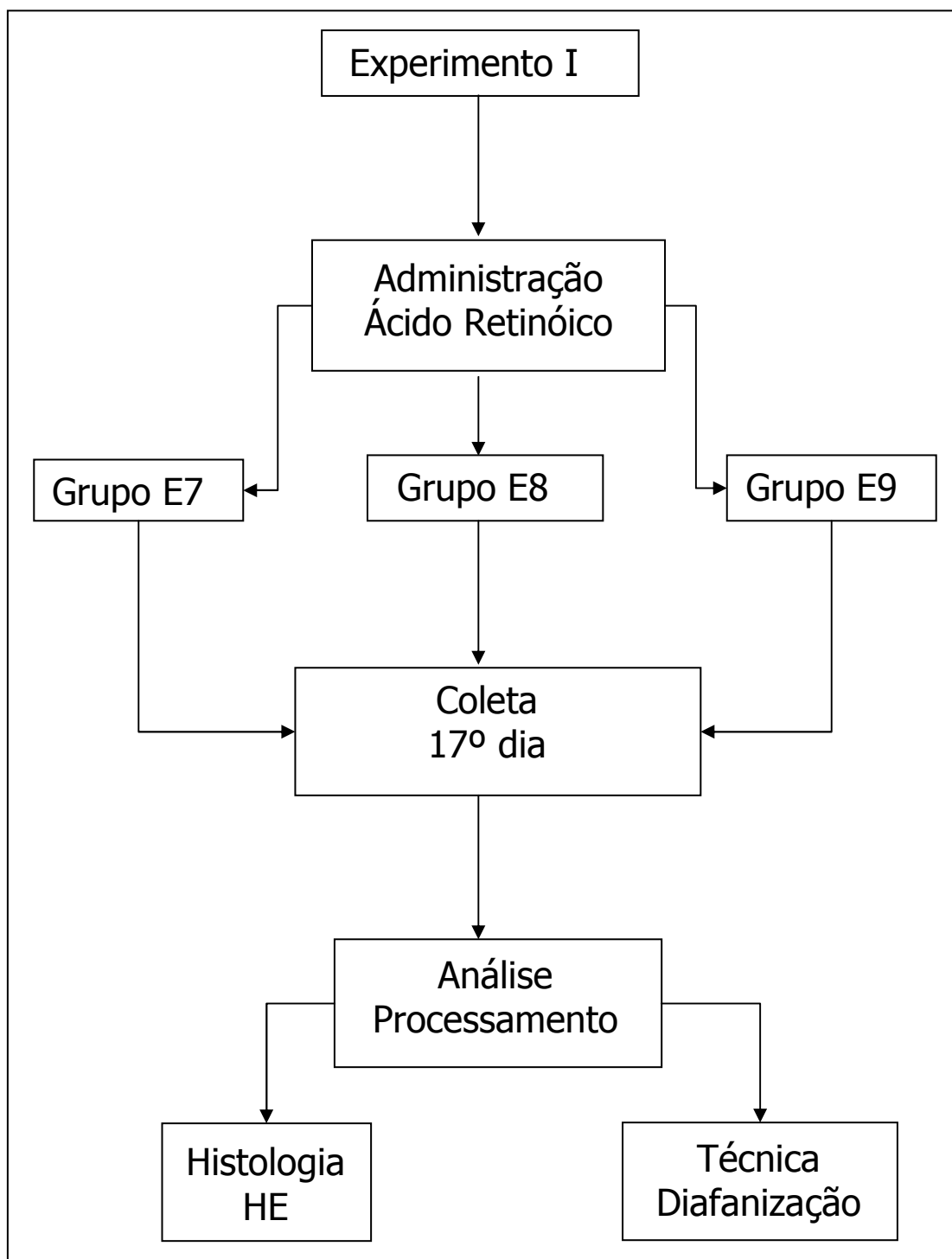
Análise Estatística

Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica no Microsoft Excell[®]. As informações foram analisadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.00, (Prism, Clicago, IL, USA). Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com os objetivos a serem analisados e serão descritos separadamente para cada experimento. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

5. Análise Segmentada

5.1. Experimento I – Indução de DFTN

Organograma experimento - I



Material e Métodos - I

Foram utilizados 24 camundongos fêmeas prenhes. Primeiramente, foi padronizada a dose de ácido *all-trans*-retinóico em diferentes dias gestacionais, sendo utilizadas doses desde 30mg/Kg até 120mg/Kg (KUNO; KADOMATSU; MURAMATSU, 1999; MULDER et al., 2000; TOM; JURILOFF; HARRIS, 1991). Observamos que doses iguais ou superiores a 80mg/Kg provocavam muitas reabsorções, enquanto que doses inferiores a 60mg/Kg causavam poucos defeitos, determinando, assim, que a dose ideal para o camundongo *Swiss* é de 70mg/Kg.

Após a padronização do ácido retinóico (AR), as fêmeas prenhes foram divididas aleatoriamente em 4 grupos com 6 animais cada: Controle (C), 7º dia gestacional (E7), 8º dia gestacional (E8) e 9º dia gestacional (E9).

Os grupos experimentais receberam uma única injeção intraperitoneal de AR (70mg/Kg) diluída em óleo de girassol, que de acordo com o grupo ocorreu no dia gestacional 7, 8 ou 9. Os animais do grupo controle (C), por sua vez, receberam apenas solução salina, pela mesma via e com igual volume, no 8º dia gestacional.

As fêmeas foram mortas em câmara de CO₂ no 17º DG e submetidas a operação cesareana por incisão cirúrgica na linha média abdominal, com exposição da cavidade peritoneal. Ambos os cornos uterinos foram retirados, colocados em placa de Petri limpa, abertos longitudinalmente, expondo os sacos gestacionais para a retirada dos fetos vivos (foram retirados também aqueles com morte fetal tardia e as reabsorções, quando presentes). O material

obtido foi examinado externamente com lupa, fotografado e fixado em formalina tamponada a 10% por 24 horas.

Em seguida, em uma parte do material (n= 18 fetos) os troncos foram isolados por corte transversal na região cervical e abdominal, e a cabeça foi separada em três partes por dois cortes coronais. O material foi colocado individualmente em cassetes plásticas, desidratado em concentração crescente de etanol, diafanizado em xilol e, posteriormente, incluído em parafina.

Os blocos resultantes foram seccionados em micrótomo rotativo (HM 330 da Marca Microm®), obtendo-se cortes histológicos de 4µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas de vidro novas e limpas. Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina (HE) e as análises foram realizadas em microscópio de luz convencional.

Outra parte do material foi fixada em etanol (70%), e os fetos desengordurados em acetona, passados novamente por etanol (95%) e transferidos para uma solução de hidróxido de potássio a 2% até os ossos ficarem visíveis, seguindo-se coloração em uma solução de Alizarin Red a 0,01% (H₂O) em hidróxido de potássio a 1% até os ossos ficarem corados em vermelho. Posteriormente, os fetos foram colocados em solução de glicerina pura e as análises foram realizadas em microscópio estereoscópico com registro fotográfico.

Durante todo o experimento, foram registrados o número de implantes, reabsorções e morte fetal tardia. A análise estatística foi realizada com programa GraphPad Prism 4.00, com os testes ANOVA, Kruskal-Wallis e Tukey, considerando $p < 0,05$.

Resultados - I

Em relação aos fetos vivos, todos os grupos apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,001$). As reabsorções foram maiores nos grupos E7 e E8 em comparação com os grupos E9 e C ($p < 0,001$), no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos E7 e E8 e entre os grupos E9 e C. O grupo E8 apresentou ainda aumento no número de mortes fetais tardias em relação aos grupos C e E9 ($p < 0,05$) como mostra a tabela 1.

As anomalias congênitas foram mais comuns nos grupos E7 e E8 do que no grupo E9 (Tabela 2). Os DFTN foram encontrados em 17 fetos (54,8%) do grupo E7 e 42 fetos (76,3%) do grupo E8, mas não foi observado no grupo D9. Entre os DFTN, observou-se a preponderância de fetos com espinha bífida oclusa (Figura 1-I), seguidos de mielomeningocele (Figura 1-J) e exencefalia (Figura 1-E, 1-F, 1-G e 1-H). Houve diferença estatística entre o número de fetos com DFTN dos grupos E7 e E8 em comparação com os grupos C e E9, mas não entre os mesmos (Tabela 1 e 3).

As anomalias congênitas da parede abdominal, onfalocele (figura 1-M) e gastrosquise (Figura 1-N), foram observadas apenas nos grupos E7 e E8, sendo este último estatisticamente diferente dos grupos C e E9 ($p < 0,001$).

Os defeitos de membro inferior (Figura 1-i e 1-L) ocorreram nos grupos E7 e E8 ($p < 0,001$). Já os defeitos de membro superior foram observados no grupo E9 ($p < 0,05$). Os defeitos de membros englobaram defeitos digitais, como sindactilia (Figura 1-O), polissindactilia (Figura 1-P), braquidactilia e até mesmo focomelia, como mostra a figura 1-K. A regressão caudal (imperfuração anal,

agenesia/redução da cauda - Figura 1-I e 1-J), foi observada em todos os fetos de todos os grupos experimentais ($p < 0,001$).

Ao exame externo com lupa dos fetos diafanizados, evidenciaram-se alterações ósseas, principalmente do membro superior (rizomesomelia) no grupo E9 (Figura 2-E) e defeitos do membro inferior (Figura 2-F e 2-G) nos grupos E7 e E8. Nos grupos E7 e E8, também foram observadas fusões entre costelas inferiores contíguas (2-G e 2-H).

Ao exame microscópico dos troncos fetais não foi observado nenhum fragmento de tecido encefálico no pulmão.

Tabela 1 - Análise estatística entre o grupo controle e os diferentes grupos experimentais para o número de fetos vivos, morte fetal tardia, reabsorções e malformação

Achados – Valor de P							
Grupos	FV	MFT	Reabsorção	DFTN	APA	AMM	RC
C e E7	P<0,001	n.s.	P<0,001	P<0,001	n.s.	P<0,001	P<0,001
C e E8	P<0,001	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
C e E9	P<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,001
E7 e E8	P<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E7 e E9	P<0,001	n.s.	P<0,001	P<0,001	n.s.	P<0,001	n.s.
E8 e E9	P<0,001	P<0,05	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	n.s.

C= Controle, E= Dia gestacional, FV= Fetos Vivos, MFT= Morte Fetal Tardia, DFTN= Defeito de Fechamento do Tubo Neural, APA= Alteração da Parede Abdominal, AMM= Alteração de Membros, RC= Regressão Caudal. n.s.= não significante.

Tabela 2 - Resultados do tratamento com ácido retinóico em fetos de camundongos *Swiss* nos diferentes dias gestacionais. Número de fetos vivos, morte fetal tardia, reabsorções e malformação nos diferentes dias gestacionais.

Achados	Grupos			
	C (n=76)	E7 (n=31)	E8 (n=55)	E9 (n=75)
Fetos Vivos	76 (100%)	31 (100%)	55 (100%)	75 (100%)
Exencefalia	-	5 (16,1%)	14 (25,4%)	-
Mielomeningocele	-	8 (25,8%)	17 (30,9%)	-
EBO	-	9 (29%)	23 (41,8%)	-
Gastrosquise	-	2 (6,4%)	3 (5,4%)	-
Onfalocele	-	2 (6,4%)	8 (14,54%)	-
Anus	-	31 (100%)	55 (100%)	75 (100%)
Cauda	-	31 (100%)	55 (100%)	75 (100%)
Membro Superior	-	-	-	5 (6.6%)
Membro Inferior	-	23 (74,19%)	44 (80%)	-
MFT	-	1 (1,2%)	6 (5,7%)	1 (1,3%)
Reabsorção	-	48 (60%)	44 (41,9%)	1 (1,3%)
Malformação	-	31 (100%)	55 (100%)	75 (100%)

EBO= Espinha bífida ocluta, MFT= Morte fetal tardia, E= dia gestacional

Tabela 3 - Análise estatística entre o grupo controle e os diferentes grupos experimentais para as malformações.

Grupos	Alterações – Valor de P							
	EX	Miel	EBO	Onf	MS	MI	Anus	Cauda
C e E7	P<0,05	P<0,001	P<0,001	n.s.	n.s.	P<0,001	P<0,001	P<0,001
C e E8	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	n.s.	P<0,001	P<0,001	P<0,001
C e E9	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	P<0,05	n.s.	P<0,001	P<0,001
E7 e E8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
E7 e E9	P<0,05	P<0,001	P<0,001	n.s.	n.s.	P<0,001	n.s.	n.s.
E8 e E9	P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001	n.s.	P<0,001	n.s.	n.s.

C= Controle, E=Dia Gestacional, EX=Exencefalia, Miel=Mielomeningocele,

EBO=Espinha Bífida Ocluta, Onf=onfalocele, MS=alterações dos Membros Superiores,

MI=alterações dos Membros Inferiores. n.s.= não significante.



Figura 1. Fotos macroscópicas de fetos selecionados. A, B, C e D são os fetos controles. E, F, G e H são fetos com exencefalia, este último apresenta, além disso, uma má formação da face. I, espinha bífida oculta, alterações do membro inferior, agenesia de cauda e ânus. J, mielomeningocele. K, feto com alteração dos membros superiores (rizomesomelia). L, apresenta alterações nos membros inferiores. M, onfalocele. N, gastrosquise. O, sindactilia e P, polissindactilia.

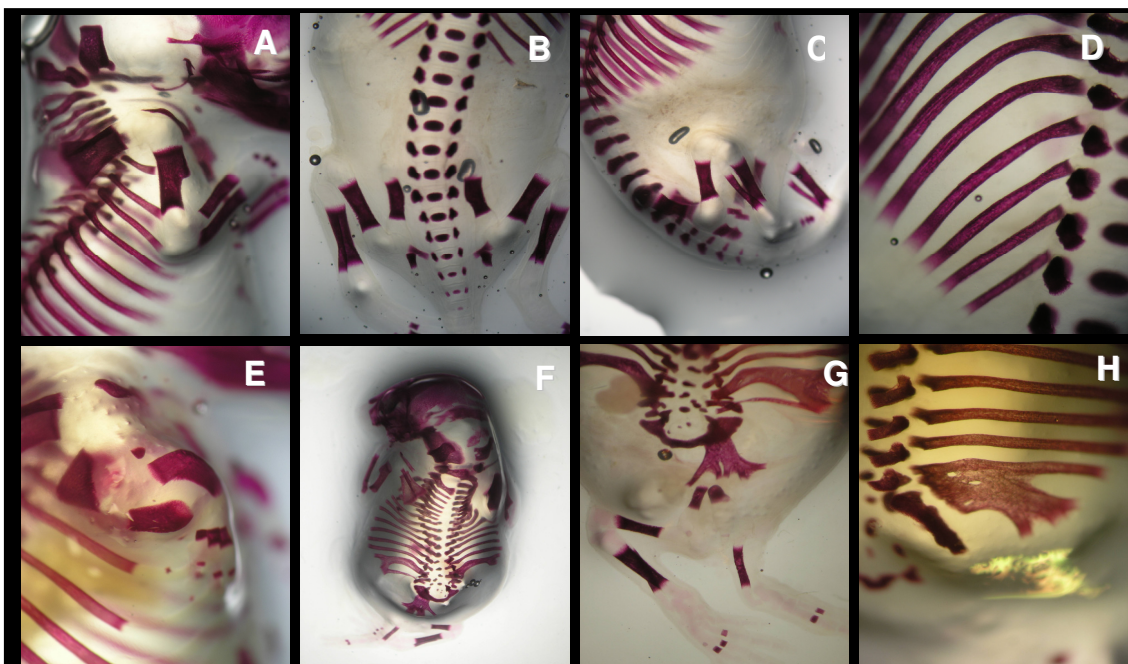


Figura 2. Fotos de fetos selecionados diafanizados. A, B, C e D são os fetos controles. E, feto com alterações nos membros superiores (rizomesomelia), notar o encurtamento comparado com o controle. F e G apresentam regressão caudal (hipoplasia da pélvis e agenesia do fêmur e fíbula). G e H apresentam fusão de costelas (Técnica de Diafanização e Coloração com Alizarin).

Discussão - I

Os DFTNs encontrados em nosso estudo indicam que os grupos E7 e E8 foram os mais afetados, principalmente o último, talvez por esse ser o período crítico no processo migratório das células da crista neural cranial em camundongos *Swiss* (MADEN, 2006). O adequado padrão de migração dessas células é essencial na morfogênese craniofacial e é altamente conservado entre os vertebrados. Sua migração é intimamente relacionada com segmentação precoce do tubo neural, de forma que elas migram, discretamente, em pequenos “fluxos” (KULESA; ELLIS; TRAINOR, 2004). Nossos resultados indicam que esta migração ocorre até o 8º DG, uma vez que não foi observado

nenhum feto com DFTN no 9º DG, o que está de acordo com os dados de Kuno, Kadomatsu e Muramatsu, em 1999.

Entre os DFNT, houve neste estudo preponderância de fetos com espinha bífida oculta, fato também observado em outros trabalhos (DIEZ-PARDO et al., 1995), seguidos de mielomeningocele e exencefalia, o que é coerente com a “*multisite closure theory*” (PADMANABHAN, 2006).

A exencefalia é o defeito mais grave e comumente incompatível com a vida. Pudemos observar que a administração de AR utilizando camundongo *Swiss* provocou exencefalia em 25% dos casos, o que está de acordo com a literatura. Estudos experimentais com administração de AR provocaram exencefalia em 14% em camundongos SWC/Bc e 22% em ICR/Bc (TOM; JURIOFF; HARRIS, 1991). Entretanto, outras linhagens modificadas geneticamente (SELH/Bc) e camundongos ICR podem induzir quantidade maior de fetos com exencefalia, 53% e 81%, respectivamente (KUNO; KADOMATSU; MURAMATSU, 1999; TOM; JURIOFF; HARRIS, 1991). Apesar dos resultados muito interessantes com modelos experimentais knock-out, estes são dispendiosos, necessitam de cuidados especiais e são de difícil manipulação, já a utilização de camundongo *Swiss* apresenta-se como um modelo experimental barato, de fácil manipulação e eficiente para a indução dos diferentes tipos de defeitos.

Nossos resultados apontaram também que, nos grupos E7 e E8, ocorreu um maior número de fetos com alterações nos membros ($p < 0,001$), o que ressalta mais uma vez esses dias como período crítico na formação embrionária e indica o papel dos retinóides no processo de formação do esqueleto

apendicular (NISWANDER, 2003; YASHIRO et al., 2004). O AR interage com receptores nucleares RAR e RXR, que reconhecem a seqüência dentro dos genes alvos, chamados de elementos de respostas do AR (RARE), afetando a regulação e formação próximo-distal dos membros e alterando a expressão de vários genes (Fgf8, Shh, Ptc1, Gli3, dHand). Esses elementos ativam a expressão dos genes *Hox*, que participam da orientação ântero-posterior do eixo, da crista neural, do mesoderma paraxial e dos membros. Desta forma, o excesso de AR pode provocar modificações na expressão dos genes *Hox*, causando posteriorização de estruturas anteriores. Como as regiões anteriores geralmente são mais sensíveis ao AR, elas não se desenvolvem normalmente nestas condições, resultando em defeitos nos membros (MARSHALL et al., 1996; SPORN; ROBERTS; GOODMAN, 1994; YASHIRO et al., 2004). Adicionalmente, a expressão da CYP26B1 também está implicada nas anomalias de membros verificadas em modelos animais, já que ela se expressa na parte distal do broto do membro e sua ação é influenciada pelos níveis circulantes do ácido retinóico (YASHIRO et al., 2004).

A fusão de costelas torácicas inferiores, observada apenas nos grupos E7 e E8, é uma anomalia esquelética que faz parte do espectro disruptivo dos efeitos teratogênicos do ácido retinóico, que inclui também hemivértebras e anomalias de bacia, tanto em humanos como em animais. Apesar de reconhecida, seu mecanismo fisiopatológico ainda não está claramente elucidado, embora os efeitos desse teratógeno sobre os genes *Hox* estejam também implicados nesse processo a partir de alguns trabalhos experimentais (KAWANISHI et al., 2003).

A regressão caudal observada em todos os grupos experimentais não possui mecanismo patogênico conhecido, embora etiologia vascular seja especulada. Animais tratados com ácido retinóico apresentaram anomalias de cauda além de espinha bífida oculta, chegando, em alguns casos, a apresentações extremas, tal como sirenomelia (PADMANABHAN, 1998).

Onfalocele e gastrosquise, observados em alguns animais dos grupos E7 e E8, não são anomalias comuns na embriopatia pelo ácido retinóico, embora já tenham sido descritas na literatura (PADMANABHAN, 1998). Esses achados podem ser explicados pelo período crítico de desenvolvimento da parede abdominal, que se inicia por volta do oitavo dia gestacional e pode se estender até o 12º dia, quando é formada a parede abdominal primária do camundongo (BREWER; WILLIAMS, 2004). No entanto, o ácido retinóico parece ter um efeito teratogênico apenas no início da formação da parede abdominal, pois não foi encontrada nenhuma alteração no grupo E9.

O espectro malformativo associado ao ácido retinóico é amplo e começou-se a compreender os mecanismos subjacentes a esse processo, através de modelos experimentais knock-out para determinados genes. Nosso trabalho utilizando camundongos *Swiss* evidência que os efeitos desse teratógeno possuem correlação temporal e espacial nos embriões, mas também alude à grande sobreposição fenotípica desses casos, sugerindo que, de fato, as interações moleculares do ácido retinóico são mais amplas do que se imaginava anteriormente e constituem um campo de excelência para a teratologia experimental.

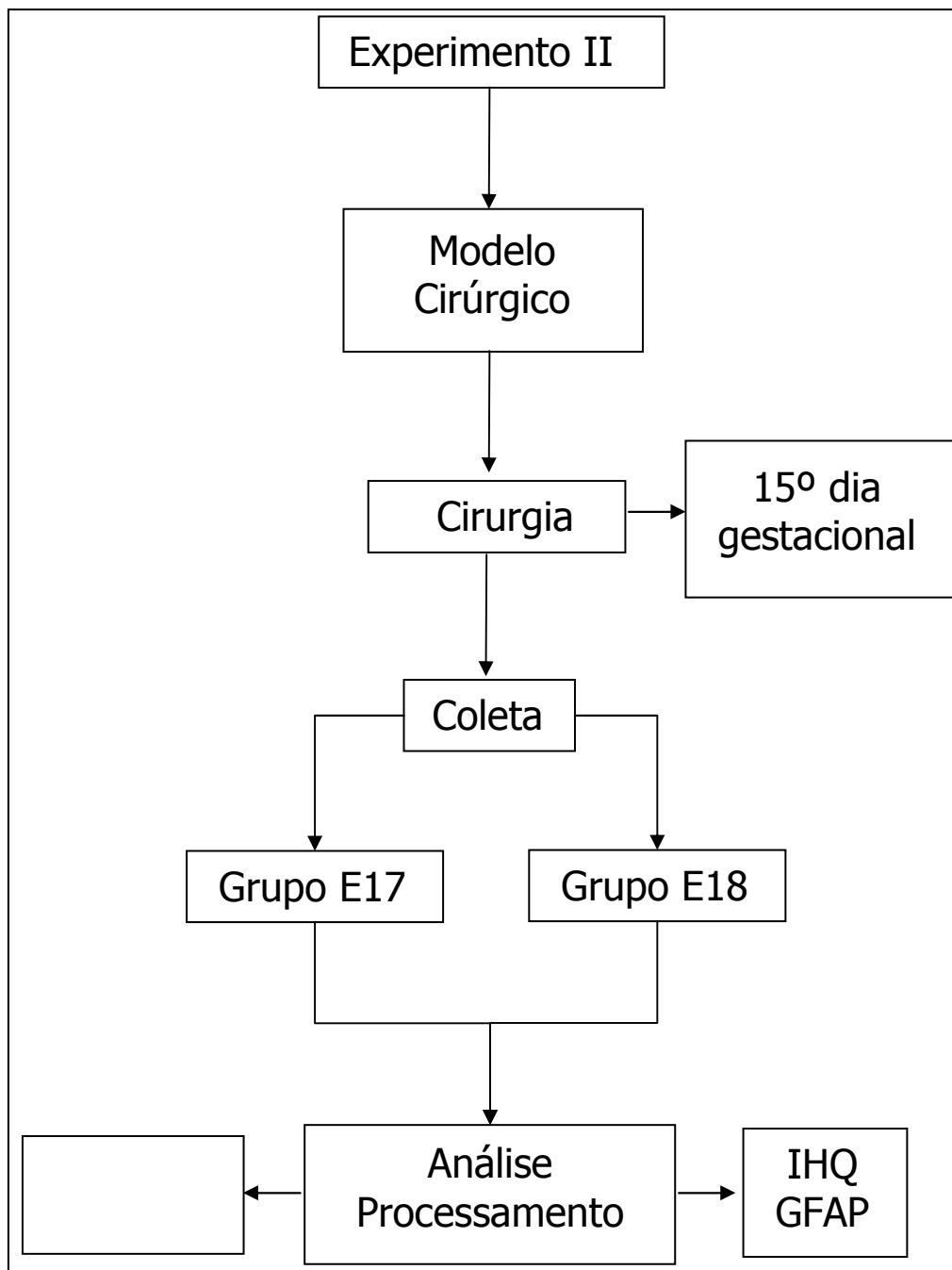
O modelo experimental com camundongo *Swiss* mostrou-se eficiente não só para indução de DFTN, como também alterações do esqueleto apendicular e regressão caudal. Pudemos observar que as anomalias no grupo E9 foram mais brandas, possivelmente por não ter atingido o período crítico da formação de vários tecidos, embora tenham ocorrido sinais de regressão caudal. Neste estudo, embora ambos E7 e E8 sejam propícios para a indução de defeitos no desenvolvimento, este último foi aquele no qual nós observamos maior número de defeitos, principalmente os DFTN.

Apesar de ter sido frustrada a heterotopia encefálica pulmonar neste modelo, os resultados deste estudo foram publicados, explorando os efeitos do AR sobre o desenvolvimento de camundongo *Swiss* – **Apêndice A.**

5.2. Experimento II – Desenvolvimento do modelo cirúrgico

Para contornar as dificuldades na obtenção de heterotopia encefálica utilizando modelo de DFTN, no caso induzido pelo AR, foi idealizado um modelo cirúrgico fetal a seguir descrito.

Organograma experimento – II



Material e Métodos - II

Foram utilizados 24 camundongos fêmeas prenhes divididas em dois grupos com 12 animais cada, denominados 17º DG (grupo E17) e 18º DG (grupo E18), indicativos do dia gestacional em que foi realizada a cirurgia para retirada dos fetos.

A cirurgia foi realizada no período da manhã do 15º dia da gestação em condições assépticas. O animal era anestesiado com injeção na musculatura lateral da coxa de 0,1 ml de solução de Ketamina base- (50mg/ml) (Ketamina® -Pfizer do Brasil Ltda. São Paulo-SP, Brasil) e Xilazina (10mg/ml) (Rompum® - Bayer do Brasil Ltda. São Paulo-SP, Brasil), utilizando seringa e agulha de insulina.

O abdome foi raspado com lâmina de barbear, feita antissepsia com álcool 70% e colocação dos campos cirúrgicos estéreis, procedendo-se à laparotomia mediana com abertura por planos (pele e aponeurose/peritônio) até a exposição dos cornos uterinos. Durante todo procedimento, os cornos uterinos foram umedecidos com solução salina (NaCl 0,9%) aquecida a 38 °C e gotejada com seringa de 10 ml.

Os fetos foram contados da região proximal para distal em relação ao corno uterino, iniciando-se a contagem pelo corno uterino direito. O primeiro feto foi retirado por histerotomia para ser o doador do tecido encefálico.

Primeiramente era realizada uma sutura em bolsa com fio de Prolene® calibre 6-0 (Polysuture Ind. E Com., São Sebastião do Paraíso-MG, Brasil) e em seguida eram abertas a camada muscular do útero e a membrana amniótica, retirando-se o feto, com fechamento subsequente da parede uterina. O feto era

colocado em placa de Petri estéril, decapitado, sendo o tecido encefálico retirado após abertura do crânio, colocando-o em meio de cultura RPMI (Medium 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio – GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), picotado com tesoura oftálmica e corado com Azul de Evans a 1%. Após este procedimento, o material era aspirado com seringa de insulina e agulha 20G, introduzindo-se 0,02 ml no hemitórax direito do segundo, terceiro e quarto fetos subseqüentes, denominados IEP – Implantação Encefálica Pulmonar. O quinto feto foi utilizado como *sham*, cujo procedimento cirúrgico constava apenas de manipulação do feto, sem a introdução de tecido encefálico e outro feto, escolhido aleatoriamente, foi utilizado como controle. Foram utilizados 40 fetos para o grupo E17 e 40 fetos para o grupo E18, dos quais, 8 eram fetos controle, 8 *sham* e 24 IEP cada. Tanto no grupo E17, quanto no grupo E18 foram inoculados tecido encefálico no pulmão de três fetos por fêmea prenhe.

Após a realização dos procedimentos nos fetos disponíveis, o útero era cuidadosamente recolocado na cavidade peritoneal e a parede abdominal era fechada em dois planos, com utilização de fio mononylon 4-0, sutura contínua, finalizando-se com assepsia com Riodeine (1% de Iodo Ativo). A recuperação anestésica foi feita em placa aquecedora até a completa restauração da atividade, quando então os animais eram levados para o biotério onde permaneceram até a coleta dos fetos. Todo procedimento cirúrgico esta ilustrado na figura 3.

No 17º dia da gestação os animais do grupo E17 foram novamente anestesiados (mesma dose descrita anteriormente) e submetidos à operação

cesariana por incisão cirúrgica na linha média abdominal, com exposição da cavidade peritoneal. Ambos os cornos uterinos foram cuidadosamente retirados e colocados em placa de Petri limpa, abertos longitudinalmente, expondo-se os sacos gestacionais para a retirada dos fetos vivos, mortos e reabsorções, quando presentes. Os animais do grupo E18 foram submetidos ao mesmo procedimento anterior no 18º dia gestacional.

Os fetos obtidos foram examinados externamente com lupa, fotografados, pesados, medindo-se o comprimento vértice-sacral. Uma parte foi fixada em formol tamponado a 10% por 24 horas, enquanto que a outra foi congelada por crioinmersão.

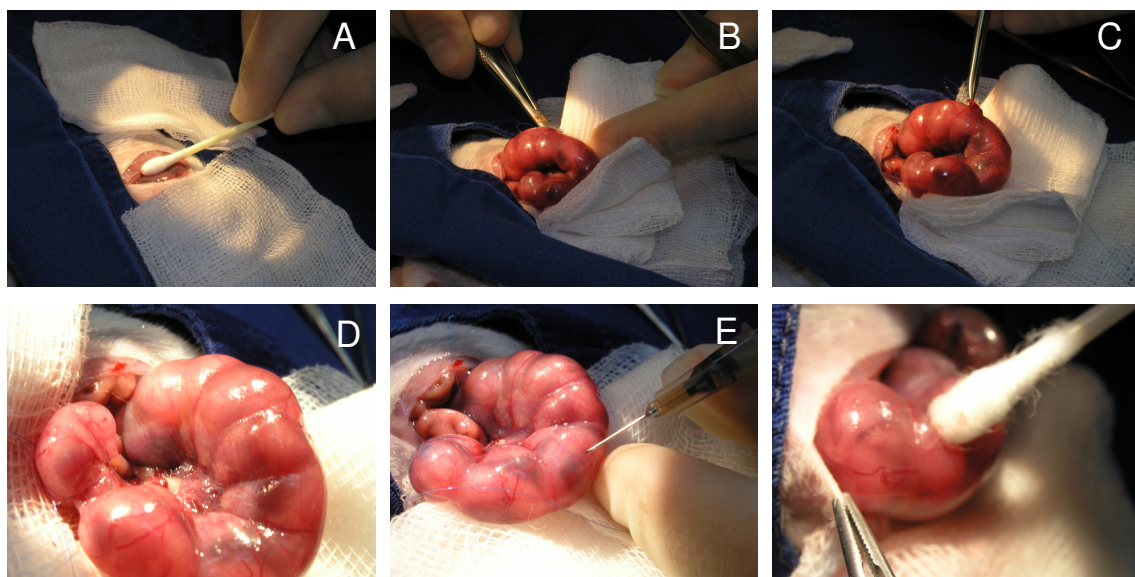


Figura 3. Laparotomia e colocação dos campos estéreis em A. Em B, retirada do corno uterino e sutura em bolsa. C, *Sham*. Em D, retirada do último feto para a doação do tecido encefálico. Notar a implantação do tecido encefálico no tórax do terceiro feto em E. Em F, retorno do útero para a cavidade abdominal.

Histologia e Imuno-histoquímica (IHQ)

Os fetos fixados em formol tiveram os troncos isolados por corte transversal na região cervical e abdominal, colocados em cassetes plásticas, desidratados em concentração crescente de etanol, diafanizados em xilol, embebidos em parafina histológica e submetidos a um novo corte transversal, dividindo o tórax em duas partes antes da inclusão em parafina. Os blocos resultantes foram seccionados em micrótomo rotativo (HM 330 da Marca Microm®, Micron, Heidelberg, Germany), obtendo-se cortes histológicos de 4µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas de vidro novas e limpas para a coloração com HE, enquanto que para a reação IHQ o material era recolhido em lâminas previamente silanizadas.

Os fetos criopreservados foram lavados em salina estéril gelada, separando-se o tronco por corte transversal na região cervical e abdominal e imediatamente o tronco foi congelado em nitrogênio líquido imerso em meio de criopreservação (Tissue-Tek). Os troncos fetais foram submetidos a criotomia (HM 505E da Marca Microm®, Zeiss, Zeiss, Walldorf, Germany) com 5µm de espessura e os cortes colocados em lâminas de vidro, sendo que o material de uma lâmina foi fixado em álcool 95% por 5 minutos e corado com HE, enquanto que os restantes foram utilizados para reação IHQ.

A reação IHQ, pelo método da imunoperoxidase através do Complexo-Avidina-Biotina (ABC) dos tecidos fixados em formalina e criotomizados seguiu basicamente os mesmos procedimentos. A recuperação antigênica foi feita no material parafinado em panela a vapor em uma solução de tampão citrato pH 6.0 por 40 minutos. Foi utilizado o anticorpo primário GFAP policlonal (Dako

Copor., Carpinteria, CA, USA) diluído a 1:500 em BSA incubação *overnight* (12 horas) em câmara úmida. O anticorpo secundário (biotinylated, affinity-purified anti-immunoglobulin; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) foi incubado por 30 minutos e em seguida foi incubado com o kit universal ABC (Novostain Super ABC Kit, universal, Novocastra Laboratories, U.K.) por 30 minutos. Para a revelação da reação IHQ foi utilizado o substrato DAB (DAB; D5638, Sigma, St. Louis, MO, USA) por 10 minutos e contracoloração com Hematoxilina por 10 segundos.

Para a reação IHQ dos cortes congelados, o material foi fixado em acetona P.A. a -20° C por 10 minutos e não se procedeu à recuperação antigênica.

Os fetos controle e *sham* foram fixados em formalina tamponada por 24 horas, processados histologicamente e os cortes foram corados pelo HE, seguindo o mesmo procedimento acima descrito. Todas as análises foram realizadas em microscópio de luz convencional.

Análise dos dados

Foram registrados o número de fetos vivos, morte fetal tardia e reabsorções, bem como o número de fetos inoculados cujos implantes de tecido encefálico foram eficientes e preservados, além de sua localização, características morfológicas e imuno-histoquímicas.

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 4.00, para o teste t e Qui Quadrado, considerando $p < 0,05$.

Resultados - II

Das 24 fêmeas utilizadas, somente 16 (66,6%) puderam ser aproveitadas. Seis (25%) morreram devido a complicações anestésicas e duas (8,3%) abortaram no 16º dia gestacional. Das 16 fêmeas que sobreviveram e seguiram até o final do experimento sem nenhuma intercorrência, oito (50%) eram do grupo E17 e oito (50%) do grupo E18. Do grupo E17 foram obtidos 34 (85%) fetos vivos, dos quais 8 (23,5%) eram controle (C), 8 (23,5%) *sham* (S) e 18 (52,9%) fetos da implantação encefálica pulmonar (IEP). Não houve nenhuma reabsorção e morte fetal tardia nos fetos dos grupos C e S, já nos fetos IEP ocorreram 6 (17,6%) mortes fetais tardias, como mostra a tabela 4. Das oito fêmeas do grupo E18 foram obtidos 30 (75%) fetos vivos, dos quais, 8 (26,6%) eram do grupo C, 8 (26,6%) do grupo S, e 14 (46,6%) fetos do grupo IEP. No grupo IEP houve dez (33,3%) mortes fetais tardias (Tabela 4).

Não houve diferença estatística entre os fetos de todos os grupos em relação ao seu peso ou comprimento vértice-sacral.

O exame microscópio das lâminas obtidas do grupo E17 revelou que dos 18 fetos vivos da IEP, em 15 (83,3%) havia fragmentos de tecido encefálico implantados, representados por células pequenas, de núcleos ovóides densos, escasso citoplasma, arranjadas em placas sobre fundo fibrilar (Figura 4-A, 4-C e 4-E), com reação imuno-histoquímica positiva para GFAP, como mostra a figura 4-B, 4-D e 4-F. As lâminas obtidas do grupo E18 revelaram que dos 14 fetos vivos da IEP todos (100%) mostraram implante de tecido encefálico (Tabela 5).

Tabela 4 - Número de fetos vivos, controle, *sham* e IEP nos fetos de em ambos os grupos.

Achados	Grupos		Valor de p
	E17	E18	
Total de Fetos	40 (100%)	40 (100%)	n.s.
Fetos Vivos	34 (85%)	30 (75%)	n.s.
Controle	8 (23,5%)	8 (26,6%)	n.s.
<i>Sham</i>	8 (23,5%)	8 (26,6)	n.s.
IEP	18 (52,9%)	14 (46,6%)	n.s.

E= Dia Gestacional; IEP= Implantação Encefálica Pulmonar.

(n.s.=não significante).

Tabela 5 - Número de fetos com implantação de tecido encefálico no pulmão.

	Grupo E17 (N=18)		Grupo E18 (N=14)		Valor de p
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
IEP	15 (83,3%)	3 (16,6%)	14 (100%)	-	n.s.

E= Dia Gestacional, IEP= Implantação Encefálica Pulmonar. (n.s.=não significante).

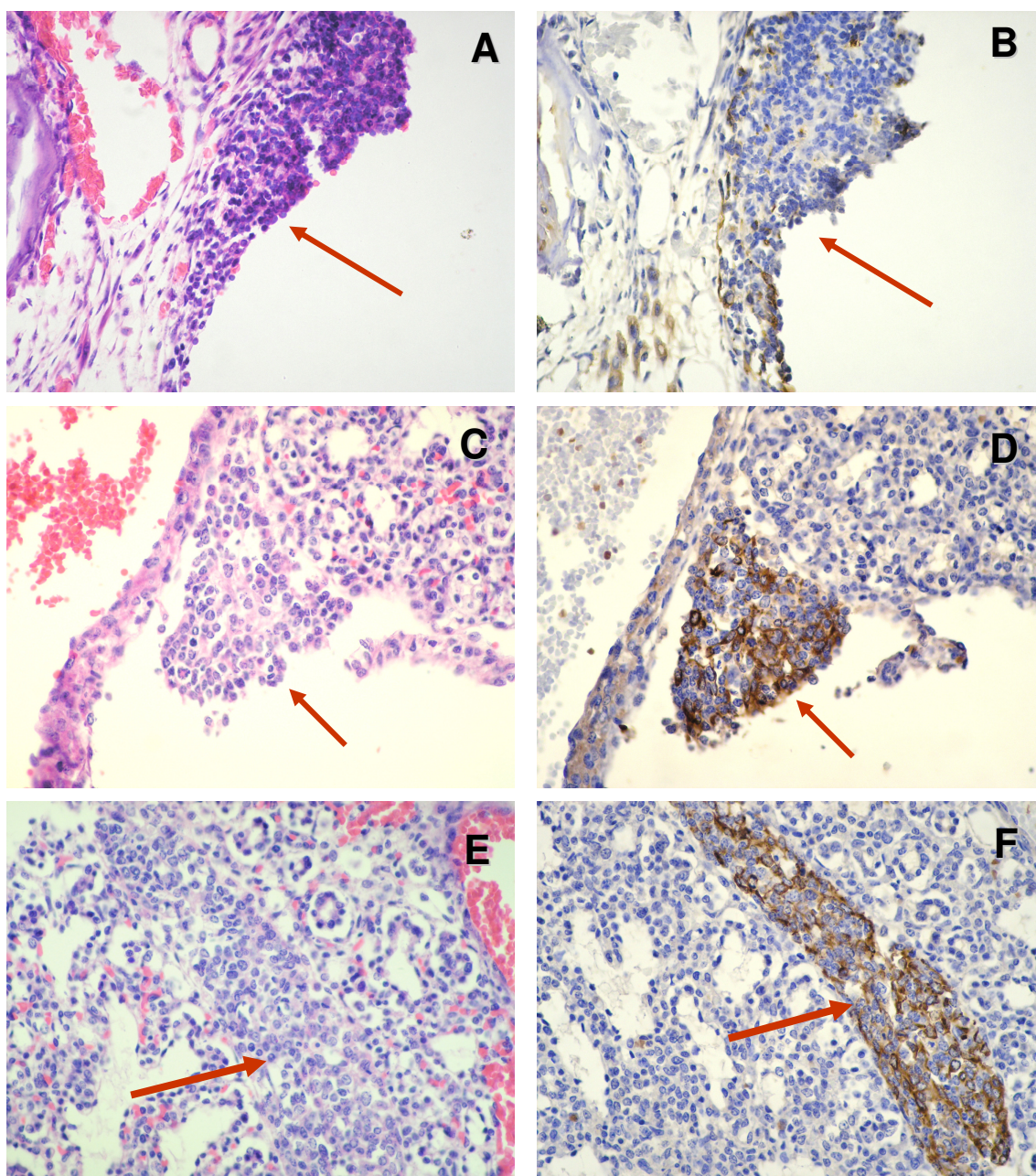


Figura 4. Fotomicrografia de cortes histológicos do tronco dos fetos com presença de tecido encefálico no tórax (setas) corados pela Hematoxilina e Eosina e submetido à reação imuno-histoquímica para o anticorpo GFAP. Notar que em A e B os fragmentos estão aderidos na pleura parietal, C e D os fragmentos estão aderidos à pleura visceral, enquanto que em E e F os fragmentos estão dentro do parênquima pulmonar. (seta) (A, C e E estão corados pela Hematoxilina e Eosina; B, D e F reação imuno-histoquímica pelo método ABC, anticorpo primário GFAP e revelação com DAB; Aumento de 400X).

Discussão - II

Os casos humanos reportados de tecido heterotópico encefálico no pulmão geralmente estão associados com DFTN (CHEN et al., 1982; KERSHINIK et al., 1992; PERES; BARBOSA, 2005; VALDES-DAPENA; AREY, 1967). Existem algumas hipóteses para o entendimento dos mecanismos patogênicos envolvidos com essa anormalidade, sendo a aspiração de fragmentos cerebrais do líquido amniótico a mais plausível (CHEN et al., 1982; KERSHINIK et al., 1992; PERES; BARBOSA, 2005; VALDES-DAPENA; AREY, 1967) e reforçada pelo relato de Morgan et al. (2003). Este descreve o caso de uma gestação gemelar monocoriônica monoamniótica em que um dos fetos era anencefálico e, no entanto, a implantação maciça de tecido encefálico ocorreu no pulmão do irmão, que não apresentava nenhuma anomalia. No entanto, existem ainda muitas dúvidas quanto aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Modelos de DFTN podem ser produzidos experimentalmente em diversas espécies animais e por diferentes mecanismos, tais como: anoxia (CHEN; FUJINAGA; GIACCIA, 1999), irradiação (ZUSMAN et al., 1990), insulto térmico (FISHER; SMITH, 1981), hiperglicemia materna (FINE et al., 1999), ácido retinóico (KHOGA; OBATA, 1992; QUEMELO; LOURENÇO; PERES, 2007), ácido valpróico (HISHIDA; NAU, 1998) e método cirúrgico em pintos (SIM et al., 1995). Estes modelos poderiam potencialmente produzir heterotopias encefálicas no pulmão, no entanto, ainda não existem relatos na literatura confirmando o seu achado, o que pode decorrer do fato de ser este um fenômeno raro e de difícil localização, ou mesmo que as metodologias não sejam adequadas para este fim.

Uma saída para tentar contornar essas dificuldades foi criar um modelo experimental, com a introdução cirúrgica de fragmentos de tecido encefálico diretamente no pulmão. Dentre os vários modelos de cirurgia fetal intra-útero experimental, nós nos baseamos no modelo experimental de gastrosquise de acordo com Bittencourt et al. (2006), com algumas modificações.

Pudemos observar que a implantação do tecido encefálico foi efetiva nos fetos vivos, ocorrendo em (n= 15) 83,3 % dos fetos no grupo E17 e (n=14) 100% dos casos no grupo E18. Os fragmentos de tecido encefálico estavam normalmente aderidos à pleura parietal e visceral, e em um dos casos do grupo E18 foi encontrado tecido encefálico em meio ao parênquima pulmonar. Os fragmentos de tecido encefálico apresentavam-se bem preservados, tanto no grupo E17 como no E18, entretanto, em um caso do grupo E18 o tecido encefálico parecia se encontrar em processo de degeneração. Os três casos do grupo E17 em que não foi encontrado tecido encefálico no pulmão podem ter decorrido de falha na implantação cirúrgica ou de representatividade nos cortes histológicos, devido à pequena dimensão dos implantes.

O modelo experimental mostrou-se eficiente para os dois grupos E17 e E18, pois os fragmentos implantados pareciam bem preservados, aderidos à pleura parietal e visceral ou mesmo dentro do parênquima pulmonar, contendo vasos sanguíneos no seu interior dentro dos quais havia hemácias e poucas células inflamatórias. A origem encefálica do tecido foi demonstrada pelas suas características histológicas e confirmada pela positividade da reação IHQ para GFAP. Dependendo da necessidade e tipo de estudo, a coleta do material pode ser a partir do 17º dia gestacional, uma vez que o tecido já estará

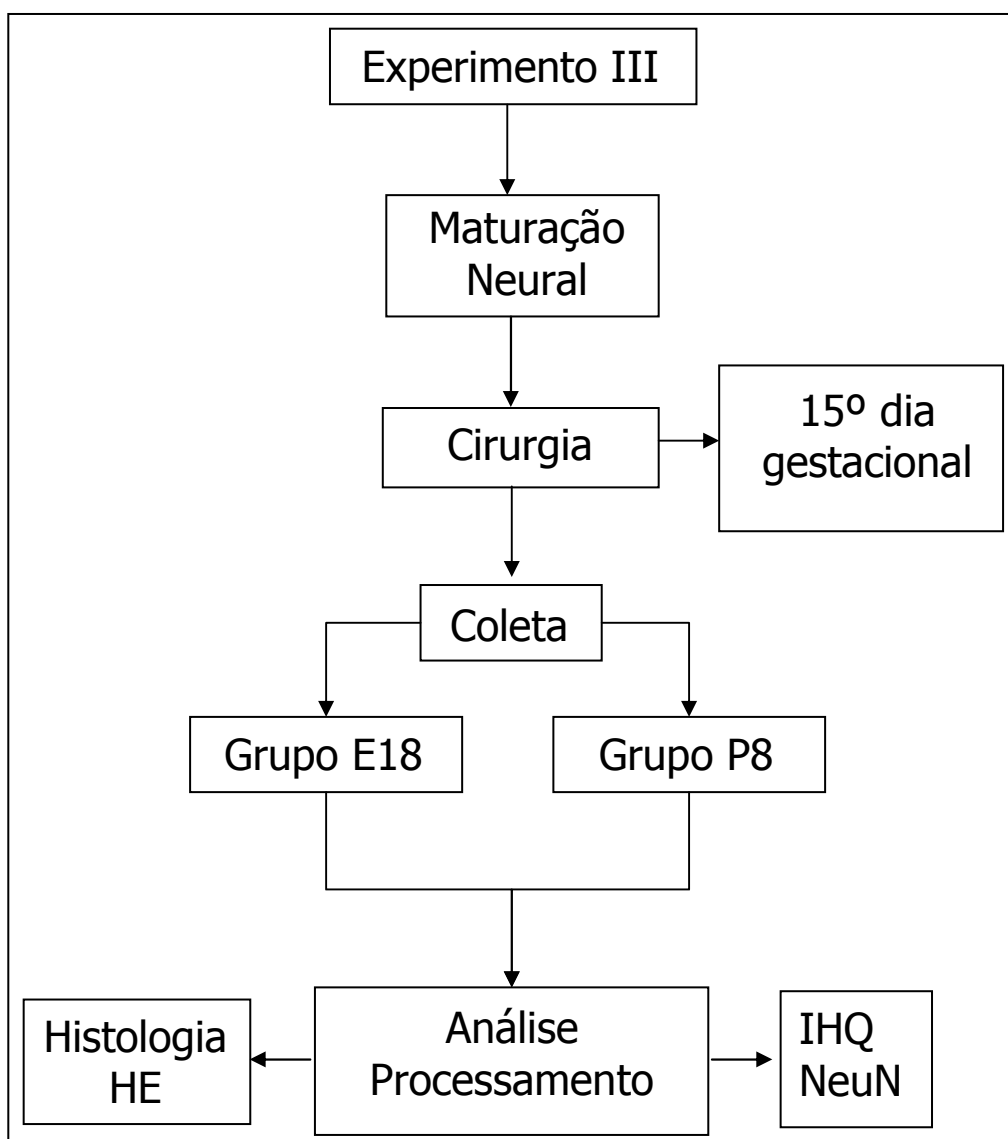
definitivamente implantado, não tendo sido demonstradas desvantagens para tempo maior, como aumento do número de fetos vivos e mortes fetais tardias. Adicionalmente, o grupo E18, onde o tecido encefálico ficou por um período de tempo maior em contato com o tecido pulmonar, a chance de implantação e interação entre as células se tornou maior (QUEMELO; SBRAGIA; PERES, 2007)

(Apêndice B).

5.3. Experimento III – Maturação neuronal na heterotopia encefálica pulmonar experimental

Em vista da eficiência do método, tornou-se importante saber se o tecido heterotópico poderia sobreviver a um tempo mais prolongado, bem como o que ocorreria com os neuroblastos. Caso o tecido implantado sobrevivesse até o período neonatal, haveria uma maior possibilidade de se explorar as interações e destino deste tecido, por isso foi dividido o experimento a seguir descrito.

Organograma experimento – III



Material e Métodos - III

Foram utilizados 24 camundongos fêmeas. A cirurgia foi realizada no período da manhã do 15º dia gestacional em condições assépticas, conforme modelo proposto por Quemelo, Sbragia e Peres (2007), adicionando algumas modificações para a coleta do material. Foram coletados 6 fetos com IEP no 18º dia gestacional (grupo E18) e 6 fetos com IEP no 8º dia pós-natal (grupo P8). Como controle para o tecido encefálico heterotópico, foram coletadas as cabeças de 6 fetos no 18º dia gestacional (CE18) e 6 fetos no 8º dia pós-natal (CP8) cujas as matrizes e fetos não foram submetidas a qualquer procedimento cirúrgico.

Em seguida, todos os fetos IEP tiveram os troncos isolados por corte transversal na região cervical e abdominal, enquanto que os fetos controles, tiveram a cabeça separada do corpo por um corte transversal na região cervical. O material foi colocado individualmente em cassetes plásticas, fixadas em formalina tamponada e processados histologicamente. Os fetos IEP foram submetidos a um novo corte transversal, dividindo o tórax em duas partes e incluído em parafina, enquanto que os fetos controle tiveram a cabeça dividida em três partes por dois cortes coronais e posteriormente, incluída em parafina. Dos blocos resultantes foram retirados cortes histológicos de 4µm de espessura para a coloração pela HE e para reação IHQ.

A recuperação antigênica do material foi realizada em panela a vapor em uma solução de tampão citrato pH 6.0 por 40 minutos. A reação IHQ para o anticorpo primário GFAP policlonal (Dako Copor., Carpinteria, CA, USA) seguiu da mesma forma do experimento II. Para o anticorpo monoclonal anti-NeuN

(Chemicon, Temecula, CA, USA) a diluição foi de 1:1500 em BSA. Para detecção do anticorpo primário foi utilizado o *SuperPicTure Polymer Detection Kit* (Zymed® Laboratories – Invitrogen, San Francisco, CA, USA) por 30 minutos. Para a revelação foi utilizado o substrato DAB por 10 minutos e a contracoloração foi feita com hematoxilina por 10 segundos.

Foram analisados os implantes de tecido encefálico heterotópico no pulmão, observando sua localização, características morfológicas e IHQ.

Todas as células dos fragmentos de tecido heterotópico encefálico no pulmão foram contadas com objetiva de 40X em ambos os grupos E18 e P8, sendo consideradas positivas para NeuN apenas aquelas células com marcação nuclear. O índice de marcação (IM) pelo NeuN foi obtido pela relação entre o número de células marcadas pelo número total de células (marcadas e não marcadas).

O IM para NeuN no encéfalo de fetos controles (CE18 e CP8) foi obtido pela média de seis campos escolhidos aleatoriamente das regiões telencefálica e mesencefálica, para comparação com o tecido encefálico heterotópico.

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 4.00, para o teste Mann Whitney, considerando-se $p \leq 0,05$.

Resultados – III

Das 24 fêmeas utilizadas, 15 (62,5%) sobreviveram até o final da gestação, cinco (20,8%) morreram devido a complicações anestésicas e quatro (16,6%) abortaram no 16º dia gestacional.

O exame microscópico dos cortes do tronco fetal corados pelo HE mostrou que os fetos IEP de ambos os grupos E18 e P8 apresentavam fragmentos de

tecido encefálico no tórax, representados por células pequenas, de núcleos ovóides densos, escasso citoplasma, arranjadas em placas sobre fundo fibrilar (Figura 5-A e 5-B). Esses fragmentos mostraram-se muitas vezes implantados na pleura parietal e visceral, bem como no parênquima pulmonar. O tecido encefálico estava bem preservado, às vezes com mitoses (Figura 5-E), vascularizados e geralmente próximos a vasos sanguíneos adjacentes, com reação IHQ positiva para GFAP e NeuN, para ambos os grupos.

Os neurônios marcados pelo NeuN estavam em meio às células glias marcadas pelo GFAP, que eram mais abundantes do que as células neuronais nos fetos de ambos os grupos E18 e P8, como mostra a figura 5-C e 5-D. A imunomarcacão com anticorpo NeuN, além de confirmar a presença de neurônios, mostrou que o índice de marcação foi maior no grupo P8 (média= 22%) (Figura 5-F) do que no grupo E18 (média= 4%) (Figura 5-E) ($p < 0,05$).

O IM para NeuN no encéfalo do grupo CP8 também foi maior (média=59%) do que o do grupo CE18 (média=38%) ($p < 0,05$). Entretanto, foram observados mais neurônios nos grupos controles (CE18 e CP8) quando comparado com o tecido encefálico heterotópico no pulmão dos grupos E18 e P8, respectivamente ($P < 0,05$; Tabela 6).

Tabela 6 - Índice de marcação para NeuN no período fetal e neonatal do grupo controle e experimental (IEP).

	Grupo Controle		Grupo IEP		Valor P
	CE18 (%)	CP8 (%)	E18 (%)	P8 (%)	
NeuN – IM	38	59	4	22	0,05

IM, índice de marcação; IEP, implantação encefálica pulmonar; CE18, grupo controle do 18º dia gestacional; CP8, grupo controle do 8º dia pós-natal; E18, tecido heterotópico encefálico do 18º dia gestacional; P8, tecido heterotópico encefálico do 8º dia pós-natal.

Figura 5

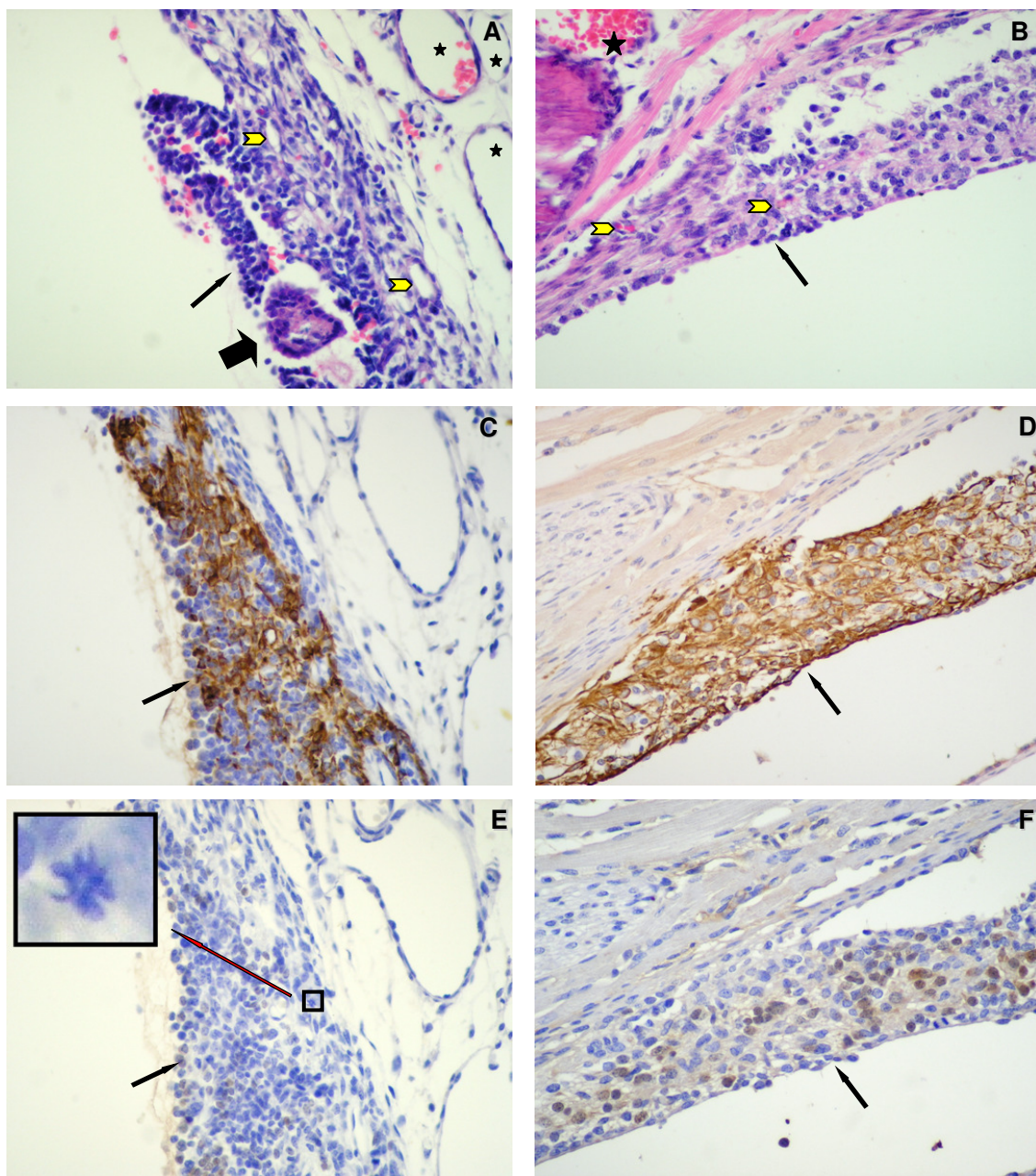


Figura 5. Fotomicrografia de cortes histológicos do tronco dos fetos com presença de tecido encefálico no tórax corados pela Hematoxilina e Eosina e submetido à reação imuno-histoquímica para o anticorpo GFAP e NeuN. A, C e E são do grupo E18, enquanto B, D e F são do grupo P8. A, mostra um fragmento de tecido encefálico implantado na pleura parietal (seta menor). Notar as células pequenas, de núcleos ovóides densos com escasso citoplasma, às vezes mostrando a formação de rosetas (seta larga), arranjadas em placas sobre fundo fibrilar e contendo vasos sanguíneos (seta amarela). Largos vasos são observados no tecido mesenquimal do hospedeiro (asterístico). Em B, o tecido heterotópico implantado é mais diferenciado, com células apresentando núcleo largo sobre abundante fundo fibrilar. Dentro do fragmento implantado foi observado a presença de capilares sanguíneos contendo hemácias (seta amarela). Notar a menor imunomarcagem para GFAP e NeuN no tecido heterotópico do grupo E18 em comparação com o grupo P8, indicando maturação do tecido implantado. Notar a presença de mitose em E. (A e B: corados pela Hematoxilina e Eosina; C e D reação imuno-histoquímica pelo método ABC, anticorpo primário GFAP; E e F: reação imuno-histoquímica usando o método SuperPicTure Polymer Detecetion Kit para o anticorpo primário NeuN, revelados com DAB; Aumento de 400X).

Discussão - III

Pouco se sabe como as células heterotópicas encefálicas podem se implantar, proliferar e interagir no pulmão, pois apenas recentemente foi desenvolvido um modelo experimental por Quemelo, Sbragia e Peres (2007), o qual permitirá investigar os mecanismos envolvidos com essa anormalidade e contornar as dificuldades encontradas no estudo das heterotopias, incluindo os observados em seres humanos.

No presente estudo, pudemos observar que o modelo experimental mostrou-se eficiente para os dois grupos E18 e P8, pois os fragmentos implantados apresentaram-se bem preservados, com vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias. A viabilidade destes fragmentos era traduzida pela escassez de necrose, hemorragia e degeneração e confirmada pela presença de mitoses.

Nós observamos que os fragmentos de tecido encefálico implantados no pulmão apresentavam poucas células com marcação IHQ positiva para NeuN em relação as células positivas para GFAP em ambos os dias investigados. Estes resultados estão de acordo com os relatos de Chen et al. (1982) e Kanbour et al. (1979) e que identificaram poucos neurônios piramidais e difusa quantidade de células gliais nos casos de heterotopia encefálica pulmonar em humanos, podendo ser explicados pelo fato de que a quantidade de células gliais no sistema nervoso é proporcionalmente maior do que os neurônios numa proporção de 10:1 (KANDEL, 1991; YAMAMOTO et al., 2007). No entanto, quando comparado com o encéfalo, percebe-se menor proporção de neurônios para células gliais nas heterotopias, indicando que houve redução seletiva

daqueles em relação a estes. Uma possível explicação é que os neuroblastos e neurônios são mais sensíveis do que as células da glia (ZHOU; MILLER, 2006) aos procedimentos realizados, resultando em sua menor proporção. Deve-se imaginar que a retirada do encéfalo do feto doador, sua desagregação mecânica e posterior injeção intra-torácica nos fetos receptores seja bastante agressiva, potencialmente levando à morte de células mais especializadas. Desta forma, esta maior vulnerabilidade de neuroblastos e neurônios também pode ocorrer nos casos humanos, pois uma das hipóteses para a sua ocorrência é a de destruição mecânica do encéfalo exposto, cujos fragmentos são aspirados junto com o líquido amniótico, indo se alojar no pulmão (CHEN et al., 1982; KANBOUR et al., 1979; MENDONÇA; GUTIERREZ; PERES, 2005; MORGAN et al., 2003; PERES et al., 2003)

Apesar da redução da proporção dos neurônios em ambos os grupos IEP, os resultados indicam que o IM para NeuN foi proporcionalmente maior em P8 do que E18, da mesma forma que o tecido encefálico dos animais controle, indicando que a maturação e desenvolvimento neuronal continuou. Sabe-se que nos camundongos o período de neurogênese é maior no período pós-natal (RICE; BARONE, 2000) e a sua existência no presente estudo revela que apesar das possíveis influências do microambiente de um tecido estranho, no caso o pulmão, a regulação do desenvolvimento neural foi pelo menos parcialmente preservada.

A maior quantidade de neurônios observada no período pós-natal também pode estar relacionada com a imunorreatividade para o anticorpo NeuN, que se inicia no 9.5 dia gestacional, mas que se torna mais efetiva nas

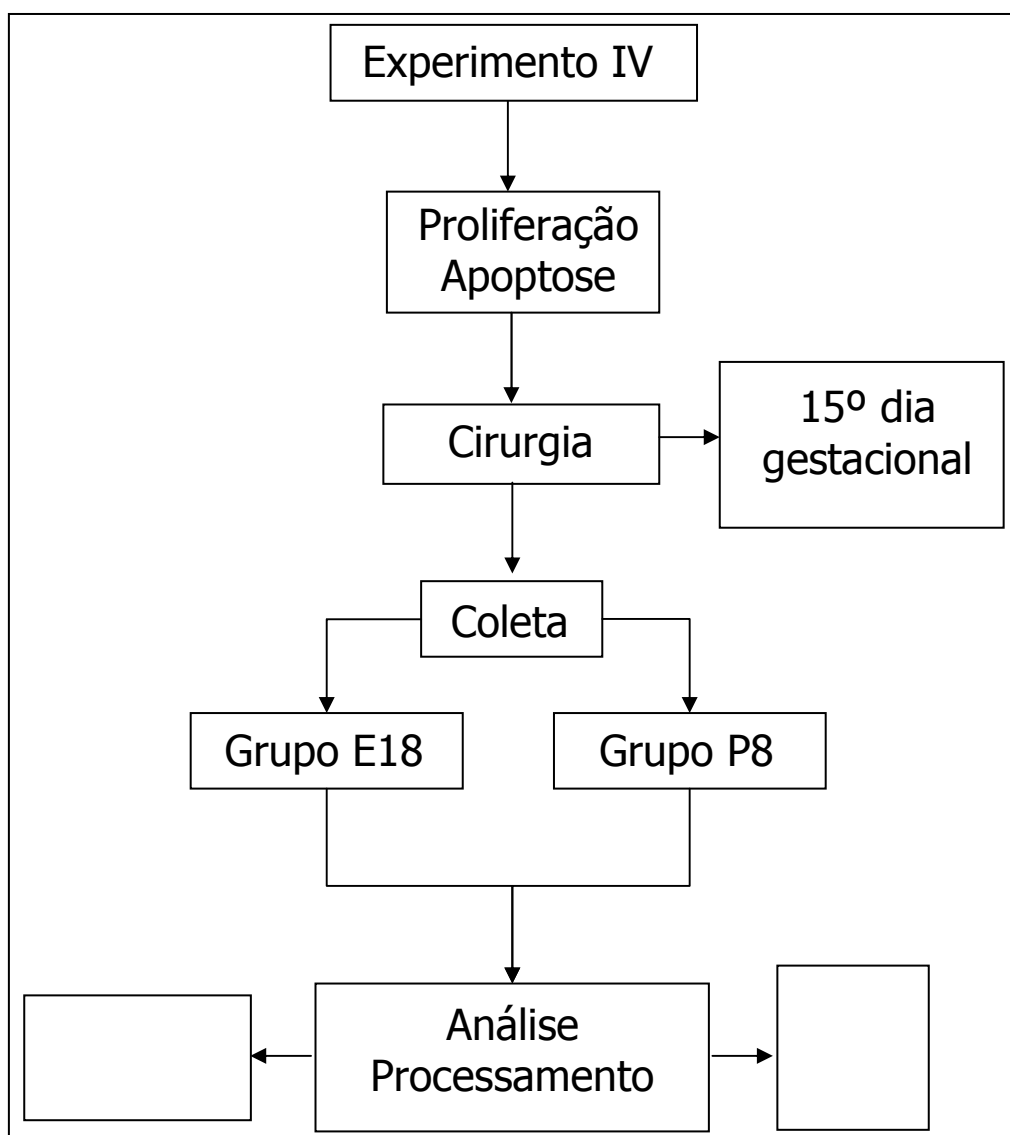
células “terminalmente” diferenciadas, sugerindo que os neurônios tornam-se imunologicamente detectáveis num período mais tardio ou pós-mitótico (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992). De qualquer forma, o mesmo fato foi observado nos encéfalos controle, indicando que não houve perda da capacidade de maturação dos neurônios. Por outro lado, esses resultados não excluem que o desenvolvimento neuronal tenha ocorrido de outra maneira. Alguns astrócitos da região subventricular (ZVS) podem funcionar como *stem cell* e gerar novos neurônios (IMURA; KORNBLUM; SOFRONIEW, 2003; QUIÑONES-HINOJOSA et al., 2006; SANAI et al., 2004), uma vez que o potencial proliferativo dos neurônios é altamente restrito a determinadas áreas do cérebro após o nascimento (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VEDUGO, 2002; GAGE, 2002; KEMPERMANN, 2002; ÖNGÜR et al., 2007; QUIÑONES-HINOJOSA et al., 2006), enquanto que a proliferação de células gliais ocorre em muitas regiões do cérebro durante toda a vida (LEVINE; REYNOLDS; FAWCETT, 2001; ÖNGÜR et al., 2007).

Durante a desagregação do tecido encefálico a ser injetado qualquer área do encéfalo pode estar presente, não podemos saber a exata origem do material, se da região mesencefálica ou telencefálica, que se sabe tem composição diferente na dependência da idade do animal. De qualquer forma, a maturação ocorreu e estudos futuros, com a implantação de áreas específicas do encéfalo, como o cerebelo, zona subventricular e região cortical, podem esclarecer melhor o comportamento e os mecanismos de interação entre esses tecidos (QUEMELO; PERES, 2008) (Apêndice C).

5.4. Experimento IV – Proliferação e morte celular na heterotopia encefálica experimental

Sabendo-se que ocorre maturação neuronal no tecido encefálico implantado, porém com redução proporcional do número de células em relação aos controles, seria importante saber o porquê deste achado, por isto procedeu-se à investigação da proliferação e morte celular nestes casos, a seguir descrita:

Organograma experimento – IV



Material e Métodos - IV

Para a análise da proliferação e apoptose celular foi realizada a reação IHQ nos mesmos seis fetos de cada grupo que foram utilizados no experimento III. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-PCNA (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK – diluição: 1/250) e anti-Bcl-2 (Upstate, Temecula, CA, USA – diluição: 1/200).

A recuperação antigênica para o PCNA foi realizada em panela a vapor em uma solução de tampão citrato pH 6.0 por 40 minutos, enquanto que para o anticorpo Bcl-2 a recuperação ocorreu em panela a vapor em uma solução de tampão Tris-EDTA pH 9,5 por 40 minutos. A reação IHQ para o anticorpo primário PCNA seguiu-se pelo método da imunoperoxidase através do Complexo-Avidina-Biotina (ABC) (Dako Copor., Carpinteria, CA, USA), enquanto que o sistema de detecção para o anticorpo Bcl-2 foi o *SuperPicTure Polymer Detection Kit* por 30 minutos. Para a revelação dos anticorpos foi utilizado o substrato DAB, como descrito nos experimentos anteriores, seguido de contracoloração com hematoxilina por 10 segundos.

Todas as células dos fragmentos de tecido heterotópico encefálico no pulmão foram contadas com objetiva de 40X em ambos os grupos E18 e P8, sendo consideradas positivas para PCNA apenas aquelas células com forte marcação nuclear, enquanto que foram consideradas positivas para o Bcl-2 as células com marcação de membrana e citoplasma. O índice de marcação (IM) para o PCNA e Bcl-2 foi obtido pela relação entre o número de células marcadas pelo número total de células (marcadas e não marcadas).

O IM para o PCNA e o Bcl-2 no encéfalo de fetos controles (CE18 e CP8) foi obtido pela média de seis campos escolhidos aleatoriamente das regiões

subventricular (ZVS) e cortical, para comparação com o tecido encefálico heterotópico.

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 4.00, para o teste Mann Whitney, considerando-se $p < 0,05$.

Resultados - IV

O IM para o PCNA no tecido heterotópico encefálico era maior no grupo E18 quando comparado com o grupo P8 ($P < 0,05$), como mostra a figura 6. O IM para PCNA do grupo E18 era também maior do que no grupo CE18 para a região cortical e média da região cortical e ZVS ($P < 0,05$), mas sem diferença estatística somente com a região com a região ZVS. O IM para PCNA do grupo P8 era maior do que no grupo controle para a região cortical (CP8) ($P < 0,05$).

A região ZVS mostrou-se com maior número de células em proliferação quando comparada com a região cortical em ambos os grupos controles (CE18 e CP8) ($P < 0,05$) e o IM do grupo CE18 era maior que no grupo CP8 para as respectivas regiões (ZVS e cortical) ($P < 0,05$), como mostra a tabela 7.

A imunomarcagem para o anticorpo Bcl2 mostrou-se positiva somente para o tecido heterotópico encefálico de ambos os grupos E18 e P8 (Figura 7), que não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 8).

Tabela 7 - Índice de marcação para PCNA no período fetal e neonatal do grupo controle e experimental (IEP).

PCNA – IM (%)	Valor P
---------------	---------

E18 (46)	P8 (18)	0,05
E18 (46)	CE18 ZVS (38)	n.s.
E18 (46)	CE18 Cortical (0,17)	0,05
E18 (46)	CE18 media (14)	0,05
P8 (18)	CP8 ZVS (19)	n.s.
P8 (18)	CP8 Cortical (0,12)	0,05
P8 (18)	CP8 media (11)	n.s.
CE18 ZVS (38)	CP8 ZVS (19)	0,05
CE18 Cortical (0,17)	CP8 Cortical (0,12)	0,05
CE18 media (14)	CP8 media (11)	n.s.
CE18 ZVS (38)	CE18 Cortical (0,17)	0,05
CP8 ZVS (19)	CP8 Cortical (0,12)	0,05

IM, índice de marcação; IEP, implantação encefálica pulmonar; CE18, grupo controle do 18º dia gestacional; CP8, grupo controle do 8º dia pós-natal; E18, tecido heterotópico encefálico do 18º dia gestacional; P8, tecido heterotópico encefálico do 8º dia pós-natal; ZVS, zona subventricular; n.s., não significante.

Tabela 8 - Índice de marcação para Bcl2 no período fetal e neonatal do grupo controle e experimental (IEP).

	Grupo Controle				IEP Grupo	
	CE18		CP8		E18	P8
	ZVS	Cortical	ZVS	Cortical		
Bcl2 - IM	-	-	-	-	12%	11%

IM, índice de marcação; IEP, implantação encefálica pulmonar; CE18, grupo controle do 18º dia gestacional; CP8, grupo controle do 8º dia pós-natal; E18, tecido heterotópico encefálico do 18º dia gestacional; P8, tecido heterotópico encefálico do 8º dia pós-natal; ZVS, zona subventricular; n.s., não significante.

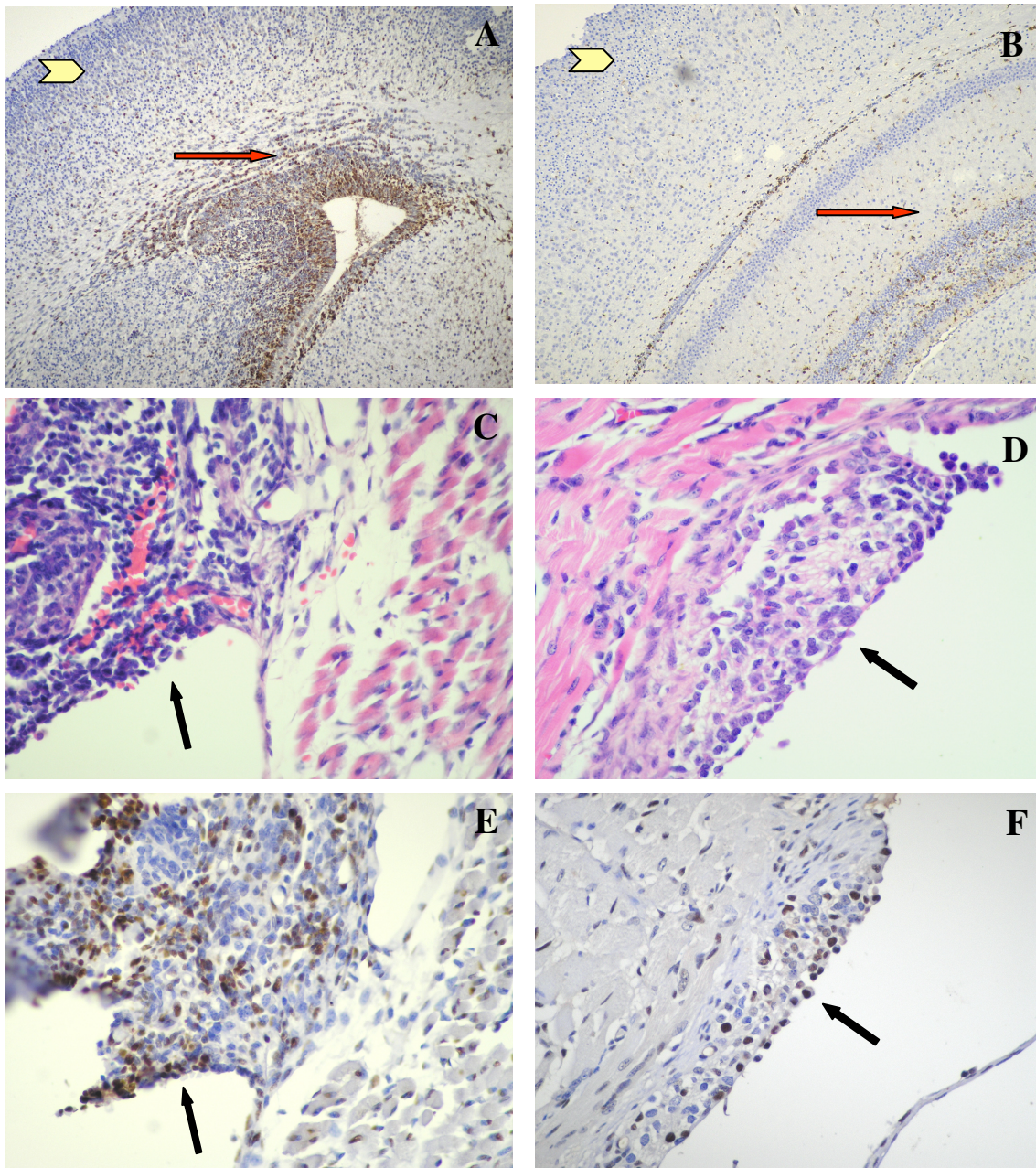


Figura 6. Fotomicrografia de cortes histológicos do encéfalo normal e do tronco de fetos com presença de tecido encefálico no tórax corados pela Hematoxilina e Eosina e submetido à reação imuno-histoquímica para o anticorpo PCNA. A e B são do grupo controle CE18 e CP8, respectivamente. Notar a menor imunomarcção na região cortical (seta larga amarela) quando comparado com a região subventricular (seta vermelha). C e E, são do grupo E18, enquanto D e F são do grupo P8. Ambos os grupos mostram um fragmento de tecido encefálico implantado na pleura parietal (seta preta). (C e D: corados pela Hematoxilina e Eosina; A, B, E e E reação imuno-histoquímica pelo método ABC, anticorpo primário PCNA; revelado com DAB; Aumento de 400X).

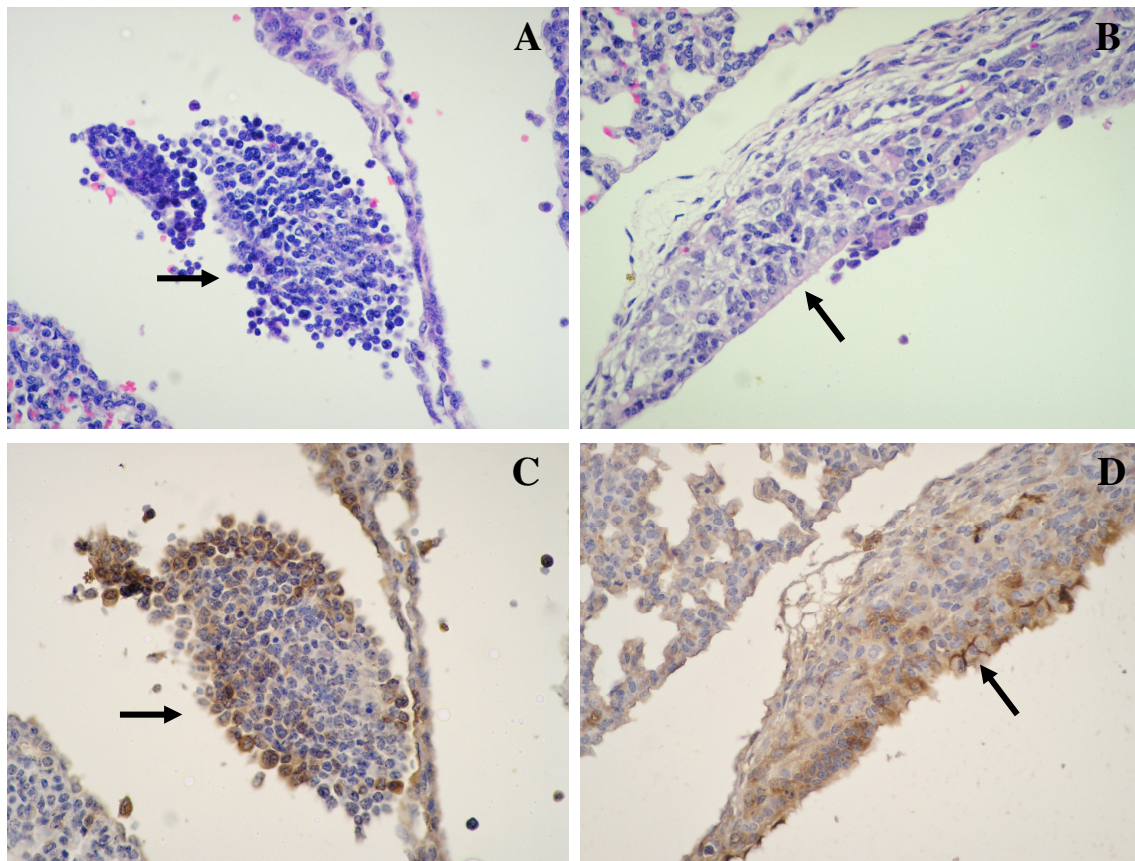


Figura 7. Fotomicrografia de cortes histológicos do tronco de fetos com presença de tecido encefálico no tórax corados pela Hematoxilina e Eosina e submetido à reação imuno-histoquímica para o anticorpo Bcl2. A e C, são do grupo E18, enquanto B e D são do grupo P8. Ambos os grupos mostram um fragmento de tecido encefálico próximo à pleura visceral (seta). (A e B: corados pela Hematoxilina e Eosina; C e D reação imuno-histoquímica pelo método ABC, anticorpo primário Bcl2; revelado com DAB; Aumento de 400X).

Discussão - IV

Ambas proliferação e morte celular durante o desenvolvimento do tecido encefálico são reguladas por programas celulares intrínsecos e extrinsecamente reguladas por múltiplas interações entre várias moléculas secretadas, tais como Sonic Hedgehog (SHH), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (KILPATRICK; BARTLETT, 1995; KOHTZ et al., 1998), que atuam usualmente dependendo da concentração com que são regulados pelos componentes da matriz extracelular (ECM). Entretanto, pouco se sabe como a ECM do pulmão pode influenciar a proliferação e morte celular do encéfalo fora do seu local de origem, como nos casos de heterotopia encefálica pulmonar no pulmão.

No presente estudo, os fragmentos de tecido encefálico estavam bem preservados, às vezes exibindo mitoses com reação IHQ positiva para PCNA, indicando um potencial proliferativo destas células em ambos os grupos experimentais (E18 e P8). Estes resultados estão de acordo com os achados em casos humanos de heterotopia encefálica, quando se identificou uma difusa proliferação de células gliais (CHEN et al., 1982; KANBOUR et al., 1979).

A marcação para o anticorpo PCNA observada no tecido encefálico heterotópico do grupo E18 foi maior quando comparada com o grupo P8. Este achado foi similar para os grupos controles (CE18 > CP8), mostrando que o processo de proliferação é maior no período gestacional do que no período pós-natal, o que está de acordo com os dados da literatura (RICE; BARONE, 2000). A imunomarcação para PCNA no tecido encefálico heterotópico do grupo experimental E18 foi maior do que no grupo controle CE18 para região cortical

e a média de ambas as regiões (cortical e ZVS), mas não houve diferença estatística somente para a região ZVS. Já o IM (PCNA) do grupo P8 foi maior somente para a região cortical do grupo CP8. Uma possível explicação é que a proliferação das células neurais apresenta comportamento diferente dependendo da região do encéfalo em que está localizada. Assim, os resultados encontrados nesse estudo que demonstram um IM maior na região ZVS quando comparado com a região cortical em ambos os grupos controles (CE18 e CP8) estão de acordo com os dados da literatura (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIA-VERDUGO, 2002; QUIÑONES-HINOJOSA et al., 2006).

O entendimento dos mecanismos proliferativos do tecido neural e glial ainda não estão totalmente compreendidos, mas parece que o controle do sistema de ciclo celular tem função importante nesse processo. Em geral, há ativação de uma variedade de proteínas que está envolvida na progressão do ciclo celular durante a proliferação. Durante os eventos de hipóxia e isquemia, que provavelmente ocorreram durante o procedimento cirúrgico, ocorre a indução e ativação do ciclo celular, o qual está associado com o aumento da regulação do PCNA (PCNA, do inglês *proliferating cell nuclear marker*) (MEIJER et al., 1997; ZHU et al., 2007). Estes fatos podem auxiliar na interpretação dos resultados deste estudo, principalmente o aumento da imunomarcagem para o anticorpo PCNA no grupo E18. Em adição, a hipóxia também ativa as células neurais progenitoras quiescentes, podendo resultar em neurogênese (ZHOU; MILLER, 2006).

O aumento da imunomarcagem para o anticorpo Bcl2 no tecido heterotópico encefálico dos grupos experimentais (E18 e P8) pode ser explicado

pela extração mecânica do encéfalo do feto doador e posterior injeção dentro do tórax dos irmãos receptores. Este procedimento é muito agressivo e potencialmente induz morte celular. Adicionalmente, a ativação aberrante do ciclo celular pode induzir apoptose em células pós-mitose, tais como neurônios (COPANI et al., 2001; FREEMAN; ESTUS; JOHNSON, 1994; ZHU et al., 2007).

Normalmente as proteínas do ciclo celular são inicialmente reguladas pós-mitose neuronal (BYRNES et al., 2007; OKANO; PFAFF; GIBBS, 1993) e quando entram novamente no ciclo celular podem causar apoptose em tais células (BECKER; BONNI, 2004; NGUYEN; MUSHYNSKI; JULIEN, 2002). O aumento das proteínas do ciclo celular é correlacionado com apoptose neuronal após lesão medular experimental (DI GIOVANNI et al., 2003) e lesão cerebral (NATALE et al., 2003). Assim, enquanto a ativação aberrante do ciclo celular pode causar apoptose em células pós-mitose (BECKER; BONNI, 2004), ela pode induzir proliferação em células mitóticas, tais como astrócitos e microglia (BYRNES; FADEN, 2007; TAKUMA; BABA; MATSUDA, 2004).

Estes resultados podem explicar os achados de Quemelo e Peres (2008), que demonstraram que o processo de maturação neural ocorre no tecido encefálico heterotópico no pulmão, mas que houve uma perda neuronal quando comparado com o encéfalo normal, indicando que ocorreu uma redução seletiva da população neuronal, talvez por estes serem mais sensíveis que as células gliais (ZHOU; MILLER, 2006).

O presente estudo demonstrou que a proliferação neuronal ocorreu, demonstrando que o tecido heterotópico encefálico apresenta um potencial proliferativo destas células durante este período. Entretanto, os resultados

também apontam que uma parte deste tecido estava em processo apoptótico. Talvez, estudos futuros com o isolamento de regiões específicas tais com cerebelo, região cortical e ZVS e a investigação de moléculas secretadas, tais como os fatores de crescimento e as proteínas do ciclo celular possam ajudar entender melhor os mecanismos de proliferação e morte celular do tecido encefálico no pulmão.

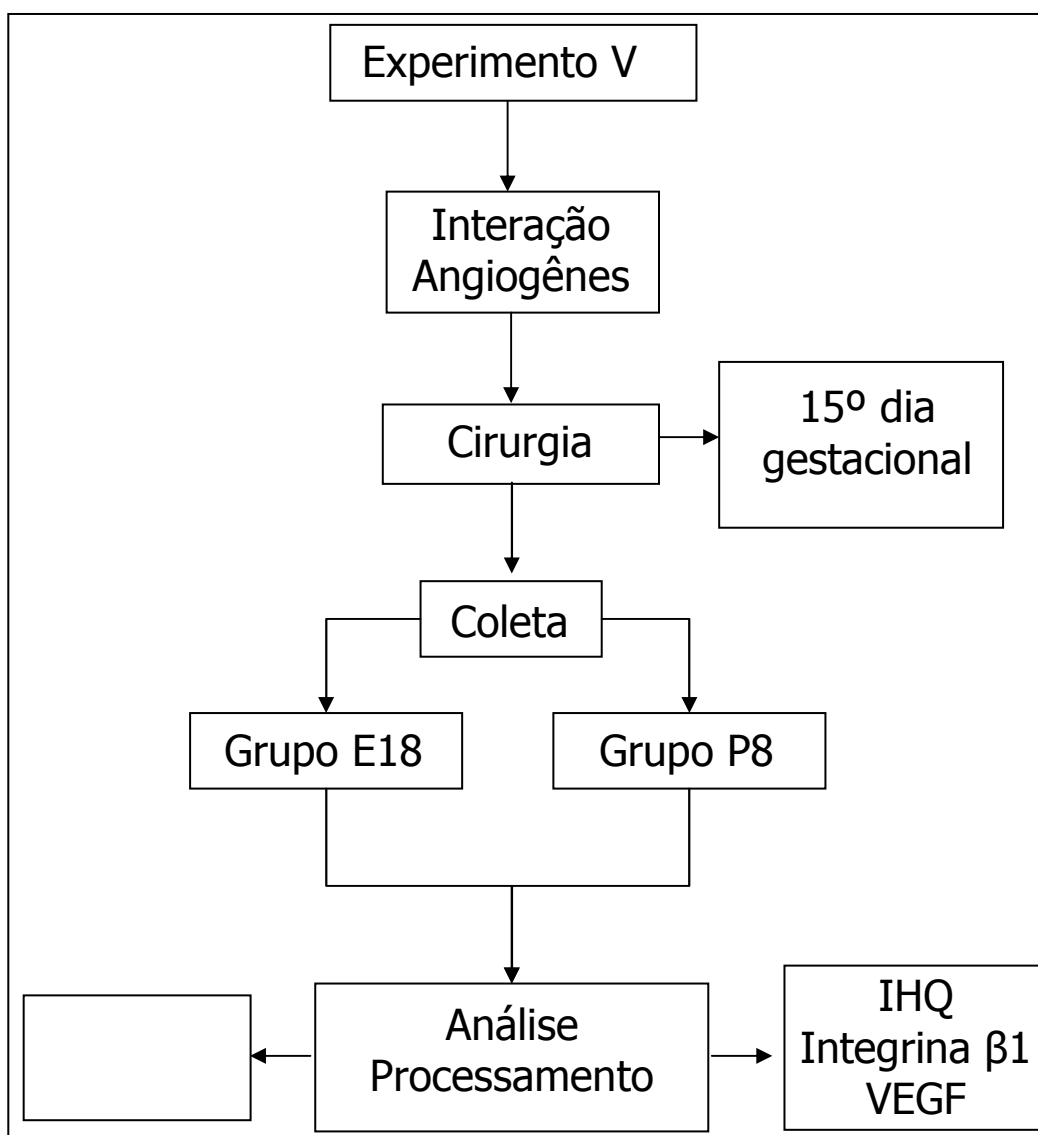
Apêndice D. Os resultados deste estudo estão compilados em um manuscrito a ser enviado para publicação¹.

¹ QUEMELO, P. R. V.; PERES, L. C. Proliferation and cell death in an experimental model of brain tissue heterotopia in the lung. (a ser publicado).

5.5. Experimento V – Expressão da Integrina $\beta 1$ e VEGF na heterotopia encefálica experimental

Como ficou demonstrado nos estudos anteriores, o tecido heterotópico mantém a capacidade de se manter vivo, proliferar e diferenciar, o que implica haver integração entre os tecidos encefálico e pulmonar. Para confirmar este fato, tornou-se importante mostrar a expressão de proteínas que sabidamente estão relacionadas com esta interação, objetivo deste estudo.

Organograma experimento – V



Material e Métodos - V

Para a análise do processo de adesão e interação celular foi realizada a reação IHQ para os anticorpos Integrina $\beta 1$ e VEGF nos mesmos seis fetos dos grupos utilizados no experimento III e IV.

A recuperação antigênica dos anticorpos foi realizada em panela a vapor em uma solução de tampão citrato pH 6.0 por 40 minutos. A reação IHQ para o anticorpo primário Integrina $\beta 1$ (Santa Cruz Biotechnology, California, USA – diluição: 1/250) seguiu-se pelo método da imunoperoxidase através do Complexo-Avidina-Biotina (ABC) (Dako Copor., Carpinteria, CA, USA), enquanto que o sistema de detecção para o anticorpo policlonal VEGF (Santa Cruz Biotechnology, California, USA – diluição: 1/400) foi o *SuperPicTure Polymer Detection Kit* (Zymed[®] Laboratories – Invitrogen, San Francisco, CA, USA) por 30 minutos. Para a revelação dos anticorpos foi utilizado o substrato DAB, seguido de contracoloração com hematoxilina por 10 segundos.

Foram analisados os implantes de tecido encefálico heterotópico no pulmão, observando sua localização, características morfológicas e IHQ.

A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism 4.00, para o teste Mann Whitney, considerando-se $p \leq 0,05$.

Resultados - V

A viabilidade dos fragmentos injetados foi demonstrada pela escassez de necrose, hemorragia e degeneração. O tecido encefálico heterotópico estava vascularizado e frequentemente com vasos adjacentes, com reação IHQ positiva para α -actina e VEGF (Figura 8).

A reação IHQ para o anticorpo $\beta 1$ integrina foi positiva dentro dos fragmentos de tecido encefálico de todos os fetos em ambos os grupos E18 e P8, e às vezes a imunomarcação estava presente na transição entre o tecido encefálico e o pulmonar/tronco (Figura 8).

Figura 8

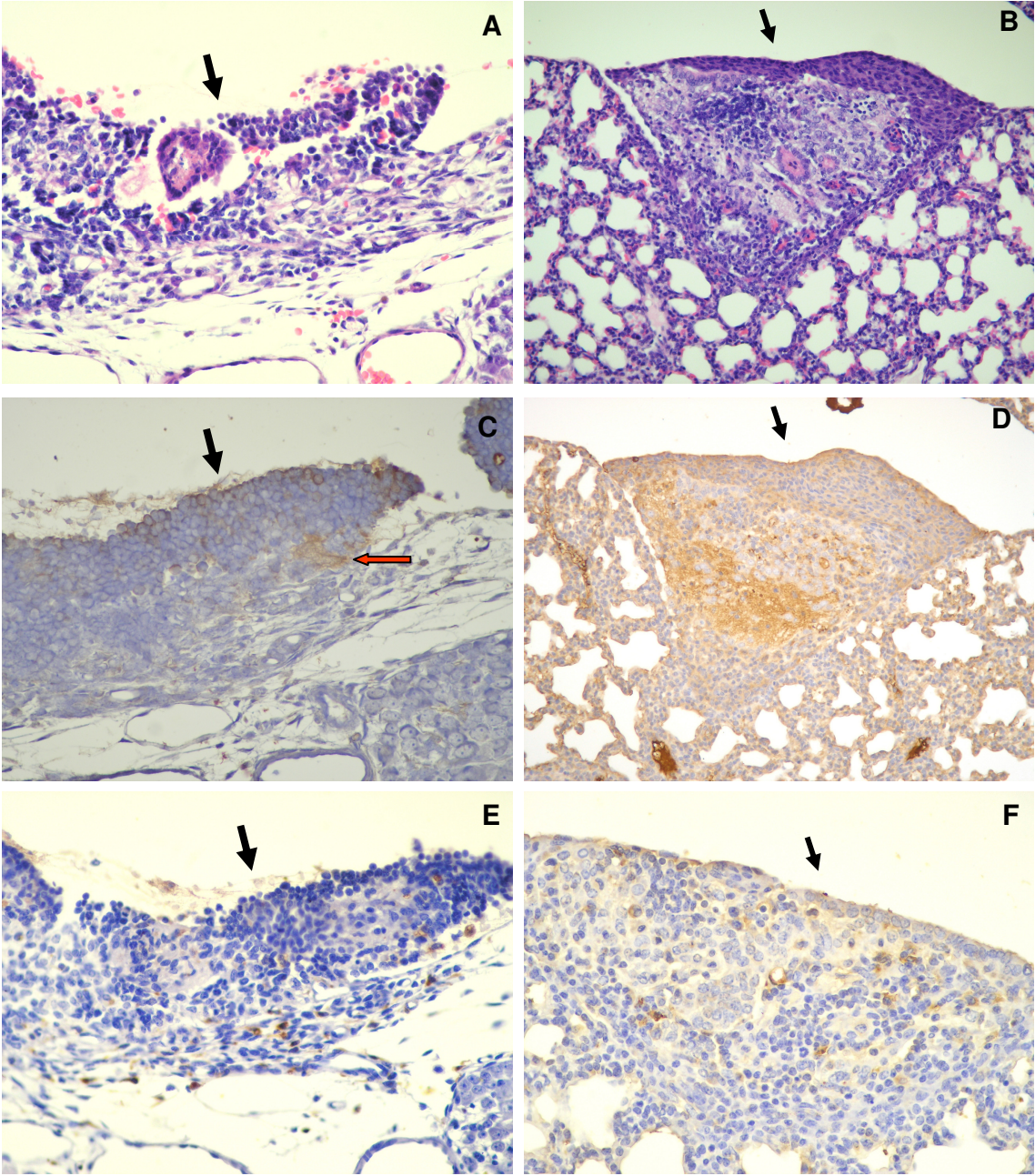


Figura 8. Fotomicrografia de cortes histológicos do tronco dos fetos com presença de tecido encefálico no tórax (seta) corados pela Hematoxilina e Eosina e submetido à reação imuno-histoquímica para o anticorpo Integrina $\beta 1$ e VEGF. A, C e E são do grupo E18, enquanto B, D e F são do grupo P8. A, mostra um fragmento de tecido encefálico implantado na pleura parietal, enquanto que em B o fragmento esta no meio do parênquima pulmonar. Notar em C e D que a expressão da Integrina $\beta 1$ estava presente dentro do tecido heterotópico encefálico e em C a imunomarcacão também estava presente na transição do tecido encefálico com o tecido torácico (seta vermelha). Em E e F notar imunomarcacão para VEGF. (A e B: corados pela Hematoxilina e Eosina; C e D reação imuno-histoquímica pelo método ABC, anticorpo primário Integrina $\beta 1$; E e F: reação imuno-histoquímica usando o método SuperPicTure Polymer Detecetion Kit para o anticorpo primário VEGF, revelados com DAB; Aumento de 400X).

Discussão - V

As moléculas de adesão têm como função promover a conexão célula-célula e as células com a ECM adjacente, apresentando assim um papel fundamental na organização e controle da estrutura dos tecidos e da morfogênese durante o desenvolvimento embrionário, bem como durante a fase adulta (ALBERTS et al., 2002; GIMOND et al., 1999). Uma das principais classes de famílias de receptores celulares que promovem essas interações são as integrinas. Elas promovem a interação das células com o meio extracelular, tendo um papel importante na interação e integridade das células (ARCANGELIS, 2000; HANASHI et al., 2003; RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987).

Desta maneira, a positividade no tecido heterotópico encefálico no pulmão para integrina $\beta 1$ em ambos os grupos experimentais (E18 e P8) no

presente estudo, pode ter contribuído para a manutenção das características morfológicas do tecido heterotópico, o qual consistia de células pequenas, de núcleos ovóides densos, escasso citoplasma, arranjadas em placas sobre fundo fibrilar, com reação IHQ positiva para GFAP e NeuN.

Da mesma forma, a expressão para integrina $\beta 1$ também indica que essa molécula de adesão estava preservada nesse tecido, mesmo fora do seu local de origem (ALBERTS et al., 2002; GIMOND et al., 1999; HANASHI et al., 2003) e deve ter sido importante para este processo uma vez que sabe-se que ela está envolvida com a transdução de sinais para dentro e para fora da célula, regulando a motilidade, crescimento e sobrevivência deste tecido (ALBERTS et al., 2002; HILLIS; MACLEOD, 1996). Adicionalmente, a expressão para integrina $\beta 1$ presente na transição do tecido heterotópico encefálico com o tecido pulmonar/tórax pode indicar que o tecido heterotópico estava ancorado e aderido ao pulmão e que ocorreu comunicação entre os tecidos.

O procedimento cirúrgico envolvido neste modelo, em que o tecido foi removido, picotado e implantado no pulmão dos irmãos, é agressivo e potencialmente induz morte celular, como demonstrado nos experimentos III e IV. Por outro lado, o método pode liberar substâncias que induzem o processo inflamatório, o qual ativa a produção de fatores de crescimento na região, podendo assim ajudar na sobrevivência do tecido heterotópico encefálico (BARKER; WIDNER, 2004; DUAN et al., 1998). Entretanto, nós observamos poucas células inflamatórias, talvez porque o sistema imunológico no período fetal é imaturo e sendo susceptível à tolerância de tecidos com antígenos estranhos. Os fragmentos de tecido encefálico, por outro lado apresentavam-se

vascularizados, com reação IHQ positiva para VEGF, indicando a provável ativação da produção de fatores de crescimento no local do implante. Desta forma, estes dados reforçam a possibilidade de implantação e sobrevivência desse tecido e estão de acordo com os nossos achados, podendo explicar a escassez de necrose, hemorragia e degeneração no tecido heterotópico encefálico.

Uma possível explicação para os capilares contendo hemácias no tecido heterotópico implantado, é que o material introduzido dentro do tórax contém fragmentos sólidos de tecido e não apenas células isoladas, desta forma contendo pequenos vasos que podem formar conexões com a vasculatura do hospedeiro, como já citado por Barker e Widner (2004). Adicionalmente, o procedimento cirúrgico, como já citado anteriormente, pode induzir hipóxia do tecido encefálico, o que estimula o HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor I*), a qual por sua vez ativa a transcrição do gene VEGF para a produção e formação de vasos sanguíneos para o tecido (ALBERTS et al., 2002).

Os resultados deste estudo indicam que o tecido heterotópico não somente sobreviveu a um dramático evento tal como a desagregação mecânica, como também ocorre nos casos humanos, porém através de mecanismos diferentes, mas manteve a expressão de integrina $\beta 1$ e VEGF independente das influências do tecido local.

A interação entre os tecidos encefálico e pulmonar pode ser explicada pelo fato de as heterotopias encefálicas serem induzidas, como neste estudo, ou surgirem, como ocorre nos casos humanos, ainda no período da organogênese, quando as células ainda não estão completamente

diferenciadas. Entretanto, nós não sabemos se as funções neuronais estão preservadas no tecido heterotópico, uma vez que as proteínas no ECM podem influenciar na função celular, criando assim um complexo mecanismo de feedback (REDDY; MANGALE, 2003). Estudos futuros com outras metodologias de análise poderão investigar a presença de potencial de ação, identificar os tipos de neurônios presentes e entender melhor o processo de comunicação e sinalização entre neurônio-neurônio e neurônio-pulmão/tórax.

Em conclusão, o tecido heterotópico encefálico mostrou-se positivo para integrina $\beta 1$ e VEGF em ambos os grupos, demonstrando que o tecido estava definitivamente implantado ao pulmão/tórax e não apenas ancorado e aderido, pois constatou-se a expressão de fatores de crescimento no local da implantação, mesmo após 12 dias de implantação.

Apêndice E. Os resultados deste estudo estão compilados em um manuscrito a ser enviado para publicação².

²QUEMELO, P. R. V.; PERES, L. C. $\beta 1$ integrin and VEGF expression in na experimental modelo of brain tissue heterotopia in the lung. (A ser publicado)

6. Considerações Finais

A ciência é movida pela curiosidade, não pela utilidade. De que nos serve saber que há buracos negros no espaço ou que as mitocôndrias podem ter sido bactérias incorporadas às células? Desta forma, desenvolver um modelo experimental de heterotopia encefálica no pulmão, que é uma anormalidade rara, é importante pelo entendimento dos fenômenos biológicos envolvidos como a implantação, interação e sobrevivência do tecido encefálico em um local diferente da sua origem, não pela sua aplicação, o que se procurou fazer nesta sequência de experimentos. De qualquer forma, uma vez que muitos aspectos da vida neuronal dependem da interação e sinalização entre célula-célula e célula-ECM, a existência de um modelo experimental pode ser fundamental como ferramenta de investigação. Não obstante, se quisermos procurar uma aplicação prática para este modelo, devemos lembrar que, muito embora os fetos humanos com DFTN sejam abortados ou morrem logo após o nascimento, limitando as possíveis aplicações destes conhecimentos na prática médica, é possível que estes venham a ter uma aplicação inusitada em casos de transplantes de múltiplos órgãos, envolvendo coração e pulmão. Isto se deve ao fato de que os doadores em geral são aqueles que sofrem trauma crânio-encefálico suficiente para potencialmente gerar êmbolos encefálicos, que podem se alojar no pulmão, o que é um fato conhecido (COLLINS; DAVIS, 1994; ROSENDALE et al., 1992; SIMONETTI et al., 1998). Como estes pacientes em geral não sobreviviam o suficiente para que houvesse possibilidade de efetiva implantação heterotópica no pulmão, esta não era uma preocupação médica. No entanto, com os transplantes de pulmão ou coração-pulmão, existe a possibilidade real de que isto aconteça. Adicione-se a isto a necessária

imunossupressão a que os receptores são submetidos e então aumenta-se o risco deste evento. Poucos nódulos de tecido encefálico no pulmão podem não ter repercussão clínica, mas há que se lembrar de que há relatos de casos humanos de heterotopia encefálica em que ocorreu insuficiência respiratória, culminando na internação (FULLER; GIBBS, 1989; GONZALEZ-CRUSSI; BOGGS; RAFFENSPERGER, 1980) e até mesmo na morte da criança (MORGAN et al., 2003). Desta maneira, o modelo experimental desenvolvido neste estudo poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos com essa anormalidade, bem como outros fenômenos patológicos, como os processos invasivos de neoplasias e a implantação de células e tecidos normais ou não, e compreender melhor os mecanismos de crescimento, migração, diferenciação e interação celular do tecido nervoso, entre outros.

7. Conclusões

1. Embora ambos os grupos E7 e E8 sejam propícios para a indução de defeitos no desenvolvimento pela administração de ácido retinóico, este último foi aquele no qual nós observamos maior número de defeitos, principalmente os DFTN. No entanto, não foi observada a presença de tecido heterotópico no pulmão dos fetos com DFNT.

2- Desenvolveu-se um modelo experimental cirúrgico de heterotopia encefálica no pulmão por cirurgia fetal que se mostrou eficiente, de execução relativamente simples e total interação com o tecido pulmonar e pleural, pois os fragmentos implantados pareciam bem preservados, aderidos à pleura parietal e visceral ou mesmo dentro do parênquima pulmonar.

3- Apesar da redução da proporção dos neurônios em ambos os grupos IEP, os resultados mostram que o processo de maturação neuronal do tecido heterotópico encefálico ocorre no pulmão de maneira semelhante ao do próprio encéfalo.

4- A proliferação neuronal foi observada no período gestacional, bem como no período pós-natal, demonstrando o potencial proliferativo destas células. Entretanto, os resultados também demonstraram que uma parte deste tecido estava em processo apoptótico.

5- O tecido heterotópico encefálico mostrou-se positivo para integrina $\beta 1$ e VEGF em ambos os períodos, demonstrando que o tecido estava ancorado e aderido ao pulmão mesmo após 12 dias do procedimento, e que a liberação de fatores de crescimento no local da implantação pode ter contribuído para a sobrevivência do tecido heterotópico.

Referências

1. ACLOQUE, H.; RISSON, V.; BIROT, A. M.; KUNITA, R.; PAIN, B.; SAMARUT, J. Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo. **Mech. Dev.**, Shannon, v. 103, p. 79-91, 2001.
2. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
3. ALI-KHAN, S.; HALES, B. Retinoid receptor antagonists alter the pattern of apoptosis in organogenesis stage mouse limbs. **Toxicol. Sci.**, Orlando, v. 90, p. 208-20, 2006.
4. ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 22, p. 629-34, 2002.
5. ARCANGELIS, A. D. Integrins and ECM functions, role in vertebrate development. **Trends. Genet.**, Amsterdam, v. 16, p. 389-95, 2000.
6. BAERGEN, R. N.; CASTILLO, M. M.; MARIO-SINGH, B.; STEHLY, A. J.; BENIRSCHKE, K. Embolism of fetal brain tissue to the lungs and the placenta. **Pediatr. Pathol. Lab. Med.**, Washington, v. 17, p. 159-67, 1997.
7. BARBER, R. C.; LAMMER, E. J.; SHAW, G. M.; GBBER, K. A.; FINNELL, R. H. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando, v. 66, p. 1-9, 1999.
8. BARKER, R. A.; WIDNER, H. Immune problems in central nervous system cell therapy. **NeuroRx**, Philadelphia, v. 1, n. 4, p. 472-81, 2004.
9. BECKER, E. B.; BONNI, A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 72, p. 1-25, 2004.
10. BITTENCOURT, D. G.; BARRETO, M. W. G.; FRANÇA, W. M. G.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, L. A. V.; SBRAGIA, L. Impact of corticosteroid on intestinal injury in a gastroschisis rat model: morphometric analysis. **J. Pediatr. Sur.**, New York, v. 41, p. 547-53, 2006.
11. BLASCHKE, A. J.; STALEY, K.; CHUN, J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. **Development**, Cambridge, v. 122, p. 1165-74, 1996.
12. BREWER, S.; WILLIAMS, T. Finally, a sense of closure? Animal models of human ventral body wall defects. **Bioessays**, New York, v. 26, p. 1307-21, 2004.

13. BYRNES, K. R.; FADEN, A. I. Role of cell cycle proteins in CNS injury. **Neurochem Res.**, New York, p. 32, n. 10, p. 1799-807, 2007.
14. BYRNES, K. R.; STOICA, B. A.; FRICKE, S.; DI GIOVANNI, S.; FADEN, A. I. Cell cycle activation contributes to post-mitotic cell death and secondary damage after spinal cord injury. **Brain**, London, v. 130, p. 2977-92, 2007.
15. BUYSE, M. L. (Ed.). **Birth defects encyclopedia**. Dover: Center for Birth Defects Information Services, 1990.
16. CAMPO, E.; BOMBI, J. A. Central nervous system heterotopia in the lung of a fetus with cranial malformation. **Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.**, Heidelberg, v. 391, p. 117-22, 1981.
17. CARLSON, B. M. **Human embryology and developmental biology**. St Louis: Mosby Year Book, 1994.
18. CHEN, E. Y.; FUJINAGA, M.; GIACCIA, A. J. Hypoxia microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development. **Teratology**, New York, v. 60, p. 215-25, 1999.
19. CHEN, W. J.; KELLY, M. M.; SHAW, C. M.; MOTTET, N. K. Pathogenic mechanisms of heterotopic neural tissue associated with anencephaly. **Human Pathol.**, London, v. 13, p. 179-82, 1982.
20. COLLINS, K. A.; DAVIS, G. J. A retrospective and prospective study of cerebral tissue pulmonary embolism in severe head trauma. **J. Forensic Sci.**, Chicago, v. 39, p. 624-28, 1994.
21. COPANI, A.; UBERTI, D.; SORTINO, M. A.; BRUNO, V.; NICOLETTI, F.; MEMO, M. Activation of cell-cycle-associated proteins in neuronal death: A mandatory or dispensable path? **Trend. Neurosci.**, Amsterdam, v. 24, p. 25-31, 2001.
22. DAMSKY, C. H.; SUTHERLAND, A.; FISHER, S. Extracellular matrix 5 adhesive interaction in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation. **FASEB J.**, Bethesda, v. 7, p. 1320-29, 1993.
23. DI GIOVANNI, S.; KNOBLACH, S. M.; BRANDOLI, C.; ADEN, S. A.; HOFFMAN, E. P.; FADEN, A. I. Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle in neuronal death. **Ann. Neurol.**, Boston, v. 53, p. 454-68, 2003.

24. DIEZ-PARDO, J. A. A.; MARINO, J. M.; BAOQUAN, Q.; DELGADO-BAEZA, E.; FERNANEEZ, A.; MORALES, M. C.; TOVAR, J. A. Neural tube defects: an experimental model in the fetal rat. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, Stuttgart, v. 5, p. 198-202, 1995.
25. DUAN, W. M.; WINDER, H.; CAMERON, R. M.; BRUNDIN, P. Quinolinic acid-induced inflammation in the striatum does not impair the survival of neural allografts in the rat. **Eur. J. Neurosci.**, Oxford, v. 10, p. 2595-606, 1998.
26. FINE, E. L.; HORAL, M.; CHANG, T. I.; FORTIN, G.; LOEKEN, M. R. Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. **Diabetes**, New York, v. 48, p. 54-62, 1999.
27. FISHER, N. L.; SMITH, D. W. Occipital encephalocele and early gestational hyperthermia. **Pediatrics**, Baltimore, v. 68, p. 480-3, 1981.
28. FREEMAN, R. S.; ESTUS, S.; JOHNSON, E. M., JR. Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. **Neuron**, Cambridge, v. 12, p. 343-55, 1994.
29. FULLER, C.; GIBBS, A. R. Heterotopic brain tissue in the lung causing acute respiratory distress in an infant. **Thorax**, London, v. 44, p. 1045-6, 1989.
30. GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult brain. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 22, p. 612-3, 2002.
31. GIEHL, K. M. Neuronal development. **Prog. Exp. Tumor. Res.**, Basel, v. 39, p. 1-29, 2007.
32. GIMOND, C.; VAN DER FLIER, A.; VAN DELFT, S.; BRAKEBUSCH, C.; KUIKMAN, I.; COLLARD, J. G.; FASSLER, R.; SONNENBERG, A. Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. **J. Cell Biol.**, New York, v. 147, n. 6, p. 1325-40, 1999.
33. GONZALEZ-CRUSSI, F.; BOGGS, J. D.; RAFFENSPERGER, J. G. Brain heterotopia in the lungs. A rare cause of respiratory distress in the newborn. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 73, p. 281-5, 1980.
34. GORDON, N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. **Brain. Dev.**, Tokyo, v. 17, p. 73-7, 1995.

35. GREENE, N. D.; COPP, A. J. Mouse models of neural tube defects: investigating preventive mechanisms. **Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.**, Hoboken, v. 135, n. 1, p. 31-41, 2005.
36. GUSMÃO, C. V. B.; PAULI, J. R. I.; ALVES, J. M.; VELLOSO, L. A.; SAAD, M. J. A.; BELANGERO, W. D.; A influência do estímulo mecânico na expressão da quinase de adesão focal no osso in vivo. **Matéria (Rio J.)**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 470-9, 2007.
37. GUTIERREZ, C. M.; RIBEIRO, C. N.; DE LIMA, G. A.; YANAGUITA, M. Y.; PERES, L. C. An experimental study on the effects of ethanol and folic acid deficiency, alone or in combination, on pregnant Swiss mice. **Pathology**, Surry Hills, v. 39, n. 5, p. 495-503, 2007.
38. HANASHI, H.; SHIOKAWA, S.; AKIMOTO, Y.; SAKAI, K.; SAKAI, K.; SUZUKI, N.; KABIR-SALMANI, M.; NAGAMATSU, S.; IWASHITA, M.; NAKAMURA, Y. Physiologic role of decidual beta1 integrin and focal adhesion kinase in embryonic implantation. **Endocr. J.**, Tokyo, v. 50, p. 189-98, 2003.
39. HILLIS, G. S.; MACLEOD, A. M. Integrins and disease. **Clin. Sci.**, London, v. 91, n. 6, p. 639-50, 1996.
40. HISHIDA, R.; NAU, H. VPA-induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur amino acids and glutathione. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, New York, v. 18, p. 49-61, 1998.
41. IMURA, T.; KORNBLUM, H. I.; SOFRONIEW. M. V. The predominant neural stem cell isolated from postnatal and adult forebrain but not early embryonic forebrain expresses GFAP. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 23, p. 2824-32, 2003.
42. JUNQUEIRA, L. C. U.; ZAGO, D. **Fundamentos de embriologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1972.
43. KANBOUR, A. I.; BARMADA, M. A.; KLIONAKY, B.; MOSSY, J. Anencephaly and heterotopic central nervous tissue in lungs. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chapel Hill, v. 103, p. 116-8, 1979.
44. KANDEL, E. R. Nerve cells and behavior. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSEL, T. (Eds.). **Principles of neural science**. New York: Elsevier, 1991. p. 19-32.
45. KAWANISHI, C. Y.; HARTIG, P.; BOBSEINE, K. L.; SCHMID, J.; CARDON, M.; MASSENBURG, G.; CHEMOFF, N. Axial skeletal and Hox expression domain alterations induced by retinoic acid, valproic acid, and bromoxynil during murine development. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, New York, v. 17, p. 346-56, 2003.

46. KEMPERMANN, G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 22, p. 635–8, 2002.
47. KERSHISNIK, M. M.; KAPLAN, C.; CRAVEN, C. M.; CAREY, J. C.; TOWNSEND, J. J.; KNISELY, A. S. Intrapulmonary neuroglial heterotopia. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 116, p. 1043-6, 1992.
48. KHOGA, H.; OBATA, K. Retinoic acid-induced neural tube defects with multiple canals in the chick: immunohistochemistry with monoclonal antibodies. **Neurosci. Res.**, Shannon, v. 13, p. 175-87, 1992.
49. KILPATRICK, T. J.; BARTLETT, P. F. Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 15, n. 5 pt 1, p. 3653-61, 1995.
50. KING, W. I. Tumor (embryoma) of lung containing brain tissue. **Med. Bull.**, Paris, v. 15, p. 181-3, 1938.
51. KOHTZ, J. D.; BAKER, D. P.; CORTE, G.; FISHELL, G. Regionalization within the mammalian telencephalon is mediated by changes in responsiveness to Sonic Hedgehog. **Development**, Cambridge, v. 125, n. 24, p. 5079-89, 1998.
52. KULESA, P.; ELLIS, D. L.; TRAINOR, P. A. Comparative analysis of neural crest cell death, migration, and function during vertebrate embryogenesis. **Dev. Dyn.**, New York, v. 229, p. 14-29, 2004.
53. KUNO, N.; KADOMATSU, K.; MURAMATSU, T. Determination of the optimal time and dosage of all-trans acid retinoic for induction of murine exencephaly. **Teratology**, New York, v. 60, p. 63-7, 1999.
54. LEVINE, J. M.; REYNOLDS, R.; FAWCETT, J. W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. **Trends. Neurosci.**, Cambridge, v. 24, p. 39-47, 2001.
55. MADEN, M. Retinoids and spinal cord development. **J. Neurobiol.**, New York, v. 66, p. 726-38, 2006.
56. MARSHALL, H.; MORRINSON, A.; MICHÈLE, S.; PÖPPERI, H.; KRUMLAUF, R. Retinoids and Hox genes. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, p. 969-78, 1996.

57. MASHAYEKHI, F. Neural cell death is induced by neutralizing antibody to nerve growth factor: an in vivo study. **Brain. Dev.**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 112-7, 2008.
58. MEIJER, L.; BORGNE, A.; MULNER, O.; CHONG, J. P.; BLOW, J. J.; INAGAKI, N.; INAGAKI, M.; DELCROS, J. G.; MOULINOUX, J. P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 243, p. 527-36, 1997.
59. MENDONÇA, E. D.; GUTIERREZ, C. M.; PERES, L. C. Brain tissue fragments in the amniotic fluid of rats with neural tube defect. **Pathology**, Surry Hills, v. 37, n. 2, p. 152-6, 2005.
60. MORGAN, T.; ANDERSON, J.; JORDEN, M.; KELLER, K.; ROBINSON, T. HINTZ, S. Pulmonary glial in a monoamniotic twin. **Pediatr. Pulmonol.**, Philadelphia, v. 36, p. 162-6, 2003.
61. MULDER, G. B.; MANLEY, N.; GRANT, S.; SCHIMIDT, K.; ZENG, W.; ECKHOFF, C.; MAGGIO-PRICE, L. Effects of excess vitamin A on development of cranial neural crest-derived structures: a neonatal and embryologic study. **Teratology**, New York, v. 62, p. 214-26, 2000.
62. MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, Cambridge, v. 116, n. 1, p. 201-11, 1992.
63. NATALE, J. E.; AHMED, F.; CERNAK, I.; STOICA, B.; FADEN, A. I. Gene expression profile changes are commonly modulated across models and species after traumatic brain injury. **J. Neurotrauma.**, New York, v. 20, p. 907-27, 2003.
64. NGUYEN, M. D.; MUSHYNSKI, W. E.; JULIEN, J. P. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. **Cell Death Differ.**, London, v. 9, p. 1294-306, 2002.
65. NISHIO, S.; MIZUNO, J.; BARROW, D. L.; TAKEI, Y.; O'BRIEN, M. S. Intracranial extracerebral glioneural heterotopia. **Childs. Nerv. Syst.**, Berlin, v. 4, n. 4, p. 244-8, 1988.
66. NISWANDER, L. Pattern formation: old models out on limb. **Nat. Rev. Genet.**, London, v. 4, p. 133-43, 2003.
67. OKANO, H. J.; PFAFF, D. W.; GIBBS, R. B. RB and Cdc2 expression in brain: correlations with 3H-thymidine incorporation and neurogenesis. **J. Neurosci.**, Baltimore, v. 13, p. 2930-8, 1993.

68. OKEDA, R. Heterotopic brain tissue in the submandibular region and lung. Report of two cases and comments about pathogenesis. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v. 43, n. 3, p. 217-20, 1978.
69. ÖNGÜR, D.; POHLMAN, J.; DOW, A. L.; EISCH, A. J.; EDWIN, F.; HECKERS, S.; COHEN, B. M.; PATEL, T. B.; CARLEZON, W. A. Electroconvulsive seizures stimulate glial proliferation and reduce expression of sprouty2 within the prefrontal cortex of rats. **Biol. Psychiatry.**, New York, v. 2, p. 505-12, 2007.
70. OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v. 14, p. 453-501, 1991.
71. PADMANABHAN, R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. **Congenit. Anom.**, Osaka, v. 46, p. 55-67, 2006.
72. PADMANABHAN, R. Retinoic acid-induced caudal regression syndrome in the mouse fetus. **Reprod. Toxicol.**, Washington, v. 12, p. 139-51, 1998.
73. PERES, L. C. Review of pediatric autopsies performed at a University Hospital in Ribeirão Preto, Brazil. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 130, p. 62-8, 2006.
74. PERES, L. C.; BARBOSA, G. H. T. S. Brain tissue aspiration in neural tube defect. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 63, p. 614-7, 2005.
75. PERES, L. C.; BARBOSA, G. H. T. S.; HANSINGINF, S. E.; PINA-NETO, J. M. Heterotopic Brain tissue in the lung. **Ann. Diagn. Paediatr. Pathol.**, Philadelphia, v. 7, p. 41-4, 2003.
76. QUEMELO, P. R. V.; LOURENÇO, C. M.; PERES, L. C. Teratogenic effect of retinoic acid in Swiss mice. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 451-6, 2007.
77. QUEMELO, P. R. V.; SBRAGIA, L.; PERES, L. C. Development of an experimental model of brain tissue heterotopia in the lung. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 88, p. 337-42, 2007.
78. QUEMELO, P. R. V.; PERES, L. C. Neuronal maturation in an experimental model of brain tissue heterotopia in the lung. **Exp. Biol. Med.** In press 2008.
79. QUIÑONES-HINOJOSA, A.; SANAI, N.; SORIANO-NAVARRO, M.; GONZALEZ-PEREZ, O.; MIRZADEH, Z.; GIL-PEROTIN, S.; ROMERO-RODRIGUEZ, R.; BERGER, M. S.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human

- subventricular zone: cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **J. Comp. Neurol.**, New York, v. 494, n. 3, p. 415-34, 2006.
80. RAFF, M. C. Social controls on cell survival and cell death. **Nature**, London, v. 356, p. 397-400, 1992.
81. REDDY, K. V.; MANGALE, S. S. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. **Tissue Cell.**, Edinburgh, v. 35, n. 4, p. 260-73, 2003.
82. RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ. Health. Perspect.**, Triangle Park, v. 108, p. 511-33, 2000.
83. ROBBOY, S. I.; SCULLY, R. E. Ovarian teratoma with glial implants on peritoneum. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 1, p. 643-4, 1970.
84. ROSENDALE, B. E.; KEENAN, R. J.; DUNCAN, S. R.; HARDESTY, R. L.; ARMITAGE, J. A.; GRIFFITH, B. P.; YOUSEM, S. A. Donor cerebral emboli as a cause of acute graft dysfunction in lung transplantation. **J. Heart Lung Transplant.**, St. Louis, v. 11, p. 72-6, 1992.
85. ROSS, S. A.; MCCAFFERY, P. J.; DRÄGER, V. C.; DE LUCA, L. M. Retinoids in embryonal development. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 80, p. 1021-54, 2000.
86. ROUGON, G.; HOBERT, O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. **Annu. Rev. Neurosci.**, Palo Alto, v.26, p.207-38, 2003.
87. RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, New York, v. 238, p. 491-7, 1987.
88. SANAI, N.; TRAMONTIN, A. D.; QUINONES-HINOJOSA, A.; BARBARO, N. M.; GUPTA, N.; KUNWAR, S.; LAWTON, M. T.; MCDERMOTT, M. W.; PARSA, A. T.; MANUEL-GARCIA, V. J.; BERGER, M. S.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. **Nature**, London, v. 427, p. 740-4, 2004.
89. SAXÉN, L.; LAPOLA, J. (Eds.). **Congenital defects**. New York: Holt, Inehart and Winston, 1969.
90. SIEKMANN, A. F.; COVASSIN, L.; LAWSON, N. D. Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. **Bioessays**, Cambridge, v. 30, n. 4, p. 303-13, 2008.

91. SIM, K. B.; CHO, B. K.; CHI, J. G.; WANG, K. C. Morphological study of surgically induced open neural tube defect in old (14 and 21 days) chick embryos. **Neurosci. Lett.**, Amsterdam, v. 192, p. 61-4, 1995.
92. SIMON, C.; MARTIN, J. C.; GALAN, A.; VALBUENA, D.; PELLICER, A. Embryonic regulation in implantation. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, New York, v. 17, p. 267-73, 1999.
93. SIMONETTI, V. A.; BASHA, M. A.; ALLENSPACH, L.; KLOSTERMAN, K. G.; NAKHLEH, R.; HIGGINS, R. S. Donor cerebral tissue pulmonary emboli in a functioning transplanted lung. **Clin. Transplant.**, Copenhagen, v. 12, p. 504-7, 1998.
94. SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B.; GOODMAN, D. S. **The retinoids: biology, chemistry and medicine.** 2nd ed. New York: Raven Press, 1994.
95. STERN, C. D. Neural induction: old problem, new findings, yet more questions. **Development**, Cambridge, v. 132, n. 9, p. 2007-21, 2005.
96. TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Prog. Neurobiol.**, Oxford, v. 72, p. 111-27, 2004.
97. TOM, C.; JURILOFF, D. M.; HARRIS, M. J. Studies of the effect of retinoic acid on anterior neural tube closure in mice genetically liable to exencephaly. **Teratology**, New York, v. 43, p. 24-40, 1991.
98. VALDES-DAPENA, M. A.; AREY, J. B. Pulmonary emboli of cerebral origin in the newborn. A report of two cases. **Arch. Path.**, Chicago, v. 84, p. 643-6, 1967.
99. WARBURTON, D.; WUENSCHHELL, C.; FLORES-DELGADO, G.; ANDERSON, K. Commitment and differentiation of lung cell lineages. **Biochem. Cell. Biol.**, Ottawa, v. 76, p. 971-95, 1998.
100. YAMAMOTO, A.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, N.; IWAMOTO, T.; YOSHIOKA, A.; KUNIYASU, H.; KISHIMOTO, T.; MORI, T. Neurons and astrocytes exhibit lower activities of global genome nucleotide excision repair than do fibroblasts. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 6, n. 5, p. 649-57, 2007.
101. YANAGUITA, M. Y.; GUTIERREZ, C. M.; RIBEIRO, C. N.; LIMA, G.A.; MACHADO, H. R.; PERES, L. C. Pregnancy outcome in ethanol-treated mice with folic acid supplementation in saccharose. **Childs. Nerv. Syst.**, Berlin, v. 24, n. 1, p. 99-104, 2007.

102. YASHIRO, K.; ZHAO, M. U.; YAMASHITA, K.; NISHIJIMA, M.; NISHINO, J.; SAIJOH, Y.; SAKAI, Y.; HAMADA, H. Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. **Dev. Cell.**, Cambridge, v. 6, p. 411-22, 2004.
103. ZHOU, L.; MILLER, C. A. Mitogen-activated protein kinase signaling, oxygen sensors and hypoxic induction of neurogenesis. **Neurodegener. Dis.**, Basel, v. 3, p. 50-5, 2006.
104. ZHOU, Y.; DAMSKY, C. H.; FISHER, S. J. Pre eclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype one cause of defective endovascular invasion in this syndrome?. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 99, p. 2152-64, 1997.
105. ZHU, Z.; ZHANG, Q.; YU, Z.; ZHANG, L.; TIAN, D.; ZHU, S.; BU, B.; XIE, M.; WANG, W. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo. **Glia**, New York, v. 55, n. 5, p. 546-58, 2007.
106. ZILE, M. H. Vitamin A and embryonic development: an overview. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 128, p. 455-8, 1998.
107. ZUSMAN, I.; YAFFE, P.; PINUS, H.; ORNOY, A. Effects of pulsing electromagnetic fields on the prenatal and postnatal development in mice and rats: in vivo and in vitro studies. **Teratology**, New York, v. 42, p. 157-70, 1990.

Apêndice A

Apêndice D

Apêndice E

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)