

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas

Pedro Moreno Pimentel Coelho

**Avaliação do Papel de Células da Fração Mononuclear do Sangue
de Cordão Umbilical Humano no Sistema Nervoso Central de Ratos
Submetidos a Hipóxia-Isquemia Neonatal**

Rio de Janeiro

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Pedro Moreno Pimentel Coelho

**Avaliação do Papel de Células da Fração Mononuclear do Sangue
de Cordão Umbilical Humano no Sistema Nervoso Central de Ratos
Submetidos a Hipóxia-Isquemia Neonatal**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Morfológicas.

Orientadores: Rosalia Mendez Otero e Marcelo Felipe Santiago

Rio de Janeiro

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Pedro Moreno Pimentel Coelho.

Avaliação do Papel de Células Mononucleares do Sangue de Cordão Umbilical Humano no Sistema Nervoso Central de Ratos Submetidos a Hipóxia-Isquemia Neonatal/ Pedro Moreno Pimentel Coelho. Rio de Janeiro, 2010.

XV, 181 f.: 22 il.

Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Rosalia Mendez Otero e Marcelo Felipe Santiago

1. Terapia Celular. 2. Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal. 3. Cordão Umbilical. 4. Células Tronco/Progenitoras. – Teses. I.Mendez-Otero, Rosalia e Santiago, Marcelo Felipe (Orient.). II.Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas. III. Título.

RESUMO

COELHO, Pedro Moreno Pimentel. Avaliação do Papel de Células da Fração Mononuclear do Sangue de Cordão Umbilical Humano no Sistema Nervoso Central de Ratos Submetidos a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal permanece como uma importante causa de mortalidade e morbidade infantil no mundo. Nesse trabalho o possível papel terapêutico das células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano foi avaliado em um modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal. De acordo com o modelo de Rice-Vannucci, foi realizada a ligação da artéria carótida comum direita de ratos Lister-Hooded com 8 dias de vida (P7). Os animais foram deixados por 2 horas sob luz quente e em seguida foram expostos por 90 minutos a um ambiente com 8% de gás O₂ e 92% de N₂. Três horas após a retirada dos animais da câmara de hipóxia, foi realizada a injeção intraperitoneal de 2x10⁶ células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano (grupo tratado) ou de veículo (grupo não tratado). Foram encontradas raras células transplantadas no córtex e no estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia, dois dias após a lesão. Análise imunohistoquímica revelou o aumento da expressão da quimiocina SDF-1 (fator derivado de estroma-1, do inglês *stromal derived-factor-1*) no estriado ipsilateral à isquemia, em animais com 2 dias de sobrevivência. Além disso, a análise através de citometria de fluxo indicou que cerca de 27% das células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano expressavam o receptor 4 de quimiocina C-X-C (CXCR4, do inglês chemokine (C-X-C motif) receptor 4), o receptor do SDF-1, sugerindo um possível papel dessa quimiocina na migração das células transplantadas para o cérebro. Os animais hipóxico-isquêmicos (tratados e não tratados) apresentaram uma redução do peso corporal em P9, em relação aos animais falso-operados. Em P11, a hipóxia-isquemia neonatal levou a um atraso no desenvolvimento dos reflexos neonatais de geotaxia negativa e de aversão ao precipício. Os animais que receberam a terapia celular mantiveram esses reflexos preservados, apresentando um desempenho semelhante aos animais falso-operados. Além disso, os animais tratados possuíam um menor número de neurônios em degeneração e uma menor ativação da enzima caspase-3 no estriado, quando comparados aos animais não tratados em P9. Além desse efeito neuroprotetor, a terapia celular também resultou em um menor número de células microgliais ativadas no córtex em P14. No entanto, o tratamento não modificou o aumento da expressão do marcador astrocitário GFAP (proteína glial fibrilar ácida, do inglês glial fibrillary acidic protein) no hemisfério ipsilateral à isquemia em P14. Nossos resultados sugerem que o transplante de células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano apresenta um efeito neuroprotetor no estriado, através da redução da ativação da enzima caspase-3, resultando em uma melhor recuperação funcional após a encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, além de apresentar um efeito anti-inflamatório no córtex. Por fim, houve um aumento no número de células CD34⁺ e CD133⁺ na medula óssea dos animais hipóxico-isquêmicos, 2 dias após a lesão, indicando uma resposta da medula óssea a uma lesão cerebral aguda.

ABSTRACT

COELHO, Pedro Moreno Pimentel. Avaliação do Papel de Células da Fração Mononuclear do Sangue de Cordão Umbilical Humano no Sistema Nervoso Central de Ratos Submetidos a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) remains as an important cause of mortality and chronic neurologic morbidity in the world. In this work we evaluated the therapeutic potential of human umbilical cord blood mononuclear cells (HUCBC) in an animal model of HIE. According to the Rice-Vannucci model, post-natal day 8 (P7) Lister-Hooded rats had the right common carotid artery ligated and, after a 2-hour recovery period, were placed in a chamber with a flow of oxygen (8%) and nitrogen (92%) for 90 minutes. After 3h, the pups received a single intraperitoneal injection of 2×10^6 cells of the mononuclear fraction of the human umbilical cord blood (treated group) or vehicle (untreated). Two days after the injection, few cells were found in the *striatum* and in the cerebral cortex ipsilateral to the ischemia, but not in the contralateral hemisphere. Immunohistochemical analysis revealed an increase in the expression of the chemokine stromal-derived factor 1 (SDF-1) in the ipsilateral *striatum* 2 days after the injury. Flow cytometry analysis showed that around 27% of the HUCBC expressed the chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), the receptor for SDF-1, suggesting a possible role of this molecule in the migration of transplanted cells to the brain. Hypoxic-ischemic (HI) animals (treated and untreated) had a lower body weight compared to sham-operated animals at P9. At P11 HI animals (untreated) displayed a retarded performance in two neonatal reflexes (cliff aversion and negative geotaxis), while the cell-treated group had a performance similar to sham-operated animals, indicating a functional effect of the cell therapy. Moreover, cell-treated animals had a lower number of degenerating neurons and reduced caspase-3 activation in the *striatum* at P9, compared to untreated animals. Besides this neuroprotective effect, the cell therapy also resulted in a reduction in the number of activated microglia in the cerebral cortex at P14. However, the treatment did not change the increased expression of the astrocytic marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) in the ischemic hemisphere at P14. These results suggest that HUCB transplantation might rescue *striatal* neurons from cell death, through a decrease in caspase-3 activation, resulting in better functional recovery after neonatal HIE and that HUCB treatment may result in an anti-inflammatory effect in the cortex. In addition, there was an increase in the number of CD34⁺ and CD133⁺ cells in the bone marrow of hypoxic-ischemic animals, when compared to sham-operated animals, 2 days after the injury, suggesting an endogenous response of bone marrow-derived cells to an acute brain injury.

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe Ane Cristina Pimentel Coelho

Aos meus orientadores Dra. Rosalia Mendez Otero e Dr. Marcelo Felipe Santiago

Ao Dr. Serge Rivest (Université Laval).

Aos colaboradores Dra. Elizabeth Soares Magalhães, Dr. Leonardo Costa de Azevedo (IFF, FIOCRUZ) e Dr. Laudelino Marques Lopes (Clínica Perinatal)

Ao Dr. Carlos Alexandre Netto e à Dra. Lenir Orlandi Pereira (UFRGS)

Ao revisor, Dr. Stevens Kastrup Rehen

Aos técnicos Felipe Marins, Suelen Serio e José Tibúrcio (IBCCF, UFRJ).

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular (IBCCF, UFRJ), especialmente ao Dr. Victor Túlio Ribeiro de Resende

Às agências de fomento: CAPES; CNPq e FAPERJ

LISTA DE FIGURAS:

Sumário

Figura 1. Vias de Morte Celular Ativadas na Hipóxia-Isquemia Neonatal.....	23
Figura 2. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Provocou um Retardo no Desenvolvimento dos Reflexos de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa	65
Figura 3. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou na Atrofia do Hemisfério Ipsilateral à Isquemia.	67
Figura 4. Morte Neuronal e Grave Atrofia do Hipocampo Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	69
Figura 5. Intensa Morte Neuronal no Córtex e no Estriado do Hemisfério Ipsilateral à Isquemia Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	70
Figura 6 A Morte Celular no Córtex e no Estriado Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal Envolve a Ativação da Enzima Caspase-3	72
Figura 7. Degeneração da Cápsula Externa Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	73
Figura 8. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais no Córtex	76
Figura 9. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais no Estriado	77
Figura 10. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais na Cápsula Externa	78
Figura 11. Resposta da Medula Óssea à Hipóxia-Isquemia Neonatal	80
Figura 12. A Terapia Celular Evitou o Atraso no Desenvolvimento dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa nos Animais Hipóxico-Isquêmicos	83
Figura 13. A Terapia Celular Não Alterou a Perda Ponderal da Fase Aguda da Hipóxia-Isquemia Neonatal	85
Figura 14. A Terapia Celular Apresentou um Efeito Neuroprotetor e Reduziu a Apoptose no Estriado de Animais Hipóxico-Isquêmicos	86

Figura 15. A Terapia Celular Não Alterou a Morte Neuronal, nem o Número de Células Expressando a Enzima Caspase 3 Ativada no Córtex de Animais Hipóxico-Isquêmicos	88
Figura 16. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais no Córtex Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	90
Figura 17. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais na Cápsula Externa Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	91
Figura 18. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais na Zona Subventricular Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	92
Figura 19. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais no Estriado Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal	93
Figura 20. Redução da Ativação das Células Microgliais no Córtex de Animais Hipóxico-Isquêmicos Após a Terapia Celular	94
Figura 21. A Terapia Celular Não Modulou a Gliose Reativa no Hemisfério Ipsilateral à Isquemia.	96
Figura 22. Possível Papel da Quimiocina SDF-1 na Migração das Células Transplantadas	99

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1. - Critérios da Academia Americana de Pediatria e do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia para o diagnóstico de asfixia perinatal (1992).	6
Tabela 2 - Critérios da Força Tarefa Internacional sobre Paralisia Cerebral (1999) para o diagnóstico de asfixia perinatal.	6
Tabela 3 - Critérios do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (2002) para o diagnóstico de asfixia perinatal.	7
Tabela 4 – Número de animais utilizados em cada experimento	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucléico

AIF: fator de indução de apoptose, do inglês *apoptotic inducing factor*

AMPA: propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol, do inglês *amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate*

ATP: trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*

Bad: promotor de morte associado ao Bcl2, do inglês *Bcl-2-associated death promoter*

Bak: proteína killer-antagonista homóloga a Bcl-2, do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

Bax: proteína X associada a Bcl-2, do inglês *Bcl-2-associated X protein*

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*

Bid: proteína agonista de morte celular de domínio interatuante com BH3, do inglês *BH3 interacting domain death agonist*

Bim: proteína 11 semelhante a Bcl-2, do inglês *Bcl-2-like 11*

CA: corno de Amon

CCR2: receptor 2 de quimiocina C-C, do inglês *chemokine (C-C motif) receptor 2*

CX3CR1: receptor 1 de quimiocina C-X3-C, do inglês *chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*

CXCR4: receptor 4 de quimiocina C-X-C, do inglês *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*

DMSO: dimetilsulfóxido

EGF: fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*

EN: encefalopatia neonatal

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*

FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto 2, do inglês *fibroblast growth factor-2*

GABA: ácido gama-aminobutírico, do inglês *gamma-aminobutyric acid*

G-CSF: fator de estimulação de colônias de granulócitos, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*

GDNF: fator neurotrófico derivado de glia, do inglês *glial-derived neurotrophic factor*

GFAP: proteína glial fibrilar ácida, do inglês *glial fibrillary acidic protein*

GFP: proteína fluorescente verde, do inglês *green fluorescent protein*

gp130: glicoproteína 130

GSH: glutationa reduzida

HGF: fator de crescimento de hepatócitos, do inglês *hepatocyte growth factor*

HI: hipóxico-isquêmicos

HLA-DR: anti-antígeno leucocitário humano-DR

HPGDS: prostaglandina D sintase hematopoiética, do inglês *hematopoietic prostaglandin D synthase*

IFN- γ : interferon gama

IGF-I: fator de crescimento semelhante a insulina I; do inglês *insulin like growth factor I*

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase induzível, do inglês *inducible nitric oxide synthase*

IPEX: desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X, do inglês *immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*

LC3-II: cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos, do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain 3*

LPS: lipopolissacarídeo

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1, do inglês *monocyte chemotactic protein-1*

MHC-II: complexo principal de histocompatibilidade classe II, do inglês *major histocompatibility complex class II*

MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 alfa, do inglês *macrophage inflammatory protein 1 alpha*

MMP-9: metaloproteinase de matriz 9, do inglês *matrix metalloproteinase-9*

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro, do inglês *messenger ribonucleic acid*

MSC: células-tronco/progenitoras mesenquimais, do inglês *mesenchymal stem cells*

NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*

NBQX: 6-nitro-7-sulfamoilbenzo-(f)quinoxalina-2,3-diona

NGF: fator de crescimento de nervos, do inglês *nerve growth factor*

NK: células assassinas naturais, do inglês *natural killer cells*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMR: taxa de mortalidade neonatal, do inglês *neonatal mortality rate*

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal, do inglês *neuronal neuronal nitric oxide synthase*

NO: óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*

NT: neurotrofina

Olig2: fator de transcrição de oligodendrócito 2

OMS: Organização Mundial de Saúde

PARP: poli (ADP-ribose) polimerase

Pax6: do inglês *paired box 6*

PEDF: fator derivado do epitélio pigmentado, do inglês *pigment epithelium-derived factor*

PGD₂: prostaglandina D₂

ppd: p-fenil-diamina

RMS: via migratória rostral, do inglês *rostral migratory stream*

SCF: fator de célula-tronco, do inglês *stem cell factor*

SDF-1: fator derivado de estroma 1, do inglês *stromal-derived factor-1*

SNC: sistema nervoso central

SVZ: zona subventricular, do inglês *subventricular zone*

TLR: receptor toll-like, do inglês *toll-like receptor*

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

tPA: ativador de plasminogênio tecidual, do inglês *tissue plasminogen activator*

Treg: linfócitos T regulatórios

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*

VZ: zona ventricular, do inglês *ventricular zone*

Sumário:

1. Introdução:	1
1.1 Encefalopatia Neonatal:	1
1.2. Asfixia Perinatal:	3
1.3. Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal:	8
1.4. Modelo Animal de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal:	11
1.5. Fisiopatologia da Hipóxia-Isquemia Neonatal:	12
1.6. Papel do Óxido Nítrico na Hipóxia-Isquemia Neonatal:	14
1.7. Mecanismos de Morte Celular:	16
1.8 Resposta das Células-Tronco Neurais à Hipóxia-Isquemia Neonatal:	24
1.9 Potencial Terapêutico das Células do Sangue de Cordão Umbilical Humano:	28
1.9.1 Células-Tronco/Progenitoras Mesenquimais do Sangue de Cordão Umbilical:	30
1.9.2 Células Progenitoras Endoteliais do Sangue de Cordão Umbilical:	36
1.9.3 Linfócitos do Sangue de Cordão Umbilical:	38
1.9.4 Monócitos do Sangue de Cordão Umbilical	40
1.9.5 Transplante de Células Mononucleares do Sangue de Cordão Umbilical em Modelos de Hipóxia-Isquemia Neonatal:	44
2 Objetivos:	47
2.1 Objetivos Específicos:	47
3 Materiais e Métodos:	48
3.1 Animais	48
3.2 Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:	49
3.3 Isolamento de células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano:	50

3.4	Marcação e Transplante das Células:.....	51
3.5	Grupos de Estudo:.....	53
3.6	Preparação Histológica:.....	54
3.7	Coloração de Cresil Violeta:.....	55
3.8	Imunohistoquímica:.....	56
3.9	Quantificação da Morte Celular:.....	57
3.10	Análise Quantitativa da Ativação da Caspase-3:	58
3.11	Análise Quantitativa da Ativação de Células Microgliais:.....	59
3.12	Avaliação Qualitativa e Quantificação da Gliose Reativa:.....	59
3.13	Avaliação dos Reflexos Neonatais:.....	61
3.14	Obtenção de Células da Medula Óssea e Análise por Citometria de Fluxo:..	62
3.15	Análises estatísticas:.....	63
4	Resultados	64
4.1	Caracterização do Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:	64
4.1.1	A Hipóxia-Isquemia Neonatal Provocou um Retardo na Realização dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa	64
4.1.2	Alterações Morfológicas e Morte Celular Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal.....	66
4.1.3	Gliose Reativa e Ativação de Células Microgliais Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal.....	74
4.1.4	Resposta da Medula Óssea a Hipóxia-Isquemia Neonatal:.....	75
4.2	Efeito da Terapia Celular no Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:.....	79
4.2.1	A Terapia Celular Evitou o Atraso no Desenvolvimento dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa nos Animais Hipóxico- Isquêmicos:.....	79
4.2.2	A Terapia Celular Não Alterou a Perda de Peso Corporal Após a Hipóxia- Isquemia Neonatal	82
4.2.3	Efeito Neuroprotetor da Terapia Celular no Estriado:	84

4.2.4	A Terapia Celular Reduziu o Número de Células Microgliais Ativadas no Córtex dos Animais HI:	87
4.2.5	A Terapia Celular não Modulou o Processo de Gliose Reativa Desencadeado Pela Hipóxia-Isquemia Neonatal:.....	95
4.2.6	Migração para o SNC das Células Injetadas:	97
4.2.7	Possível Papel da Quimiocina SDF-1 na Migração das Células Injetadas:	97
5	Discussão	100
6	Conclusões	140
7	Bibliografia:	142
	Anexo	181

1. INTRODUÇÃO:

1.1 Encefalopatia Neonatal:

Encefalopatia neonatal (EN) é uma síndrome clínica caracterizada pela presença de alterações neurológicas nos primeiros dias de vida de crianças nascidas a termo, que se manifestam através de dificuldade em iniciar e manter a respiração, redução do tônus muscular e do nível de consciência, alterações de reflexos neurológicos e, ocasionalmente, pela presença de convulsões. Os sintomas evoluem ao longo de dias e uma melhora transiente no nível de consciência pode ocorrer na primeira semana de vida, sem que haja o desaparecimento de outros sintomas neurológicos, que podem persistir por alguns meses (Ferriero, 2004).

A presença de EN é o principal marcador associado ao aparecimento de alterações no desenvolvimento neurológico de crianças nascidas a termo. Cerca de 15-20% das crianças com esta síndrome vai a óbito no período neonatal e cerca de 25% irá apresentar sequelas neurológicas graves (Vannucci *et al.*, 2000). Estas sequelas frequentemente resultam em incapacidade física e/ou déficits cognitivos que resultam em comprometimento da linguagem, do aprendizado e de habilidades sociais.

A EN ocorre em 1-6 de cada 1000 nascidos vivo a termo e sua severidade pode ser classificada através do uso da escala de Sarnat, que divide a lesão em três estágios que estão associados ao prognóstico dessas crianças. O estágio 1 é caracterizado por uma encefalopatia leve e essas crianças normalmente não irão apresentar sequelas importantes. No outro extremo, o estágio 3 é caracterizado pela presença de uma encefalopatia severa, com ausência de respostas do tronco

cerebral e alterações sistêmicas afetando múltiplos órgãos. Estas crianças morrem precocemente ou sobrevivem com sequelas severas, como quadriparesia espástica e retardo mental severo. Já no estágio 2, uma encefalopatia moderada, encontram-se crianças com prognósticos variados, que podem apresentar sequelas cognitivas e motoras importantes, epilepsia, ou não apresentar quaisquer sequelas (Pin *et al.*, 2008). Já foi verificado que 81% das crianças com diagnóstico de EN moderada apresentavam déficits cognitivos quando avaliadas com 15-19 anos (Lindstrom *et al.*, 2008).

Até o momento, o tratamento da EN se restringe a medidas de suporte e manutenção da homeostase, na tentativa de minimizar os danos neurológicos (Yager *et al.*, 2009).

Embora a EN seja classicamente definida como uma síndrome clínica em recém-nascidos a termo, esse diagnóstico também pode ser feito em crianças prematuras. No entanto, existe uma maior dificuldade para o diagnóstico em crianças prematuras, pois os sintomas podem não ser evidentes ou podem ocorrer por outras razões. Os prematuros apresentam, por exemplo, um menor tônus muscular do que os bebês nascidos a termo, o que poderia ser considerado como um achado anormal caso a idade gestacional não fosse considerada (Logitharajah *et al.*, 2009).

1.2. Asfixia Perinatal:

Asfixia perinatal é definida como uma alteração na troca de gases no período perinatal, com o desenvolvimento de acidose metabólica, hipoxemia e hipercapnia. Pode ser induzida por diferentes eventos e, quando severa e/ou prolongada o suficiente, apresenta o potencial de causar lesão cerebral, sendo a etiologia mais comum da síndrome de EN (Low *et al.*, 2004).

No entanto, sua definição clínica permanece complicada. Alguns dos critérios utilizados no passado para definir asfixia, como a presença de acidose metabólica nos primeiros 30 minutos de vida (pH < 7,0 no sangue arterial do cordão umbilical), retardo no aparecimento da respiração espontânea, presença de mecônio, ou baixo escore Apgar, são insuficientes se considerados isoladamente.

Combinando os dados de 7 diferentes estudos, foi verificado que um pH menor do que 7,0 no sangue arterial do cordão umbilical estava presente em 3,7 de cada 1000 nascidos vivos e que 17,2% dessas crianças sobreviveram apresentando morbidade neurológica, 5,9% morreram durante o período neonatal, enquanto 76,9% sobreviveram sem apresentar morbidade neurológica no momento da alta hospitalar. Esses dados mostraram que, apesar de morte, convulsões e outras morbidades neurológicas serem mais comuns em neonatos com um pH menor do que 7,0, mais de dois terços dessas crianças não apresentaram morbidade a curto prazo (Graham *et al.*, 2008).

Além disso, isoladamente, esses fatores podem estar presentes em outras condições. Um baixo escore Apgar pode ocorrer em função da anestesia ou sedação materna no momento do parto, em casos de malformações, ou na presença

de infecções. Outros indicadores, como a necessidade de reanimação neonatal imediata ou de ventilação sob pressão positiva por mais de um minuto antes do aparecimento de respiração espontânea, também não são específicos, podendo ocorrer em função de outras condições neurológicas.

Dessa forma, é necessário o uso de múltiplos marcadores para um diagnóstico mais preciso de asfixia perinatal. Na tentativa de padronizar a definição de asfixia perinatal, três diferentes conjuntos de critérios diagnósticos já foram criados desde 1992. Estes critérios estão sumarizados nas tabelas 1, 2 e 3 (Shevell, 2004).

No mundo, das 130 milhões de crianças que nascem a cada ano, 4 milhões (3%) morrem no período neonatal, ou seja, nas primeiras 4 semanas de vida. Foi estimado que cerca de 23% das mortes no período neonatal ocorridas no ano 2000 foram decorrentes de complicações da asfixia perinatal. Ao contrário de outras causas, como diarreia, tétano e infecções graves, que ocorrem quase exclusivamente em países com uma elevada taxa de mortalidade neonatal (NMR, do inglês *neonatal mortality rate*), a proporção de mortes por asfixia neonatal é praticamente constante em países com diferentes NMRs (Lawn *et al.*, 2005). De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a asfixia perinatal foi responsável por 23% das mortes no período neonatal no Brasil no ano 2000 (http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_amro_bra_brazil.pdf).

No Brasil, as principais causas de mortalidade no período perinatal (a partir de 24 semanas de gestação até os 7 primeiros dias de vida, pela definição da OMS) são a asfixia perinatal e o nascimento de crianças prematuras (com idade

gestacional inferior a 37 semanas) ou com baixo peso (menos de 2500 gramas ao nascer). No Rio de Janeiro, a taxa de mortalidade perinatal caiu de 28,2 para 19,8 óbitos por mil nascidos vivos entre 1997 e 2006 (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2008/c02.htm>, DataSUS). Já em um estudo que avaliou todos os nascimentos ocorridos nas maternidades da cidade de Pelotas em 1982, 1993 e 2004, foi verificado que houve uma redução de 43% na taxa de mortalidade perinatal no período estudado. A redução mais importante ocorreu entre 1982 e 1993 (31%). Dentre as causas, a asfixia neonatal foi responsável por 14% das mortes em 1982 e por 8% das mortes em 2004 (Matijasevich *et al.*, 2008).

Em um país em desenvolvimento, como a Zâmbia, cerca de um quarto das crianças sobreviventes em uma unidade de terapia intensiva neonatal apresentavam diagnóstico de asfixia perinatal, entre março e abril de 2005. Destas, 31% apresentavam alguma anormalidade no exame neurológico, representando cerca de 50% das crianças com exame neurológico alterado nessa unidade (Halloran *et al.*, 2009).

Já no Brasil, em uma unidade de terapia intensiva neonatal de Porto Alegre, a asfixia perinatal foi diagnosticada em 51% das crianças que apresentavam crises convulsivas (Nunes *et al.*, 2008).

Tabela 1: Critérios da Academia Americana de Pediatria e do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (1992) para o diagnóstico de asfixia perinatal.

Acidose metabólica profunda (pH <7.0)
Apgar ≤ 3 após 5 minutos
Encefalopatia neonatal
Disfunção de múltiplos órgãos

Tabela 2: Critérios da Força Tarefa Internacional sobre Paralisia Cerebral (1999) para o diagnóstico de asfixia perinatal.

Critérios Essenciais:
- pH < 7,0
- Encefalopatia neonatal moderada ou severa
- Paralisia cerebral (espástica, discinética, quadriparética ou mista)
Critérios de Suporte:
- Evento sentinela associado ao parto
- Alterações da frequência cardíaca fetal (bradicardia, perda da variabilidade ou desacelerações)
- Apgar < 6 após 5 minutos
- Envolvimento Multissistêmico
- Evidências de envolvimento cerebral agudo (eletroencefalograma ou neuroimagem)

Tabela 3: Critérios do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (2002) para o diagnóstico de asfixia perinatal

Critérios de Asfixia:
- pH < 7,0 ou déficit de base > 12 mmol/L
- Encefalopatia neonatal moderada ou severa
- Paralisia cerebral (espástica, discinética, quadriparética ou mista)
- Exclusão de outras etiologias
Critérios que definem o momento da asfixia (intraparto):
- Evento sentinela associado ao parto
- Alterações da frequência cardíaca fetal (bradicardia, perda da variabilidade ou desacelerações)
- Apgar ≤ 3 após 5 minutos
- Envolvimento Multissistêmico
- Alterações precoces em exames de neuroimagem

1.3. Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal:

Os termos asfixia perinatal e encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal já foram usados como sinônimos de EN. No entanto, atualmente sabe-se que muitos dos casos de EN ocorrem em crianças nas quais não existem evidências de hipóxia-isquemia, nem de asfixia. Diversos relatos de caso apontam outras possíveis causas, como doenças infecciosas e metabólicas, causas genéticas, acidente vascular cerebral isquêmico no período perinatal ou vasculopatias trombóticas placentárias (Nelson, 2007).

Atualmente o termo encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é utilizado nos casos de EN acompanhada de evidências de asfixia neonatal e após a exclusão de outras possíveis causas para a lesão neurológica.

Em um estudo foram encontrados eventos indicativos de asfixia perinatal em 29% dos casos de EN (Badawi *et al.*, 1998b), sendo aceito que a asfixia perinatal é a principal causa de EN.

Uma revisão recente, combinando dados de 10 estudos que avaliaram a incidência de encefalopatia hipóxico-isquêmica em países desenvolvidos, relatou uma incidência de 2,5 casos (variando de 1,2 a 7,7 casos) para cada 1000 nascidos vivos a termo. Estudos em países em desenvolvimento podem apresentar incidências maiores, como no caso da Nigéria, com 26,5 casos (Graham *et al.*, 2008). No Brasil, já foi relatada uma prevalência de 1,7 por 1000 nascimentos a termo em uma unidade neonatal da cidade de São Paulo entre 2004 e 2006 (Cruz, 2008).

Ainda existem controvérsias em relação ao momento em que o insulto hipóxico-isquêmico ocorre durante a gestação. Um estudo analisou imagens de ressonância magnética obtidas nas primeiras duas semanas de vida de 245 crianças com EN e evidências de asfixia. Em 80% das crianças foram encontradas lesões compatíveis com o insulto hipóxico-isquêmico. As lesões normalmente eram bilaterais e envolviam o córtex cerebral, o tálamo, os gânglios da base ou a substância branca, apresentando características de evolução aguda, o que sugere que o evento de asfixia ocorreu pouco tempo antes ou durante o parto (Cowan *et al.*, 2003). No entanto, vários fatores de risco presentes antes da concepção ou durante a gestação (na mãe e no feto) já foram associados à EN. Dentre esses fatores, os mais importantes incluem doenças da glândula tireóide na mãe, tratamento para infertilidade, pré-eclampsia severa, hemorragias durante a gravidez, doenças virais, presença de anomalias placentárias, crescimento intra-uterino retardado, baixo *status* socioeconômico, presença de convulsões ou doenças neurológicas na família e pós-maturidade (Badawi *et al.*, 1998a). Esses fatores podem estar relacionados a um possível mecanismo de lesão intra-uterina, mas também é possível que tais fatores apenas contribuam de forma sinérgica para o aparecimento da lesão após um episódio de asfixia perinatal.

Em um estudo interessante, Sie e colaboradores (2000) encontraram uma correlação entre a idade gestacional, o momento da lesão e os achados nos exames de neuroimagem. Foram descritos três padrões de lesão:

- leucomalácia periventricular: caracterizada por lesões na substância branca periventricular e ventriculomegalia. Em 50% dos casos também havia lesão da substância branca subcortical. Ocorreu predominantemente em crianças nascidas

antes do termo (70% dos casos) e havia sinais de hipóxia-isquemia subaguda ou crônica, algumas vezes combinados com sinais de asfixia aguda, em 92% dos casos.

- lesões bilaterais envolvendo o putâmen e o tálamo: nesse grupo, metade das crianças também apresentava lesões no hipocampo e na substância branca, enquanto um terço também apresentava lesão no globo pálido. Ocorreu principalmente em crianças nascidas a termo (86% dos casos) e em todas, exceto uma, havia evidências de um episódio agudo de asfixia perinatal.

- encefalopatia multicística: presença de múltiplas cavidades císticas na substância branca, se estendendo da parede dos ventrículos até o córtex, com lesões corticais em 90% dos casos. Em 50% dos casos havia também atrofia ou lesão no tálamo e/ou nos gânglios da base. As crianças que apresentaram esse tipo de lesão haviam nascido a termo em 60% dos casos e tinham evidências de hipóxia-isquemia leve, seguida do aparecimento de encefalopatia severa, não esperada.

Dessa forma, dependendo do momento em que ocorre a hipóxia-isquemia e de sua duração e intensidade, a encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal pode se apresentar de diferentes formas nos exames de neuroimagem e apresentar diferentes prognósticos (Shah e Perlman, 2009). Já foi sugerido que o prognóstico dessas crianças se associa mais fortemente ao padrão da lesão, do que à severidade da lesão em uma determinada região (Miller *et al.*, 2005).

Das crianças que sobrevivem, a seqüela mais grave da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é o desenvolvimento de um quadro de paralisia cerebral, que é um termo utilizado para descrever um grupo de síndromes não-

progressivas caracterizadas pela presença de déficit motor secundário a uma lesão ou anomalia nos estágios iniciais do desenvolvimento cerebral (Shevell *et al.*, 2004). A asfixia perinatal é responsável por cerca de 14,5% dos casos de paralisia cerebral em crianças a termo e existe um consenso de que uma EN moderada/severa deve invariavelmente estar presente quando a asfixia perinatal é o evento causador de paralisia cerebral (Graham *et al.*, 2008).

1.4. Modelo Animal de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica Neonatal:

Um dos modelos animais mais utilizados para o estudo da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal consiste na oclusão permanente e unilateral da artéria carótida comum, seguida por um período de exposição sistêmica a um ambiente com 8% de oxigênio, balanceado com nitrogênio. Este modelo foi descrito por Levine em ratos adultos, tendo sido, posteriormente, modificado por Vannucci para o estudo da hipóxia-isquemia neonatal (revisado em Yager *et al.*, 2009).

O modelo de Levine-Vannucci utiliza ratos P7, idade em que o cérebro destes animais corresponde, histologicamente, ao cérebro de uma criança com 32-34 semanas de gestação. Ou seja, a laminação cortical está completa, a matriz germinativa está involuindo e ainda há pouca mielinização (Vannucci *et al.*, 1999).

Como esse foi o modelo animal utilizado nesse trabalho, nos próximos tópicos serão discutidos aspectos importantes da fisiopatologia da lesão hipóxico-isquêmica neonatal, observados em estudos que utilizaram esse mesmo modelo.

1.5. Fisiopatologia da Hipóxia-Isquemia Neonatal:

O funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC) depende do aporte adequado de oxigênio e glicose. A redução da oxigenação cerebral leva a uma alteração do metabolismo neuronal, levando à parada da Na^+/K^+ ATPase, com acúmulo dos íons Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} . O acúmulo de Na^+ e Cl^- leva a um transporte passivo de água para o interior das células, causando edema celular. O acúmulo de Ca^{2+} resulta em ativação de lipases, proteases e endonucleases que destroem o citoesqueleto, causando morte celular (Berger *et al.*, 2002). Além disso, a hipóxia-isquemia leva a uma abertura de canais ativado por glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) na membrana celular, permitindo a entrada de mais íons Ca^{2+} para o citoplasma. Esta abertura decorre de uma redução no potencial da membrana em função da hipóxia, assim como de uma excessiva liberação de glutamato no espaço extracelular. Níveis elevados de glutamato já foram encontrados no líquido cerebrospinal de crianças após um evento de asfixia perinatal (Gucuyener *et al.*, 1999).

O acúmulo de glutamato no cérebro em condições de hipóxia-isquemia, com uma ativação excessiva de receptores desse neurotransmissor, é um mecanismo importante de morte de neurônios e oligodendrócitos. Em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal, a lesão na substância branca foi atenuada pela administração sistêmica de NBQX (6-nitro-7-sulfamóilbenzo-(f)quinoxalina-2,3-diona), um antagonista do receptor glutamatérgico AMPA (propionato de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol). No entanto, como este fármaco apresenta toxicidade renal severa, sua utilização clínica não seria possível (Follet *et al.*, 2000). O topiramato, uma droga utilizada como anti-convulsivante em adultos e crianças com mais de 3 anos,

é capaz de atenuar correntes induzidas pelo AMPA em pré-oligodendrócitos e pode ser uma possível alternativa ao NBQX. Este fármaco foi capaz de proteger pré-oligodendrocitos da morte induzida por cainato, bem como pela deprivação de glicose e oxigênio *in vitro*. Além disso, reduziu a lesão na substância branca em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Follet *et al.*, 2004). A memantina, um antagonista dos receptores NMDA utilizado no tratamento de demências vasculares na Europa há mais de 20 anos e recentemente aprovado para uso nos EUA em casos moderados/severos de doença de Alzheimer, também foi eficaz em reduzir a morte de oligodendrócitos, a desmielinização e a redução na espessura do manto cortical em ratos P6 submetidos à hipóxia-isquemia (Manning *et al.*, 2008). Atualmente o uso da memantina está sendo avaliado em pacientes jovens (entre 18 e 32 anos) com síndrome de Down (ClinicalTrials.gov, identificador NCT01112683). No entanto, não se sabe se o uso desse fármaco seria seguro em neonatos.

Além das subunidades NR1 e NR2, necessárias para formar canais NMDA funcionais, uma terceira subunidade foi posteriormente descoberta, denominada de NR3. A adição da subunidade NR3 diminui a permeabilidade ao Ca^{2+} de canais NR1/NR2, de forma que a amplitude das correntes evocadas por NMDA, bem como a condutância ao Ca^{+2} , são maiores em neurônios que não expressam a subunidade NR3. *In vitro*, neurônios que não expressavam essa proteína apresentaram maior vulnerabilidade, quando expostos a 100 ou 200 μ M de NMDA, doses que induzem apoptose neuronal. Como o pico de expressão dessa proteína ocorre entre P7 e P10 em camundongos e na sua ausência os animais apresentaram um volume maior de lesão após a hipóxia-isquemia neonatal, foi sugerido que esta subunidade apresenta um efeito neuroprotetor em neonatos (Nakanishi *et al.*, 2009).

1.6. Papel do Óxido Nítrico na Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Outra enzima ativada pelo aumento do Ca^{2+} intracelular é a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, do inglês *neuronal nitric oxide synthase*), produtora de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), que apresenta um importante papel na morte celular durante eventos isquêmicos. O NO pode ser lesivo para as células, danificando a mitocôndria e o ADN, após a formação de peroxinitrito, que se decompõe espontaneamente em dióxido de nitrogênio e NO^{2+} (Blomgren *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento, a expressão da nNOS correspondendo às áreas de maior vulnerabilidade à lesão hipóxico-isquêmica (Vexler e Ferriero, 2001). Animais que não expressam a enzima nNOS apresentaram uma menor lesão no córtex e, embora de forma não tão acentuada, também no hipocampo quando submetidos à hipóxia-isquemia neonatal (Ferriero *et al.*, 1996). No entanto, a inibição farmacológica dessa enzima, através da administração de 7-nitroindazol (0, 4 e 24 horas após a lesão hipóxico-isquêmica) não resultou em alteração da lesão no córtex e hipocampo (Muramatsu *et al.*, 2000). Esta mesma droga, no entanto, apresentou um efeito neuroprotetor quando administrada 30 minutos antes da hipóxia (Ishida *et al.*, 2001).

Outro estudo, no entanto, mostrou que tanto a inibição farmacológica da NOS, como a administração de um doador de NO, podem reduzir a lesão após a hipóxia-isquemia neonatal. Como um possível mecanismo envolvido nesse efeito, foi mostrado que o doador de NO foi capaz de evitar a redução do fluxo sanguíneo cerebral no hemisfério ipsilateral à isquemia, uma vez que nos vasos o NO atua como vasodilatador (Wainwright *et al.*, 2007). Resultados semelhantes foram observados em camundongos adultos, nos quais a deficiência da enzima eNOS

(óxido nítrico sintase endotelial, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*) resultou em uma maior área de infarto e em uma maior redução do fluxo sanguíneo cerebral no território da artéria cerebral média após a oclusão (Huang *et al.*, 1996). Dessa forma, o efeito do NO parece variar de acordo com o momento em que é liberado e com o local de liberação. É possível que a produção de NO pelo endotélio apresente um efeito protetor após episódios de isquemia, regulando o fluxo sanguíneo cerebral.

O NO pode ainda apresentar outros papéis após lesões no SNC, estando envolvido no controle da proliferação de células-tronco/progenitoras neurais da zona subventricular e do hipocampo e também em mecanismos de plasticidade sináptica (Cardenas *et al.*, 2005). Outros efeitos benéficos do NO estão relacionados à inibição da adesão de leucócitos e da agregação plaquetária (Vexler *et al.*, 2001).

Além de ser produzido pela nNOS e pela eNOS, o NO pode também ser produzido pela enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível, do inglês *inducible nitric oxide synthase*), cuja expressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias e/ou pela hipóxia em astrócitos, em células microgliais, em neutrófilos e também em neurônios. A indução da expressão da iNOS e a produção de NO por neutrófilos e pela microglia ativada é um dos principais mecanismos associados à toxicidade da inflamação no SNC (Moro *et al.*, 2004).

Em modelos de hipóxia-isquemia neonatal, a morte de oligodendrócitos e de seus precursores é bastante significativa, levando a um quadro de desmielinização no SNC. Os precursores de oligodendrócitos parecem ser especialmente sensíveis ao dano causado pelo óxido nítrico. Estas células são mais susceptíveis ao estresse

oxidativo, por apresentarem uma expressão reduzida de enzimas antioxidantes (Back *et al.*, 2007) e por acumularem Fe^{+} , necessário para a diferenciação em oligodendrócitos maduros e para a mielinização (Todorich *et al.*, 2009). Os progenitores tardios de oligodendrócitos, que expressam o marcador O4 mas não expressam O1, foram identificados como as células da linhagem glial mais susceptíveis à hipóxia-isquemia neonatal (Back *et al.*, 2002).

1.7. Mecanismos de Morte Celular:

O principal mecanismo de morte celular desencadeado pela hipóxia-isquemia neonatal é a apoptose, uma forma de morte celular envolvendo a ativação sequencial de caspases. Já foi demonstrado que tanto neurônios como progenitores de oligodendrócitos morrem por apoptose mediada pela ativação da caspase-3, até 48 horas após a hipóxia-isquemia. Essas células podiam ser encontradas na região cortical, subcortical, no estriado e também na SVZ lateral. Além disso, um terço das células apoptóticas expressava o marcador de progenitores de oligodendrócitos O4 (Rothstein e Levinson, 2005). No tálamo, a ativação de caspase-3 também parece ser o principal mecanismo de morte celular, ocorrendo um pouco mais tarde do que no córtex e no estriado e sendo mediada pela ativação de receptores Fas (Northington *et al.*, 2001).

Já foi também observado que a ativação de caspase-3 se correlaciona de forma espaço-temporal com a expressão de 3 marcadores de dano ao ADN (ácido desoxirribonucléico) e com a perda da expressão do marcador neuronal MAP-2, 24 horas após a lesão (Zhu *et al.*, 2000). No entanto, embora haja a expressão de

marcadores bioquímicos de apoptose na maioria das células em degeneração, apenas poucas células apresentam o fenótipo característico de apoptose como, por exemplo, a condensação nuclear completa. Além disso, células expressando a caspase-3 ativada apresentam também o produto da quebra da espectrina de 145/159 kDa, cuja formação é mediada pela calpaína. Foi sugerido, portanto, que a maioria das células em degeneração após a hipóxia-isquemia neonatal apresenta um fenótipo intermediário, no qual o processo de apoptose é interrompido, resultando em um misto de apoptose e necrose (Northington *et al.*, 2007).

Assim, a inibição da ativação da caspase-3 pode ser considerada como uma estratégia de neuroproteção na maioria das regiões afetadas pela hipóxia-isquemia. De fato, a inibição farmacológica da ativação da caspase-3 através da administração de um inibidor seletivo resultou em uma redução da lesão no córtex, no estriado e no hipocampo (Han *et al.*, 2002). No entanto, animais deficientes para a enzima caspase-3 apresentaram maior lesão quando submetidos à hipóxia-isquemia neonatal. Nestes animais, é possível que a ausência da caspase-3 durante o desenvolvimento do SNC tenha levado a mecanismos compensatórios, através da ativação de outras vias de morte celular, com o consequente agravamento da lesão (West *et al.*, 2006).

A autofagia é uma via essencial para a degradação e reciclagem de macromoléculas intracelulares. O mecanismo principal consiste no sequestro de proteínas e organelas danificadas em vesículas chamadas de autofagossomos, que posteriormente se fundem a lisossomos para que haja a degradação de seu conteúdo. Além de apresentar um papel fisiológico na manutenção da homeostase, recentemente foi descrito um envolvimento do aumento da autofagia na morte

neuronal após eventos isquêmicos. De forma interessante, alguns neurônios em degeneração no córtex, além de apresentarem características típicas de apoptose, como a expressão de caspase-3 ativada, também apresentavam características de autofagia, como um aumento da expressão de LC3-II (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos, do inglês *microtubule-associated protein 1 light chain 3*), um marcador dos autofagossomos. Havia também um aumento da atividade de lisossomos no córtex, a partir de 6 horas após a hipóxia-isquemia neonatal. Além disso, através de microscopia eletrônica foi possível visualizar a fusão dos autofagossomos com os lisossomos. Já no hipocampo, o mecanismo predominante de morte celular variou de acordo com a região. Em CA1 (corno de Amon 1), a maioria dos neurônios apresentava características relacionadas à autofagia, sem expressar os marcadores que indicam apoptose, enquanto em CA3 (corno de Amon 3) ocorria o oposto (Ginet *et al.*, 2009).

Outra enzima envolvida na hipóxia-isquemia neonatal é a caspase-8. Esta enzima é ativada pela citocina TNF- α (fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*) ou por outros ligantes do receptor Fas, podendo então ativar a enzima caspase-3 diretamente ou ativar a proteína Bid (proteína de morte celular de domínio interatuante BH3, do inglês *BH3 interacting domain death agonist*). A ativação de Bid, por sua vez, irá resultar na liberação de citocromo c da mitocôndria. A atividade da caspase-8 aumenta 12 horas após a hipóxia-isquemia neonatal, permanecendo elevada após 24 horas. Animais tratados com um inibidor seletivo da caspase-8 imediatamente após a indução da lesão apresentaram uma menor atrofia do hemisfério ipsilateral à isquemia (Feng *et al.*, 2003b).

Já a expressão do receptor Fas aumenta no cérebro 24 horas após a hipóxia-isquemia neonatal, embora a expressão de outros três receptores da família de receptores do TNF não se altere. A ausência de receptores Fas resulta em neuroproteção no córtex, estriado e tálamo de animais hipóxico-isquêmicos. No entanto, este efeito não foi verificado no hipocampo, mostrando que existem diferenças nos mecanismos de morte celular em diferentes áreas do cérebro em desenvolvimento (Graham *et al.*, 2004).

Também é interessante ressaltar que os sinais que induzem a apoptose podem ser difundidos entre células vizinhas através de junções comunicantes e que o bloqueio dessa comunicação intercelular através da droga carbenoxolona apresenta um efeito neuroprotetor em um modelo animal de asfixia perinatal (de Pina-Benabou *et al.*, 2005).

Calpaínas representam uma classe de cisteína proteases que são ativadas em condições de depleção energética e de aumento do influxo de cálcio, resultando na ativação de mecanismos que levam à neurodegeneração. A ativação de calpaínas após a hipóxia-isquemia neonatal apresenta um padrão temporal dependente da idade dos animais. Animais neonatos apresentaram uma ativação precoce das calpaínas, cerca de 3 horas após a hipóxia-isquemia, enquanto em animais adultos a ativação foi mais tardia e prolongada, permanecendo por até 72 horas após a lesão (Zhu *et al.*, 2005).

As enzimas nucleares poli (ADP-ribose) polimerases, ou PARPs, são ativadas em resposta ao estresse celular e facilitam o relaxamento e reparo do ADN. A isoforma mais abundante no cérebro é a PARP-1. Estas enzimas podem, no

entanto, estar envolvidas na morte celular, ao depletarem reservas de NAD⁺ (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) e de ATP (trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*). Podem também estimular diretamente a apoptose, através da liberação do fator de indução de apoptose (AIF, do inglês *apoptotic inducing factor*) da mitocôndria (Yu *et al.*, 2003). Na hipóxia-isquemia neonatal foi demonstrado que a ausência de PARP-1 protege o cérebro de animais do sexo masculino, mas não apresenta efeito no sexo feminino. Embora tenha havido um aumento dos níveis de poli (ADP-ribose) no hemisfério ipsilateral à isquemia em ambos os sexos (1-4 horas após a lesão), apenas nos animais do sexo masculino foi observado uma redução dos níveis de NAD⁺ (Hagberg *et al.*, 2004).

Outras diferenças gênero-dependentes nos mecanismos de morte celular também já foram descritas. Em animais do sexo masculino, foi verificada uma maior translocação de AIF (da mitocôndria para o núcleo), enquanto no sexo feminino havia uma maior ativação da caspase-3 após a hipóxia-isquemia neonatal (Zhu *et al.*, 2006). Em outro estudo, o tratamento com 2-iminobiotina apresentou um efeito neuroprotetor apenas em animais do sexo feminino. Foi também demonstrado novamente que apenas os animais do sexo masculino apresentavam uma translocação do AIF, o que não ocorria nas fêmeas. No entanto, animais de ambos os sexos apresentavam os mesmos níveis de ativação da caspase-3 e de liberação de citocromo c para o citosol (Nijboer *et al.*, 2007).

In vitro, neurônios XY e XX obtidos de embriões de ratos (E16, E17) apresentaram diferentes susceptibilidades a tratamentos citotóxicos. Neurônios XY apresentaram maior susceptibilidade à excitotoxicidade e ao estresse nitrosativo,

enquanto neurônios XX foram mais sensíveis à apoptose induzida por estaurosporina ou etoposídeo. Além disso, a morte celular ocorria principalmente via ativação de AIF em células masculinas, enquanto era dependente de citocromo c em neurônios femininos. Esses resultados demonstraram que existem diferenças intrínsecas tanto na susceptibilidade quanto nos processos de morte celular entre neurônios masculinos e femininos, as quais não dependem dos efeitos de esteróides circulantes (Du *et al.*, 2004).

Existem também diferenças nos mecanismos de morte celular que estão relacionados à idade. A proteína ciclofilina D, que está envolvida na regulação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, apresenta papéis opostos após a hipóxia-isquemia em animais neonatos e adultos. A deficiência dessa proteína agravou a lesão em animais P9 e provocou uma redução da lesão em animais P60 (Wang *et al.*, 2009). Além disso, a formação desses poros pode ser evitada pela ciclosporina A, um inibidor da ciclofilina D, a qual apresenta um efeito neuroprotetor após eventos isquêmicos no cérebro adulto, mas que não foi capaz de reduzir a lesão hipóxico-isquêmica em animais neonatos (Puka-Sundvall *et al.*, 2001).

Uma segunda forma de ocorrer a permeabilização da mitocôndria requer as proteínas Bax/Bak (do inglês *Bcl-2-associated X protein* e *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), que podem diretamente permeabilizar a membrana mitocondrial externa. Animais deficientes para proteína Bax apresentaram uma menor lesão hipocampal após a hipóxia-isquemia neonatal (Gibson *et al.*, 2001) e o pré-tratamento com um peptídeo inibidor do Bax reduziu a lesão hipóxico-isquêmica em cerca de 75% em animais P9, mas não em animais P60 (Wang *et al.*, 2009). Dessa forma, a permeabilização da membrana interna mitocondrial dependente de

ciclofilina D parece ser fundamental para a lesão hipóxico-isquêmica em animais adultos, enquanto mecanismos dependentes de Bax prevalecem em animais neonatos.

Outras proteínas da família Bcl-2 também contribuem para a lesão após a hipóxia-isquemia neonatal. Animais com a expressão aumentada da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L apresentaram uma menor lesão no hipocampo, estriado e córtex após a hipóxia-isquemia neonatal (Parsadanian *et al.*, 1998). Já animais deficientes para as proteínas pró-apoptóticas Bad e Bim (promotor de morte associado ao Bcl2, do inglês *Bcl-2-associated death promoter* e proteína 11 semelhante a Bcl-2, do inglês *Bcl-2-like 11*) apresentaram uma menor lesão hipocampal após a hipóxia-isquemia neonatal (Ness *et al.*, 2006).

Ocorre também maior produção de H₂O₂ no cérebro de animais neonatos do que em animais adultos após uma lesão hipóxico-isquêmica. Dessa forma, a enzima glutationa peroxidase, que converte H₂O₂ em oxigênio e água, apresenta um papel fundamental na proteção do cérebro dos animais neonatos. Em animais que apresentam a expressão aumentada de glutationa peroxidase houve uma menor lesão do que nos animais controle. Além disso, os níveis de glutationa reduzida (GSH), um co-fator importante para a conversão de H₂O₂ em água estavam reduzidos após a hipóxia-isquemia neonatal. No entanto, a administração de ácido α -lipóico, capaz de restaurar os níveis de GSH, não alterou a lesão (Sheldon *et al.*, 2008).

Na figura 1 estão resumidos os principais mecanismos de morte celular já observados no modelo de hipóxia-isquemia neonatal em roedores.

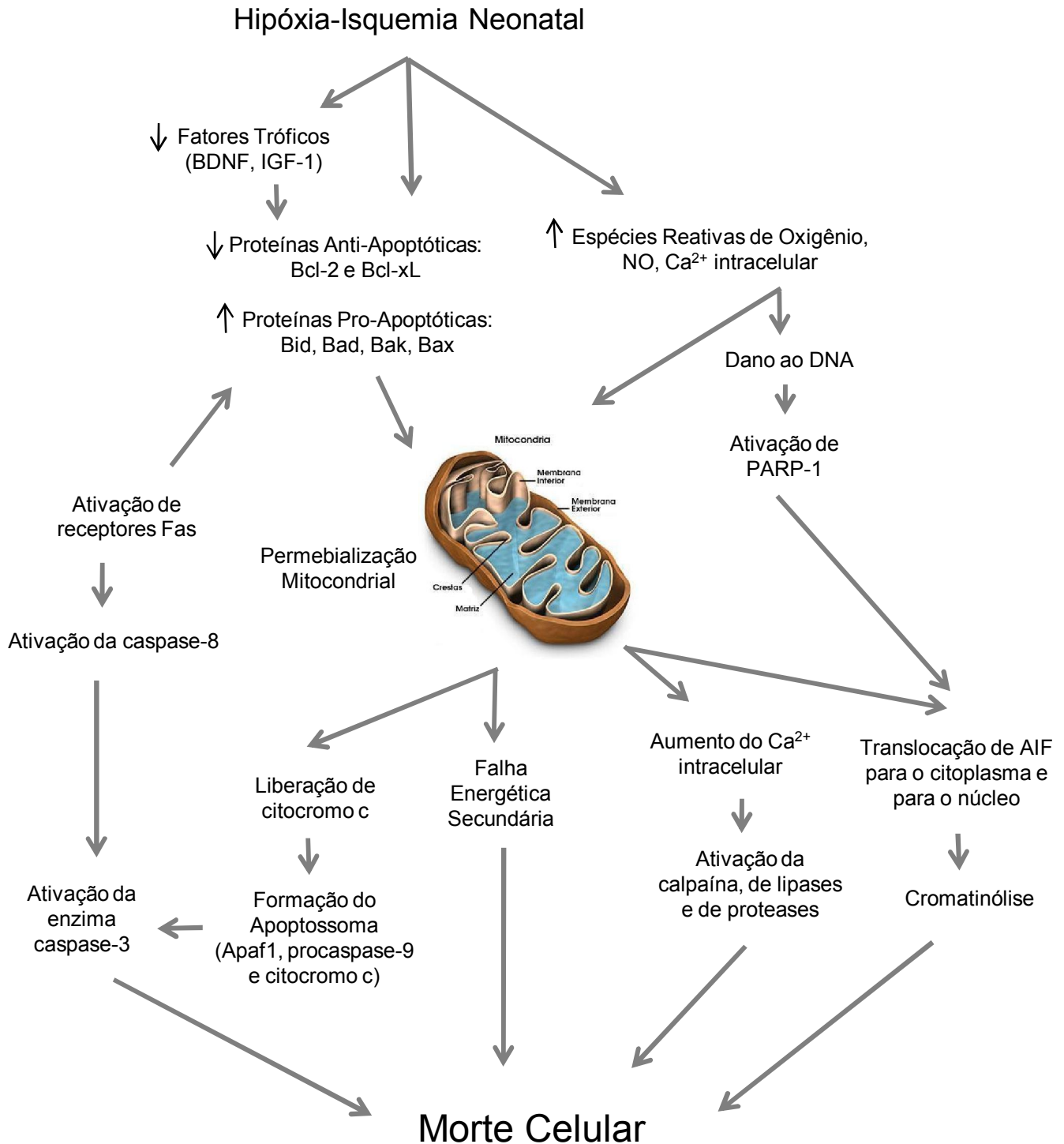


Figura 01. Vias de Morte Celular Ativadas na Hipóxia-Isquemia Neonatal. Após o evento hipóxico-isquêmico ocorre um estresse mitocondrial, levando à permeabilização da membrana mitocondrial externa, com a subsequente ativação de mecanismos de morte celular. Já a ativação de receptores Fas leva à ativação da enzima caspase-8, culminando com a ativação da enzima caspase-3 e morte celular. Adaptado de Hagberg *et al.*, 2009 e Fatemi *et al.*, 2009.

1.8 Resposta das Células-Tronco Neurais à Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Durante o desenvolvimento do SNC a parede das vesículas encefálicas apresenta, inicialmente, apenas duas camadas: a zona ventricular (VZ, do inglês ventricular zone), que reveste os ventrículos, e a zona marginal. A VZ é uma zona germinativa, onde se formam a maior parte dos precursores neurais até o período perinatal, quando, então, surge uma segunda zona germinativa: a zona subventricular (SVZ, do inglês subventricular zone).

Além da SVZ, existem outras áreas de neurogênese secundária, como a camada granular externa do cerebelo e a camada subgranular do giro denteado, no hipocampo. Estudos recentes demonstraram que duas dessas áreas de neurogênese secundária permanecem com potencial neurogênico, ao longo de toda a vida, no cérebro de mamíferos adultos: a SVZ e a camada subgranular do hipocampo. Já a VZ, permanece apenas durante as primeiras semanas após o nascimento (Tramontin *et al.*, 2003), período durante o qual há diferenciação das células de glia radial presentes nessa região em astrócitos, células endimárias (Spassky *et al.*, 2005) e nas células-tronco presentes na SVZ pós-natal (Merkle *et al.*, 2004).

O modelo mais aceito atualmente propõe que as células-tronco presentes na zona subventricular do adulto apresentam características ultraestruturais de astrócitos e expressam o marcador astrocitário GFAP (proteína glial fibrilar ácida, do inglês *glial fibrillary acidic protein*), proliferando lentamente, sendo chamadas de células B. Estas células dão origem às células amplificadoras transitórias (células C), que se dividem rapidamente e originam células mais comprometidas com uma

determinada linhagem, como precursores de oligodendrócitos ou neuroblastos (células A). Estes últimos migram por uma via conhecida como RMS (via migratória rostral, do inglês *rostral migratory stream*) até o bulbo olfatório, onde se diferenciam em interneurônios (Doetsh *et al.*, 1997 e 1999). A citoarquitetura da SVZ é bastante controlada, com cada um dos tipos celulares ocupando posições específicas, espacialmente distintas. As células C normalmente se localizam em *clusters* próximos a vasos sanguíneos e podem ser separadas em diferentes subtipos, de acordo com a expressão de fatores de transcrição neurogênicos ou gliogênicos, indicando que já existe algum grau de comprometimento com um determinado fenótipo nesse estágio de diferenciação. Células C expressando o fator de transcrição Pax6 (do inglês *paired box 6*), por exemplo, estão comprometidas com um fenótipo neuronal, enquanto células expressando o fator Olig2 (fator de transcrição de oligodendrócito 2) estão comprometidas com um fenótipo glial (Kazanis *et al.*, 2009). Já as células B apresentam um pequeno prolongamento apical, em contato com o ventrículo, um único cílio, bem como um prolongamento radial basal, que é mais longo e termina em contato com vasos sanguíneos (Mirzadeh *et al.*, 2008). Embora não exista um marcador definitivo para identificação dos astrócitos neurogênicos, recentemente foi demonstrado que células-tronco/progenitoras neurais da SVZ humana expressam seletivamente uma isoforma do filamento intermediário GFAP, chamada de GFAP-delta (Middeldorp *et al.*, 2010; van den Berge *et al.*, 2010).

Além da migração pela RMS, vários trabalhos recentes sugerem que os neuroblastos podem também migrar a partir da SVZ em direção a locais de lesão cerebral traumática ou isquêmica (Sun *et al.*, 2004; Martí-Fàbregas *et al.*, 2010). No

modelo de hipóxia-isquemia neonatal, também já foi demonstrado que as células-tronco/progenitoras neurais participam do processo de regeneração (Hayashi *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2005). Apenas dois dias após a lesão, já foi possível observar um número praticamente duas vezes maior de células proliferando na SVZ ipsilateral à isquemia. Com três e cinco semanas de recuperação havia uma expressão aumentada de doublecortina, um marcador de neuroblastos, tanto na SVZ como no estriado, em células com morfologia migratória. A análise por microarranjo de ADN, 48 horas após a lesão, revelou a indução de 35 transcritos relacionados a precursores neurais, entre eles o receptor de EGF (fator de crescimento epidermal, do inglês *epidermal growth factor*), envolvido na proliferação de células-tronco neurais, assim como de *Notch1* e gp130 (glicoproteína 130), receptores envolvidos na manutenção dessa população celular (Felling *et al.*, 2006). Após a lesão, esses neuroblastos também são capazes de migrar para o córtex, ocupando áreas desprovidas de neurônios, ou seja, os aglomerados de morte neuronal. Surpreendentemente, essa produção de novos neurônios permanecia por até 5 meses após a lesão. No entanto, cerca de 85% dos neuroblastos morriam antes da maturação, o que representa um obstáculo para o processo regenerativo endógeno do cérebro de neonatos (Yang *et al.*, 2007). Além disso, o fenótipo apresentado por esses novos neurônios que migram para o estriado após a lesão hipóxico-isquêmica parece ser bastante restrito, havendo a formação apenas de neurônios que expressam calretinina, os quais representam cerca de 0,5% da população neuronal do estriado (Yang *et al.*, 2008).

Após a hipóxia-isquemia neonatal ocorrem alterações intrínsecas nas células-tronco/progenitoras neurais. Cerca de duas vezes mais neuroesferas podiam ser

geradas a partir da SVZ ipsilateral à isquemia, 3 dias após a lesão, do que da SVZ de animais controle ou mesmo da SVZ contralateral à lesão. Além disso, essas neuroesferas eram maiores, apresentavam mais divisões simétricas (expandindo o *pool* de células-tronco/progenitoras) e eram multipotentes. Cerca de 75% das neuroesferas produziam pelo menos dois tipos celulares, enquanto cerca de 50% eram tripotentes. Já as neuroesferas obtidas dos animais controle raramente eram tripotentes (Felling *et al.*, 2006). Um fator que parece estar envolvido na expansão das células-tronco/progenitoras neurais após a lesão é o LIF (fator inibidor de leucemia, do inglês *leukemia inhibitory factor*). O mRNA (ácido ribonucléico mensageiro, do inglês *messenger ribonucleic acid*) deste fator tem sua expressão aumentada cerca de 13 vezes, 48 horas após a hipóxia-isquemia neonatal. *In vitro*, o LIF aumenta o número e o tamanho das neuroesferas (Covey e Levinson, 2007). O aumento das concentrações de glutamato no meio extracelular após a lesão também pode contribuir para a proliferação de células-tronco/progenitoras neurais. *In vitro*, o glutamato não é tóxico para as células presentes nas neuroesferas, mesmo em concentrações que seriam tóxicas para neurônios e oligodendrócitos. Surpreendentemente, o glutamato estimulou a proliferação dessas células e ainda reduziu os níveis basais de apoptose (Brazel *et al.*, 2005).

A resposta hipocampal ao evento hipóxico-isquêmico também já foi avaliada, havendo um aumento na neurogênese que ocorre normalmente na zona subgranular do giro denteado do hipocampo. Com dois dias de recuperação, houve um aumento do número de células proliferativas no giro denteado ipsilateral à isquemia. Com 35 dias de recuperação, podiam ser vistos novos neurônios formados em resposta à lesão (Bartley *et al.*, 2005). Outro estudo, no entanto, falhou em encontrar uma maior

formação de novos neurônios no hipocampo de animais P9 submetidos à hipóxia-isquemia (Qiu *et al.*, 2007).

Esse potencial regenerativo endógeno pode ser manipulado, numa tentativa de aumentar a eficiência do processo de formação de novos neurônios. Já foi demonstrado, por exemplo, que a injeção intracerebroventricular do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2, do inglês *fibroblast growth factor-2*) aumenta o número de novos neurônios formados na SVZ após a oclusão bilateral das artérias carótidas comuns em ratos P3 (Jin-qiao *et al.*, 2008). No entanto, não foi avaliado se esse tratamento resultaria em algum benefício na recuperação funcional dos animais.

Assim, as células-tronco neurais presentes tanto na SVZ como no hipocampo podem ser consideradas potenciais alvos terapêuticos para a regeneração do SNC após uma lesão hipóxico-isquêmica. Novas estratégias devem ser testadas no sentido de aumentar a sobrevivência e a integração dessas novas células. Deve-se também procurar novas formas de indução da diferenciação nos subtipos neuronais apropriados e necessários para a regeneração e recuperação funcional após a lesão.

1.9 Potencial Terapêutico das Células do Sangue de Cordão Umbilical

Humano:

O sangue de cordão umbilical humano é considerado uma fonte importante de células-tronco hematopoiéticas, responsáveis pela formação dos diversos tipos celulares encontrados na circulação sanguínea e, recentemente, vem sendo usado

como uma nova opção aos transplantes de medula óssea. O primeiro transplante realizado com sucesso, reportado por Gluckman em 1989, ocorreu na França, em um paciente com anemia de Fanconi. Desde então, milhares de transplantes já foram realizados e já existem bancos públicos, que armazenam células de sangue de cordão umbilical, criopreservadas (Madlambayan e Rodgers, 2006).

Em um estudo comparando o número de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas (que, em humanos, expressam o marcador CD34) no sangue de cordão umbilical e no sangue periférico imediatamente após o nascimento de crianças a termo, foi demonstrado que existe um maior número de células CD34⁺ no sangue de cordão umbilical (Kim *et al.*, 2007). Nas primeiras 2-6 horas de vida, há uma redução de cerca de 30% no número de células CD34⁺ no sangue periférico, possivelmente por ocorrer a migração dessas células para a medula óssea (Li *et al.*, 2001). Além disso, existe uma relação inversamente proporcional entre a idade gestacional e o número de células CD34⁺ no sangue de cordão umbilical. Parto cesário, sexo masculino e maior peso ao nascer, por sua vez, se associam a um maior número de células CD34⁺ (Jan *et al.*, 2008).

Além das células-tronco/progenitoras hematopoiéticas, o sangue de cordão umbilical humano apresenta outras populações celulares com um possível potencial terapêutico em lesões do SNC, como descrito a seguir.

1.9.1 Células-Tronco/Progenitoras Mesenquimais do Sangue de Cordão Umbilical:

No sangue do cordão umbilical, além das células-tronco hematopoiéticas, podemos encontrar também uma população de células-tronco/progenitoras mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cells*), ou células-tronco/progenitoras estromais, capazes de dar origem a células do mesoderma normalmente encontradas na medula óssea: adipócitos, condrócitos e osteoblastos (Erices *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004).

Na medula óssea, estas células residem em nichos perivasculares, apresentando um papel na regulação da hematopoiese, expressando fatores envolvidos na regulação das células tronco hematopoiéticas, como angiopoietina e a quimiocina SDF-1 (fator derivado de estroma 1, do inglês *stromal-derived factor-1*; da Silva Meirelles *et al.*, 2008). MSC quando transplantadas no espaço subcutâneo de animais imunodeficientes, formam ossículos nos quais se desenvolve um sistema de sinusóides. Após 8 semanas, células tronco/progenitoras hematopoiéticas circulantes colonizam estes ossículos, formando um nicho hematopoiético ectópico que apresenta uma composição celular semelhante à medula óssea. Em contraste, o transplante de osteoblastos é capaz de formar ossos ectópicos que não dão suporte à hematopoiese (Sacchetti *et al.*, 2007).

A purificação de MSC pode ser feita com base em critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. De acordo com esses critérios, as MSC são aderentes ao plástico quando cultivadas *in vitro* e pelo menos 95% deve expressar os marcadores CD105, CD90 e CD73. Além disso, devem ser negativas

(\leq 2% de células positivas) para os marcadores CD45, CD34, CD14 (ou CD11b), CD79 α (ou CD19) e HLA classe II. Por fim, devem ser capazes de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

Além da medula óssea e do sangue de cordão umbilical, as MSC podem ser derivadas e expandidas *in vitro* de praticamente todos os órgãos, incluindo cérebro, baço, fígado e vasos sanguíneos (da Silva Meirelles *et al.*, 2006). Já no sangue periférico de adultos, estas células estão presentes em baixíssimo número, sendo difícil sua purificação. No entanto, algumas situações podem mobilizá-las para a circulação. Em ratos adultos submetidos a um protocolo de hipóxia crônica por 3 semanas, houve um aumento de 15 vezes no *pool* de MSC presentes no sangue periférico (Rochefort *et al.*, 2006).

No sangue de cordão umbilical não se consegue isolar MSC de todas as amostras. No trabalho de Kern e colaboradores, por exemplo, estas células foram isoladas em apenas 63% das amostras de sangue de cordão umbilical a termo. Neste estudo, as células eram semelhantes em morfologia e expressavam os mesmos marcadores que MSC obtidas da medula óssea e de tecido adiposo humano, embora proliferassem mais e apresentassem uma maior capacidade de expansão *in vitro*, podendo ser cultivadas por um número maior de passagens (Kern *et al.*, 2006). Apesar de serem encontradas em baixas quantidades no sangue de cordão umbilical humano, podem ser rapidamente expandidas *in vitro*, mantendo a capacidade de diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos mesmo após várias passagens.

Alternativamente, essas células podem ser isoladas a partir de outros tecidos fetais, como da geléia de Warthon, um tecido gelatinoso que protege os vasos do cordão umbilical (Troyer *et al.*, 2008), ou da placenta (Parolini *et al.*, 2008).

Alguns estudos sugeriram que as MSC seriam bastante plásticas, podendo ser induzidas a se diferenciar em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios, astrócitos e cardiomiócitos, *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a maioria desses trabalhos se baseou principalmente na morfologia e na expressão de antígenos para caracterizar as células diferenciadas. Recentemente foi demonstrado que um dos protocolos utilizados para a transdiferenciação de MSC em neurônios, utilizando compostos químicos, leva em poucas horas à aquisição de uma morfologia neuronal e à expressão de proteínas neuronais. No entanto, estas células não possuíam propriedades funcionais de neurônios, ou seja, não apresentavam correntes de Na⁺ ou K⁺, nem eram capazes de apresentar potenciais de ação. Além disso, 50% das células expressava marcadores indicativos de apoptose 24 horas após o tratamento (Barnabé *et al.*, 2009).

Uma característica interessante dessas células é sua capacidade de migração para tecidos isquêmicos. MSC, quando injetadas sistemicamente em modelos de oclusão da artéria cerebral média em ratos, migram para a área isquêmica e essa migração depende da interação da quimiocina SDF-1 com seu receptor CXCR4 (receptor 4 de quimiocina CXC, do inglês *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*). O pré-tratamento com um antagonista específico do receptor CXCR4 é capaz de evitar a migração dessas células para as áreas com lesão. Além disso, a expressão de CXCR4 aumenta nas MSC submetidas à hipóxia (Wang *et al.*, 2008).

Diversos grupos já demonstraram que essas células apresentam um efeito terapêutico quando injetadas sistemicamente em diferentes modelos de isquemia cerebral e promovem uma melhora funcional dos animais tratados, independente da via, intracerebral ou intravenosa, e da origem das células. Recentemente, nosso grupo mostrou que MSC derivadas da medula óssea quando injetadas em um modelo de isquemia focal levam a um melhor desempenho dos animais tratados em um teste motor, quando injetadas 24 horas após a lesão, mas não quando injetadas 30 dias após a isquemia (de Vasconcelos dos Santos *et al.*, 2010).

MSC obtidas do tecido adiposo e cultivadas *in vitro* secretam uma grande variedade de fatores tróficos, como IGF-1 (de crescimento semelhante a insulina I; do inglês *insulin like growth factor I*), HGF (fator de crescimento de hepatócitos, do inglês *hepatocyte growth factor*) e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*). Para testar o potencial neuroprotetor desse conjunto de fatores em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal, o meio condicionado obtido a partir do cultivo dessas células foi injetado 1 hora antes ou 24 horas após a indução da lesão, através da veia jugular. Tanto o pré-tratamento como a injeção tardia resultaram em uma redução da lesão no tálamo, córtex, hipocampo e estriado, bem como em um melhor desempenho no labirinto aquático de Morris. Quando o meio condicionado foi incubado com anticorpos anti-BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) ou anti-IGF-1 por 30 minutos e injetado 1 hora antes da hipóxia-isquemia, o efeito neuroprotetor foi um pouco reduzido, embora não totalmente. Dessa forma é possível que o efeito neuroprotetor seja um resultado da ação de diferentes fatores presentes no meio e não de um único fator (Wei *et al.*, 2008).

Além disso, algumas evidências indicam que a inflamação pode induzir a expressão de fatores tróficos por MSC humanas. Nesse sentido, a exposição à citocina TNF- α aumenta a produção de VEGF, HGF e IGF-1 por estas células, *in vitro* (Wang *et al.*, 2006).

As MSC humanas obtidas do sangue de cordão umbilical já foram transplantadas em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em cães. As células foram injetadas na artéria basilar, 1 dia após a lesão. O tratamento resultou em um menor volume de lesão e em uma recuperação funcional mais rápida do que nos animais que receberam salina. Muitas células puderam ser encontradas no cérebro dos animais tratados, principalmente na proximidade de vasos sanguíneos, até 4 semanas após o transplante, expressando os fatores tróficos VEGF e BDNF (Chung *et al.*, 2009).

Além de um possível efeito parácrino, através da liberação de fatores neurotróficos, as MSC apresentam também um efeito imunomodulador, o qual foi descrito a partir da observação de que essas células suprimem a proliferação de linfócitos T *in vitro*. Posteriormente, foi verificado que esse efeito envolve a interação de MSC com praticamente todas as células do sistema imune inato e adaptativo (Uccelli *et al.*, 2008).

Este efeito imunomodulador já foi também demonstrado após a injeção intrahipocampal de MSC em um modelo de isquemia global transiente em animais adultos. Nesse estudo, após observarem um efeito neuroprotetor e uma melhora funcional, os autores realizaram uma análise dos genes que tiveram sua expressão modulada pelo tratamento. Foram encontrados 3 genes com a expressão

aumentada nos animais tratados, 2 deles envolvidos em neuroproteção: o gene da lisozima e o gene Ym1 (ou Chi3l3, do inglês chitinase 3-like 3), o qual é expresso por células microgliais e por macrófagos. Além disso, 65 genes tiveram sua expressão reduzida após o tratamento, 19 deles envolvidos em respostas do sistema imune. De especial interesse foi a redução da expressão de 12 genes responsivos ao IFN. Além disso, foi observado um aumento dos níveis do fator trófico IGF-1 e um aumento da razão IL-4/IFN- γ e IL-4/TNF- α , indicando um efeito anti-inflamatório no hipocampo dos animais tratados. Também foi demonstrado que a expressão de IGF-1 e Ym1 ocorria nas células microgliais, mas não nas células transplantadas, indicando que houve uma alteração do fenótipo das células microgliais após o tratamento (Ohtaki *et al.*, 2008).

Por fim, estas células já foram transplantadas em dois trabalhos realizados por grupos independentes, no modelo de hipóxia-isquemia neonatal.

MSC humanas obtidas da medula óssea de pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas foram injetadas 72 horas após a lesão, resultando em uma melhora dos déficits sensorimotores avaliados pelo teste do cilindro. No entanto, não houve redução do volume de lesão nos animais tratados. As células injetadas foram encontradas em ambos os hemisférios, expressando principalmente marcadores de astrócitos e microglia/macrófagos, 6 semanas após o transplante (Lee *et al.*, 2009).

Em outro estudo, MSC murinas, também injetadas 72 horas após a lesão, intensificaram a capacidade regenerativa endógena do cérebro, aumentando a formação de novos neurônios e oligodendrócitos no hemisfério ipsilateral à isquemia. Um efeito anti-inflamatório também foi sugerido, já que houve uma redução na

proliferação de células microgliais no córtex dos animais tratados (van Velthoven *et al.*, 2009).

No entanto, MSC obtidas do sangue de cordão umbilical humano ainda não foram testadas em modelos de hipóxia-isquemia neonatal.

Uma desvantagem no uso de MSC para um transplante autólogo é o longo tempo necessário para seu isolamento e expansão *in vitro*. Assim, uma possível terapia utilizando essa população celular do sangue de cordão umbilical da própria criança não poderia ser realizada na primeira semana de vida, o que pode representar a perda da janela terapêutica para a neuroproteção. No entanto, talvez essas células ainda possam apresentar um efeito imunomodulador ou estimular processos regenerativos mesmo quando injetadas na fase subaguda da encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal.

1.9.2 Células Progenitoras Endoteliais do Sangue de Cordão

Umbilical:

A formação de novos vasos pode ocorrer através de dois processos: vasculogênese e angiogênese. Vasculogênese é um processo que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, no qual novos vasos são formados a partir de células progenitoras endoteliais. Resumidamente, esse processo ocorre através da formação de agrupamentos de células, chamados de ilhotas sanguíneas, nos quais as células progenitoras endoteliais estão localizadas na periferia, dando origem ao endotélio, enquanto as células-tronco hematopoiéticas se localizam no centro, originando as células do sangue. Por fim, o crescimento e a fusão dessas ilhotas

resultam na formação de uma rede de capilares. Já o processo de angiogênese ocorre através da formação de novos capilares através de células endoteliais maduras. A ativação de células endoteliais, a ruptura da membrana basal e a migração das células endoteliais para o interstício iniciam o processo, que se completa pela proliferação das células endoteliais, o recrutamento de pericitos e a formação da membrana basal (Murohara *et al.*, 2001).

Células progenitoras endoteliais e células-tronco hematopoiéticas são formadas a partir de um precursor comum, o hemangioblasto, e expressam alguns antígenos em comum. Utilizando os antígenos CD34, KDR e CD133, que são expressos tanto nas células-tronco hematopoiéticas como nas células progenitoras endoteliais embrionárias, é possível isolar da fração mononuclear do sangue periférico adulto células progenitoras endoteliais circulantes que se diferenciam em células endoteliais *in vitro* e que, quando transplantadas em modelos de isquemia se integram em locais onde está ocorrendo angiogênese, (Murohara *et al.*, 2001; Eguchi *et al.*, 2007). Desde a descoberta dessas células circulantes em adultos, o conceito de que a vasculogênese seria um fenômeno restrito ao desenvolvimento embrionário vem sendo revisado. Acredita-se que estas células circulariam pelo corpo, participando de processos regenerativos que ocorrem diariamente, como a cicatrização de pequenas lesões na pele ou em mucosas.

No entanto, em 2005 um grupo questionou o papel de células provenientes da medula óssea como progenitores endoteliais no SNC. Nesse artigo, células expressando a proteína verde fluorescente GFP (do inglês *green fluorescent protein*), provenientes da medula óssea, eram encontradas nas proximidades de vasos do SNC de camundongos normais. Nenhuma dessas células expressava

marcadores de células endoteliais. Encontravam-se em uma localização subendotelial, apresentando uma morfologia típica de microglia (sendo possível marcar essas células com uma lectina) ou uma morfologia alongada. Possuíam também alguns vacúolos intracitoplasmáticos que expressavam CD31, o que sugere que essas células fagocitam células endoteliais (Galimi *et al.*, 2005). Assim, podemos acreditar que existe uma população celular na medula óssea e possivelmente no sangue de cordão umbilical, responsável pelo remodelamento de vasos no SNC através da fagocitose de células endoteliais, em condições fisiológicas, cujo papel no cérebro após um episódio de isquemia é ainda desconhecido. Esse trabalho, entretanto, não exclui a possibilidade de haver um progenitor endotelial com atuação fora do SNC ou que atue apenas após uma abertura da barreira hematoencefálica, como ocorre nos casos de isquemia.

Recentemente, estudos isolando células progenitoras endoteliais do sangue de cordão umbilical humano demonstraram que tais células possuem um potencial de diferenciação *in vivo* e *in vitro*, semelhante ao das células obtidas a partir do sangue periférico adulto (Asahara *et al.*, 2007).

1.9.3 Linfócitos do Sangue de Cordão Umbilical:

Diversos estudos demonstraram que os linfócitos presentes no sangue de cordão umbilical humano apresentam diversas diferenças em relação aos linfócitos presentes no sangue de indivíduos adultos. Foi demonstrado, por exemplo, que linfócitos T do sangue de cordão umbilical são hiporesponsivos a estímulos que

ativam receptores C1q, resultando numa produção diminuída de IFN- γ , em relação aos linfócitos T adultos (Jiang *et al.*, 2004).

Linfócitos T regulatórios (Treg) são células caracterizadas por expressarem os antígenos CD4, CD25 e Foxp3, constituindo cerca de 5-15% da população de linfócitos T CD4⁺, ou seja, cerca de 1-2% das células do sangue periférico adulto. Quando ativadas, são capazes de suprimir a proliferação e a produção de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺ efectoras. A principal função das células Treg é evitar o desenvolvimento de autoimunidade. Animais com mutações no gene Foxp3 (que resultam em células Treg disfuncionais) apresentam diversos sintomas relacionados à autoimunidade, os quais se assemelham aos sintomas apresentados por pacientes com a síndrome IPEX (desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X, do inglês *immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), que apresentam alterações no mesmo gene (Sutmuller *et al.*, 2006).

Em fetos, as células Treg apresentam um papel importante em suprimir uma reação do sistema imune fetal contra células maternas que cruzam a placenta e passam a residir em linfonodos fetais (Mold *et al.*, 2008).

As células Treg do cordão umbilical são mais facilmente isoladas do que as presentes no sangue periférico adulto. Isso ocorre porque no sangue periférico adulto existe uma população de células de memória que são CD25^{dim}, de forma que mesmo nas populações de células Treg do sangue periférico adulto separadas por citometria de fluxo, existe uma contaminação com células T de memória. Já no sangue de cordão umbilical, uma população mais pura de células Treg pode ser separada mais facilmente, mesmo através de técnicas mais simples, como a

purificação através do sistema MACS (do inglês *magnetic cell sorting purification*). Foi também demonstrado que células Treg do sangue de cordão umbilical e do sangue periférico adulto apresentam o mesmo potencial imunossupressor (Godfrey *et al.*, 2005).

Embora, *in vitro*, o efeito supressor das células Treg ocorra independente da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e dependa do contato célula-célula, foi mostrado que células Treg apresentam um papel anti-inflamatório dependente da liberação de IL-10 em um modelo de acidente vascular cerebral, resultando em um efeito neuroprotetor (Liesz *et al.*, 2009).

O sangue de cordão umbilical representa, portanto, uma fonte importante de células Treg, que podem ser facilmente purificadas e que apresentam um potencial anti-inflamatório e neuroprotetor significativo.

1.9.4 Monócitos do Sangue de Cordão Umbilical:

Na maioria das espécies, incluindo invertebrados como a *Drosophila*, o sistema imune inato é composto de um braço humoral, que consiste de peptídeos antimicrobianos e opsoninas, e um braço celular, que é formado por células especializadas chamadas de fagócitos. Estes, são células capazes de internalizar e digerir bactérias e outras células, remover compostos tóxicos e produzir mediadores inflamatórios capazes de matar bactérias, vírus e parasitas, bem como de ativar outros tipos celulares. Dentre as células do braço celular do sistema imune inato, encontramos os monócitos que representam cerca de 10% dos leucócitos no sangue

periférico humano. Em mamíferos, além de contribuir para a homeostase através da fagocitose de células apoptóticas e da remoção de substâncias tóxicas, os monócitos também representam um elo entre o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. Além disso, representam uma reserva sistêmica de precursores mielóides, capazes de originar macrófagos teciduais e células dendríticas apresentadoras de antígenos.

Os monócitos humanos podem ser identificados pela expressão de CD115 e do receptor de quimiocina CX3CR1 (receptor 1 de quimiocina C-X3-C, do inglês *chemokine (C-X3-C motif) receptor 1*). Quando estimulados, podem produzir espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, prostaglandinas, enzimas proteolíticas, diversas citocinas e VEGF. São células apresentadoras de antígenos, embora sejam muito menos eficientes do que as células dendríticas. Três populações de monócitos humanos podem ser definidas, a partir da expressão de CD14 e CD16 (CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ e CD14^{dim}CD16⁺). Os monócitos CD14⁺CD16⁻ representam cerca de 80-90% dos monócitos do sangue e expressam altos níveis do receptor CCR2 (receptor 2 de quimiocina C-C, do inglês *chemokine (C-C motif) receptor 2*) e baixos níveis de CX3CR1. Em resposta ao LPS (lipopolissacarídeo), produzem principalmente a citocina anti-inflamatória IL-10, ao invés das citocinas IL-1 e TNF- α . Já os monócitos CD16⁺ expressam altos níveis de CX3CR1 e baixos níveis de CCR2, produzindo TNF- α quando estimulados com LPS, sendo por isso chamados de monócitos inflamatórios. Estes, por sua vez, podem ser divididos em duas subpopulações: monócitos CD14⁺CD16⁺, que também expressam os receptores Fc CD64 e CD32, apresentam atividade fagocítica e são os responsáveis pela produção de TNF- α e IL-1, e monócitos CD14^{dim}CD16⁺, que não expressam

outros receptores Fc, são pouco fagocíticos e não produzem TNF- α e IL-1 em resposta ao LPS (Auffray *et al.*, 2009).

Os monócitos do sangue de cordão umbilical apresentam diferenças em relação aos monócitos do sangue periférico adulto. Após uma estimulação com LPS, foram encontrados 168 genes expressos de forma diferente nessas duas populações, sendo que 159 deles apresentavam a expressão aumentada nos monócitos adultos (Lawrence *et al.*, 2007). Uma das principais diferenças entre monócitos adultos e neonatais está relacionada à apresentação de antígenos. Em um estudo que avaliou o processamento e a apresentação de antígenos MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade classe II, do inglês *major histocompatibility complex class II*), foi demonstrado que monócitos do sangue de cordão umbilical geraram uma menor ativação de linfócitos T do que monócitos do sangue periférico adulto (Canaday *et al.*, 2006).

Além disso, a idade gestacional também está relacionada à função dos monócitos. Monócitos obtidos do sangue de cordão umbilical de crianças nascidas com 30 semanas ou menos de gestação apresentaram uma menor resposta quando estimulados por LPS do que monócitos de crianças nascidas com mais de 30 semanas (Pérez *et al.*, 2010).

Por fim, o tipo de parto também pode induzir a ativação dos monócitos, de forma que monócitos obtidos do sangue de cordão de crianças nascidas de parto vaginal apresentaram uma maior expressão de TLR-2 e TLR-4 (receptores *toll-like 2* e 4, respectivamente) do que os monócitos obtidos de crianças nascidas de parto cesário (Shen *et al.*, 2009).

Recentemente foi demonstrado que o transplante de células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano resultou em melhora da função neurológica em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos adultos. Para descobrir quais populações celulares contribuíram para o efeito observado, os autores trataram outros quatro grupos de animais com a fração mononuclear depletada de monócitos CD14⁺, linfócitos-T, linfócitos-B ou células CD133⁺. Os animais tratados com a fração mononuclear depletada de monócitos CD14⁺ não apresentaram melhora, quando comparados aos outros grupos, demonstrando que estes monócitos são indispensáveis para os efeitos terapêuticos observados após o transplante de células mononucleares do sangue de cordão umbilical (Sanberg *et al.*, 2009).

Em camundongos, duas populações de monócitos foram identificadas. Os monócitos inflamatórios expressam o antígeno Ly6c (Gr1⁺), o receptor CCR2 e a molécula de adesão L-selectina, apresentando semelhanças em relação aos monócitos CD14⁺CD16⁻ humanos. Já os monócitos residentes não expressam a proteína Ly6c (Gr1⁻), apresentam uma maior expressão do receptor CX3CR1 e da integrina LFA-1, mas não expressam CCR2 e L-selectina, sendo semelhantes aos monócitos CD14^{dim}CD16⁺ humanos. Os monócitos residentes patrulham os vasos sanguíneos e são os primeiros a extravasar para os tecidos, sendo responsáveis pela produção de TNF- α nas primeiras duas horas após uma infecção e posteriormente se diferenciando em macrófagos. Já os monócitos inflamatórios infiltram os tecidos mais tarde, após uma infecção, e se diferenciam em células dendríticas inflamatórias (Auffray *et al.*, 2007).

Em um modelo de infarto agudo do miocárdio foi observada uma mobilização de monócitos inflamatórios para o sangue periférico e posteriormente para o miocárdio isquêmico. Estes monócitos inflamatórios apresentaram um papel proteolítico, fagocítico e pró-inflamatório. Em seguida, ocorreu a mobilização de monócitos residentes circulantes, que expressam VEGF e apresentaram um papel na regeneração e no reparo tecidual, promovendo a angiogênese, o acúmulo de miofibroblastos e o depósito de colágeno. Além disso, a migração dos monócitos inflamatórios para o miocárdio isquêmico não ocorreu na ausência de CCR2, enquanto a migração dos monócitos residentes não ocorreu na ausência do receptor CX3CR1, demonstrando que a migração desses monócitos é regulada por diferentes quimiocinas (Nahrendorf *et al.*, 2007).

1.9.5 Transplante de Células Mononucleares do Sangue de

Cordão Umbilical em Modelos de Hipóxia-Isquemia

Neonatal:

O primeiro estudo a testar o transplante de células mononucleares de cordão umbilical humano em um modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal, publicado em 2006, encontrou evidências de que os animais tratados apresentaram um melhor desempenho motor. Nos animais tratados, a distância entre os passos (na pata contralateral ao hemisfério que sofreu a isquemia) foi semelhante a dos animais controle e maior que a dos animais hipóxico-isquêmicos que receberam uma injeção de salina. O transplante foi feito através de uma injeção intraperitoneal de 10^7 células, 24 horas após a hipóxia. Utilizando um anticorpo anti-HLA-DR (anti-antígeno

leucocitário humano-DR), um número grande de células foi encontrado no hemisfério ipsilateral à isquemia, 13 dias após o transplante. No entanto, não houve indícios de diferenciação dessas células em astrócitos ou neurônios (Meier *et al.*, 2006).

Em 2009, mais dois trabalhos foram publicados utilizando o mesmo modelo animal de hipóxia-isquemia neonatal, porém com pequenas alterações metodológicas.

Em um dos estudos foi realizado o transplante de um número pequeno de células ($1,5 \times 10^4$) na veia jugular, 7 dias após a indução da hipóxia-isquemia. Os animais tratados apresentaram uma menor assimetria no uso das patas dianteiras e uma melhor coordenação motora do que os animais que receberam uma injeção de veículo. Foi também demonstrado que o transplante aumentou a plasticidade sináptica no hipocampo ipsilateral à isquemia (Yasuhara *et al.*, 2009).

No segundo estudo foram transplantadas 1×10^7 células por via intravenosa, 24 horas após a hipóxia-isquemia. Poucas células foram encontradas 24 horas, 1 semana ou 3 semanas após o transplante. Além disso, nenhum efeito benéfico associado ao tratamento foi verificado no labirinto aquático de Morris, que avalia o aprendizado e a memória espacial. Também não foram verificadas alterações no volume do infarto nos animais tratados (de Paula *et al.*, 2009). No entanto, o protocolo utilizado por esse grupo (com 120 minutos de hipóxia) causa uma lesão bastante grave. É possível que o efeito terapêutico verificado pelos outros 2 grupos possa não ocorrer em casos severos de hipóxia-isquemia.

Dessa forma, o sangue de cordão umbilical humano contém diferentes populações celulares que podem contribuir para um efeito terapêutico após a

hipóxia-isquemia neonatal. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda não foram identificados. Além disso, o momento em que as células foram transplantadas nesses trabalhos (24 horas ou 7 dias após a lesão) talvez tenha sido muito tarde para promover um efeito neuroprotetor.

Trabalhos recentes indicam que a janela terapêutica para mecanismos de neuroproteção é bastante curta. Tratamentos neuroprotetores iniciados com um atraso de algumas horas após a lesão apresentam um efeito apenas na morte neuronal secundária, mas não salvam a maioria dos neurônios afetados no centro da lesão. Como os trabalhos clínicos mais recentes apontam que a lesão hipóxico-isquêmica ocorre poucas horas antes do parto, um possível tratamento neuroprotetor deve, portanto, ser instituído nas primeiras horas após o nascimento. Nesse sentido, o tratamento com hipotermia é eficaz apenas quando realizado nas primeiras 6 horas após o nascimento (Schulzke *et al.*, 2007).

Como a coleta e a separação da fração mononuclear é um procedimento simples que pode ser realizado imediatamente após o nascimento da criança, a realização do transplante 3 horas após o nascimento é exequível e poderia ser aplicada na prática clínica.

Esse trabalho tem como o objetivo avaliar o possível efeito terapêutico das células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical quando transplantadas precocemente, 3 horas após a lesão, identificando os possíveis efeitos do tratamento na morte neuronal e na inflamação.

2 OBJETIVOS:

Nesse estudo investigamos o possível papel terapêutico das células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano no desenvolvimento pós-natal do SNC de ratos submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia neonatal de Rice-Vannucci.

2.1 Objetivos Específicos:

- Avaliar a migração para o SNC das células injetadas sistemicamente em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal.
- Usando esse modelo, analisar o efeito da terapia celular:
 - 1) na morte neuronal no córtex, no hipocampo e no estriado;
 - 2) na ativação da enzima caspase-3 no córtex e no estriado;
 - 3) na ativação de astrócitos no hemisfério ipsilateral à isquemia;
 - 4) na ativação de células microgliais no córtex, no estriado, na cápsula externa e na zona subventricular
 - 5) no desenvolvimento da marcha e dos reflexos neonatais de aversão ao precipício e de geotaxia negativa
- Avaliar a resposta da medula óssea à hipóxia-isquemia neonatal

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Animais:

Foram usados ratos Lister-Hooded no oitavo dia pós-natal (P7), do sexo masculino, fornecidos pelo biotério de nossa Instituição. Os animais foram utilizados respeitando-se os princípios estabelecidos pela Comissão de Avaliação da Utilização de Animais em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde (CAUAPE-CCS, protocolo número IBCCF 059). O número de animais utilizado em cada experimento está indicado na tabela 4.

Tabela 4: Número de animais utilizados em cada experimento:

Experimento	Falso-operados	HI + veículo	HI + células	Total	Eutanásia em
Análise dos reflexos Neonatais e do Peso Corporal	30	25	31	86	P21
Análise quantitativa da morte celular (caspase-3 ativada/Fluoro-Jade C)	0	5/6	6/7	13	P9
Análise quantitativa da ativação da microglia	0	9	9	18	P14
Análise da gliose reativa (imunoblotting)	0	5	4	9	P14
Análise da resposta da medula óssea	6	6	0	12	P9 e P14
Total	36	51	51	138	

3.2 Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Os animais foram submetidos ao modelo de hipóxia-isquemia de Levine-Vannucci (Vannucci *et al.*, 1999).

Inicialmente, os animais foram anestesiados com o anestésico inalatório sevoflurano (Sevorane, Abbot) e submetidos a uma cirurgia para exposição e oclusão da artéria carótida comum direita utilizando material cirúrgico estéril. Após as medidas de assepsia com álcool 70%, foi feita uma incisão cervical anterior de aproximadamente 0,5 cm com uma lâmina de bisturi, seguida da dissecação da região paratraqueal direita, com afastamento do músculo esternocleidomastoideo, utilizando pinças curvas. A artéria carótida comum direita foi, então, visualizada e separada da veia que a acompanha e do nervo vago, sendo posteriormente ocluída permanentemente através da ligadura com fio de seda 6-0 em dois pontos. Não foi realizada sutura da pele, para evitar rejeição pela mãe, havendo boa cicatrização por segunda intenção. Este procedimento cirúrgico tem duração de cerca de 5-10 minutos.

Após duas horas de recuperação sob luz quente, afastados da mãe, os animais foram expostos a um ambiente de hipóxia, com oxigênio a 8%, balanceado com nitrogênio a 92%, por noventa minutos. Este ambiente consiste num *kitasato* de 500 ml, submerso em banho-maria a 37° C. Sua entrada lateral está ligada a um cilindro contendo a mistura de oxigênio na concentração citada, recebendo o fluxo de 2 L/min. Sua segunda abertura fica vedada com uma rolha de borracha, na qual existe um cilindro central que faz a interface entre o interior do *kitasato* e o meio externo, permitindo a saída dos gases. Denominamos esse aparato de *câmara de*

hipóxia. Após um período de 15 minutos de recuperação sob luz quente, os animais foram devolvidos para a gaiola de sua mãe.

3.3 Isolamento de células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano:

O sangue de cordão umbilical humano foi obtido a partir de uma colaboração com o Professor Dr. Laudelino Marques Lopes, diretor do Centro Pré-Natal de Diagnóstico e Tratamento da Clínica Perinatal Laranjeiras (Rio de Janeiro). Foi recolhido de recém-nascidos a termo (idade gestacional entre 25 e 40 semanas), de ambos os sexos, saudáveis, cujas mães assinaram um termo de consentimento, doando esse material para pesquisa, respeitando os requerimentos éticos da maternidade onde foram colhidos. Foi coletado da veia umbilical da placenta, logo após o parto, em bolsas contendo citrato fosfato dextrose adenina (citrato de sódio 2,63%, ácido cítrico 0,299%, sódio bifosfato 0,222%, adenina 0,0275% e dextrose 3,19%; JP Indústria Farmacêutica) por profissionais da equipe médica da maternidade. O sangue foi armazenado por no máximo 24 horas, a 4°C, antes de ser manipulado para separação celular.

As células da fração mononuclear foram separadas através de um gradiente de densidade obtido com uma solução isotônica de metrizoato de sódio Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare). O sangue foi passado para tubos de 50ml e foi realizada a centrifugação por 30 minutos a 1300G. Em seguida, após a remoção do sobrenadante, o sangue foi diluído (volume 1:1) em salina tamponada em tampão fosfato 10 mM (PBS – NaCl 0,13 M, Na₂HPO₄.7H₂O 0,007 M e NaH₂PO₄ 0,003 M,

pH 7,4). Em um tubo de 15 ml foram adicionados 3 ml de Ficoll e, lentamente, adicionados 4 ml do sangue diluído em PBS sobre o Ficoll, formando duas fases distintas. Foi realizada uma nova centrifugação por 30 minutos a 1200G, sem frenagem, entre 18 e 25° C. Após a centrifugação o halo branco que contém as células mononucleadas, localizado na interface entre as duas fases formadas durante a centrifugação, foi recolhido e as células foram lavadas duas vezes com PBS para retirada dos resíduos de Ficoll. Após as lavagens, foi feita a quantificação do número de células vivas utilizando um hemocitômetro pela técnica de exclusão de Azul de Tripán 4%. Após a contagem, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em plasma obtido do próprio sangue de cordão e 5% de DMSO (dimetilsulfóxido). Após 15 minutos em gelo, as células foram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. Todo o procedimento foi realizado em condições estéreis em uma capela de fluxo laminar.

3.4 Marcação e Transplante das Células:

As células foram rapidamente descongeladas, sendo rapidamente mergulhadas em um banho-maria a 37° C. Logo após centrifugação e 3 lavagens com PBS, foram ressuspensas em meio DMEM-F12 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Media*, Invitrogen). Antes da injeção, foi feita novamente a quantificação do número de células vivas com Azul de Tripán 4%. Após nova centrifugação, foram ressuspensas em DMEM-F12, em volume necessário para se obter a densidade de 2×10^6 células por 100 μ L de meio.

Para alguns experimentos, antes de serem injetadas as células foram coradas com o traçador fluorescente CellTrace™ Far Red DDAO-SE (Invitrogen), um marcador fluorescente, que se liga a amins primárias, não-tóxico para as células, permanecendo nas células por pelo menos 3 semanas. Para isso, as células foram incubadas por 40 minutos em uma solução de Cell Trace 1:1000, diluído em meio DMEM-F12, em estufa de mistura ar/CO₂ a 37° C. As células, foram a seguir centrifugadas, lavadas três vezes em PBS, centrifugadas novamente e ressuspendidas em DMEM-F12.

Três horas após saírem da câmara de hipóxia, os animais receberam o transplante celular, que foi realizado por via intraperitoneal, administrando lentamente 100 µl da solução contendo 2 x 10⁶ células em meio DMEM-F12, utilizando uma seringa com uma agulha 30G. Outro grupo de animais foi submetido ao mesmo procedimento, três horas após a retirada da câmara de hipóxia, recebendo uma injeção intraperitoneal de 100 µL de DMEM-F12, sem células.

Os animais foram mantidos sob luz quente após o procedimento, por cerca de 15 minutos, até serem devolvidos para a mãe.

A escolha da dose utilizada nesse trabalho se baseou em um estudo de Vendrame e colaboradores que demonstrou uma melhora funcional, assim como uma redução da área infartada apenas nos animais adultos que receberam a injeção sistêmica de mais de 10⁶ células mononucleares de sangue de cordão umbilical humano após a oclusão da artéria cerebral média. Além disso, o grupo que recebeu uma injeção de 3 x 10⁷ células apresentou a maior recuperação funcional (Vendrame *et al.*, 2004). Como o peso médio de um animal adulto é de 175 g e o de um animal

P7 13g, utilizamos uma dose de 2×10^6 células (aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/g de peso corporal).

3.5 Grupos de Estudo:

No oitavo dia de vida pós-natal (P7), as ninhadas foram padronizadas quanto ao número de animais por mãe, de forma a não haver diferenças relacionadas à nutrição dos filhotes e aos cuidados maternos. Assim, cada mãe teve sua ninhada reduzida a um número entre 5 e 8 animais.

Os animais foram divididos em três diferentes grupos experimentais:

- Grupo Controle (animais falso-operados):

Os animais foram anestesiados com o anestésico sevoflurano e submetidos a uma cirurgia para exposição da artéria carótida comum direita utilizando material cirúrgico estéril. Após assepsia com álcool 70%, foi feita uma incisão cervical anterior de aproximadamente 0,5 cm com lâmina de bisturi, seguida da dissecação da região paratraqueal direita, com afastamento do músculo esternocleidomastoideo, utilizando pinças curvas. A artéria carótida comum direita foi, então, visualizada, terminando o procedimento cirúrgico. Em seguida, os animais permaneceram afastados da mãe por um período de 3 horas e 30 minutos, sob luz quente, ou seja, por um período total de afastamento materno semelhante ao dos animais dos demais grupos experimentais.

- Grupo Hipóxico-Isquêmico 1 (HI + veículo, ou animais não tratados):

Animais submetidos ao modelo de Levine-Vanucci, recebendo uma injeção intraperitoneal de 100 μ L de DMEM-F12, três horas após a hipóxia.

- Grupo Hipóxico-Isquêmico 2 (HI + células, ou animais tratados):

Animais submetidos ao modelo de Levine-Vanucci, recebendo uma injeção intraperitoneal de 100 μ L de DMEM-F12, contendo 2×10^6 células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano, três horas após a hipóxia.

3.6 Preparação Histológica:

Os animais, em diferentes sobrevivências (2, 4 e 7 dias após a hipóxia-isquemia ou a falsa cirurgia), foram anestesiados com isoflurano e submetidos a uma perfusão transcardíaca, para fixação de seus tecidos, utilizando paraformaldeído 4% (em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4).

Após a anestesia foi feita uma incisão mediana, estendida ao longo do esterno, realizando-se rapidamente um corte no diafragma do animal para levar a uma parada respiratória, com o animal ainda anestesiado. Foram infundidas, através do ventrículo esquerdo dos animais, soluções de salina 0,9%, paraformaldeído 4% e paraformaldeído 4% + sacarose 10%, respectivamente, mantidas em gelo. Além disso, o átrio direito foi cortado, para que houvesse a saída da solução que chega a partir das veias cavas.

A crioproteção foi completada com a imersão do cérebro por 24 horas em soluções de tampão fosfato 0,1M pH 7,4 + sacarose 20% e tampão fosfato 0,1M pH 7,4 + sacarose 30%, respectivamente.

O tecido foi cortado utilizando criostato, em fatias de 14 μ m, em lâminas gelatinizadas que foram submetidas a reações de imunohistoquímica ou de histoquímica convencional. As lâminas foram mantidas a -20° C até serem utilizadas para as reações.

3.7 Coloração de Cresil Violeta:

Para a coloração de cresil violeta, as lâminas foram mergulhadas nas seguintes soluções, respectivamente:

- 1) álcool etílico 75%, álcool 90% e álcool 100% (lavagens de 3 minutos),
- 2) álcool-clorofórmio (diluição de 1:1), por 10 minutos,
- 3) álcool 100%, álcool 90%, álcool 75% e água destilada (3 minutos cada),
- 4) solução de cresil violeta a 40° C por 1 minuto,
- 5) água destilada (3 minutos),
- 6) álcool 75% diferenciador e álcool 95% diferenciador (3 lavagens rápidas),
- 7) álcool 90%, álcool 100% e álcool etílico-butílico (diluição de 1:1), por 3 minutos em cada solução,
- 8) xilol I e xilol II, por 5 minutos,

Em seguida, foram montadas com o meio de montagem Entellan (Sigma) e cobertas com uma lamínula.

3.8 Imunohistoquímica:

As lâminas foram lavadas três vezes, por cinco minutos em cada lavagem, com salina tamponada com PBS (pH 7,4) + 0,01% Triton X-100 (Sigma). Em seguida, foi feito o bloqueio de sítios inespecíficos, através da incubação por 30 minutos com 5% NGS (soro normal de cabra, do inglês *normal goat serum*, Sigma).

O próximo passo foi a incubação com o anticorpo primário, por 12 horas, diluído em PBS (pH 7,4), em uma câmara úmida a 4° C, seguida de três lavagens com salina tamponada com PBS (pH 7,4) + Triton X-100 0,01%. A seguir, as lâminas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida, com um ou com uma combinação dos seguintes anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit (1:400, Molecular Probes), Cy3-Conjugated Anti-Mouse IgM (1:1000, Jackson), FITC-Conjugated Anti-Mouse IgG (1:100, Capel), juntamente com o marcador nuclear TO-PRO-3[®] (1:1000, Invitrogen), diluídos em PBS.

Foram lavadas por 5 minutos com PBS e incubadas por 3 minutos com bisbenzimidida 0,1% em solução aquosa (Sigma), para marcação nuclear, nos casos em que o corante TO-PRO-3[®] não foi utilizado.

Após duas lavagens com PBS, por 5 minutos cada, as lâminas foram montadas com o meio de montagem ppd (p-fenil-diamina, Sigma), cobertas com uma lamínula e analisadas utilizando os microscópios Confocal LSM 510 Meta

(Zeiss) ou um microscópio Axiovert 200M equipado com o sistema ApoTome (Zeiss). Foi utilizada a câmera AxioCam HRC para obtenção de imagens digitalizadas (Zeiss).

3.9 Quantificação da Morte Celular:

A morte celular foi avaliada, em animais com 2 dias de sobrevivência após a hipóxia-isquemia neonatal, através de reação histoquímica para o corante fluorescente Fluoro-Jade C, que marca neurônios em degeneração (Millipore). Foram utilizados 3 cortes anteriores para a reação: o primeiro deles 140 µm após o aparecimento do ventrículo lateral e os demais respeitando uma distância de 154 µm entre si. O número de células Fluoro-Jade C positivas no córtex e no estriado foi quantificado em uma fotomicrografia obtida com uma objetiva de 20x (NA de 0,5) de cada região, em cada um dos 3 cortes.

Foram também utilizados 4 cortes posteriores: o primeiro deles 140 µm após o aparecimento do terceiro ventrículo e os demais respeitando uma distância de 154 µm entre si. O número de células Fluoro-Jade C positivas no córtex e nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo foi quantificado em uma fotomicrografia obtida com uma objetiva de 20x (NA de 0,5) para cada região, em cada um dos 3 cortes.

Os cortes foram lavados com água destilada e secados na estufa a 45° C por 20-30 min. Em seguida foram lavados por 3 min em álcool etílico 100%, por 1 min em álcool 70% e por 1 min em água destilada. As lâminas foram então colocadas em uma placa de *petri* mergulhadas em permanganato de potássio (KMnO₄) 0,06%, sob agitação branda por 15 minutos, novamente lavadas por 1 min em água destilada e

então incubadas com a solução de Fluoro-Jade C a 0,001% (diluído em ácido acético 0,1%) por 30 min em temperatura ambiente.

Após 3 lavagens de 1 min cada em água destilada, as lâminas secaram na estufa a 45° C por 5-10 min. Em seguida foram imersas em xilol por 1 min, e cobertas com o meio de montagem DPX (di-n-butil phthalato em xileno, Sigma) e uma lamínula.

3.10 Análise Quantitativa da Ativação da Caspase-3:

As células em apoptose através da via da caspase 3 foram identificadas através de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo primário anti-caspase 3 ativada (1:100, ABCAM), em animais com 2 dias de sobrevivência após a hipóxia-isquemia neonatal.

Foram utilizados 3 cortes para a reação: o primeiro deles 140 µm após o aparecimento do ventrículo lateral e os demais respeitando uma distância de 154 µm entre si. O número de células expressando a enzima caspase-3 ativada no estriado foi quantificado em uma fotomicrografia obtida com uma objetiva de 20x (NA de 0,5), para cada corte, em uma reconstrução confocal de 9,25 µm no eixo z. Já no córtex parietal, o número de células expressando a enzima caspase-3 ativada foi quantificado em uma fotomicrografia obtida com uma objetiva de 40x (NA de 1,3), para cada corte, em uma reconstrução confocal de 7,68 µm no eixo z.

3.11 Análise Quantitativa da Ativação de Células Microgliais:

As células microgliais ativadas foram identificadas através de imunohistoquímica, utilizando o anticorpo primário anti-ED1 (1:100, Serotec) em animais com 7 dias de sobrevivência após a hipóxia-isquemia neonatal.

Foram utilizados 3 cortes para a reação: o primeiro deles 140 µm após o aparecimento do ventrículo lateral e os demais respeitando uma distância fixa de 154 µm entre si. O número de células expressando o antígeno ED1 no córtex, no estriado, na cápsula externa e na zona subventricular foi quantificado em uma fotomicrografia obtida com uma objetiva de 20x (NA de 0,5) para cada região, em cada um dos 3 cortes.

Também foi realizada a análise qualitativa da co-expressão dos marcadores ED1 e Iba1, utilizando o anticorpo primário anti-Iba1 (1:200, Wako).

3.12 Avaliação Qualitativa e Quantificação da Gliose Reativa:

O fenômeno de gliose reativa foi avaliado de forma qualitativa através de imunohistoquímica para o marcador astrocitário GFAP, utilizando o anticorpo policlonal anti-GFAP (1:500, DAKO). A análise quantitativa da expressão de GFAP foi feita através de *Western Blotting*, em animais com 7 dias de sobrevivência.

O cérebro dos animais foi dissecado rapidamente, retirando-se o cerebelo e o tronco cerebral e os 2 hemisférios foram separados. Cada hemisfério foi triturado mecanicamente em uma solução contendo tampão de lise (Tris HCL 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM e 0,2% Triton X-100) e coquetel de inibidor de

protease III (Calbiochem), e permaneceu por 40 minutos no gelo. A cada 10 minutos o material foi agitado vigorosamente para melhor ação do tampão de lise. Posteriormente o material foi centrifugado a 13.000xg e o sobrenadante foi congelado a -80° C até a utilização. As proteínas foram dosadas segundo o método colorimétrico de Bradford.

O perfil protéico dos extratos foi obtido através de eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições de redução segundo o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970).

As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Amersham*) usando-se as condições descritas por Towbin et al (Towbin *et al.*, 1979) em sistema convencional de transferência a 200 mA por 2 horas (Bio-Rad). Nos ensaios de SDS-PAGE foram utilizados marcadores de peso molecular (*Amersham-RPN756*).

Após incubação por uma hora com 5% de leite desnatado (*Molico*[®]) em tampão de lavagem (PBS pH 7,4 com 0,05% de Tween 20 – Sigma) a membrana foi lavada por 15 minutos com tampão de lavagem. Em seguida a membrana foi incubada 12 horas a 4° C com o anticorpo primário diluído em 1% de leite desnatado em tampão de lavagem. Após lavagem de 15 minutos a membrana foi incubada por uma hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. Finalizando com nova lavagem de 15 minutos, o complexo formado foi revelado por quimioluminescência (ECL – Chemiluminescence Luminol 38 Reagente – *Amersham*) e a membrana exposta ao filme (*Hiperfilm* – *Amersham*).

Após exposição, o filme foi revelado com revelador e fixador (*Kodak*).

Para reutilização das membranas com anticorpos primários diferentes, as mesmas foram lavadas por 15 minutos em tampão de lavagem e incubadas em banho-maria a 60° C com solução de *stripping* (100 mM de 2-β mercaptoetanol, 2% SDS e 62,5 mM de Tris-HCL pH 6,7) sob agitação constante. Em seguida as membranas foram lavadas 3x por 10 minutos para nova reação de *imunoblotting*.

Os filmes foram digitalizados e as imagens foram analisadas pelo programa Image J (NIH) para determinação da densidade óptica das bandas obtidas. A quantidade de proteína foi normalizada com o controle endógeno da tubulina-α.

Os anticorpos primários utilizados para o *imunoblotting* foram: anti-GFAP (policlonal - coelho, 1:32.000, DAKO) e anti-tubulina-α (monoclonal – camundongo, 1:30.000, Sigma)

Os anticorpos secundários utilizados para o *imunoblotting* foram: HRP anti-IgG de coelho feito em cabra (1:4.000, Sigma) e HRP anti-IgA, M e G de camundongo feito em cabra (1:5.000, Sigma).

3.13 Avaliação dos Reflexos Neonatais:

Os seguintes reflexos sensorimotores neonatais foram testados:

- reflexo de aversão ao precipício: os animais foram colocados com suas patas dianteiras ligeiramente adiantadas à borda de uma superfície plana elevada cerca de 1 metro do chão. O tempo (em segundos) que os animais levaram para girar o corpo 90° foi avaliado (2, 4 e 7 dias após a lesão ou a falsa cirurgia, que corresponde às idades P9, P11 e P14).

- reflexo de geotaxia negativa: os animais foram colocados em um plano inclinado (a 35°) de 3 cm. As patas dianteiras foram colocadas no centro do plano inclinado, com a cabeça dos animais na parte mais baixa. O tempo (em segundos) que os animais levaram para girar o corpo 180° (no sentido de escalar o plano inclinado) foi avaliado (2, 4 e 7 dias após a lesão ou a falsa cirurgia).

- marcha: os animais foram colocados no centro de uma superfície circular de 13 cm de diâmetro. O tempo (em segundos) que eles levaram para sair do círculo, colocando ambas as patas dianteiras fora do círculo, foi avaliado. Nesse teste, como os animais P9 não se moviam ao serem colocados no centro do círculo, o teste foi realizado 4, 7 e 10 dias após a lesão ou a falsa cirurgia.

3.14 Obtenção de Células da Medula Óssea e Análise por Citometria de

Fluxo:

A medula óssea foi coletada de animais com 2 e 7 dias após a lesão hipóxico-isquêmica ou após a falsa-cirurgia. A assepsia local foi feita com álcool 70%. Os 2 fêmures foram retirados em condições assépticas de cada animal, com o auxílio de material cirúrgico estéril (pinças e tesouras), sendo transferidos para uma placa de Petri de 100 mm de diâmetro (Corning) contendo meio de cultura RPMI 1640 (Sigma). A cavidade óssea foi então lavada com o mesmo meio, utilizando-se seringa de 10 mL e agulha 25G. Após esse procedimento, a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL, homogeneizada e então as células foram diluídas numa proporção de 1:10 (90 µL do corante Turk's e 10 µL da suspensão celular) e contadas em hemocitômetro. Suspensões contendo 10⁶ células da medula

óssea foram bloqueadas com 1 µg de IgG total de rato, incubadas por 30 minutos a 4° C com 0,5 µg de anticorpo anti-CD34-FITC (BD Pharmingen) ou anti-CD133-FITC (BD Pharmingen) em azida 0,1%, BSA 0,2% (albumina bovina do soro, do inglês bovine serum albumine) então lavadas e fixadas com paraformaldeído 1% diluído em PBS até a aquisição com um citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences).

3.15 Análises estatísticas:

As análises estatísticas foram realizadas intergrupos utilizando os testes de Mann-Whitney-U e ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando o programa GraphPad Prism versão 4.02 para Windows (GraphPad Software).

4 RESULTADOS:

4.1 Caracterização do Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:

4.1.1 A Hipóxia-Isquemia Neonatal Provocou um Retardo na Realização dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa

O exame da função neurológica dos animais hipóxico-isquêmicos (HI) foi realizado através de 2 testes que avaliam o tempo necessário para os animais realizarem movimentos reflexos que se desenvolvem durante as primeiras semanas de vida (descritos por Ten *et al.*, 2003).

O primeiro teste, que avaliou o movimento de girar o corpo 90°, em um reflexo de aversão ao precipício, foi realizado em P9, P11 e P14, ou seja, 2, 4 e 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal ou a falsa-cirurgia (Figura 2A). Em P9 houve uma tendência dos animais HI a realizarem esse movimento com um atraso de cerca de 3s em relação aos animais falso-operados (HI: 10,96s \pm 1,47 SEM, falso-operados: 7,16s \pm 1,15 SEM) e em P11 esse retardo também foi de cerca de 3s, sendo estatisticamente significativo (HI: 7,28 \pm 1,26 SEM, falso-operados: 4,23 \pm 0,45 SEM, $p < 0,05$). Em P14 não houve diferença entre os grupos.

O segundo teste avaliou o tempo necessário para que os animais girassem o corpo 180° no sentido de escalarem um plano inclinado, em um reflexo de geotaxia negativa, em P9, P11 e P14 (Figura 2B). Em P9, os animais HI apresentaram um retardo de cerca de 8s na realização desse reflexo, em relação aos animais falso-

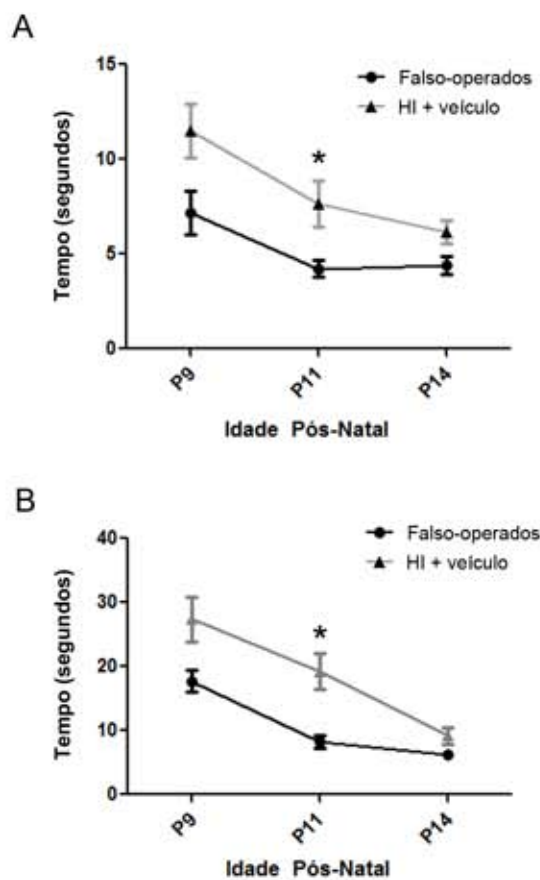


Figura 02. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Provocou um Retardo no Desenvolvimento dos Reflexos de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa. Os animais hipóxico-isquêmicos levaram um tempo maior do que os animais falso-operados para girar o corpo 90° em um reflexo de aversão ao precipício, em P11 (A, * $p < 0,05$). Nessa mesma idade, a hipóxia-isquemia neonatal também resultou em um retardo na realização do reflexo de geotaxia negativa, em que os animais devem girar o corpo 180°, com a intenção de escalar um plano inclinado (B, * $p < 0,05$). Em P14 ambos os grupos apresentaram desempenhos semelhantes em ambos os testes (A e B). Pontos representam média \pm SEM.

operados (HI: 25,88s \pm 3,60 SEM, falso-operados: 17,66s \pm 1,73 SEM), embora essa diferença não tenha sido significativa. Em P11 esse retardo foi de cerca de 11s, sendo estatisticamente significativo (HI: 19,28s \pm 2,79 SEM, falso-operados: 8,28s \pm 1,01 SEM, $p < 0,05$). Em P14 não houve diferença entre os grupos.

Esses resultados demonstraram que o desenvolvimento de 2 reflexos neonatais ocorrem de forma atrasada nos animais HI, indicando uma alteração da função neurológica desses animais.

4.1.2 Alterações Morfológicas e Morte Celular Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal

Apenas 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal já foi possível verificar alterações morfológicas no hemisfério ipsilateral à isquemia. Houve uma redução da área corada com cresil violeta na parte lateral do estriado, na parte médio-lateral do córtex e ao longo de toda a cápsula externa (Figura 3A). Com 7 dias de sobrevivência, essas alterações se tornaram mais evidentes, poupando apenas a parte medial do córtex e já sendo possível observar uma atrofia do hemisfério ipsilateral à isquemia, acompanhada de ventriculomegalia compatível com um quadro de hidrocefalia *ex-vacuum* (Figura 3B). Com 14 dias, a atrofia era mais severa, havendo a substituição de uma grande área do hemisfério direito por um cisto porencefálico (Figura 3C). Além disso, cistos menores também podiam ser observados em áreas adjacentes ao cisto porencefálico (Figura 3B).

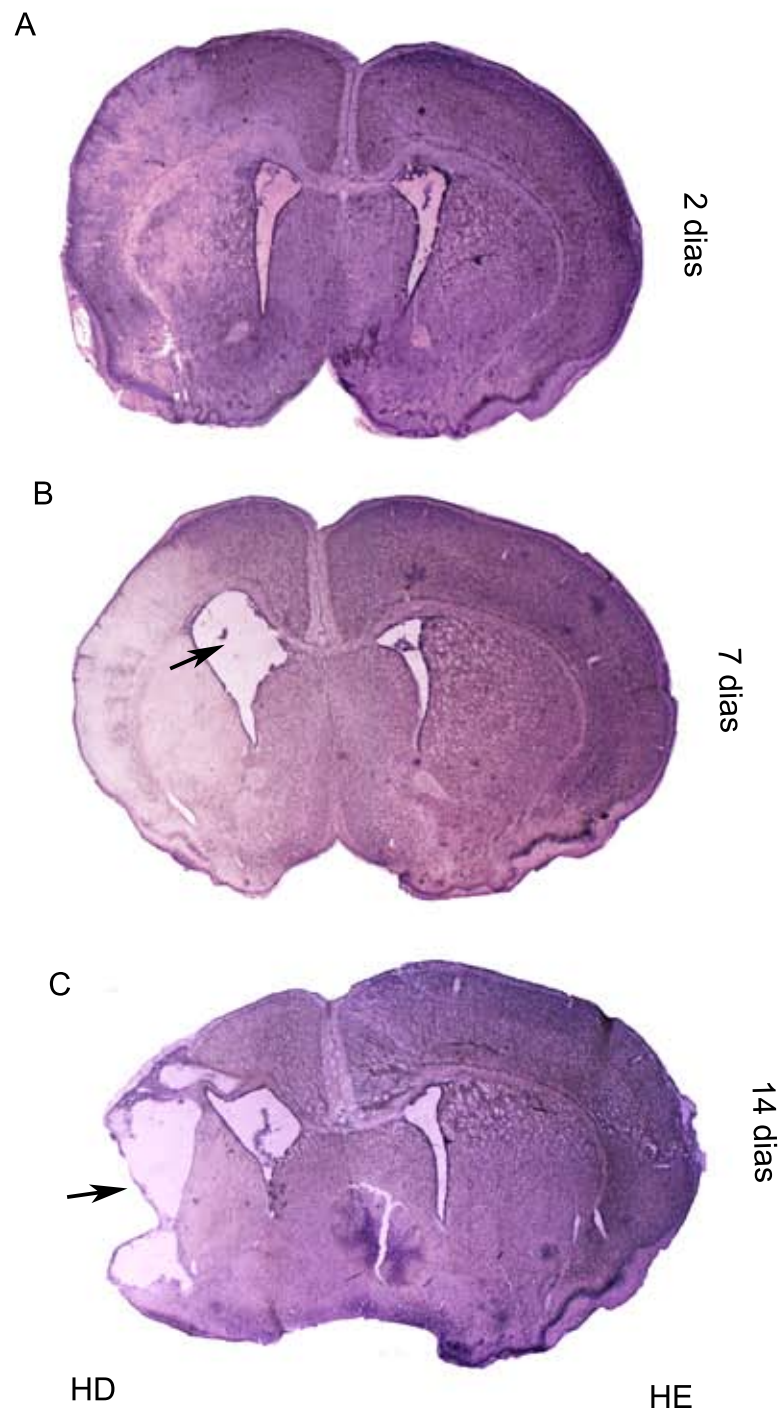


Figura 03. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou na Atrofia do Hemisfério Ipsilateral à Isquemia. Fotomontagens mostrando cortes coronais rostrais do cérebro de animais hipóxico-isquêmicos, corados com cresil violeta, 2, 7 e 14 dias após a lesão (A, B e C, respectivamente). Observe a ventriculomegalia (seta em B) e a atrofia do hemisfério ipsilateral à isquemia (seta em C) 7 e 14 dias após a lesão (B e C, respectivamente). HD: hemisfério direito; HE: hemisfério esquerdo.

Também observamos uma grave atrofia hipocampal no hemisfério ipsilateral à isquemia, em animais com 7 (Figura 4B) e 14 dias de sobrevida (Figura 4C). Em muitos animais restava apenas parte do giro denteado (Figura 4B).

Para analisar a morte neuronal após a hipóxia-isquemia neonatal, utilizamos a reação de Fluoro-Jade C, que marca apenas neurônios em degeneração, independente do mecanismo de morte celular (Schmued *et al.*, 2005). Com esse método, foi possível identificar um grande número de neurônios em degeneração no córtex do hemisfério ipsilateral à isquemia, formando aglomerados de morte neuronal, 2 dias após a lesão (Figura 5A). No hemisfério contralateral, a marcação se limitava à superfície pial, não havendo neurônios em degeneração no córtex (Figura 5B). No estriado também encontramos um grande número de neurônios em degeneração no hemisfério ipsilateral à isquemia (Figura 5C), mas não no hemisfério contralateral (Figura 5D). Da mesma forma, havia um grande número de neurônios em degeneração nas regiões CA1, CA2 e CA3 e, em menor grau, no giro denteado do hipocampo do hemisfério ipsilateral à isquemia (Figura 4A), mas não no hemisfério contralateral, em animais com 2 dias de sobrevida.

Para análise da morte celular utilizamos um anticorpo que reconhece de forma específica a forma ativada da enzima caspase-3, identificando células em apoptose, independente do tipo celular (Rothstein *et al.*, 2005). Com esse anticorpo foi possível observar um grande número de células em apoptose no córtex ipsilateral à isquemia, em um padrão colunar semelhante ao observado com a reação de Fluoro-Jade C, 2 dias após a lesão (Figura 6A). Já no hemisfério contralateral, foi

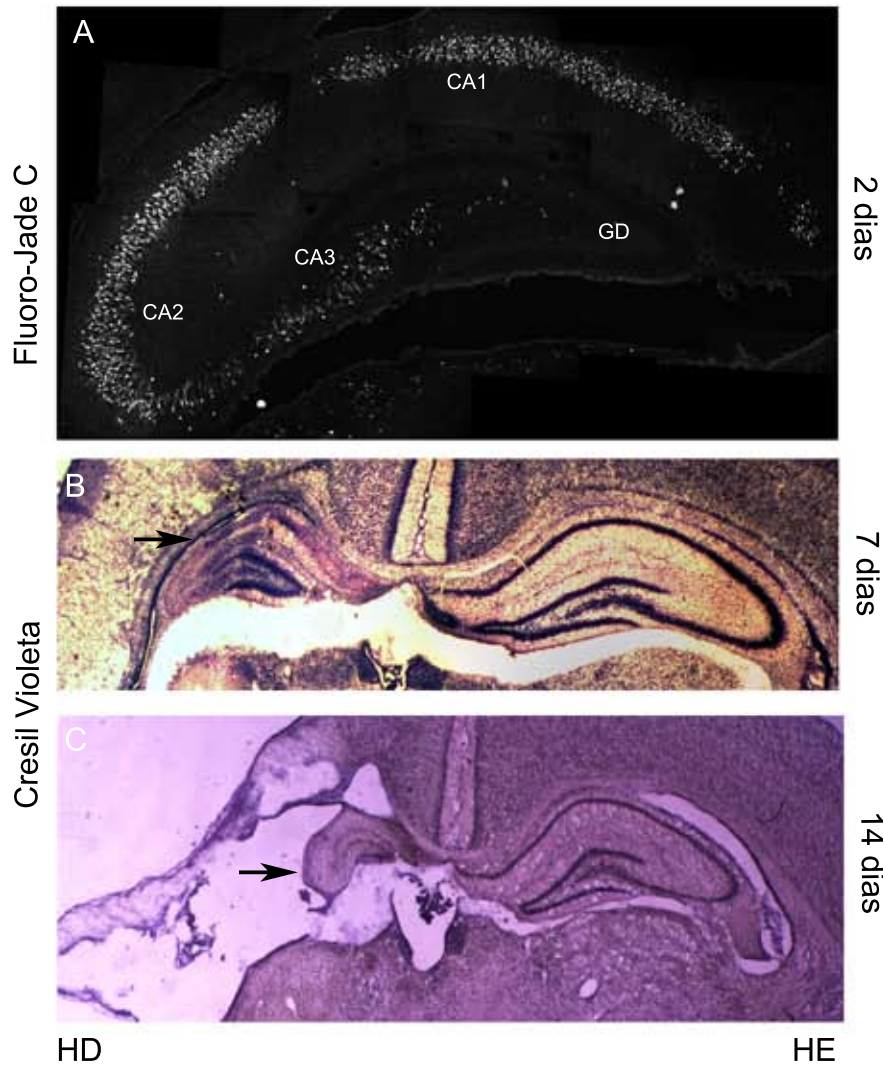


Figura 04. Morte Neuronal e Grave Atrofia do Hipocampo Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomontagem mostrando a presença de um grande número de neurônios em degeneração nas regiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3 do hemisfério ipsilateral à isquemia, corados com Fluoro-Jade C, 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal (A). Fotomontagens mostrando o hipocampo de ambos os hemisférios cerebrais em cortes coronais corados com cresil violeta, 7 dias (B) e 14 dias (C) após a hipóxia-isquemia neonatal. Observe a atrofia hipocâmpal (setas), poupando apenas parte do giro denteado, no hemisfério ipsilateral à isquemia (B e C). HE: hemisfério esquerdo; HD: hemisfério direito. GD: giro denteado.

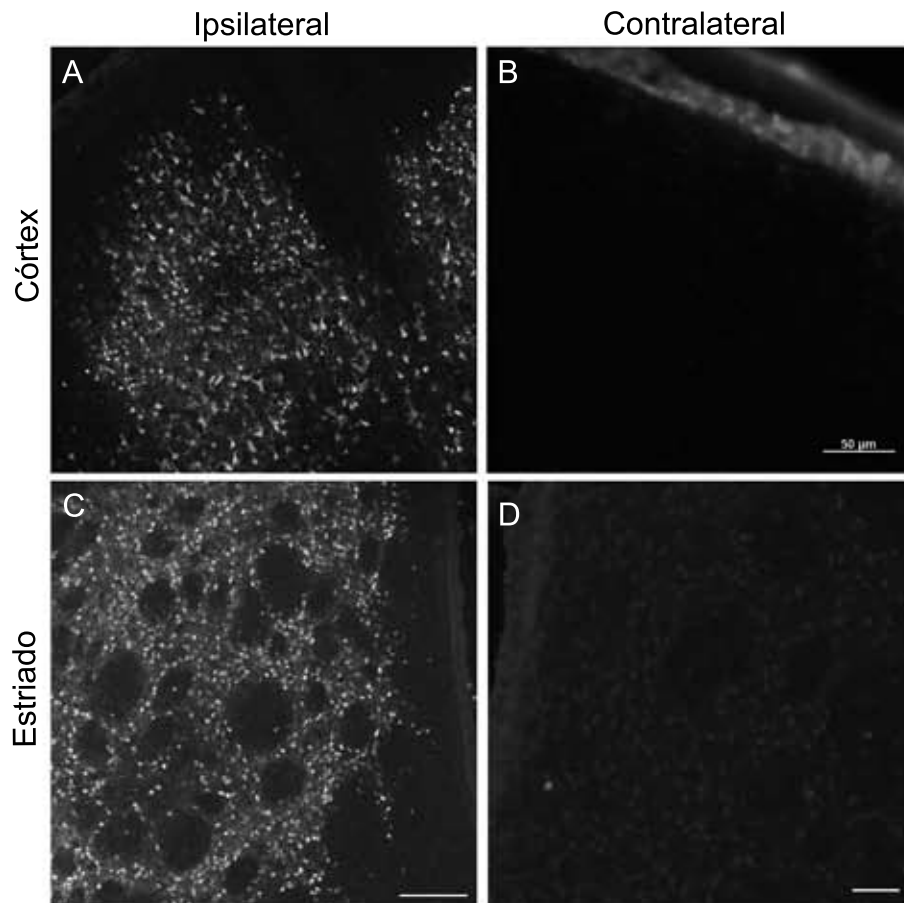


Figura 05. Intensa Morte Neuronal no Córtex e no Estriado do Hemisfério Ipsilateral à Isquemia Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos, demonstrando neurônios em degeneração marcados com Fluoro-Jade C no córtex (A) e no estriado (C) do hemisfério ipsilateral à isquemia. Já no hemisfério contralateral à isquemia, não foram encontrados neurônios em degeneração no córtex (B) ou no estriado (D). Barras de calibração correspondem a 50 μm .

encontrado apenas um pequeno número de células expressando a forma ativada dessa enzima (Figura 6B).

No estriado ipsilateral à isquemia também encontramos a expressão da enzima caspase-3 ativada em um grande número de células, em um padrão em que era possível identificar a expressão dessa enzima em núcleos celulares, bem como em axônios presentes na substância branca dessa região (Figura 6C). Já no estriado do hemisfério contralateral, não encontramos células expressando essa enzima (Figura 6D).

A expressão da enzima caspase-3 ativada em axônios da substância branca presente no estriado ipsilateral à isquemia indica uma limitação da reação de Fluoro-Jade C, que marcou apenas os corpos celulares de neurônios em degeneração, não marcando os axônios localizados na substância branca do estriado (Figura 5C).

Também observamos a expressão de caspase-3 ativada em axônios e núcleos celulares presentes na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia, 2 dias após a lesão (Figura 7A), mas não no hemisfério contralateral (Figura 7B). Nessa mesma região, houve uma alteração do padrão de expressão da proteína básica de mielina, que já apresentava um padrão organizado de expressão ao longo dos axônios no hemisfério contralateral (Figura 7D), enquanto possuía um padrão desorganizado no hemisfério ipsilateral à isquemia (Figura 7C), o que pode ocorrer em função da degeneração axonal ou de um processo de desmielinização pela morte ou alteração da função de oligodendrócitos.

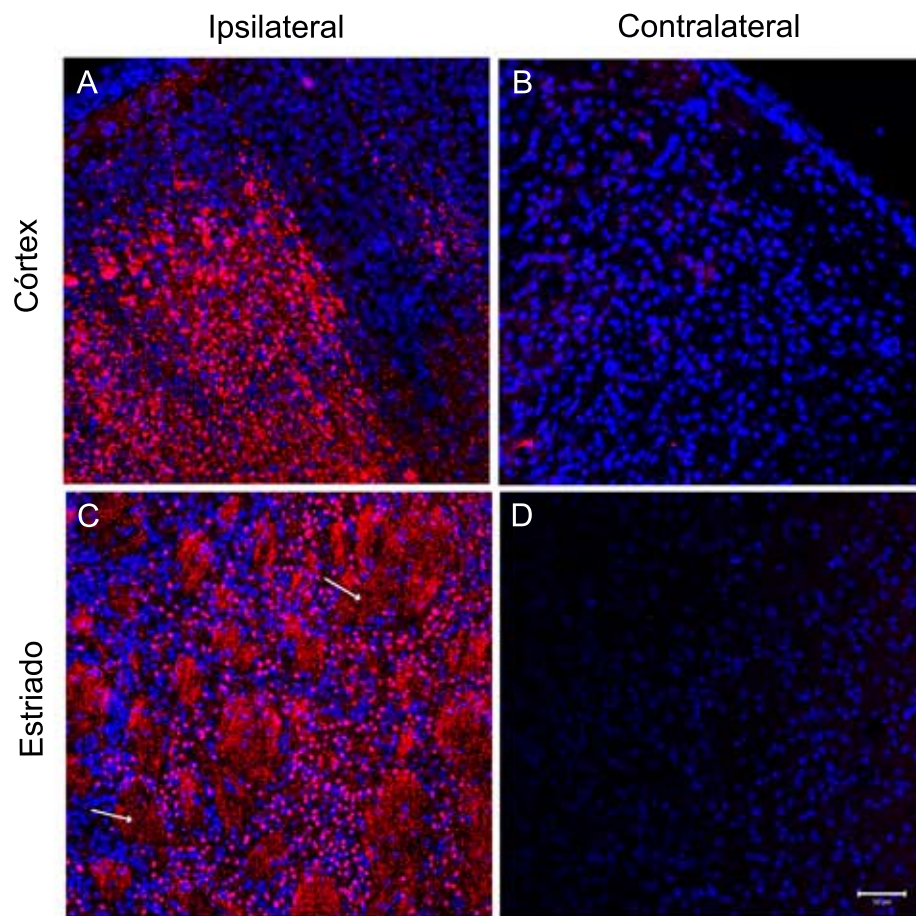


Figura 06. A Morte Celular no Córtex e no Estriado Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal Envolve a Ativação da Enzima Caspase-3. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 2 dias de sobrevivência após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão da enzima caspase-3 ativada (A-D, em vermelho) no córtex e no estriado. No córtex ipsilateral à isquemia, a ativação da enzima caspase-3 pode ser observada em aglomerados celulares (A), enquanto raríssimas células foram encontradas expressando a forma ativada dessa enzima no córtex do hemisfério contralateral (B). No estriado ipsilateral à isquemia, observa-se um grande número de células expressando a enzima caspase-3 ativada em seus núcleos (em C), bem como a expressão em axônios presentes na substância branca dessa região (setas brancas em C). Já no estriado contralateral à isquemia, a expressão da enzima caspase-3 ativada é praticamente nula (D). Marcação nuclear com TO-PRO-3® (A-D, em azul). Barra de calibração corresponde a 50 µm.

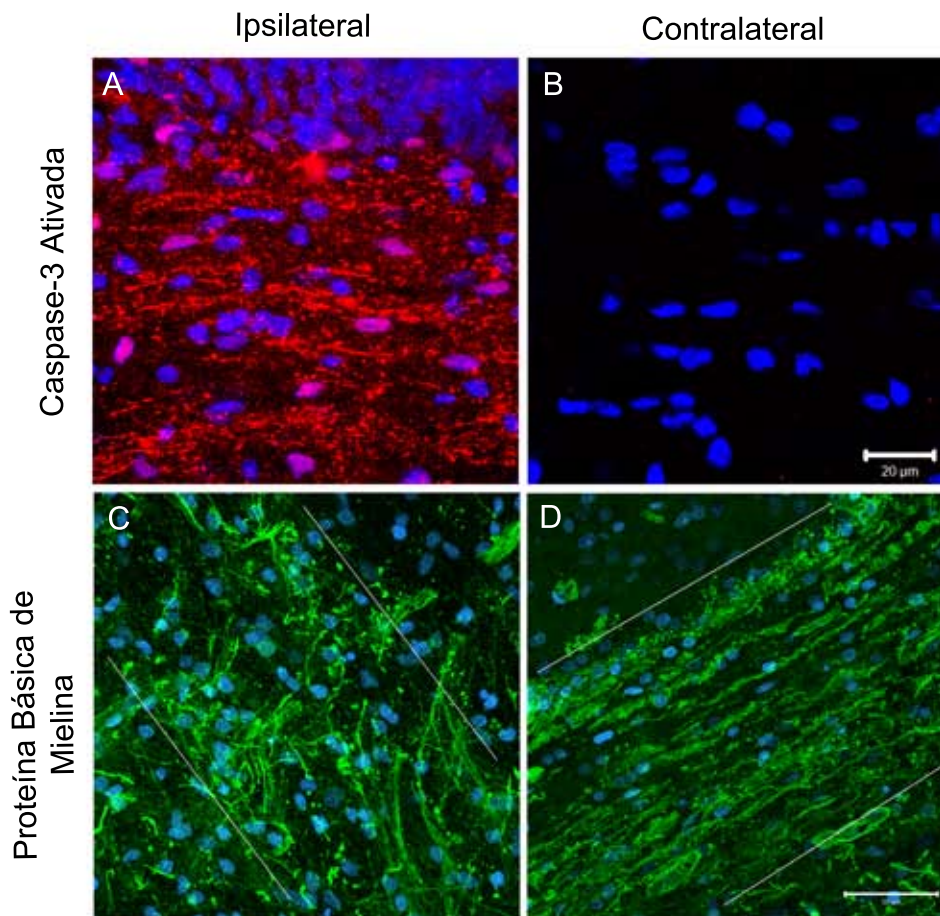


Figura 07. Degeneração da Cápsula Externa Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos, após reação imunohistoquímica demonstrando a expressão da enzima caspase-3 ativada (A e B, em vermelho) e da proteína básica de mielina (D e E, em verde) na cápsula externa, 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. Na cápsula externa ipsilateral à isquemia, a ativação da enzima caspase-3 ocorre em um grande número de núcleos celulares e axônios (A), enquanto na região homóloga do hemisfério contralateral não se observa expressão dessa enzima (B). Na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia observa-se uma alteração da expressão da proteína básica de mielina, compatível com uma desmielinização dessa região (C), enquanto no hemisfério contralateral a proteína básica de mielina é expressa de forma contínua ao longo dos axônios da cápsula externa (D). Marcação nuclear com TO-PRO-3® (A-D, em azul). Barras de calibração correspondem a 20 μ m (A e B) e 50 μ m (C e D).

4.1.3 Gliose Reativa e Ativação de Células Microgliais Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal

A gliose reativa foi avaliada através de reações de imunohistoquímica, utilizando um anticorpo que reconhece o marcador astrocitário GFAP.

Em animais HI com 7 dias de sobrevivência, encontramos um grande número de células expressando GFAP no hemisfério ipsilateral à isquemia, localizadas principalmente no córtex, no estriado e na cápsula externa (Figuras 8D, 9A e 10A, respectivamente), apresentando uma morfologia compatível com a de astrócitos ativados. Em contraste, um pequeno número de astrócitos foi encontrado no hemisfério contralateral à isquemia, em regiões como a zona marginal do córtex (Figura 8G), e na proximidade de vasos sanguíneos no estriado (Figura 9D). A cápsula externa representou uma exceção, por apresentar um grande número de astrócitos no hemisfério contralateral à isquemia, embora aparentemente em menor quantidade do que na região homóloga do hemisfério ipsilateral (Figuras 10D e 10A).

Também encontramos um grande número de astrócitos próximos às formações císticas no córtex do hemisfério ipsilateral à isquemia, formando a parede ao redor desses cistos, juntamente com células microgliais expressando ED1, um marcador de ativação dessas células (Figura 8A).

Em relação à resposta das células microgliais à lesão, observamos um aumento no número de células ED1⁺ no córtex, no estriado, na cápsula externa e na SVZ no hemisfério ipsilateral à isquemia, em comparação ao hemisfério contralateral dos animais HI (Figura 20). Além disso, essas células apresentavam uma morfologia

amebóide com poucos ou mesmo sem prolongamentos, ou seja, um fenótipo indicativo de ativação (Figuras 8, 9, 10 e 19)

Já no hemisfério contralateral, as células ED1⁺ eram bastante raras no córtex, sendo encontradas preferencialmente em proximidade à superfície pial (Figura 8), e também muito raras no estriado, onde se localizavam próximas a vasos sanguíneos (Figura 9).

No entanto, estas células podiam ser facilmente encontradas na cápsula externa e na SVZ do hemisfério contralateral à isquemia, embora estivessem em menor número e apresentassem uma morfologia mais ramificada do que as células ED1⁺ das regiões homólogas do hemisfério ipsilateral à isquemia (Figuras 10, 18, 19 e 21).

Por fim, havia uma semelhança no padrão de localização de astrócitos e células microgliais ativadas no córtex, no estriado e na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia, sendo possível observar uma proximidade entre os prolongamentos de astrócitos e o corpo celular de células microgliais ativadas (Figuras 8C, 8F, 9C e 10C).

4.1.4 Resposta da Medula Óssea a Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Para avaliar a resposta da medula óssea à hipóxia-isquemia neonatal, quantificamos através de citometria de fluxo o número de células expressando as proteínas CD34 e CD133, as quais são expressas tanto por células progenitoras hematopoiéticas, como por células progenitoras endoteliais (Murohara *et al.*, 2001).

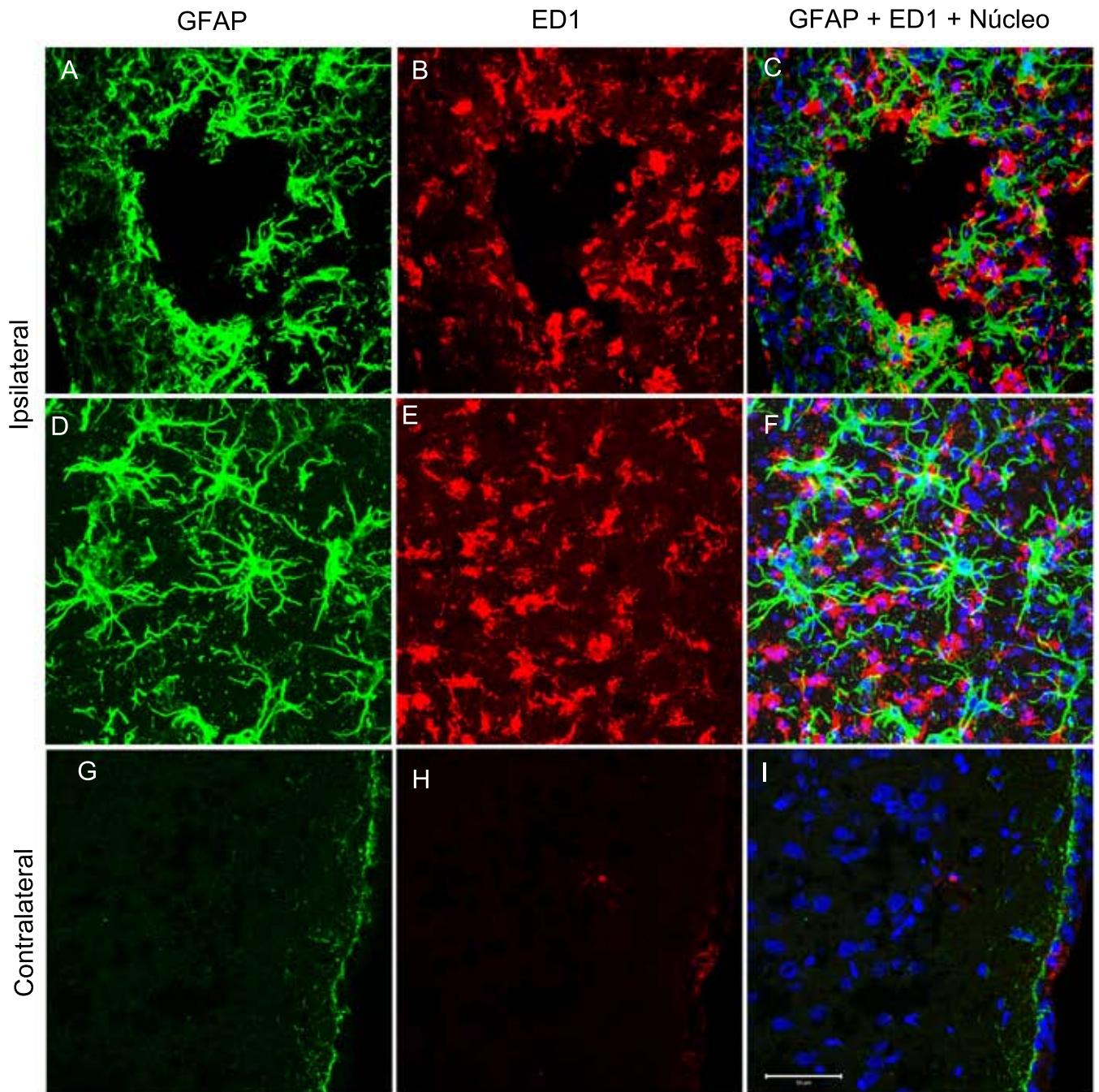


Figura 08. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais no Córtex. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 7 dias de sobrevivência, após reação imunohistoquímica demonstrando a expressão do marcador astrocitário GFAP (A, D e G em verde) e do marcador de células microgliais ativadas ED1 (B, E e H, em vermelho). Um grande número de astrócitos e de células microgliais ativadas pode ser observado nas paredes que revestem os cistos que se formam no córtex do hemisfério ipsilateral à isquemia (A-C). Ocorre também um aumento do número de astrócitos e de células microgliais ativadas no córtex desse hemisfério (D-F), em relação à região homóloga do hemisfério contralateral à isquemia (G-I). Marcação nuclear com TO-PRO-3® (em azul) em sobreposição às imagens A e B (C), D e E (F) e G e H (I). Barra de calibração corresponde a 50 µm.

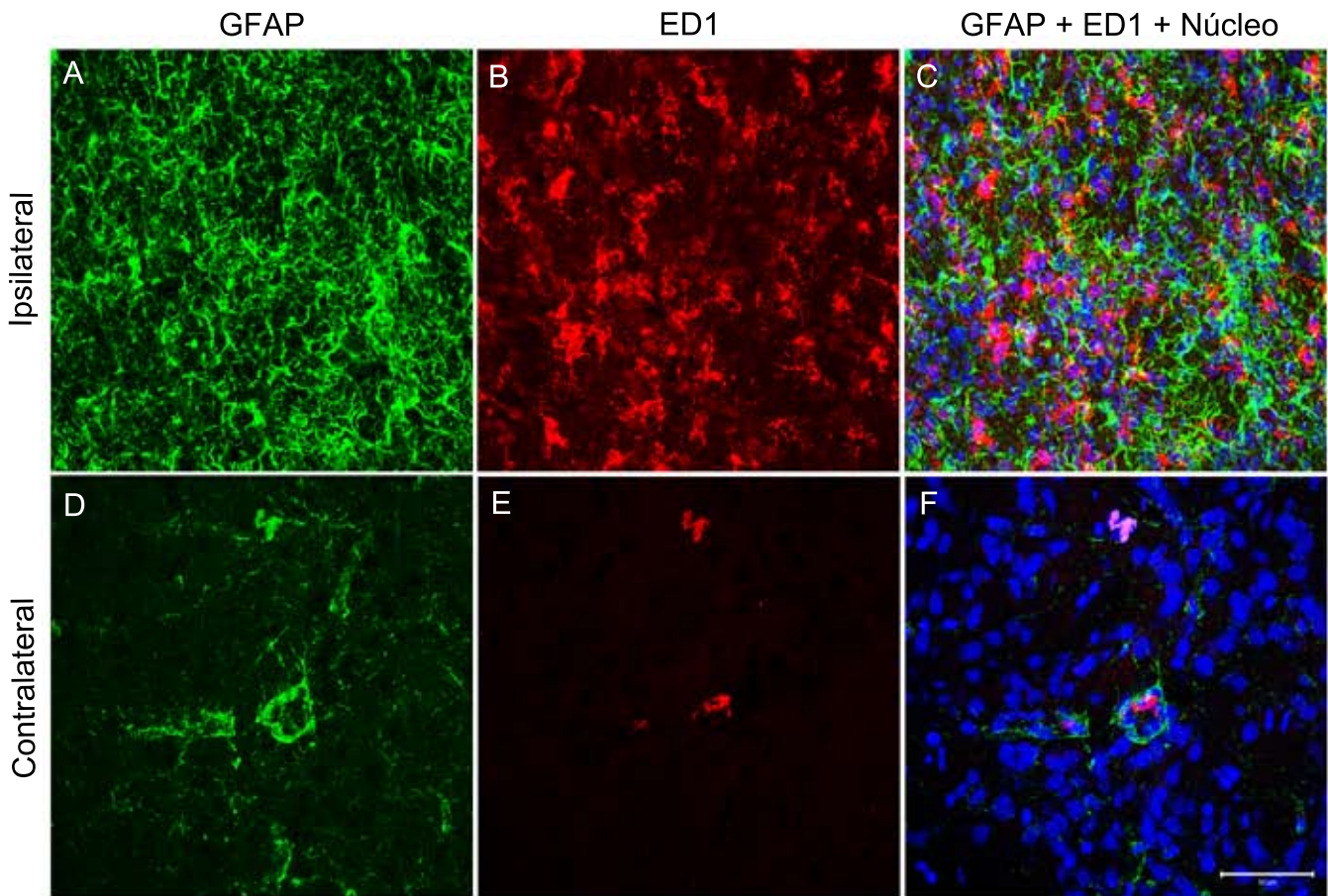


Figura 09. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais no Estriado. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 7 dias de sobrevivência, após reação imunohistoquímica demonstrando a expressão do marcador astrocitário GFAP (A e D, em verde) e do marcador de células microgliais ativadas ED1 (B e E, em vermelho). No estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia ocorre um aumento do número de astrócitos e de células microgliais ativadas (A-C) em relação à região homóloga do hemisfério contralateral à isquemia (D-F). Marcação nuclear com TO-PRO-3® (em azul) em sobreposição às imagens A e B (C) e D e E (F). Barra de calibração corresponde a 50 μm .

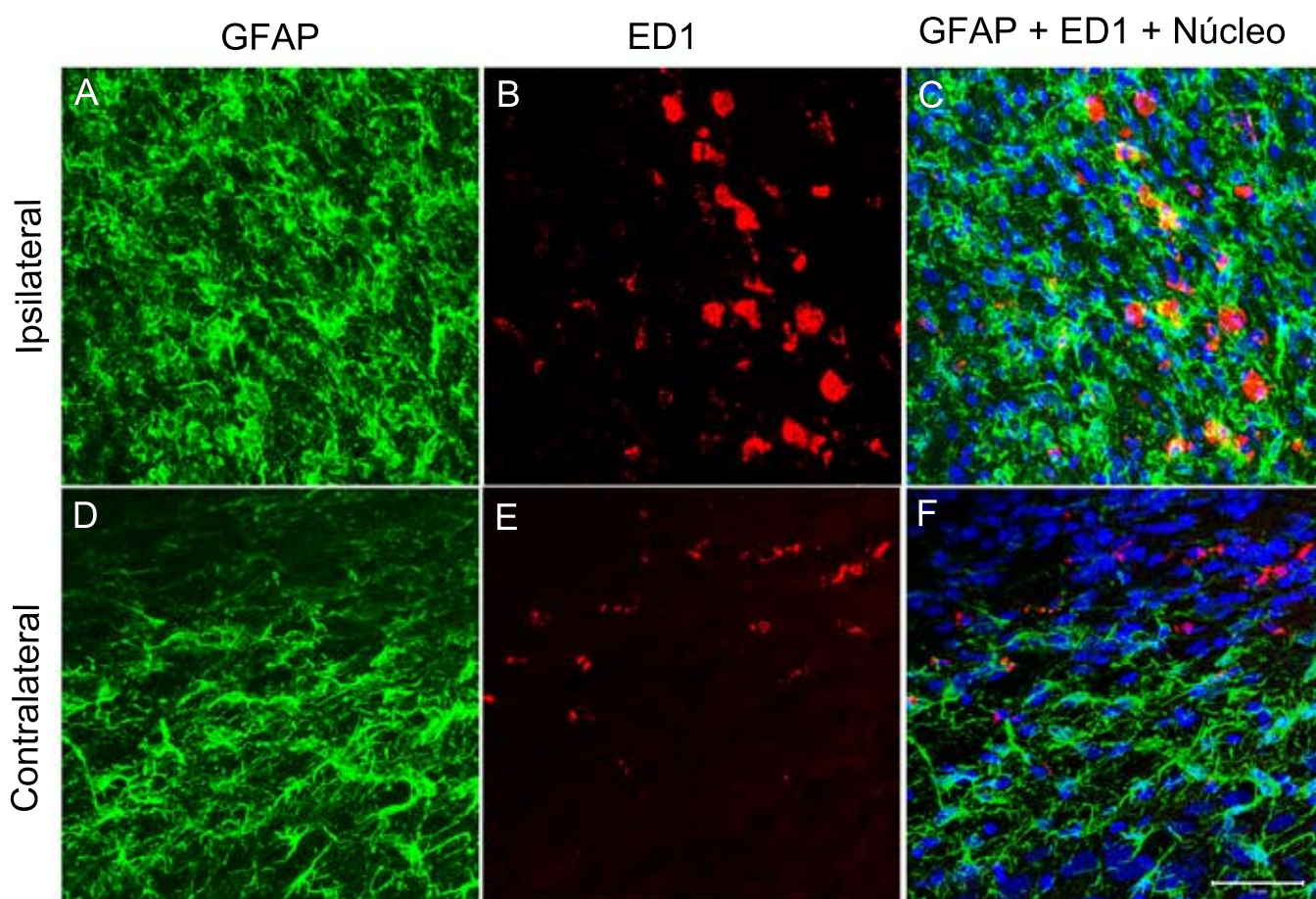


Figura 10. A Hipóxia-Isquemia Neonatal Resultou em um Processo de Gliose Reativa e na Ativação de Células Microgliais na Cápsula Externa. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 7 dias de sobrevivência, após reação imunohistoquímica demonstrando a expressão do marcador astrocitário GFAP (A e D, em verde) e do marcador de células microgliais ativadas ED1 (B e E, em vermelho). Na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia ocorre um aumento do número de astrócitos e de células microgliais ativadas (A-C) em relação à região homóloga do hemisfério contralateral à isquemia (D-F). Note a mudança da morfologia das células microgliais, que possuem um fenótipo intermediário, apresentando algumas ramificações, na cápsula externa contralateral (E e F), enquanto apresentam um formato amebóide, indicativo de ativação, no hemisfério ipsilateral à isquemia (B e C). Marcação nuclear com TO-PRO-3® (em azul), em sobreposição às imagens A e B (C) e D e E (F). Barra de calibração corresponde a 50 μm .

Observamos um aumento no número de células-CD34⁺ e de células CD133⁺ na medula óssea de animais hipóxico-isquêmicos, quando comparados aos animais falso-operados, 2 dias após a lesão ou a falsa-cirurgia (Figura 11A). No entanto, não houve diferença no número de células CD34⁺ nem de células CD133⁺ nos animais hipóxico-isquêmico com 7 dias de sobrevivência (Figura 11B).

Esses resultados indicam que ocorre uma resposta da medula óssea na fase aguda da lesão hipóxico-isquêmica.

4.2 Efeito da Terapia Celular no Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Para determinar o possível efeito terapêutico de uma terapia celular com células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano, um grupo de animais HI recebeu o transplante dessas células por via intraperitoneal, 3 horas após a lesão (animais tratados). A seguir, serão descritos os efeitos obtidos após a terapia celular, comparando os animais tratados com os animais HI que receberam uma injeção intraperitoneal de veículo, 3 horas após a lesão (animais não tratados).

4.2.1 A Terapia Celular Evitou o Atraso no Desenvolvimento dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa nos Animais Hipóxico-Isquêmicos:

Para determinar o efeito da terapia celular na função neurológica dos animais tratados, foram realizados testes que avaliam 2 reflexos que se desenvolvem durante as primeiras semanas de vida e que estão comprometidos nos animais HI.

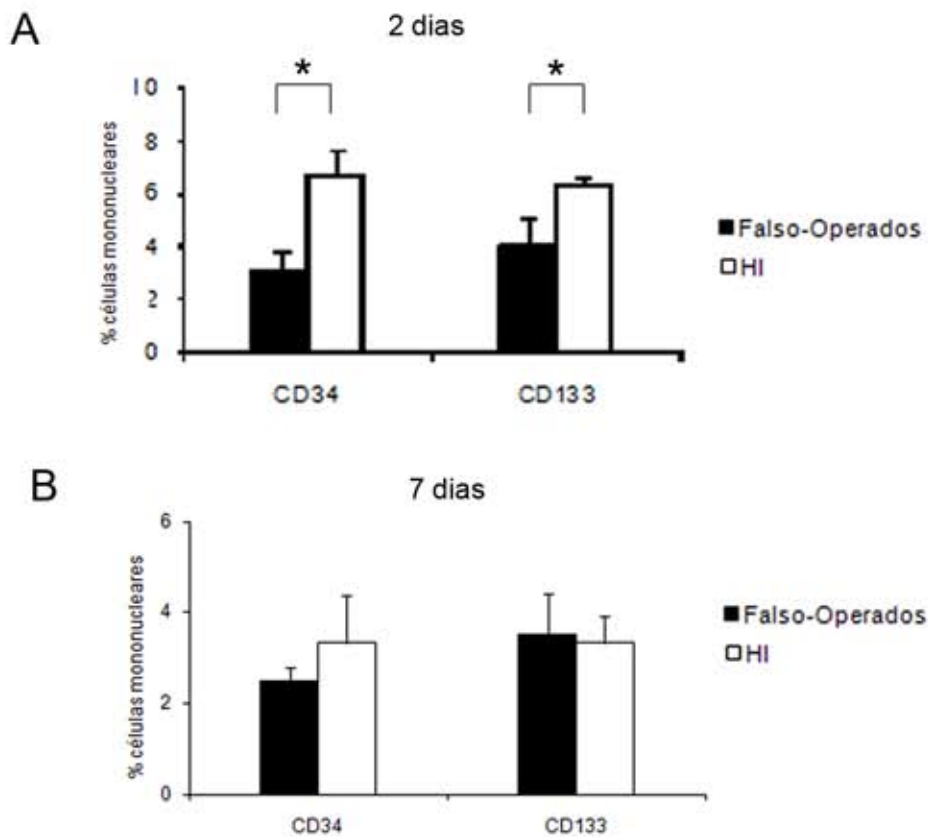


Figura 11. Resposta da Medula Óssea à Hipóxia-Isquemia Neonatal. Análise por citometria de fluxo do número de células CD34+ e CD133+ na medula óssea, 2 ou 7 dias após a hipóxia-isquemia ou a falsa-cirurgia (A e B, respectivamente). Ocorreu um aumento do número de células CD34+ e CD133+ na medula óssea dos animais hipóxico-isquêmicos em relação aos animais falso-operados, na fase aguda (2 dias, em A, * $p < 0,05$), mas não na fase subaguda da lesão (7 dias, em B). Barras representam média \pm SEM.

Como mostrado anteriormente, em P11 os animais HI não tratados apresentaram um retardo estatisticamente significativo na realização de um movimento reflexo de aversão ao precipício, quando comparados aos animais falso-operados.

Os animais HI tratados, por sua vez, tiveram em P11 um desempenho semelhante ao dos animais falso-operados, ou seja, não apresentando o retardo na realização do reflexo de aversão ao precipício verificado nos animais não tratados (Figura 12A). Nessa idade a diferença de desempenho entre os animais HI tratados e os não tratados foi significativa, demonstrando um efeito da terapia celular na preservação do desenvolvimento pós-natal do reflexo de aversão ao precipício (falso-operados: média de $4,23s \pm 0,45$ SEM, HI + veículo: $7,28s \pm 1,26$ SEM, HI + células: $4,41s \pm 0,40$ SEM, $p < 0,05$).

A hipóxia-isquemia neonatal também resultou em um retardo na realização do reflexo de geotaxia negativa em P9 e P11. Como descrito previamente, em P11 esta diferença entre os animais HI não tratados e os animais falso-operados foi significativa. Os animais HI tratados, no entanto, apresentaram em ambas as idades um desempenho bastante próximo ao dos animais falso-operados. Além disso, em P11 a diferença entre os animais HI tratados e não tratados foi significativa (falso-operados: média de $8,28s \pm 1,01$ SEM, HI + veículo: $19,28s \pm 2,79$ SEM, HI + células: $11,87 \pm 0,95$ SEM, $p < 0,05$), com os animais tratados realizando o reflexo de geotaxia negativa em um tempo menor do que os animais não tratados (Figura 12B).

Já em P14, os animais dos 3 grupos experimentais apresentaram desempenho semelhante na realização de ambos os reflexos (Figura 12A e 12B).

Em conjunto, esses resultados demonstram que o transplante das células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano evitou a deterioração da função neurológica dos animais tratados, preservando o processo de aquisição de 2 reflexos sensorimotores neonatais.

Por fim, uma análise da marcha e da movimentação espontânea, baseada no tempo que os animais demoravam para se movimentar e sair de um círculo com 13 cm de diâmetro (conforme descrito por Lubics *et al.*, 2005), não demonstrou diferença entre os animais HI e os animais falso-operados, em todas as idades analisadas (P11, P14 e P17). Da mesma forma, também não houve diferença entre os animais tratados e os não tratados na realização desse teste (Figura 13B).

4.2.2 A Terapia Celular Não Alterou a Perda de Peso Corporal Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal

Os animais HI interagem com a mãe e se alimentavam de forma semelhante aos animais falso-operados. No momento da perfusão era possível observar leite no estômago e intestino de todos os animais. No entanto, em P9 e P11, ou seja, 2 e 4 dias após a lesão, os animais HI apresentaram uma redução significativa do peso corporal em comparação aos animais falso-operados e a terapia celular não modificou essa perda ponderal (média em P9: falso-operados: 16,978g ± 0,356 SEM, HI + veículo: 14,541g ± 0,385 SEM, HI + células: 14,492g ± 0,286 SEM, $p < 0,05$; em P11: falso-operados: 19,578g ± 0,51 SEM, HI + veículo: 17,753 ± 0,482

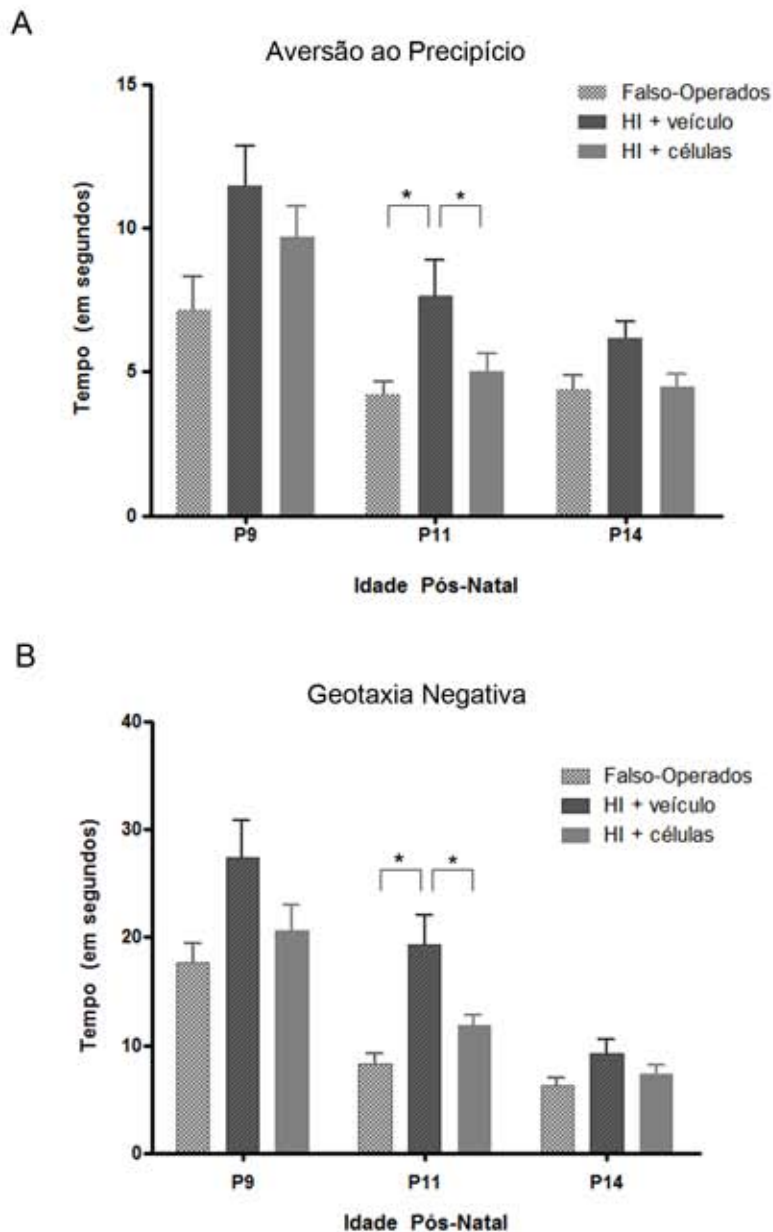


Figura 12. A Terapia Celular Evitou o Atraso no Desenvolvimento dos Reflexos Neonatais de Aversão ao Precipício e de Geotaxia Negativa nos Animais Hipóxico-Isquêmicos. Os animais hipóxico-isquêmicos que receberam uma injeção de veículo apresentaram um retardo na realização dos reflexos de aversão ao precipício (A) e de geotaxia negativa (B) em P11, em relação aos animais falso-operados e aos animais que receberam a terapia celular (* $p < 0,05$). Em P11, os animais tratados apresentaram um desempenho semelhante ao dos animais falso-operados em ambos os reflexos, evidenciando um efeito funcional da terapia celular, evitando o atraso no desenvolvimento de 2 reflexos neurológicos primitivos. Barras representam média \pm SEM.

SEM, HI + células: $17,492 \pm 0,338$ SEM, $p < 0,05$). A partir de P14 essa diferença passou a não ser significativa. Em nenhuma idade avaliada houve diferença no peso corporal entre os animais hipóxico-isquêmicos tratados e os não tratados (Figura 13A).

4.2.3 Efeito Neuroprotetor da Terapia Celular no Estriado:

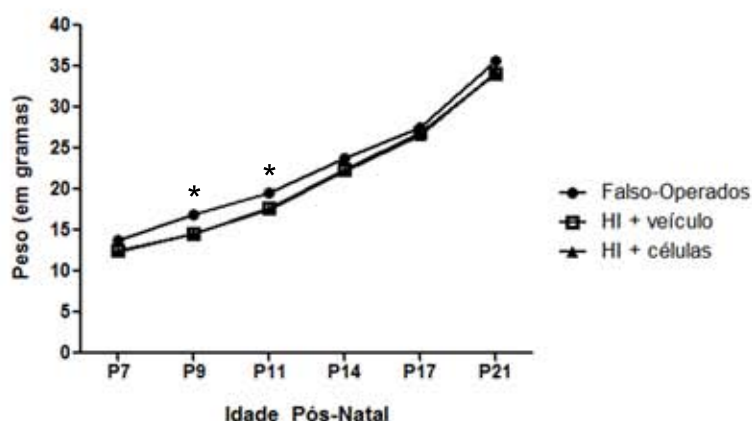
Para avaliar se a terapia celular apresentou um efeito neuroprotetor que possa ter contribuído como um dos possíveis mecanismos responsáveis pela melhora funcional apresentada pelos animais tratados, foi realizada uma análise quantitativa da morte celular por apoptose, bem como do número de neurônios em degeneração no hemisfério ipsilateral à isquemia dos animais tratados e não tratados.

A quantificação do número de neurônios em degeneração, marcados com Fluoro-Jade C, 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal, revelou uma redução significativa da morte neuronal no estriado ipsilateral à isquemia nos animais tratados, em comparação aos animais não tratados (Figuras 14A, 14B e 14E, HI + veículo: $270,4$ neurônios $\pm 14,84$ SEM, HI + células: $190,5$ neurônios $\pm 17,91$ SEM, $p < 0,05$).

Esse efeito neuroprotetor foi acompanhado de uma redução significativa no número de células em apoptose, expressando a enzima caspase-3 ativada, no estriado dos animais tratados, em comparação ao dos animais não tratados (Figuras 14C, 14D e 14F, HI + veículo: $323,1$ células $\pm 15,57$ SEM, HI + células: $252,2$ células $\pm 19,39$ SEM, $p < 0,05$).

A

Pesos



B

Marcha

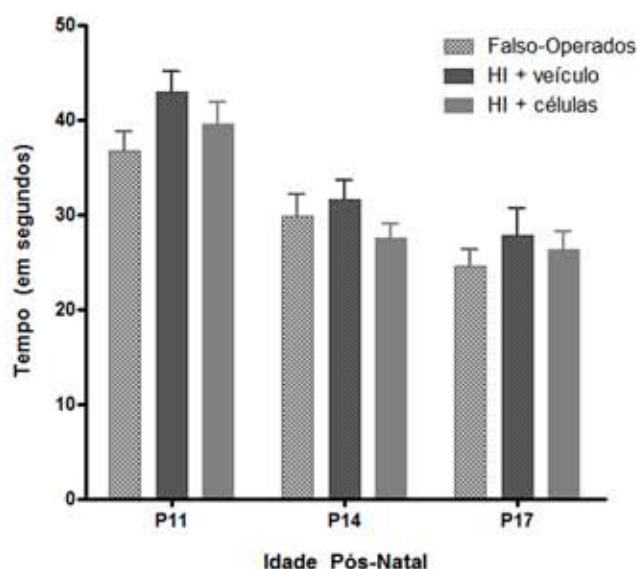


Figura 13. A Terapia Celular Não Alterou a Perda Ponderal da Fase Aguda da Hipóxia-Isquemia Neonatal. O peso dos animais falso-operados foi significativamente maior que o dos animais hipóxico-isquêmicos (tratados e não tratados) em P9 e P11, ou seja, 2 e 4 dias após a hipóxia-isquemia neonatal ou a falsa cirurgia (* $p < 0,05$). A partir de P14 já não havia diferença no peso dos animais dos 3 grupos experimentais. Além disso, não houve diferença no peso corporal dos animais tratados e não tratados em nenhuma das idades avaliadas (A). Em um exame que avalia a marcha, não houve diferença no desempenho dos animais falso-operados e hipóxico-isquêmicos (tratados e não-tratados) nas 3 idades avaliadas (P11, P14 e P17, em B). Barras e pontos representam média \pm SEM.

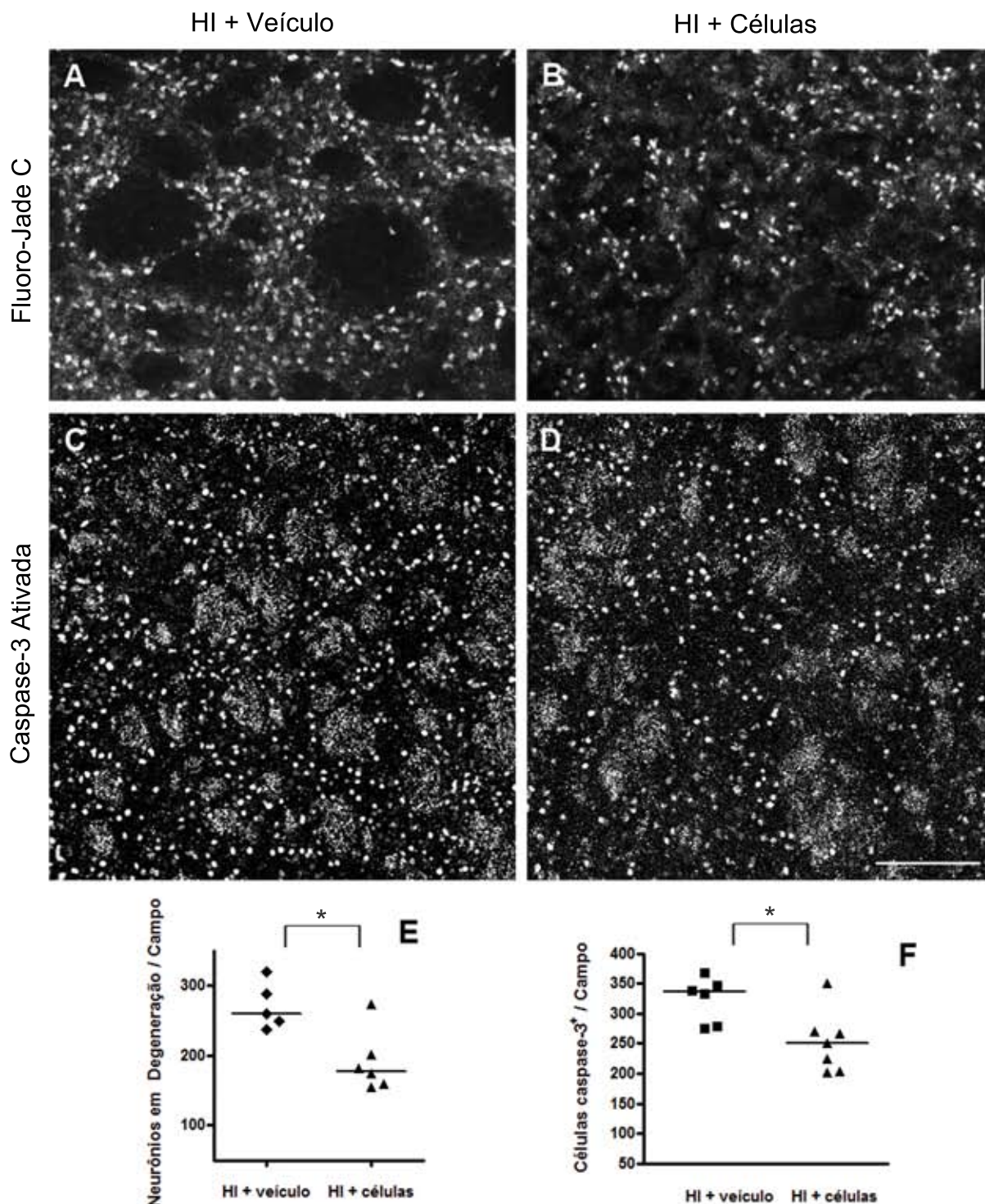


Figura 14. A Terapia Celular Apresentou um Efeito Neuroprotetor e Reduziu a Apoptose no Estriado de Animais Hipóxico-Isquêmicos. Fotomicrografias de microscopia convencional de fluorescência de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 2 dias de sobrevida, após reação de Fluoro-Jade C, marcando neurônios em degeneração no estriado ipsilateral à isquemia, em animais que receberam uma injeção de veículo (A) ou a terapia celular (B). Houve uma redução significativa no número de neurônios em degeneração no estriado ipsilateral à isquemia dos animais tratados com as células, em relação aos animais não tratados (E, * $p < 0,05$). Fotomicrografias em microscopia confocal demonstrando a expressão da enzima caspase-3 ativada no estriado ipsilateral à isquemia, 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal, em animais que receberam uma injeção de veículo (C) ou a terapia celular (D). Houve uma redução significativa no número de células expressando a enzima caspase-3 ativada no estriado ipsilateral à isquemia dos animais que receberam a terapia celular (F, * $p < 0,05$). Barra de calibração corresponde a 100 μm .

Já no córtex ipsilateral à isquemia, não houve diferença no número de neurônios em degeneração entre os animais tratados e não tratados, tanto nos cortes rostrais (Figura 15F), quanto nos cortes caudais (Figura 15G). Também não houve diferença no número de células expressando a enzima caspase-3 ativada no córtex dos animais tratados em comparação ao dos animais não tratados (Figuras 15A a 15C).

Por fim, a terapia celular também não alterou o número de neurônios em degeneração, marcados com Fluoro-Jade C, nas regiões hipocâmpais CA1, CA2 e CA3 do hemisfério ipsilateral à isquemia, comparando os animais tratados com os não tratados (Figura 15H).

Em conjunto, esses resultados demonstram que a terapia celular apresentou um efeito neuroprotetor e reduziu a morte celular por apoptose no estriado, mas não alterou a morte neuronal no córtex e no hipocampo.

4.2.4 A Terapia Celular Reduziu o Número de Células Microgлияis Ativadas no Córtex dos Animais HI:

Para avaliar um possível efeito da terapia celular no processo de inflamação do SNC após a hipóxia-isquemia neonatal, realizamos uma análise quantitativa do número de células microgлияis expressando ED1, um marcador de ativação da microgлия, 7 dias após a lesão.

Nos animais HI observamos um aumento significativo do número de células microgлияis ativadas ED1⁺ no córtex, no estriado, na SVZ e na cápsula externa do

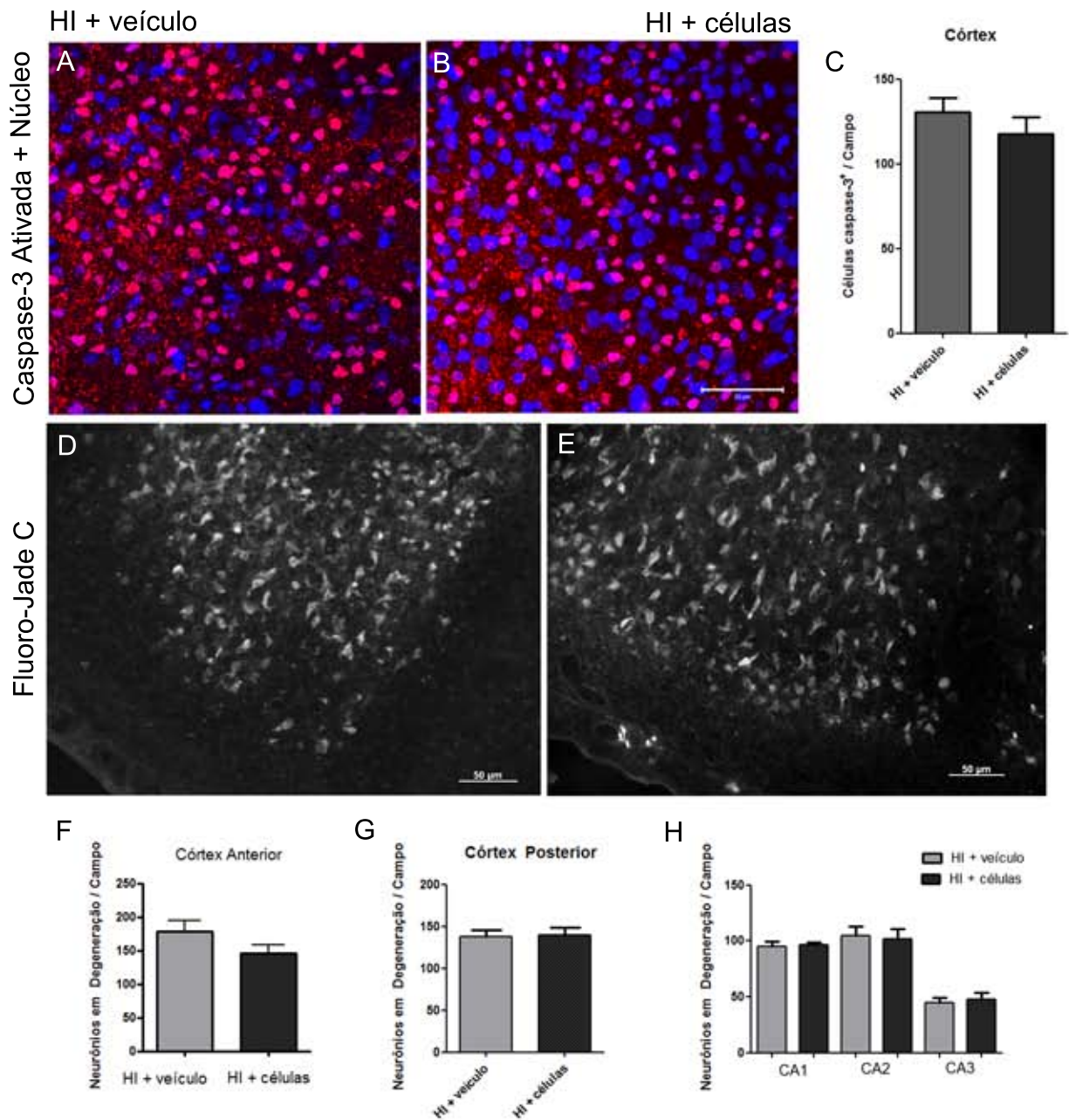


Figura 15. A Terapia Celular Não Alterou a Morte Neuronal, nem o Número de Células Expressando a Enzima Caspase 3 Ativada no Córtex de Animais Hipóxico-Isquêmicos.

Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão da enzima caspase-3 ativada no córtex ipsilateral à isquemia, 2 dias após a lesão, em animais que receberam uma injeção de veículo (A, em vermelho) ou a terapia celular (B). Não houve diferença significativa na quantificação do número de células expressando a enzima caspase-3 ativada no córtex ipsilateral à isquemia entre os animais tratados e os não tratados (C). Marcação nuclear com TO-PRO-3® em azul (A e B). A quantificação do número de neurônios em degeneração no córtex ipsilateral à isquemia, marcados com Fluoro-Jade C em cortes coronais anteriores (F) e posteriores (G), também não revelou uma diferença significativa entre animais hipóxico-isquêmicos tratados (E) e não tratados (D), 2 dias após a lesão. A terapia celular também não alterou o número de neurônios em degeneração nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo dos animais hipóxico-isquêmicos (H). Imagens obtidas por microscopia confocal (A e B) e microscopia convencional de fluorescência (D e E). Barras de calibração correspondem a 50 μ m. Barras correspondem à média \pm SEM (C e F-H).

hemisfério ipsilateral à isquemia, em relação ao hemisfério contralateral (Figuras 16 a 20). Esse aumento ocorreu de forma similar na cápsula externa, na SVZ e no estriado dos animais tratados e dos não tratados, não havendo diferença no número de células ED1⁺ em cada uma dessas regiões do hemisfério ipsilateral à isquemia dos animais tratados, em comparação à região homóloga do hemisfério ipsilateral à isquemia dos animais não tratados (Figura 20A, 20C e 20D). Da mesma forma, no hemisfério contralateral à isquemia, também não houve diferença no número de células ED1⁺ entre os animais tratados e não tratados, nas 4 regiões analisadas (SVZ, cápsula externa, estriado e córtex, Figura 20).

No entanto, os animais que receberam a terapia celular apresentaram um número significativamente menor de células ED1⁺ no córtex ipsilateral à isquemia, em relação aos animais HI não tratados (Figuras 16 e 20B; HI + veículo: 83,52 células \pm 11,48 SEM, HI + células: 46,44 \pm 13,17 SEM, $p < 0,05$).

A análise da co-expressão dos marcadores Iba1 (expresso por todas as células microgliais, independente do fenótipo) e ED1 revelou que todas as células ED1⁺ também expressavam o marcador microglial Iba1, como era esperado (Figuras 16 a 19).

Também verificamos que embora o número de células ED1⁺ no córtex ipsilateral à isquemia dos animais tratados fosse menor do que nos animais não-tratados, o número total de células microgliais (Iba1⁺) nessa mesma região aparentemente não diferia em ambos os grupos experimentais, embora esse dado não tenha sido quantificado (Figura 16).

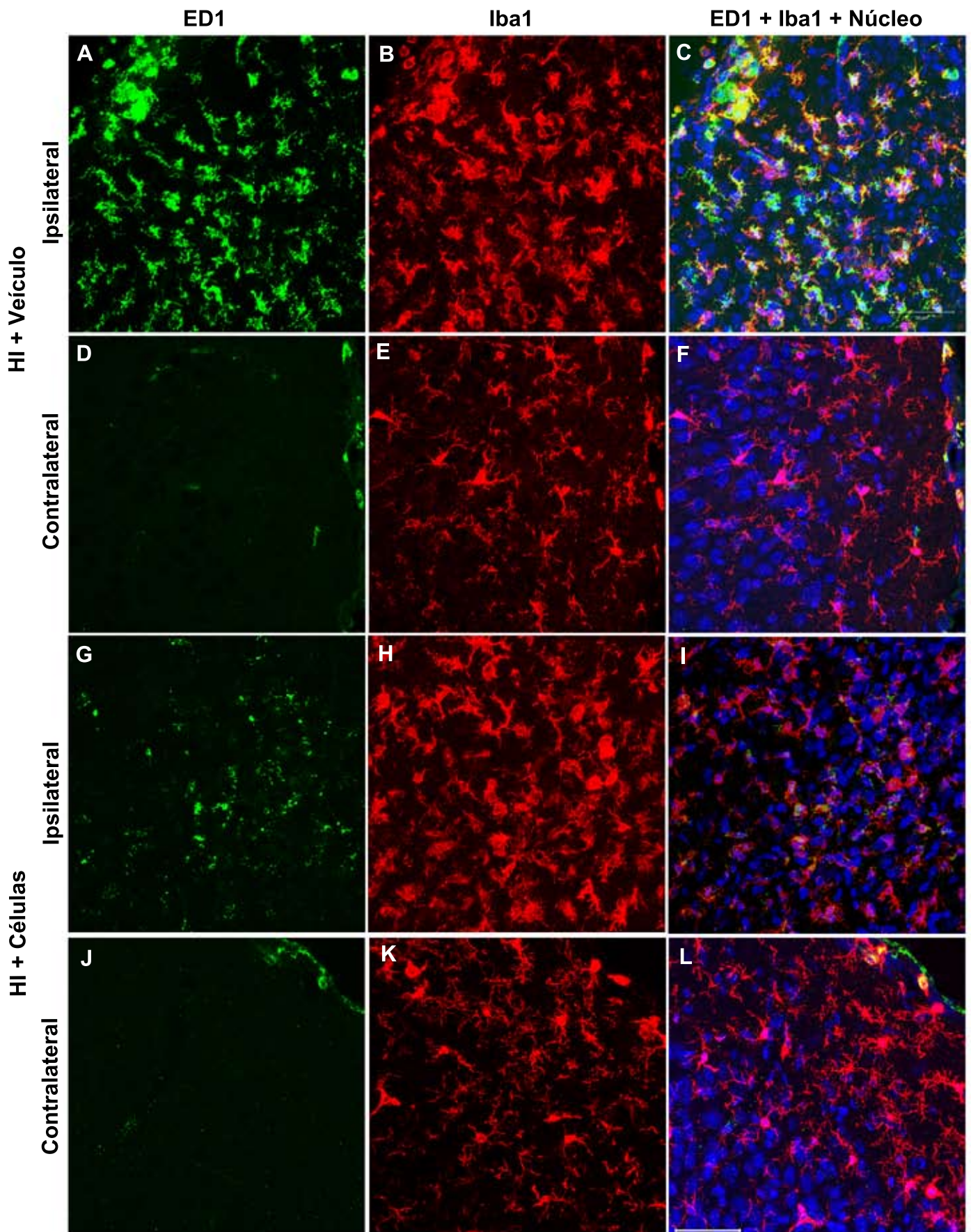


Figura 16. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais no Córtex Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão do marcador de células microgliais Iba1 (B, E, H e K, em vermelho) e do marcador de ativação microglial ED1 (A, D, G e J, em verde) no córtex, 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. A análise da co-expressão desses marcadores demonstrou que todas as células ED1+ encontradas também expressavam o marcador microglial Iba1. Além disso, houve um aumento da expressão de ambos os marcadores no córtex do hemisfério ipsilateral à isquemia (A-C e G-I), em relação à região homóloga do hemisfério contralateral (D-F e J-L), em ambos os grupos experimentais (animais tratados e não tratados). Nos animais que receberam a terapia celular (G-I), esse aumento foi menor do que nos animais não-tratados (A-C). Marcação nuclear com TO-PRO-3® em azul, em sobreposição às imagens A e B (em C), D e E (em F), G e H (em I) e J e K (em L). Barras de calibração correspondem a 50 µm.

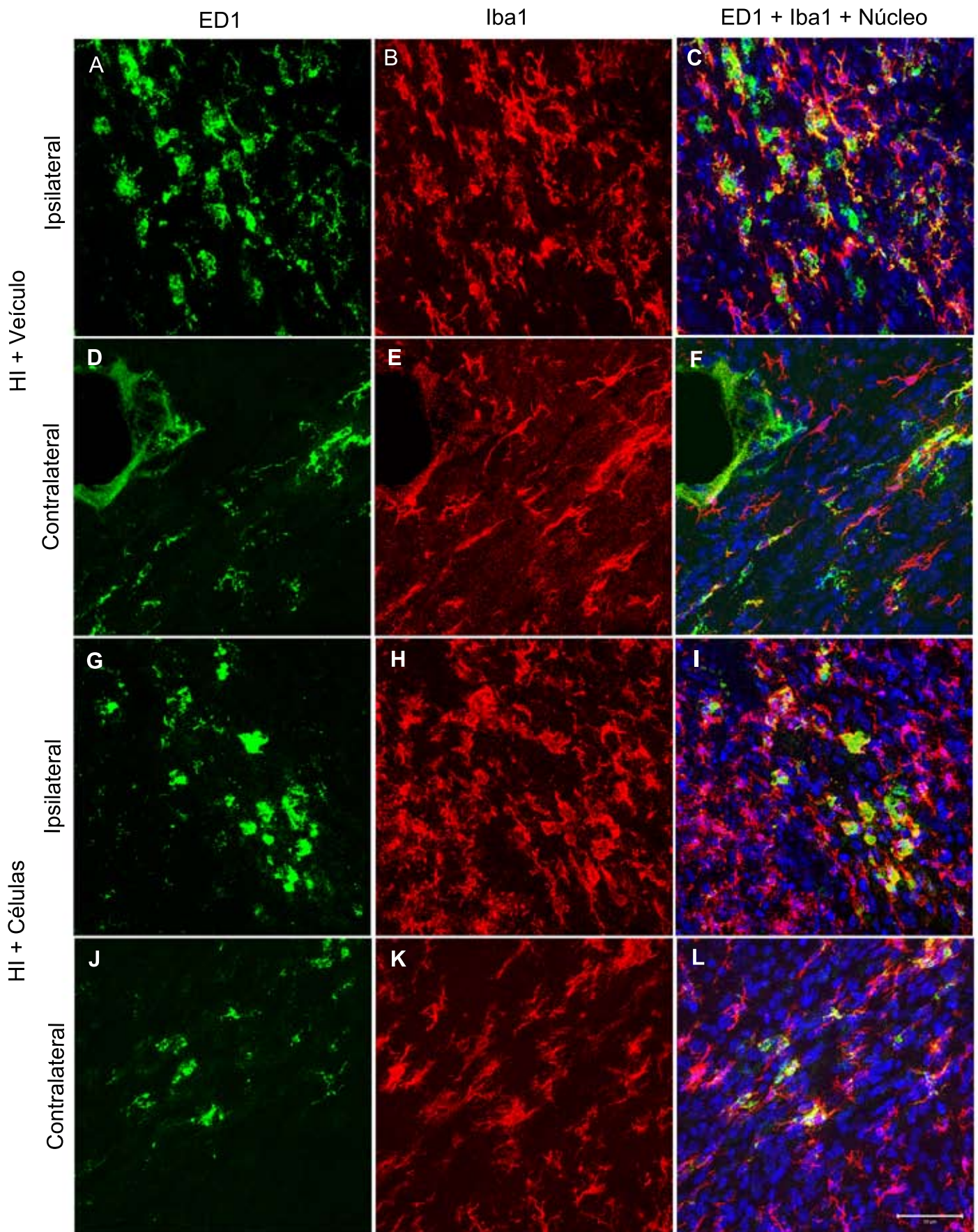


Figura 17. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais na Cápsula Externa Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão do marcador de células microgliais Iba1 (B, E, H e K, em vermelho) e do marcador de ativação microglial ED1 (A, D, G e J, em verde) na cápsula externa, 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. A análise da co-expressão desses marcadores demonstrou que todas as células ED1+ encontradas também expressavam o marcador microglial Iba1. Além disso, houve um aumento da expressão de ambos os marcadores na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia (A-C e G-I), em relação à região homóloga do hemisfério contralateral (D-F e J-L), em ambos os grupos experimentais (animais tratados e não tratados). Marcação nuclear com TO-PRO-3® em azul, em sobreposição às imagens A e B (em C), D e E (em F), G e H (em I) e J e K (em L). Barra de calibração corresponde a 50 µm.

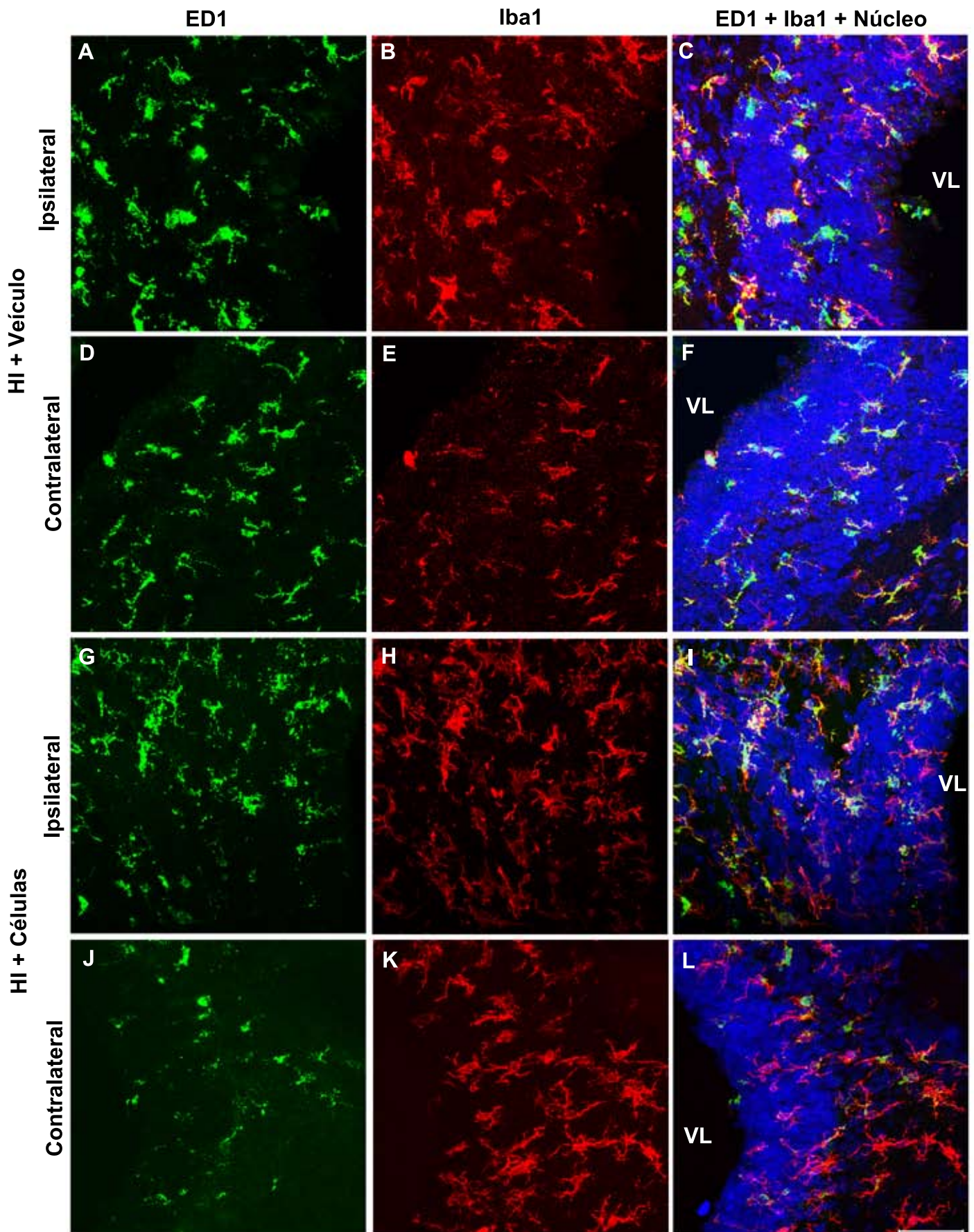


Figura 18. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais na Zona Subventricular Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão do marcador de células microgliais Iba1 (B, E, H e K, em vermelho) e do marcador de ativação microglial ED1 (A, D, G e J, em verde) na zona subventricular, 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. A análise da co-expressão desses marcadores demonstrou que as células ED1+ encontradas também expressavam o marcador microglial Iba1. Além disso, houve um aumento da expressão de ambos os marcadores na zona subventricular do hemisfério ipsilateral à isquemia (A-C e G-I), em relação à região homóloga do hemisfério contralateral (D-F e J-L), em ambos os grupos experimentais (animais tratados e não tratados). Marcação nuclear com TO-PRO-3® em azul, em sobreposição às imagens A e B (em C), D e E (em F), G e H (em I) e J e K (em L). VL: ventrículo lateral. Barras de calibração correspondem a 50 µm.

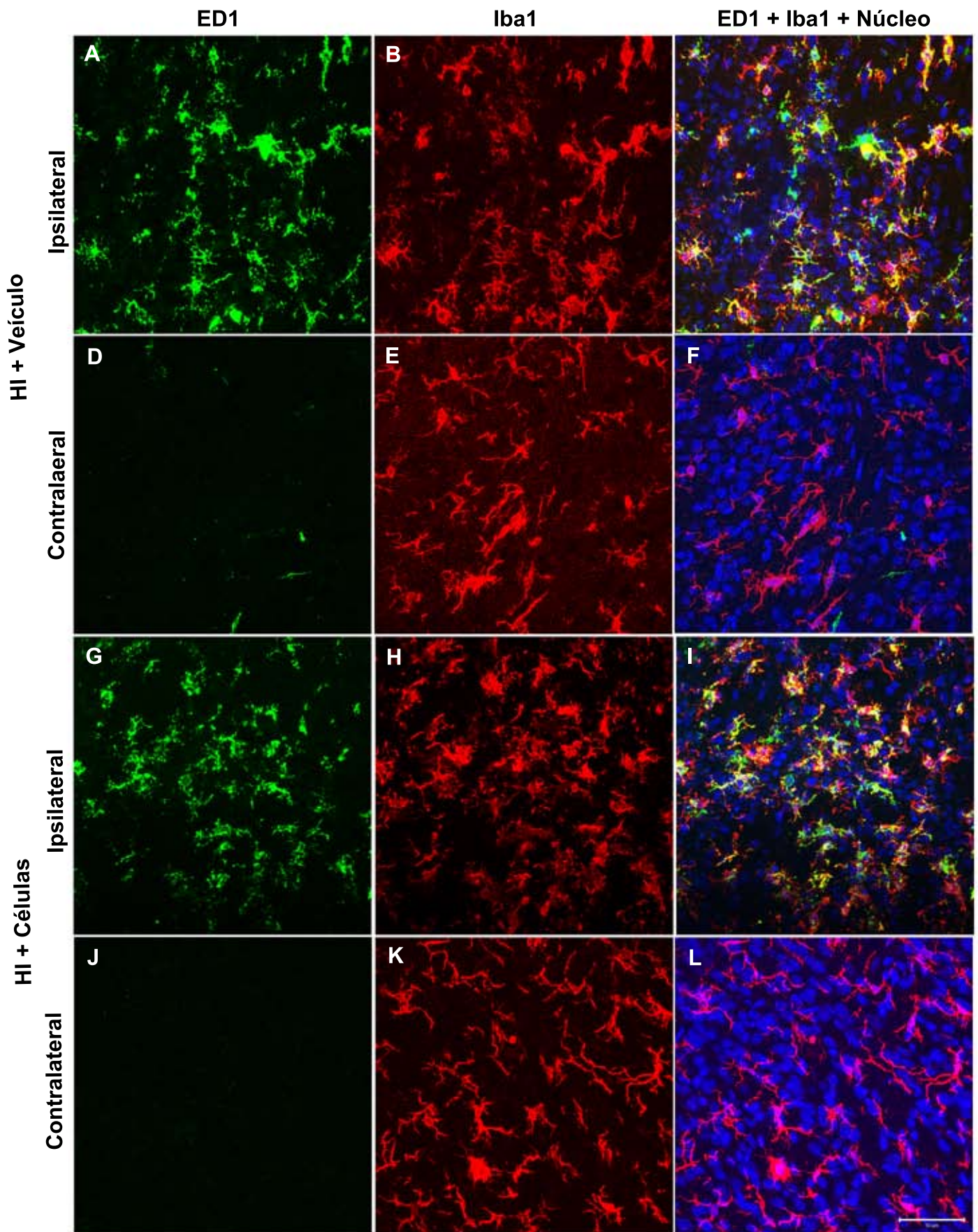


Figura 19. Análise do Efeito da Terapia Celular na Ativação das Células Microgliais no Estriado Após a Hipóxia-Isquemia Neonatal. Fotomicrografias confocais de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos após reação imunohistoquímica, demonstrando a expressão do marcador de células microgliais Iba1 (B, E, H e K, em vermelho) e do marcador de ativação microglial ED1 (A, D, G e J, em verde) no estriado, 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. A análise da co-expressão desses marcadores demonstrou que as células ED1+ encontradas também expressavam o marcador microglial Iba1. Além disso, houve um aumento da expressão de ambos os marcadores no estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia (A-C e G-I), em relação à região homóloga do hemisfério contralateral (D-F e J-L), em ambos os grupos experimentais (animais tratados e não tratados). Marcação nuclear com TO-PRO-3® em azul, em sobreposição às imagens A e B (em C), D e E (em F), G e H (em I) e J e K (em L). Barra de calibração corresponde a 50 µm.

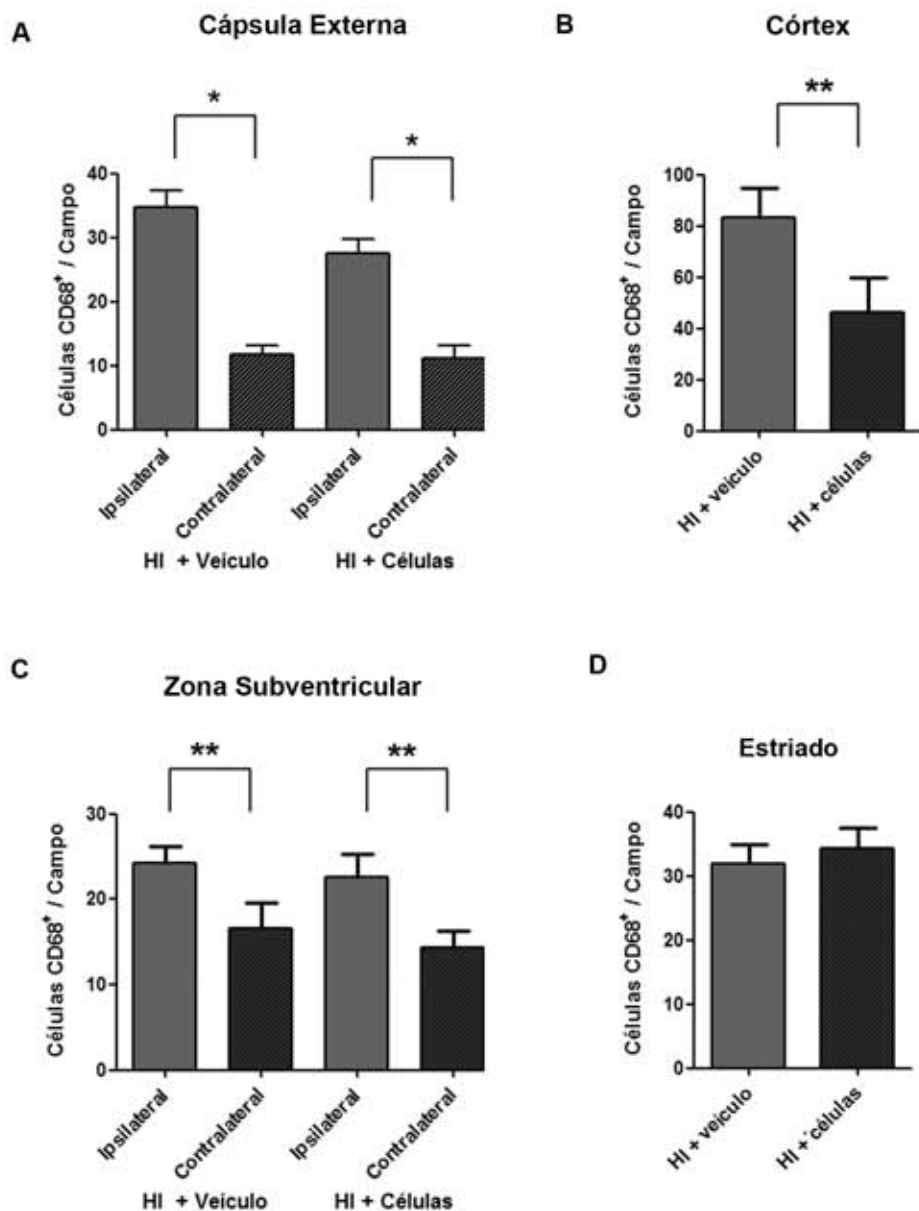


Figura 20. Redução da Ativação das Células Microgлияis no Córtex de Animais Hipóxico-Isquêmicos Após a Terapia Celular. Quantificação do número de células microgлияis expressando ED1, um marcador de ativação microgлияl, na cápsula externa (A), no córtex (B), na zona subventricular (C) e no estriado (D), 7 dias após a hipóxia-isquemia neonatal. Na cápsula externa foi observado um aumento significativo do número de células ED1+ no hemisfério ipsilateral à lesão, em comparação com o hemisfério contralateral em ambos os grupos de animais hipóxico-isquêmicos (tratados e não tratados, * $p < 0,01$), não havendo diferenças entre os animais que receberam o transplante de células e os animais não-tratados (A). Já no córtex, houve uma redução significativa do número de células microgлияis ativadas no hemisfério ipsilateral à lesão dos animais tratados, em comparação aos animais não tratados (B, ** $p < 0,05$). No córtex do hemisfério contralateral à lesão, o número de células ED1+ era nulo em ambos os grupos (dado não mostrado no gráfico). Na zona subventricular houve um aumento significativo do número de células ED1+ no hemisfério ipsilateral à lesão, em comparação com o hemisfério contralateral tanto nos animais tratados, quanto nos não tratados (C, ** $p < 0,05$), não havendo diferença entre esses dois grupos de animais. Já no estriado, o número de células microgлияis expressando o antígeno ED1 aumentou igualmente no hemisfério ipsilateral, tanto nos animais que receberam a terapia celular, quanto nos animais não tratados (D), sendo nulo no hemisfério contralateral de ambos os grupos experimentais (não mostrado no gráfico). Barras indicam média \pm SEM.

4.2.5 A Terapia Celular não Modulou o Processo de Gliose

Reativa Desencadeado Pela Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Para avaliar um possível efeito da terapia celular na gliose reativa, realizamos um *imunoblotting* para o marcador astrocitário GFAP no hemisfério ipsilateral à isquemia, em animais com 7 dias de sobrevivida.

Esse método revelou a presença de múltiplas bandas GFAP⁺, com pesos moleculares ao redor de 50 kDa, no hemisfério ipsilateral à isquemia (Figura 21A). Esse padrão, em que o GFAP tem sua expressão aumentada no hemisfério ipsilateral à isquemia, sendo detectado em múltiplas bandas no *imunoblotting*, já havia sido descrito previamente no modelo de hipóxia-isquemia neonatal, ocorrendo possivelmente pela degradação dessa proteína em subunidades com menor peso molecular que ainda são reconhecidas pelo anticorpo policlonal anti-GFAP (Vannucci *et al.*, 2004).

A análise das densidades ópticas relativas dessas bandas não demonstrou uma diferença significativa na expressão de GFAP entre os animais HI tratados e os não tratados, 7 dias após a lesão (Figura 21B). Dessa forma, a terapia celular parece não alterar o processo de gliose reativa que ocorre após a hipóxia-isquemia neonatal.

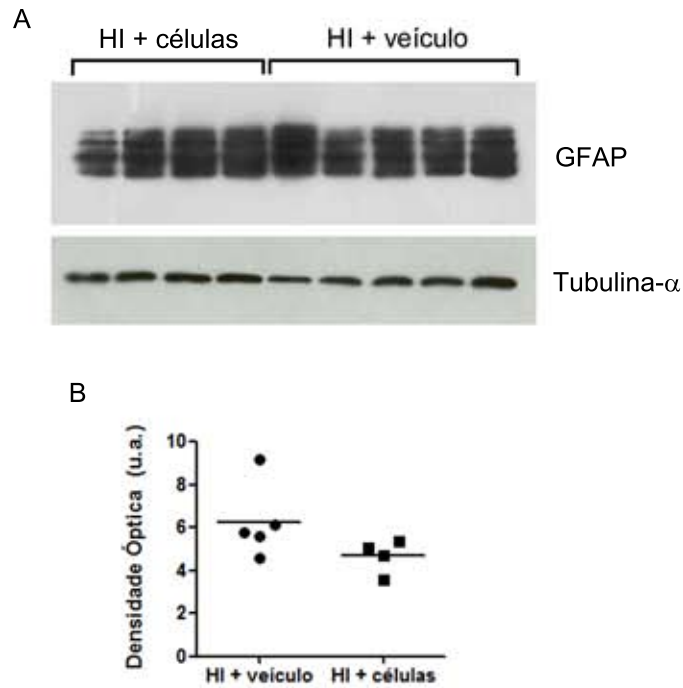


Figura 21. A Terapia Celular Não Modulou a Gliose Reativa no Hemisfério Ipsilateral à Isquemia. Imagens digitalizadas dos filmes que mostram as bandas protéicas dos imunoblottings para GFAP e tubulina- α , utilizada como controle endógeno de carregamento (A). A análise da densidade óptica relativa da expressão de GFAP no hemisfério ipsilateral à isquemia não revelou uma diferença significativa entre os animais hipóxico-isquêmicos tratados e os não tratados (B). u.a.: unidade arbitrária.

4.2.6 Migração para o SNC das Células Injetadas:

Em dois animais tratados, as células foram marcadas com o corante fluorescente Cell Trace[®] antes de serem injetadas, de forma a permitir o rastreamento dessas células após o transplante. Analisando o cérebro desses animais 2 dias após o transplante, raras células foram encontradas no hemisfério ipsilateral à isquemia. Na figura 22D pode-se observar um exemplo de uma célula com o citoplasma marcado, encontrada no córtex, bem próxima da superfície pial, no hemisfério ipsilateral à isquemia.

Em outro experimento, utilizamos um anticorpo específico para um antígeno nuclear humano para identificar as células transplantadas (de origem humana) no cérebro dos animais HI. Após reações de imunohistoquímica utilizando esse anticorpo, encontramos raras células transplantadas, localizadas no córtex (Figuras 22A e 22B) e no estriado (Figura 22C) do hemisfério ipsilateral à isquemia. No entanto, em função do pequeno número de células que foram encontradas, não realizamos uma análise do fenótipo dessas células utilizando outros anticorpos.

4.2.7 Possível Papel da Quimiocina SDF-1 na Migração das Células Injetadas:

Para avaliar o possível envolvimento da quimiocina SDF-1 na migração das células transplantadas para o SNC, analisamos a expressão dessa quimiocina no cérebro dos animais HI através de imunohistoquímica, 2 dias após a lesão.

No hemisfério contralateral à isquemia, a expressão de SDF-1 se restringiu às células endimárias e à zona subventricular, não tendo sido encontrada no córtex ou no estriado (Fig 22E). Já no hemisfério ipsilateral à isquemia, a expressão de SDF-1 também foi observada no estriado, em um padrão de expressão pontual que se estendia ao longo dessa região (Fig 22F).

Também analisamos se as células mononucleares do sangue de cordão umbilical expressam a proteína CXCR4, o receptor do SDF-1, em três amostras obtidas de crianças nascidas a termo. Através de citometria de fluxo, observamos que cerca de 27% dessas células expressava o receptor CXCR4 (média de 27,22% \pm 2,678 SEM, n=3, Figura 22I).

Além disso, uma análise da co-expressão desse receptor e de CD34, um marcador de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas humanas, revelou que, do total de células mononucleares, cerca de 3,8% era CD34⁺ CXCR4⁺ (média de 3,857% \pm 0,871 SEM, n=3), enquanto cerca de 1,3% era CD34⁺ CXCR⁻ (média de 1,387% \pm 0,265 SEM, n=3) (Fig 22I).

Esses resultados demonstraram que a quimiocina SDF-1 tem sua expressão aumentada no estriado após a hipóxia-isquemia neonatal e que cerca de 27% das células do sangue de cordão umbilical humano possuem o receptor CXCR4, podendo responder ao estímulo quimiotático do SDF-1. Além disso, cerca de 70% das células CD34⁺ possuem esse receptor, indicando que sua expressão é ainda maior no *pool* de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas.

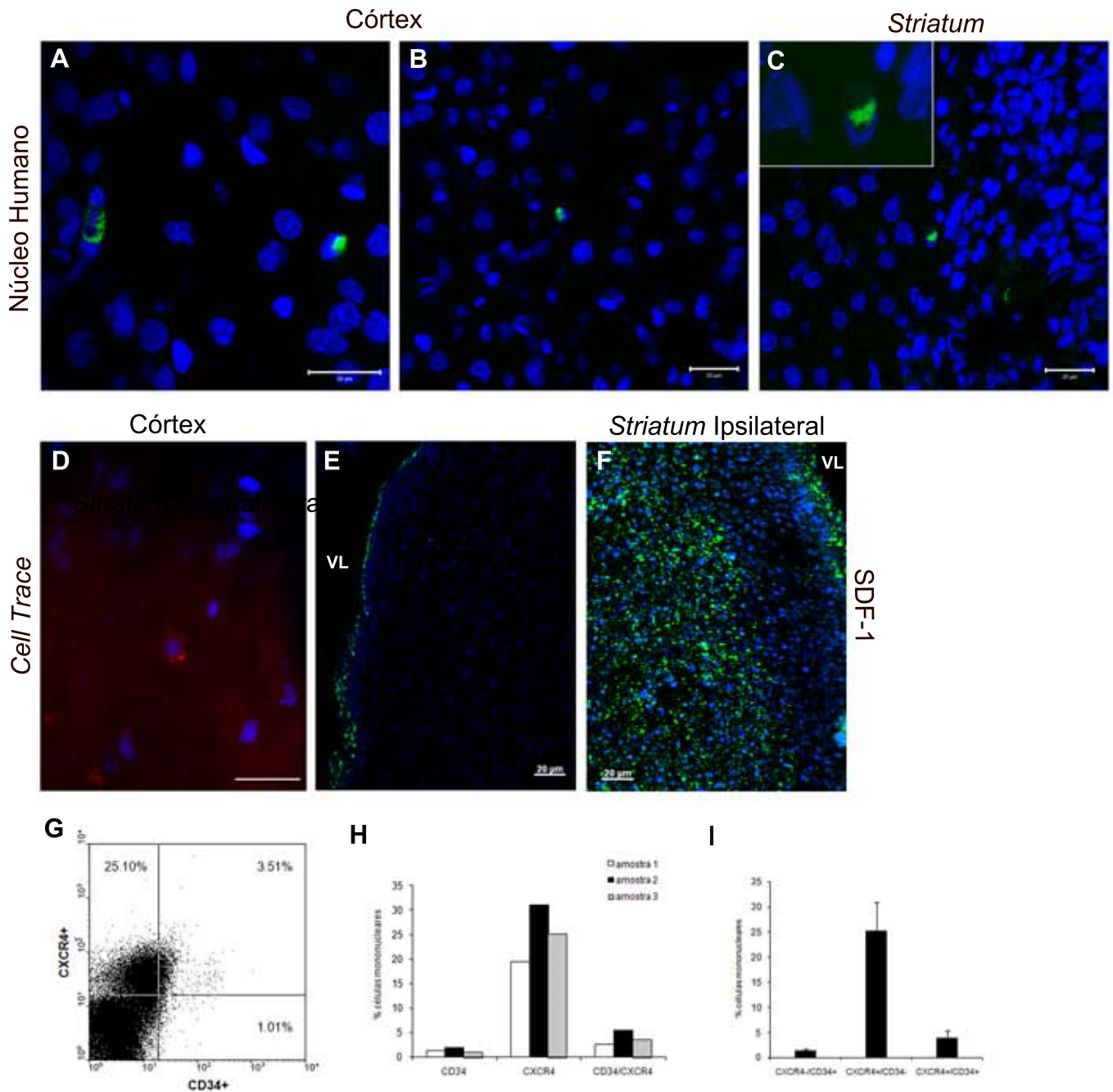


Figura 22. Possível Papel da Quimiocina SDF-1 na Migração das Células Transplantadas. Fotomicrografias de cortes coronais do encéfalo de animais hipóxico-isquêmicos com 2 dias de sobrevivência após reação imunohistoquímica utilizando um anticorpo anti-núcleo humano, revelando a presença de raras células transplantadas que migraram para o córtex (A e B, em verde) e para o estriado (C, em verde) do hemisfério ipsilateral à isquemia. Em (D) pode-se observar uma célula marcada com o corante fluorescente Cell Trace® encontrada no córtex ipsilateral à isquemia, 2 dias após o transplante (D, em vermelho). A análise imunohistoquímica da expressão da quimiocina SDF-1 (em verde) no hemisfério ipsilateral à isquemia revelou uma intensa marcação no estriado e nas regiões endimária e subependimária (F), enquanto no hemisfério contralateral, essa expressão se restringiu às regiões endimária e subependimária, 2 dias após a hipóxia-isquemia neonatal (E). Em azul, marcação nuclear com TO-PRO-3® (A-C) ou bisbenzimidaz (D-F). Células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano expressam o receptor CXCR4, como pode ser observado através da análise por citometria de fluxo da expressão dos antígenos CD34 e CXCR4 em células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano de uma criança nascida a termo (G). Em (H) observe a porcentagem de células CD34⁺CXCR⁻, CD34⁻CXCR4⁺ e CD34⁺CXCR4⁺ nas amostras de cada paciente, e em (I) a média desses resultados. Imagens obtidas com microscopia confocal (A-C), microscopia de fluorescência convencional (D) ou com o sistema de imagens ApoTome® (E e F). Barra de calibração corresponde a 20 µm. VL: ventrículo lateral.

5 DISCUSSÃO:

Apesar dos avanços nos cuidados intensivos em unidades neonatais, a encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal permanece como a principal causa de sequelas neurológicas em recém-nascidos a termo. Embora estudos clínicos recentes indiquem que a hipotermia terapêutica possa aumentar a sobrevivência sem sequelas graves, o efeito ainda é limitado, beneficiando um número pequeno de crianças (Edwards *et al.*, 2010).

O sangue de cordão umbilical é uma fonte de diversas populações celulares que podem apresentar um papel terapêutico após lesões do SNC. Dentre outras vantagens, o uso dessas células para o transplante autólogo em recém-nascidos poderia ser realizado poucas horas após o diagnóstico.

Em nosso trabalho, verificamos que a administração de células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano apresentou um efeito benéfico na recuperação funcional dos animais tratados em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal. Também observamos que essa melhora da função neurológica foi acompanhada de um efeito neuroprotetor no estriado e de um efeito anti-inflamatório no córtex. Esses resultados indicam que a terapia celular pode representar uma nova opção para o tratamento de crianças com EN.

Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Utilizando o modelo de hipóxia-isquemia neonatal de Rice-Vannucci, observamos uma lesão moderada/severa após a oclusão permanente da artéria carótida comum direita, seguida de um período de 90 minutos de hipóxia.

A reação com o marcador fluorescente Fluoro-Jade C, que marca seletivamente neurônios em degeneração (Schmued *et al.*, 2005), demonstrou uma morte neuronal importante no córtex, no estriado e no hipocampo do hemisfério ipsilateral à isquemia, 2 dias após a lesão. O padrão da marcação parece ser diferente do encontrado em animais adultos, nos quais o Fluoro-Jade C também marca alguns axônios em degeneração, enquanto em nossos animais a marcação se limitava ao corpo celular, em um padrão semelhante ao descrito por Leonardo e colaboradores (2008). No entanto, observamos axônios na cápsula externa e na substância branca do estriado expressando a enzima caspase-3 ativada no hemisfério ipsilateral à isquemia, indicando um processo de apoptose.

Já a coloração com cresil violeta demonstrou que ocorre uma extensa atrofia desse hemisfério, 14 dias após a lesão, ocorrendo ventriculomegalia e em alguns casos a formação de cistos na substância cinzenta e/ou na substância branca. Nos casos mais severos, os animais perdiam praticamente o hemisfério inteiro, restando apenas um grande cisto porencefálico, semelhante ao caso de um paciente descrito recentemente por Trabacca e DiCuonzo (2009).

Também analisamos a resposta das células gliais (microglia e astrócitos) à lesão hipóxico-isquêmica, o que será discutido nos próximos tópicos.

Papel da Microglia no Modelo de Hipóxia-Isquemia Neonatal:

As células microgliais são as células do sistema imune inato que residem no cérebro, presentes ao longo de todo o SNC, representando cerca de 20% da população glial (Soulet e Rivest, 2008). São formadas a partir da migração de progenitores do saco vitelino, do mesênquima ao redor do SNC ou de órgãos hematopoiéticos fetais (fígado e baço, por exemplo) que colonizam o SNC entre E10 e E12 em roedores e no início do segundo trimestre de gestação em humanos. Posteriormente, ocorre a migração de progenitores mielóides (possivelmente monócitos) da medula óssea, originando células microgliais no período perinatal em humanos ou entre P0 e P15 em roedores (Chan *et al.*, 2007).

Essas células apresentam uma morfologia ramificada, possuindo prolongamentos ativos e dinâmicos que se movimentam e estão constantemente “patrulhando” o SNC (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Ao detectar alterações no ambiente, a microglia é ativada, mudando sua morfologia (com a retração de seus prolongamentos, passando a apresentar o corpo celular mais arredondado) e migrando para a área de lesão. Uma vez ativadas, exercem um importante papel na fagocitose de debris celulares e de restos de mielina, além de produzirem citocinas, quimiocinas, proteases e outros fatores que contribuem para o processo inflamatório e para o reparo tecidual no SNC. No entanto, o papel da microglia após uma lesão isquêmica pode ser benéfico ou maléfico, dependendo do momento e do contexto em que ocorre a ativação (Hanisch e Kettenmann, 2007).

Na hipóxia-isquemia neonatal ocorre um aumento dos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias já nas primeiras horas após a indução da lesão (Bona *et al.*, 1999). Dentre estas citocinas, destacam-se a IL-1 β e a IL-18, que contribuem para o agravamento da lesão, sendo produzidas exclusivamente por células microgliais. Já foi demonstrado que a expressão da IL-18 aumenta progressivamente no hemisfério ipsilateral à isquemia nas duas primeiras semanas após a lesão e que na ausência dessa citocina há uma redução da gravidade da lesão no hipocampo, no estriado, no tálamo, no córtex (Hedtjarn *et al.*, 2002) e na substância branca (Hedtjarn *et al.*, 2005). Já a IL-1 β apresenta um padrão bifásico de expressão, com dois picos: 8 horas e 6 dias após a lesão; e a administração intracerebroventricular de um inibidor da IL-1 β diminui significativamente a lesão no modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Hagberg *et al.*, 1996). Por fim, camundongos que não expressam a enzima caspase-1, responsável pela clivagem e ativação da IL-18 e da IL-1 β , também apresentam uma menor lesão após a hipóxia-isquemia neonatal (Liu *et al.*, 1999). Não se sabe exatamente como essas citocinas podem contribuir para a lesão. Sabe-se que ambas levam à indução de genes pró-inflamatórios via NF κ B, incluindo a enzima iNOS, aumentando, portanto, a produção de NO. Outra possibilidade seria uma neurotoxicidade direta, uma vez que neurônios expressam o receptor da interleucina-18 (Hedtjarn *et al.*, 2002). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que as citocinas IL-1 β e TNF- α podem alterar a captação de glutamato por astrócitos, potenciando o estresse oxidativo induzido por esse neurotransmissor (Liao e Chen, 2001).

Em um estudo clínico recente foi demonstrada uma correlação entre o aumento da razão entre lactato/colina (um marcador de alteração do metabolismo

oxidativo cerebral) no tálamo ventrolateral, núcleo lentiforme e parte posterior da cápsula externa, com um aumento dos níveis das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α no sangue periférico de recém-nascidos a termo com diagnóstico de EN. Também foi relatado que os níveis plasmáticos das citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 eram significativamente maiores em crianças com um desenvolvimento neurológico anormal, ou seja, que apresentaram alguma deficiência motora ou cognitiva aos 30 meses de idade (Bartha *et al.*, 2004).

Uma das proteases secretadas pela microglia é a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9, do inglês *matrix metalloproteinase-9*), uma enzima capaz de degradar o colágeno tipo IV da membrana basal do endotélio, levando à quebra da barreira hematoencefálica após eventos isquêmicos ou inflamatórios, resultando no extravasamento de plasma e na entrada de células (leucócitos, por exemplo) e moléculas que em situações fisiológicas não entrariam no parênquima cerebral. A MMP-9 também é capaz de regular a inflamação, participando do processo em que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , passam para sua forma biologicamente ativa. Esta enzima tem sua atividade aumentada no cérebro, 24 horas após um evento hipóxico-isquêmico, sendo expressa exclusivamente pela microglia no tálamo, córtex, hipocampo e estriado. Além disso, animais que não expressam MMP-9, quando submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia neonatal, apresentaram um menor volume de infarto e menor desmielinização (Svedin *et al.*, 2007). Da mesma forma, a administração de AGG3340, um potente inibidor de MMPs, iniciada 24 horas após a hipóxia-isquemia neonatal e mantida por 6 dias, resultou em um efeito neuroprotetor (Leonardo *et al.*, 2008).

Outra protease secretada por células microgliais é o ativador de plasminogênio tecidual (tPA, do inglês *tissue plasminogen activator*), que agrava a lesão hipóxico-isquêmica neonatal, através de seu efeito na quebra da barreira hematoencefálica e na ativação de metaloproteinases. Foi demonstrado que os níveis de tPA aumentam no cérebro, já na primeira hora após a lesão, e que essa expressão aumentada se mantinha por até 24 horas em astrócitos e células microgliais (Adhami *et al.*, 2008). A administração de um inibidor do tPA reduziu a permeabilidade da barreira hematoencefálica, a ativação da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) e a formação de edema, resultando em um efeito neuroprotetor (Yang *et al.*, 2009).

No entanto, a microglia pode também apresentar um papel benéfico após a hipóxia-isquemia neonatal, principalmente na fase aguda da lesão.

Já foi demonstrado que os níveis de prostaglandina D₂ (PGD₂) aumentam rapidamente, cerca de 90 vezes, 10 minutos após a hipóxia-isquemia neonatal. A enzima PGD sintase hematopoiética (HPGDS, do inglês *hematopoietic prostaglandin D synthase*), responsável pela síntese de PGD₂, é expressa exclusivamente em células microgliais, enquanto o receptor da PGD₂, chamado de DP₁, é expresso apenas em células endoteliais 1 hora após a lesão, passando a ser expresso também em astrócitos 24 horas após a lesão. Na ausência do receptor DP₁ ou da enzima HPGDS houve uma redução mais acentuada e prolongada do fluxo sanguíneo cerebral durante a hipóxia, resultando em um agravamento da lesão. Os animais *knockout* para as proteínas HPGDS ou DP₁ apresentaram ainda uma maior degeneração de células endoteliais e um maior edema. Dessa forma, a liberação de PGD₂ por células microgliais apresenta um papel na atenuação da lesão

cerebrovascular e do subsequente dano cerebral que ocorre após a hipóxia-isquemia neonatal (Taniguchi *et al.*, 2007).

No nosso estudo demonstramos que ocorre um aumento do número de células ED1⁺ no córtex, SVZ, cápsula externa e estriado na fase subaguda da hipóxia-isquemia neonatal (7 dias após a lesão) no hemisfério ipsilateral à lesão.

Como a expressão de caspase-1 e de seus dois substratos conhecidos (IL-18 e IL-1 β) ocorre predominantemente em células microgliais, permanecendo elevada de forma prolongada após a hipóxia-isquemia neonatal (Hedtjarn *et al.*, 2002), pode-se sugerir uma possível associação entre os efeitos neurotóxicos atribuídos a essas citocinas com a ativação prolongada das células microgliais.

Além disso, essa é a primeira demonstração de que ocorre aumento do número de células microgliais ativadas no estriado e na SVZ dorsolateral após a hipóxia-isquemia neonatal.

Em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos adultos já havia sido demonstrado um aumento do número de células ED1⁺ na SVZ e no estriado ipsilaterais à lesão, que permanecia por até 16 semanas. Além disso, entre 2 e 16 semanas após a lesão, ocorria um aumento progressivo da expressão do fator trófico IGF-1, cuja expressão está associada a um fenótipo neuroprotetor, por células microgliais da SVZ. Como cerca de 60% das células microgliais da SVZ expressava o marcador de ativação ED1, enquanto apenas 5% expressava IGF-1 (16 semanas após a lesão), é possível que uma pequena subpopulação das células microgliais adote um fenótipo neuroprotetor, enquanto a maioria dessas células

permaneça com um perfil pró-inflamatório na fase crônica da lesão (Thored *et al.*, 2009).

Já foi demonstrado que ocorre morte celular na região dorsolateral da SVZ após a hipóxia-isquemia neonatal, ocorrendo um aumento da atividade das enzimas caspase-3 e calpaína na SVZ ipsilateral à isquemia (Romanko *et al.*, 2007). Nessa região, a expressão de caspase-3 ativada parece ocorrer predominantemente em neuroblastos (Romanko *et al.*, 2004). Assim, é possível que a morte de neuroblastos induza a ativação das células microgliais na SVZ.

A microglia da SVZ pode influenciar a proliferação e a diferenciação de células-tronco/progenitoras neurais e esse efeito pode variar de acordo com o estado de ativação da microglia. *In vitro*, células microgliais pré-tratadas com LPS, IL-4 ou baixas doses de IFN- γ apresentaram diferentes efeitos quando co-cultivadas com células-tronco/progenitoras neurais. A microglia pré-tratada com LPS reduziu a neurogênese e a oligodendrogênese, enquanto um efeito oposto foi obtido pelo co-cultivo com as células microgliais pré-tratadas com IL-4 e IFN- γ . Além disso, as células pré-tratadas com IL-4 levaram a uma produção maior de oligodendrócitos, enquanto a microglia pré-tratada com IFN- γ induziu uma maior neurogênese (Butovsky *et al.*, 2006).

A microglia ativada produz diversas quimiocinas responsáveis pela migração de leucócitos para as áreas isquêmicas. É possível que essas quimiocinas também levem à migração de neuroblastos em direção ao estriado e ao córtex. As células-tronco/progenitoras neurais expressam diversos receptores de quimiocinas, como CCR1, CCR2, CCR5, CXCR3 e CXCR4 (Tran *et al.*, 2007) e a quimiocina MCP-1

(proteína quimiotática de monócitos-1, do inglês *monocyte chemotactic protein-1*) e seu receptor CCR2 apresentam um papel importante na migração de neuroblastos para o estriado após a oclusão transiente da artéria cerebral média em ratos e camundongos adultos (Yan *et al.*, 2007).

Nos nossos experimentos, outro resultado interessante que obtivemos foi a observação de que alguns animais hipóxico-isquêmicos apresentavam cistos no córtex e na substância branca. Estes cistos apresentavam astrócitos e células microgliais nas suas bordas, formando uma parede que parecia isolar o cisto do tecido ao redor. Um aspecto histológico semelhante já foi verificado em humanos, tendo sido observado um grande número de astrócitos na parede de cistos formados na substância branca após um evento isquêmico perinatal, embora mais detalhes sobre a causa da lesão não tenham sido informados (Villapol *et al.*, 2008). No entanto, é a primeira vez que se observa a presença de células microgliais com uma morfologia ativada, expressando o antígeno ED1, na parede desses cistos.

Nossos resultados sugerem que astrócitos e microglia, quando ativados, migram para os locais de lesão, ficando espacialmente bem próximos. Essa proximidade pode sugerir uma interação entre essas células, um assunto ainda pouco explorado, mas que parece ser importante durante a inflamação. Já foi mostrado, por exemplo, que a glicoproteína CD200, expressa de forma constitutiva por neurônios, passa a ser expressa por astrócitos em processos de inflamação crônica, como ocorre na esclerose múltipla. Essa molécula sinaliza através do receptor CD200R, que é expresso predominantemente em células microgliais e macrófagos, sendo um sinal que suprime a ativação dessas células. Dessa forma, os astrócitos ativados apresentam um papel no controle da ativação da microglia, via

CD200-CD200R (Koning *et al.*, 2009). Após uma lesão traumática, astrócitos também contribuem para a ativação e para a movimentação dos prolongamentos de células microgliais em direção à lesão, através da liberação de ATP, que sinaliza via receptores purinérgicos presentes na microglia (Davalos *et al.*, 2005). Já a produção de PGD₂ por células microgliais, parece influenciar a ativação de astrócitos, através de seus receptores DP₁ e DP₂ (Mohri *et al.*, 2006).

Papel de Astrócitos na Hipóxia-Isquemia Neonatal:

Astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC, apresentando um amplo espectro de funções, como um papel na homeostase de íons e água, a participação na formação da barreira hematoencefálica, o controle do fluxo sanguíneo cerebral, a regulação da sinaptogênese e a síntese e remoção de glutamato e GABA (Ransom *et al.*, 2003). Embora os astrócitos possam sobreviver por longos períodos em situações de hipóxia, através da utilização anaeróbica da glicose, evidências recentes sugerem que um número considerável de astrócitos pode morrer após um evento isquêmico no cérebro em desenvolvimento. Em um modelo de isquemia focal em ratos P7 foi mostrado que já é possível encontrar astrócitos em apoptose tanto na substância branca como no córtex, 24 horas após a lesão. Além disso, astrócitos apresentando características de clasmotodendrose, ou seja, com evidências de desintegração de prolongamentos distais, podiam ser encontrados mais tardiamente, 3 semanas após a lesão (Villapol *et al.*, 2008).

Nossos resultados demonstram que ocorre um aumento da expressão de GFAP, associado a um acúmulo de astrócitos no córtex, no estriado e na cápsula

externa do hemisfério ipsilateral à isquemia, 7 dias após a lesão. Esses resultados são compatíveis com um processo de gliose reativa, no qual ocorre hiperplasia, hipertrofia e aumento da expressão de GFAP e vimentina, dentre outras mudanças morfológicas e metabólicas que ocorrem em astrócitos em resposta a uma lesão. Em lesões crônicas ou em lesões agudas severas, esse processo leva à formação de uma cicatriz glial, que dificulta a regeneração axonal e a mielinização, embora apresente um papel benéfico, ao proteger áreas não afetadas pela isquemia dos mediadores tóxicos liberados no centro da lesão. Os astrócitos ativados também participam do processo inflamatório, liberando citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Sherman *et al.*, 2007).

Em modelos de acidente vascular cerebral em animais adultos, a ativação de astrócitos parece ser benéfica. Já foi relatado que animais que não expressam os filamentos intermediários GFAP e vimentina apresentaram um maior volume de infarto após a transecção da artéria cerebral média (Li *et al.*, 2008). Além disso, a inibição da ativação de astrócitos (através da droga fluorocitrato) levou a uma menor recuperação funcional e a um menor remodelamento neurovascular após a indução de um acidente vascular cerebral em camundongos (Hayakawa *et al.*, 2009).

Já em animais P9 que não expressam as proteínas GFAP e vimentina, a atenuação da gliose reativa não alterou o volume de infarto em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Järlestedt *et al.*, 2010).

É possível que a gliose reativa no cérebro em desenvolvimento apresente diferenças em relação à gliose que ocorre no cérebro adulto, uma vez que o processo de gliogênese se inicia tardiamente no período embrionário (a partir de

E16), se completando nas primeiras semanas pós-natais em roedores (Costa *et al.*, 2009). Assim, no momento em que ocorre a lesão hipóxico-isquêmica, existe uma grande quantidade de progenitores gliais no cérebro dos animais neonatos, o que pode representar uma diferença importante no processo de gliose reativa e da formação da cicatriz glial.

Por fim, nossos resultados demonstraram que o tratamento com as células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano não modificou o aumento da expressão de GFAP no hemisfério ipsilateral à isquemia, sugerindo que a terapia celular não foi capaz de modular o processo de gliose reativa, pelo menos na idade estudada.

Migração e Fenótipo das Células Transplantadas:

Utilizando um anticorpo anti-núcleo humano, raras células transplantadas puderam ser encontradas no córtex e no estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia dos animais tratados, 2 dias após o transplante.

A quimiocina SDF-1 é uma das principais citocinas envolvidas na regulação da migração, retenção e mobilização de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas da/para a medula óssea (Lapidot *et al.*, 2005). Além disso, essa quimiocina também apresentou um papel na migração de células-tronco/progenitoras neurais para as regiões isquêmicas em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Imitola *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que a migração das células mononucleares do sangue de cordão umbilical para a área de lesão hipóxico-isquêmica também dependia da interação da quimiocina SDF-1 com seu receptor CXCR4. A expressão de SDF-1 aumentou no hemisfério ipsilateral à isquemia, principalmente em astrócitos, e cerca de 80% dos monócitos e dos linfócitos do sangue de cordão umbilical expressavam o receptor CXCR4. Além disso, a administração de anticorpos neutralizantes anti-SDF-1 resultou em um menor número de células migrando para a lesão (Rosenkranz *et al.*, 2009).

Nossos dados complementam esses resultados, pois mostramos que cerca de 30% das células mononucleares do sangue de cordão umbilical expressam o receptor CXCR4. Assim, 70% das células que foram injetadas não expressavam esse receptor, e dependeriam de outras quimiocinas para migrarem para o cérebro. Além disso, no momento em que encontramos as células no córtex e no estriado (2 dias após a lesão), a expressão de SDF-1 estava aumentada apenas no estriado ipsilateral à isquemia, mas não no córtex, o que está de acordo com o que já havia sido demonstrado em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal em camundongos. Nesse modelo a quimiocina SDF-1 teve sua expressão aumentada por até 7 dias no hipocampo e no estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia e o pico de sua expressão ocorreu 3 dias após a lesão, principalmente em astrócitos e células endoteliais (Miller *et al.*, 2005). Dessa forma, SDF-1 provavelmente não é a principal quimiocina envolvida na migração de células para o córtex após a hipóxia-isquemia.

No entanto, a expressão do receptor CXCR4 por células hematopoiéticas é bastante dinâmica. Já foi demonstrado que as células CD34⁺ CXCR4⁻ apresentam níveis baixos da proteína CXCR4 no citoplasma e que a estimulação dessas células

com as citocinas IL-6 e SCF (fator de célula-tronco, do inglês *stem cell factor*), ou com HGF, leva à expressão desse receptor na membrana plasmática após cerca de 24-48 horas (Lapidot *et al.*, 2005).

As quimiocinas MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófago 1 alfa, do inglês *macrophage inflammatory protein 1 alpha*) e MCP-1 também induzem a migração de células mononucleares do sangue de cordão umbilical, *in vitro* (Jiang *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de MCP-1 aumenta no hemisfério ipsilateral à isquemia a partir de 1 hora após a indução da hipóxia-isquemia neonatal, embora o pico de sua expressão ocorra após 8-24 horas (Ivacko *et al.*, 1997). Já o pico da expressão da quimiocina MIP1- α (ou CCL-3) ocorre 16 horas após a lesão, e esta quimiocina permanece elevada por pelo menos 5 dias no cérebro dos animais hipóxico-isquêmicos (Cowell *et al.*, 2002).

O padrão temporal da expressão dessas quimiocinas pode explicar as diferenças entre os resultados obtidos por diferentes grupos que avaliaram a migração das células mononucleares do sangue de cordão umbilical para o cérebro após um transplante sistêmico. Nos estudos em que foi encontrado um grande número de células transplantadas no parênquima cerebral, as células foram administradas por via intraperitoneal 24 horas após a lesão, período que coincide com o pico de expressão de MCP-1 e bem próximo do pico de MIP1- α (Meier *et al.*, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2009). No entanto, em outro estudo, embora as células tenham sido administradas por via intravenosa 24 horas após a hipóxia-isquemia, poucas células transplantadas foram encontradas no cérebro, diferença que pode estar relacionada ao método utilizado para identificar as células, ou à via de administração (de Paula *et al.*, 2009). Já em nosso trabalho, as células foram

injetadas 3 horas após a lesão, período que precede o pico de expressão das quimiocinas que já foram estudadas no modelo de hipóxia-isquemia neonatal, o que pode explicar o baixíssimo número de células que encontramos no cérebro dos animais tratados.

Em relação ao fenótipo das células transplantadas, foi demonstrado que não havia expressão de marcadores neurais ou astrocitários pelas células que migraram para o cérebro hipóxico-isquêmico (Meier *et al.*, 2006). Esses dados, em conjunto com os nossos resultados e com os resultados de Yasuhara (2009), que indicaram uma melhora funcional dos animais apesar de poucas células terem migrado para o cérebro, sugerem fortemente que o mecanismo terapêutico obtido com o transplante das células do sangue de cordão umbilical humano não se deve à transdiferenciação dessas células, ou seja, à substituição de neurônios perdidos.

Em modelos de acidente vascular cerebral em animais adultos, as células mononucleares do sangue de cordão umbilical também contribuem para a recuperação neurológica dos animais, mesmo quando não migram para o cérebro (Borlongan *et al.*, 2004).

No entanto, é possível que algumas das células progenitoras hematopoiéticas que se alojam no cérebro se diferenciem, adotando fenótipos relacionados à linhagem hematopoiética. Já foi demonstrado, por exemplo, que células CD34⁺ do sangue de cordão umbilical humano podem se diferenciar em células microgliais com morfologia ramificada quando transplantadas em camundongos adultos após irradiação (Asheuer *et al.*, 2004).

Também não podemos descartar a possibilidade de fusão de algumas das células injetadas com células de Purkinje no cerebelo, um evento que já foi mostrado após o transplante de células da medula óssea, embora ocorra em baixíssima frequência (Alvarez-Dolado *et al.*, 2003).

Melhora Funcional dos Animais Tratados:

A avaliação dos reflexos primitivos apresenta grande importância na prática pediátrica. O reflexo de Moro, um dos reflexos mais utilizados, por exemplo, deve estar presente a partir de 28-32 semanas de gestação e desaparecer antes dos 6 meses de idade. Ausência, diminuição ou assimetria desse reflexo nos primeiros meses de vida, ou ainda a persistência do reflexo após 6 meses de idade, indicam uma alteração da função neurológica. Um estudo avaliou esse reflexo em 204 crianças com risco de desenvolverem sequelas neurológicas. Em 43 das 58 crianças que apresentaram paralisia cerebral (74%), o reflexo de Moro permaneceu presente no sétimo mês de vida, enquanto apenas 5 de 146 crianças sem alterações na função motora (3,4%) ainda apresentavam esse reflexo (Zafeiriou *et al.*, 1999).

No modelo de hipóxia-isquemia neonatal em camundongos já foi demonstrado que o desempenho dos animais nos reflexos de aversão ao precipício e de geotaxia negativa se correlacionava com o tempo de hipóxia (30 ou 60 minutos), com o volume de infarto, e com o desempenho dos animais no labirinto aquático de Morris, analisados 8 semanas após a lesão (Tem *et al.*, 2003). Dessa forma, é possível sugerir que as alterações que encontramos nesses 2 reflexos

neonatais em animais hipóxico-isquêmicos podem se correlacionar com a gravidade da lesão e com a preservação da memória espacial a longo prazo.

As alterações que encontramos no desempenho dos animais hipóxico-isquêmicos nos testes que avaliam os reflexos neonatais foram mais importantes em P9 e P11, voltando a valores normais em P14. O fato de animais hipóxico-isquêmicos realizarem esses testes de forma comparável aos animais falso-operados mais tardiamente, em P14, indica que o amadurecimento de funções neurológicas básicas foi retardado pela hipóxia-isquemia. Resultados semelhantes já foram encontrados mesmo após uma lesão mais severa (2 horas de hipóxia). Nesse modelo, foi relatado que os animais hipóxico-isquêmicos apresentavam alterações no reflexo de geotaxia negativa até P18, passando a apresentar um desempenho semelhante ao dos animais falso-operados em P20 (Lubics *et al.*, 2005).

Em P9 os animais tratados apresentavam um desempenho em ambos os testes semelhante ao dos animais falso-operados, indicando que as alterações provocadas pela hipóxia-isquemia no desenvolvimento de reflexos primitivos neonatais foram minimizadas pelo tratamento.

O melhor desempenho funcional apresentado pelos animais que receberam a terapia celular pode ocorrer por diversos mecanismos. Até o momento, nenhum trabalho havia avaliado um possível mecanismo neuroprotetor na fase aguda da hipóxia-isquemia neonatal. Em nosso trabalho, ao analisar a morte celular no córtex, no estriado e no hipocampo, observamos que o tratamento com as células do sangue de cordão umbilical reduziu a morte neuronal no estriado e que o mecanismo associado a esse efeito envolvia uma redução da ativação da enzima

caspase-3. Como um mecanismo adicional, observamos um efeito anti-inflamatório no córtex, evidenciado pela redução da ativação da microglia na fase subaguda da lesão. Nos próximos tópicos discutiremos esses mecanismos de forma mais detalhada.

Efeito Neuroprotetor:

Nossos resultados demonstraram que houve uma redução do número de neurônios em degeneração no estriado, mas não no córtex ou no hipocampo, 2 dias após o tratamento com as células do sangue de cordão umbilical. Também mostramos que houve uma redução do número de células expressando a enzima caspase-3 ativada no estriado dos animais tratados.

Já foi relatado que a principal diferença em relação aos mecanismos de morte celular após a hipóxia-isquemia em ratos neonatos e animais adultos foi uma maior ativação da caspase-3 nos neonatos. Além disso, esses animais apresentavam maior translocação de AIF e liberação de citocromo c para o citosol (Zhu *et al.*, 2005). A relevância da ativação da caspase-3 nas lesões cerebrais em animais neonatos deve estar relacionada ao papel da morte celular programada durante o desenvolvimento do SNC. A morte de progenitores neurais em áreas neurogênicas durante o período embrionário depende da ativação de caspases e já foi demonstrado que a ausência de caspase-3 ou de caspase-9 durante esse período leva a mal-formações e a um crescimento exagerado do cérebro (Kuida *et al.*, 1998).

No entanto, já foi demonstrado que mesmo após a inibição farmacológica da caspase-3, a ativação precoce (cerca de 30 minutos após a hipóxia) da calpaína no córtex não foi afetada (Han *et al.*, 2002). Dessa forma, outras vias de morte celular, caspase-3-independentes também contribuem para a lesão hipóxico-isquêmica. Em nosso estudo, o efeito na redução da ativação da caspase-3 (expressa em neurônios e glia) no estriado está associado a um efeito neuroprotetor, uma vez que observamos também uma redução do número total de neurônios em degeneração, marcados com Fluoro-Jade C (específico para neurônios) , nessa mesma região.

Um efeito neuroprotetor já havia sido atribuído às células do sangue de cordão umbilical anteriormente. *In vitro*, já foi demonstrado que estas células, quando em co-cultura com neurônios corticais, protegem estes neurônios da morte induzida pelo glutamato. Dentre os mecanismos de neuroproteção propostos por este estudo, destaca-se a ativação da via de sinalização Akt, que está envolvida em vias de sobrevivência celular, inibindo o processo de apoptose (Dasari *et al.*, 2008). As células do sangue de cordão umbilical também reduziram a morte celular induzida pela hipóxia em células de uma linhagem neuronal cultivadas *in vitro* (Hau *et al.*, 2008). *In vivo*, já foi relatado que o transplante intravenoso dessas células em um modelo de oclusão da artéria cerebral média em ratos adultos foi capaz de reduzir o volume do infarto, de maneira dose-dependente (Vendrame *et al.*, 2004).

A neuroproteção observada no estriado (que corresponde a parte dos gânglios da base em humanos) após o tratamento com as células do sangue de cordão pode apresentar uma grande relevância clínica. Alguns estudos clínicos, avaliando o padrão de lesão apresentado por crianças nascidas a termo, com diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, indicam que pode haver

um comprometimento seletivo dos gânglios da base e do tálamo, poupando o córtex, quando a asfixia ocorre de forma aguda, momentos antes do parto.

Em um estudo, foram avaliadas 11 crianças nascidas a termo que apresentaram convulsões durante o período neonatal e que apresentaram uma bradicardia terminal e persistente que não se recuperou até o final do parto, seis das quais apresentavam também um evento sentinela (ruptura uterina, ruptura do cordão e trombose do cordão). Avaliando as imagens dos exames de ressonância magnética dessas crianças, foi verificado que as lesões se restringiam ao tálamo, tronco-cerebral e gânglios da base, poupando o córtex e a substância branca (Pasternak *et al.*, 1998). Posteriormente, outro estudo verificou que na presença de um evento sentinela indicativo de asfixia perinatal aguda em crianças a termo, a lesão predominante ocorria no tálamo e nos glânglios da base (Okerefor *et al.*, 2008).

Esses resultados estão de acordo com estudos pré-clínicos prévios. Modelos de asfixia perinatal utilizando macacos *Rhesus*, já haviam mostrado que um episódio de asfixia intra-uterina aguda de 10-25 minutos de duração se associava a lesões principalmente no tronco cerebral e no tálamo, poupando o córtex. A partir de 25 minutos de asfixia, tais lesões eram acompanhadas de danos mais extensos e tendiam a ser letais. Já uma asfixia parcial e prolongada, durando de 30 minutos a algumas horas, produzia lesões corticais.

Da mesma forma, em crianças prematuras com diagnóstico de encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal foi encontrado um padrão de lesão que poupava o córtex, havendo uma correlação entre uma maior idade gestacional e a presença de

lesões corticais. Lesões nos gânglios da base foram encontradas em 72% dos casos, lesões talâmicas em 62% e lesões difusas na substância branca em 89% das crianças (Logitharajah *et al.*, 2009).

Assim, esse grupo de pacientes se beneficiaria de uma terapia que apresentasse um efeito neuroprotetor nos gânglios da base. Além disso, em experimentos futuros pretendemos avaliar se existe um efeito neuroprotetor no tálamo dos animais tratados com as células do sangue de cordão umbilical.

Ainda em relação ao estriado, sabe-se que essa região é composta principalmente por neurônios de projeção que expressam os marcadores DARPP-32 e calbindina (95% dos neurônios totais). Os outros 5% são interneurônios, que são divididos em 4 grandes grupos, de acordo com a expressão de parvalbumina, calretinina, somatostatina ou colina acetiltransferase (Yang *et al.*, 2009). Dessa forma, também seria interessante avaliar no futuro se o tratamento com as células do sangue de cordão protegeu de forma seletiva alguma(s) população(ões) específica(s) do estriado.

Efeito Anti-Inflamatório:

Evidências de que a modulação da inflamação pode apresentar um potencial terapêutico na hipóxia-isquemia neonatal surgiram a partir dos estudos que investigaram o efeito do tratamento com a droga minociclina, uma tetraciclina de segunda geração que apresenta um efeito neuroprotetor baseado principalmente em suas propriedades anti-inflamatórias (Buller *et al.*, 2009).

Em um estudo *in vitro*, já foi demonstrado que o pré-tratamento com minociclina é capaz de reduzir a ativação da microglia induzida pela hipóxia, reduzindo a expressão de ED1 e a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , bem como da enzima iNOS (diminuindo a produção de óxido nítrico). Por outro lado, a produção dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF (fator neurotrófico derivado de glia, do inglês *glial-derived neurotrophic factor*) não sofreu alteração após o pré-tratamento com minociclina, indicando que este antibiótico é capaz de mudar seletivamente o fenótipo da microglia, prevenindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores neurotóxicos, sem evitar um aumento da liberação de fatores neurotróficos induzidos pela hipóxia (Lai e Todd, 2006).

No modelo de hipóxia-isquemia neonatal, a administração de doses de 45 mg/kg de minociclina imediatamente antes ou imediatamente após a hipóxia foram capazes de reduzir a lesão no hipocampo, no córtex e no estriado, diminuindo a ativação da caspase 3 no córtex e no hipocampo. Já doses de 22.5 mg/kg imediatamente antes ou de 45 mg/kg 3 horas após a hipóxia não foram capazes de diminuir a lesão nessas regiões, mostrando que existe uma janela terapêutica para que o tratamento seja eficaz e que doses baixas de minociclina não resultam em efeito neuroprotetor (Arvin *et al.*, 2002). Também já foi demonstrado que a administração de minociclina (em doses de 50 mg/kg), imediatamente após a lesão e em intervalos de 12 horas por mais 4 dias, reduziu a desmielinização e a ativação da microglia na substância branca em animais hipóxico-isquêmicos (Lechpammer *et al.*, 2008).

No entanto, o uso de minociclina em neonatos ainda permanece controverso. Historicamente, este antibiótico não é utilizado em mulheres grávidas ou crianças,

por se ligar ao fosfato de cálcio, sendo seletivamente incorporado aos ossos e dentes em formação. Mesmo após breves períodos de administração, principalmente após a décima quarta semana de gestação, pode causar hipoplasia do esmalte dentário, deixar uma coloração marrom nos dentes permanentemente e aumentar a susceptibilidade a cáries. Pode ainda interromper temporariamente o crescimento ósseo e evitar a ligação da bilirrubina à albumina plasmática em neonatos, causando lesão neurológica induzida pela bilirrubina (Buller *et al.*, 2009). Além disso, a dose utilizada para seu efeito antibiótico em humanos é de cerca de 3 mg/kg/dia. Os estudos em modelos pré-clínicos de hipóxia-isquemia neonatal em ratos utilizaram doses entre 45 e 100 mg/kg/dia para obter efeitos neuroprotetores, ou seja, doses pelo menos 9 vezes maiores do que a usada atualmente em humanos. Como a minociclina apresenta uma meia-vida de 17 horas em humanos, enquanto em roedores sua meia-vida é bem menor, cerca de 3 horas, ainda é possível que doses menores em humanos possam oferecer a mesma proteção observada nos modelos pré-clínicos. No entanto, doses de 45 ou 135 mg/kg/dia agravaram a lesão hipóxico-isquêmica em camundongos, mostrando haver uma possível variação espécie-específica entre a dose e o efeito observado (Tsuji *et al.*, 2004). Outra limitação seria a janela terapêutica para sua utilização, já que o efeito neuroprotetor foi observado apenas quando a droga foi administrada imediatamente após a hipóxia, mas não quando administrada após 3 horas (Arvin *et al.*, 2002). Dessa forma a possível utilização da minociclina na encefalopatia hipóxico-isquêmica ainda permanece controversa em função de seu potencial efeito tóxico em neonatos.

O efeito anti-inflamatório que observamos no córtex após o tratamento com as células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano foi bastante semelhante ao da minociclina. O tratamento com as células reduziu o número de células expressando o antígeno ED1 no córtex ipsilateral à isquemia, 7 dias após a lesão. Como a proteína ED1 está envolvida na fagocitose e sua expressão está relacionada a um estado de ativação das células microgliais, nossos resultados indicam que a terapia celular apresentou um efeito anti-inflamatório no córtex, reduzindo a ativação da microglia na fase subaguda da hipóxia-isquemia neonatal.

Em função destes resultados positivos e do fato de que os potenciais efeitos adversos de um transplante intravenoso autólogo de células mononucleares do sangue de cordão umbilical humano serem praticamente nulos, é possível que essa terapia celular possa ser mais segura do que a possível utilização de doses elevadas de minociclina em recém-nascidos.

No entanto, ao contrário do efeito mais generalizado que foi observado com a minociclina nos estudos pré-clínicos, o tratamento com as células do sangue de cordão umbilical levou a um efeito mais localizado, ocorrendo apenas no córtex.

É possível que o fenótipo das células microgliais não seja o mesmo nas diferentes áreas analisadas e que o efeito anti-inflamatório induzido pelo tratamento com as células do sangue de cordão possa ser específico ou intenso o suficiente para causar a modulação de apenas uma determinada subpopulação de células microgliais. Dando suporte a essa hipótese, já foi relatado que células microgliais isoladas de diferentes regiões do cérebro de ratos recém-nascidos (do córtex, diencéfalo, cerebelo, hipocampo e tegmento) e mantidas em cultura, expressaram

de forma diferenciada alguns genes envolvidos na inflamação, como a citocina TNF- α e a molécula CD4 (Ren *et al.*, 1999).

Além disso, a microglia já se encontra em um estado basal de ativação em determinadas regiões do cérebro em desenvolvimento. A expressão de ED1, por exemplo, já foi demonstrada na microglia presente na substância branca de ratos entre P7 e P13, mesmo em condições fisiológicas (Lechpammer *et al.*, 2008). Em humanos, a presença de células expressando ED1 na zona ventricular e no corpo caloso já foi descrita em fetos entre 12 e 17 semanas de gestação (Rezaie *et al.*, 2005). É possível que a microglia participe, por exemplo, do processo de eliminação de axônios no corpo caloso, um processo que é fundamental para a correta formação do sistema visual (Rochefort *et al.*, 2002). Nossos dados também mostraram que a expressão de ED1 ocorria bilateralmente na SVZ e na cápsula externa, 7 dias após a lesão (ou seja, em animais com 15 dias de vida), enquanto no córtex e no estriado a expressão de ED1 se restringiu ao hemisfério ipsilateral à isquemia. Dessa forma, as células microgлияis da SVZ e da cápsula externa já se encontram ativadas no cérebro em desenvolvimento, representando mais uma diferença regional no fenótipo dessas células.

Outra evidência das diferenças regionais da microglia no cérebro em desenvolvimento foi descrita por Elkabes e colaboradores (1996). Nesse trabalho, foi observado que a expressão do fator trófico NT-3 nas células microgлияis de ratos P10 se limitava ao córtex e ao *globus pallidus*, não ocorrendo nas meninges, na cápsula externa e na zona subventricular, ou seja, em regiões onde a microglia se encontra ativada durante o desenvolvimento pós-natal. Além disso, as células microgлияis não expressavam NT-3 (neurotrofina 3) nos animais adultos.

A ativação da microglia é controlada por duas classes de sinais, chamados de “On” e “Off”. Os sinais “Off” são expressos de forma constitutiva no SNC em condições fisiológicas e quando desaparecem provocam a ativação das células microgлияis. Já os sinais “On” são produzidos apenas em determinadas situações (por neurônios em apoptose, por exemplo) e induzem a ativação da microglia, podendo ser pró- ou anti-inflamatórios (Biber *et al.*, 2007). É possível que na SVZ e na cápsula externa seja mais difícil obter os sinais “On” (ou a ausência de sinais “Off”) que induzem a ativação da microglia e que já estão presentes (ou ausentes) antes mesmo da lesão hipóxico-isquêmica.

Outra possibilidade é que o padrão temporal de ativação da microglia não seja o mesmo em diferentes áreas. Como só avaliamos o efeito da terapia celular 7 após o tratamento, podemos não ter observado um efeito anti-inflamatório no estriado, na SVZ e/ou na cápsula externa em outras janelas de tempo.

Recentemente foi demonstrado que a co-cultura de células do sangue de cordão umbilical humano com células microgлияis reduziu a sobrevivência da microglia em condições de hipóxia. Linfócitos B e monócitos/macrófagos foram responsáveis por esse efeito. Por outro lado, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ aumentaram a sobrevivência de células microgлияis, tanto em normóxia, quanto em hipóxia (Jiang *et al.*, 2009).

No entanto, nossos resultados sugerem que houve uma modulação do fenótipo da microglia e não a indução da morte dessas células pelo tratamento. Embora não tenhamos quantificado o número de células Iba1⁺ (ou seja, o número total de macrófagos/microglia), a análise qualitativa da co-expressão de ED1 e Iba1

demonstrou que embora tenha havido uma redução praticamente total do número de células ED1⁺ em alguns animais, o tratamento aparentemente não reduziu, ou pelo menos não reduziu de forma proporcional, o número total de células microgliais (Iba1⁺). Resultados semelhantes foram observados recentemente em um trabalho que injetou células mononucleares do sangue de cordão umbilical 48 horas após a indução da isquemia em animais adultos. Esse tratamento reduziu a ativação de células microgliais, que mudaram de um formato amebóide, indicativo de ativação, para uma morfologia ramificada (característica das células residentes em estado não-ativado) 72 horas após a lesão, ou seja, um efeito no fenótipo e não na sobrevivência dessas células (Leonardo *et al.*, 2009).

Também já foi demonstrada uma redução nos níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-2 e TNF- α e nos níveis das proteínas TNF- α e IL-1 β no hemisfério ipsilateral à isquemia, em animais adultos que receberam uma injeção sistêmica de células da fração mononuclear de cordão umbilical humano. Além disso, o número de células inflamatórias (CD45⁺/CD11b⁺ e CD45⁺/B220⁺) infiltrando o cérebro isquêmico foi menor nos animais tratados (Vendrame *et al.*, 2005). Dessa forma, um efeito anti-inflamatório associado ao tratamento com as células do sangue de cordão umbilical parece ser importante para a melhora funcional dos animais.

Existem pelo menos três possíveis mecanismos que podem explicar esse efeito anti-inflamatório, os quais podem ocorrer em conjunto, ou isoladamente:

- 1) um efeito parácrino no córtex, através da liberação de fatores por células que migraram para o parênquima, ou de fatores liberados no sangue, modulando diretamente as células microgliais;

- 2) um efeito parácrino indireto, causado pela regulação da expressão de sinais “*On*” ou “*Off*” pelos neurônios, por astrócitos ou mesmo por outras células inflamatórias que infiltraram o parênquima após a lesão;
- 3) um efeito imunomodulador periférico, em órgãos linfóides secundários, por exemplo, modulando o processo inflamatório sistêmico.

O efeito poderia também ocorrer de forma secundária, como consequência de um efeito neuroprotetor, pois um menor número de neurônios em degeneração levaria a uma menor ativação da microglia. No entanto, esse não foi o caso, já que na fase aguda da lesão não observamos um efeito neuroprotetor do transplante celular no córtex.

Em relação às duas primeiras hipóteses, a produção de fatores tróficos e citocinas por células do sangue de cordão umbilical pode ter ocorrido diretamente no cérebro, ou na circulação. Como em nosso trabalho raras células foram encontradas no córtex e no estriado, é mais provável que a liberação desses fatores na circulação seja mais importante do que a produção no parênquima cerebral. O trabalho de Yasuhara e colaboradores (2009) também dá suporte a essa hipótese, ao verificar que apesar de poucas células transplantadas terem sido encontradas no córtex e no hipocampo, houve um aumento dos níveis dos fatores tróficos BDNF, NGF (fator de crescimento de nervos, do inglês *nerve growth factor*) e GDNF no cérebro dos animais tratados, 3 dias após o transplante. Além disso, tanto a melhora da função motora quanto os níveis dos fatores tróficos no cérebro, foram ainda maiores nos animais que receberam uma injeção de manitol, uma droga capaz de permeabilizar a barreira hematoencefálica, logo após o transplante. Como o manitol

não provocou um aumento do número de células no cérebro, foi sugerido que essa droga poderia facilitar a entrada no SNC de fatores tróficos liberados na circulação (Yasuhara *et al.*, 2009).

Em relação à terceira hipótese, já foi demonstrado um efeito do transplante de células mononucleares do sangue de cordão umbilical no baço de animais adultos após a oclusão permanente da artéria cerebral média. Houve uma redução das alterações que ocorrem no baço após a isquemia cerebral (uma redução no peso deste órgão e no número de linfócitos T CD8⁺), acompanhada de um aumento nos níveis de IL-10 e IFN- γ e de uma redução nos níveis de TNF- α no baço dos animais tratados (Vendrame *et al.*, 2006).

Produção de Citocinas e Fatores Tróficos por Células Mononucleares do Sangue de Cordão Umbilical:

Um efeito parácrino, através da liberação de fatores tróficos e citocinas pelas células mononucleares do sangue de cordão umbilical possivelmente está associado ao efeito neuroprotetor, ao efeito anti-inflamatório e, conseqüentemente, à melhora funcional que observamos nos animais hipóxico-isquêmicos após o transplante.

O mRNA de diversos fatores tróficos neurais, como BDNF, GDNF, NGF, NT-3 e NT-5, já foram identificados em células da fração mononuclear do sangue de cordão umbilical humano. Além disso, BDNF, NT-4 e NT-5 foram identificados no sobrenadante de culturas dessas células (Fan *et al.*, 2005).

O BDNF já foi descrito como neuroprotetor no modelo de hipóxia-isquemia neonatal de Vannucci, bloqueando a ativação de caspase 3 em neurônios (Han *et al.*, 2000). Além disso, a injeção intracerebroventricular de NGF, iniciada imediatamente antes da oclusão da carótida e mantida por 2 dias, também reduziu de maneira global a lesão cerebral induzida pela hipóxia-isquemia neonatal (Holtzman *et al.*, 1996).

Em um relato de caso, duas crianças de 8 e 13 meses de idade, admitidas em uma unidade de terapia intensiva neonatal após uma parada cardiorrespiratória prolongada, apresentavam um quadro neurológico severo que incluía tetraparesia flácida, ausência de respostas ao ambiente externo e coma. Após 4 meses, essas crianças receberam uma injeção de NGF por 10 dias consecutivos, através de um cateter intraventricular (que havia sido implantado para controle da pressão intracraniana). Após esse período, as crianças apresentaram redução da fraqueza dos membros, recuperaram progressivamente o nível de consciência e passaram a apresentar movimentos espontâneos. Foi também demonstrada uma melhora nos padrões eletroencefalográficos dessas crianças, bem como um aumento da perfusão em algumas regiões do cérebro (Chiaretti *et al.*, 2007). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que essa recuperação ocorreria naturalmente, independente do tratamento.

Também é interessante o papel que os fatores tróficos NGF, NT-3 e BDNF apresentam como sinais “Off” que podem atuar na microglia, reduzindo sua ativação (Biber *et al.*, 2007).

Já em relação ao GDNF, foi demonstrado que o implante de uma cápsula contendo células renais de hamster transfectadas com esse fator, dois dias antes da indução da hipóxia-isquemia, reduziu o volume de lesão de maneira global. O tálamo, o córtex, o hipocampo e o estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia, apresentaram lesões menos severas nos animais que receberam o implante com células transfectadas. Além disso, houve um aumento da concentração plasmática de GDNF, 7 dias após a lesão. Por fim, uma análise histológica revelou que as células transfectadas permaneciam vivas no momento em que o implante foi retirado, sugerindo que a liberação desse fator ocorreu de forma crônica (Katsuragi *et al.*, 2005).

A produção de citocinas por células da fração mononuclear do sangue de cordão também já foi avaliada. Após 10 dias em cultura, diversas citocinas foram encontradas no meio de cultura, entre elas a IL-8 (interleucina 8), uma α -quimocina. Outra quimocina encontrada, a MCP-1, é um fator de atração de monócitos e possui também a capacidade de induzir a migração de células-tronco neurais de rato, *in vitro* (Newman *et al.*, 2006).

Foi também demonstrado a produção de VEGF, o fator de crescimento de endotélio vascular, por essas células. Além do seu papel clássico na indução da angiogênese, através da interação com receptores do tipo tirosina-cinase nas células endoteliais, vários trabalhos recentes têm atribuído um efeito neurotrófico e neuroprotetor a esse fator. Este fator possui a capacidade de estimular a neurogênese, tanto no hipocampo como na SVZ de ratos adultos, *in vivo* (Jin *et al.*, 2002). Além disso, este fator foi considerado neuroprotetor em diversos modelos de lesão do SNC, como na morte de células ganglionares da retina após axotomia (Kilic

et al., 2006), e em modelos *in vitro* de hipóxia e privação de glicose utilizando células da linhagem HN33 (derivada da fusão de neurônios hipocâmpais de camundongo com células de neuroblastoma) e neurônios corticais (Kun *et al.*, 2000). É capaz, ainda, de promover a extensão axonal e a sobrevivência de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos, em cultura (Sondell *et al.*, 1999). Recentemente, foi demonstrado que o VEGF apresentou um efeito neuroprotetor dose-dependente, quando injetado 5 minutos após a reoxigenação, em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal (Feng *et al.*, 2008).

É possível que o próprio evento de hipóxia possa modular a produção de VEGF pelas células do sangue. Já foi observado um aumento dos níveis de VEGF no sangue de cordão umbilical de crianças que sofreram asfixia perinatal e esse aumento foi ainda maior nas crianças diagnosticadas com encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (Aly *et al.*, 2009). No entanto, não foi avaliada a origem do VEGF circulante, que pode ter sido secretado pelas células sanguíneas ou pode ter sido produzido no cérebro ou algum outro órgão, sendo posteriormente liberado na circulação.

Translação Clínica e Possível Associação com Outras Terapias:

A intervenção que tem se mostrado mais eficaz até o momento é a hipotermia prolongada (24-72 h). Uma revisão recente avaliou os dados de 5 estudos clínicos que realizaram hipotermia como uma estratégia de neuroproteção, analisando um total de 552 pacientes avaliados até 18-22 meses de idade. De modo geral, foi verificado que a hipotermia se associou a um melhor prognóstico e a uma menor

mortalidade, reduzindo a incidência de sequelas neurológicas. Um dos estudos clínicos mostrou também que o subgrupo que mais se beneficiou desse tratamento foi aquele com alterações eletroencefalográficas menos severas (Schulzke *et al.*, 2007). No entanto, embora os resultados sejam animadores, os benefícios ainda são limitados e, no futuro, a associação de hipotermia com alguma outra terapia talvez seja uma opção para uma neuroproteção mais completa. Dessa forma, seria interessante testar de que forma a hipotermia influenciaria uma terapia celular com células do sangue de cordão umbilical em um estudo pré-clínico.

No momento, existe um estudo clínico fase I em andamento, analisando a segurança e a exequibilidade do tratamento com células do sangue de cordão umbilical para crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, na Universidade de Duke (Carolina do Norte, EUA). Neste estudo será realizado um transplante autólogo em crianças com até 14 dias de vida, que serão acompanhadas através de exames neurológicos e de neuroimagem por 12 meses (ClinicalTrials.gov identificador número NCT00593242).

Em relação à dose, serão feitas de 1 a 4 injeções de 2×10^7 células/kg, de acordo com o número de células disponíveis para cada paciente, ou seja, uma dose máxima de 8×10^4 células/g, que é praticamente metade da dose utilizada em nosso estudo ($1,5 \times 10^5$ células/g).

A dose que utilizamos poderia facilmente ser utilizada em um estudo clínico. Como o peso médio ao nascer é de cerca de 3200 g (Nascimento *et al.*, 2001), seriam necessárias $4,8 \times 10^8$ células para o tratamento de uma criança. Esse

número pode ser obtido da maioria das amostras de sangue de cordão umbilical e não representaria um obstáculo para o tratamento.

No entanto, o estudo de Yasuhara e colaboradores (2009) encontrou uma melhora funcional nos animais que receberam uma dose bem menor de células (cerca de $1,1 \times 10^3$ células/g). Dessa forma, novos estudos pré-clínicos são necessários para se determinar a dose que se associa a um melhor efeito terapêutico.

Resposta das Células da Medula Óssea à Hipóxia-Isquemia Neonatal:

O aumento no número de células CD34⁺ e CD133⁺ que observamos na medula óssea dos animais hipóxico-isquêmicos 2 dias após a lesão pode estar relacionado a mecanismos de reparo e regeneração.

Em humanos, já foi demonstrado que ocorre um aumento no número de células CD34⁺ no sangue periférico, nas primeiras 24 horas e até 6 dias após o início dos sintomas de um acidente vascular cerebral isquêmico (Paczkowska *et al.*, 2005). Também já foi relatado que os pacientes com um maior aumento no número de células CD34⁺ circulantes (> 15.000 células / mL nos primeiros 14 dias) apresentaram uma maior recuperação neurológica do que os pacientes que mobilizaram um número menor de células, quando avaliados 3 meses após o acidente vascular cerebral (Dunac *et al.*, 2007).

Um possível envolvimento dessas células na formação de novos vasos foi sugerido em dois estudos que quantificaram o número de células CD34⁺ circulantes

em pacientes com oclusão (ou estenose severa) da porção supraclínóide da artéria carótida interna ou da porção proximal da artéria cerebral média. Nesse grupo de pacientes, foi observada uma correlação direta entre o número de células CD34⁺ (e de células CD133⁺) no sangue periférico e o fluxo sanguíneo cerebral em áreas de hipoperfusão crônica (Taguchi, 2004). Posteriormente, foi verificado que apenas os pacientes com evidências angiográficas de neovascularização acelerada nas regiões próximas à oclusão apresentavam um número maior de células CD34⁺ circulantes (Yoshihara *et al.*, 2008).

O papel das células CD34⁺ na manutenção da função neurológica também já foi demonstrado em pacientes com histórico de acidente vascular cerebral. No momento em que foram incluídos no estudo, em média cerca de 4 anos após o último evento isquêmico, os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com o número de CD34⁺ no sangue. Foi demonstrado que aqueles com um menor número de células CD34⁺ circulantes apresentaram um maior declínio da função neurológica ao serem avaliados 1 ano após a inclusão no estudo, quando comparados aos pacientes com um número maior de células CD34⁺ (Taguchi *et al.*, 2009).

Já em pacientes com demência vascular, foi observada uma redução no número de células CD34⁺ circulantes, que não foi verificado em pacientes com déficits cognitivos associados a outras causas, como a doença de Alzheimer (Taguchi *et al.*, 2008).

Dessa forma, a mobilização de células CD34⁺ e CD133⁺ pode contribuir para a formação de novos vasos e para a manutenção da homeostase cerebrovascular

após um evento isquêmico agudo ou em situações de hipoperfusão crônica. Quando essa mobilização é comprometida, pode ocorrer uma maior deterioração da função neurológica.

Além do efeito na manutenção do fluxo sanguíneo cerebral, é possível que os mecanismos de angiogênese e neovascularização influenciem outros processos regenerativos do cérebro, como a neurogênese. As células-tronco/progenitoras neurais residem em uma área altamente vascularizada e se encontram bem próximas ou mesmo em contato com os vasos sanguíneos (Shen *et al.*, 2008). Além disso, as células endoteliais liberam fatores solúveis que regulam a proliferação e diferenciação de células-tronco/progenitoras neurais *in vitro* (Shen *et al.*, 2004). O fator derivado de epitélio pigmentado (PEDF, do inglês pigment epithelium-derived factor), secretado por células endoteliais e por células endoteliais, é um dos fatores envolvidos nessa interação entre o endotélio vascular e as células-tronco/progenitoras neurais, estimulando mecanismos de auto-renovação e mantendo as células B indiferenciadas (Ramírez-Castillejo *et al.*, 2006). Assim, é possível que, indiretamente, as células CD34⁺ contribuam para mecanismos de neurogênese após eventos isquêmicos.

Nesse sentido, já foi relatado que o transplante de células CD34⁺ do sangue de cordão umbilical humano aumentou o número de células endoteliais em proliferação, assim como o número de novos vasos no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria cerebral média de camundongos. Os animais tratados também apresentaram um menor número de células em apoptose no córtex, assim como um número maior de neuroblastos migrando da SVZ para a área de lesão. Além disso, caso os animais fossem tratados com a droga anti-angiogênica endostatina após o

transplante celular, havia uma redução de cerca de 20% na proliferação de células endoteliais, acompanhada de uma redução na migração de neuroblastos, sugerindo que o efeito das células CD34⁺ na neurogênese estava relacionado à angiogênese. No entanto, não podemos descartar um possível efeito da endostatina diretamente nas células-tronco/progenitoras neurais ou nos neuroblastos (Taguchi *et al.*, 2004). Ainda em relação a esse trabalho, é possível que a formação de novos vasos tenha ocorrido diretamente, pela diferenciação de células progenitoras endoteliais (que expressam CD34), em um processo de vasculogênese, ou tenha sido estimulada pela liberação de fatores angiogênicos pelas células CD34⁺ (como o VEGF). Em relação a essa última hipótese, já foi relatado que células CD34⁺ obtidas do sangue periférico e da medula óssea humana possuem um papel importante na regulação da hematopoiese de forma parácrina, através da liberação de diversos fatores, como a trombopoietina e o IGF-1. Também foi observado que os fatores angiogênicos VEGF, FGF-2, HGF e IL-8 estavam presentes no meio condicionado obtido a partir da cultura dessas células, o qual aumentou a proliferação de células endoteliais *in vitro* (Majka *et al.*, 2001).

Além disso, células derivadas da medula óssea apresentam um efeito neuroprotetor quando injetadas em diversos modelos de acidente vascular cerebral em animais adultos (Mendez-Otero *et al.*, 2007). Nosso grupo já demonstrou que a injeção intra-arterial de células da fração mononuclear da medula óssea é capaz de promover uma redução da assimetria na utilização das patas anteriores no teste do cilindro em um modelo de isquemia focal em ratos adultos (Giraldi-Guimarães *et al.*, 2009). Também já foi demonstrado que células da fração mononuclear da medula óssea injetadas na artéria cerebral média de pacientes na fase subaguda do

acidente vascular cerebral (entre 59 e 82 dias) se localizam preferencialmente no hemisfério afetado pela isquemia, indicando que estas células apresentam um tropismo pelas regiões isquêmicas (Barbosa da Fonseca *et al.*, 2009).

Uma linhagem de células multipotentes progenitoras adultas da medula óssea já foi transplantada em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal. Foi demonstrado que tanto a injeção intrahipocampal como a intravenosa, 7 dias após a lesão, foram capazes de promover uma redução equivalente da morte neuronal na região CA3 do hipocampo, bem como uma melhora na performance motora dos animais tratados. A substituição de células perdidas não parece ter sido o principal mecanismo responsável pelos efeitos observados, uma vez que apenas um pequeno número das células injetadas foi encontrado no hipocampo expressando o marcador neuronal NeuN (Yasuhara *et al.*, 2008).

Células da medula óssea podem também ser mobilizadas para o sangue periférico através da injeção sistêmica de G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*), resultando em uma redução da lesão em modelos de isquemia em animais adultos. Esta droga, atualmente, está sendo testada em estudos clínicos fase I/II de acidente vascular cerebral. No entanto, já foi demonstrado que neurônios apresentam o receptor para o G-CSF, de forma que é possível que exista um efeito neuroprotetor direto, não mediado pelas células mobilizadas da medula óssea (England *et al.*, 2009). Em um modelo de hipóxia-isquemia neonatal, a administração de G-CSF também levou a um efeito neuroprotetor, reduzindo a apoptose nos animais tratados, em dois estudos independentes (Yata *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

Assim, nosso resultado de que existe um aumento no número de células CD34⁺ e CD133⁺ na medula óssea na fase aguda da hipóxia-isquemia neonatal, levanta várias questões. No futuro, pretendemos verificar quais são os mecanismos envolvidos nesse efeito e se essas células são capazes de migrar para as áreas isquêmicas do cérebro. Também pretendemos analisar o potencial neuroprotetor e angiogênico dessas células. É possível que a mobilização dessas células seja uma tentativa endógena de neuroproteção e regeneração, de forma que estratégias de manipulação dessa migração podem apresentar um grande potencial terapêutico.

Dados de nosso laboratório, em colaboração com o Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz, indicam que a mobilização de células CD34⁺, expressando o receptor CXCR4⁺ para o sangue periférico, também ocorre em recém-nascidos após a asfixia perinatal (Magalhães et al., em preparação). Dessa forma, torna-se interessante analisar se essa mobilização se correlaciona com o prognóstico dessas crianças, uma vez que existe um amplo espectro de possíveis sequelas neurológicas relacionadas à encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal, que podem variar em gravidade. Podem ocorrer, por exemplo, déficits auditivos, desordens de aprendizado, alterações na coordenação motora, atraso global no desenvolvimento neurológico, retardo mental, convulsões, e déficits motores, sendo paralisia cerebral a sequela motora mais grave.

Este amplo espectro de possíveis sequelas reflete possíveis variações no momento em que ocorre o evento hipóxico-isquêmico, em sua intensidade e duração, bem como em características individuais que podem resultar em uma maior ou menor susceptibilidade à lesão ou em diferenças na capacidade de adaptação, plasticidade e regeneração.

Um marcador biológico ideal deve ser facilmente medido logo após o nascimento, se correlacionando com a extensão da lesão, além de identificar o prognóstico mais provável para cada criança, selecionando aquelas que necessitam de alguma intervenção. Assim, a identificação das crianças com risco de desenvolver sequelas contribuiria para um melhor aconselhamento, bem como para a indicação da terapia mais adequada para cada criança.

6 CONCLUSÕES:

- O modelo de hipóxia-isquemia neonatal de Rice-Vannucci resultou em uma lesão extensa no hemisfério ipsilateral à isquemia, incluindo o córtex, o hipocampo, o estriado e a cápsula externa.
- No estriado e no córtex a morte celular ocorreu principalmente através da ativação da enzima caspase-3. Axônios expressando a enzima caspase-3 ativada também foram encontrados na substância branca do estriado e na cápsula externa.
- O transplante intraperitoneal das células do sangue de cordão umbilical humano resultou na migração de raras células para o córtex e para o estriado do hemisfério ipsilateral à isquemia e a quimiocina SDF-1 possivelmente está envolvida na migração dessas células.
- Os animais hipóxico-isquêmicos apresentaram uma redução do peso corporal em P9, em comparação aos animais falso-operados, e o tratamento com as células mononucleares do sangue de cordão umbilical não alterou essa perda ponderal.
- A hipóxia-isquemia neonatal levou a um atraso no desenvolvimento dos reflexos neonatais de geotaxia negativa e de aversão ao precipício. Os animais que receberam a terapia celular mantiveram esses reflexos preservados, apresentando um desempenho semelhante aos animais falso-operados.

- O tratamento com as células do sangue de cordão umbilical levou a um efeito neuroprotetor no estriado dos animais hipóxico-isquêmicos, embora não tenha alterado a morte neuronal no córtex e no hipocampo.
- Esse efeito neuroprotetor foi acompanhado de uma menor ativação da enzima caspase-3 no estriado dos animais tratados.
- A hipóxia-isquemia neonatal resultou em uma ativação de astrócitos no córtex, no estriado e na cápsula externa do hemisfério ipsilateral à isquemia e esse processo de gliose reativa não foi alterado pela terapia celular.
- A resposta das células gliais à lesão hipóxico-isquêmica também incluiu a ativação da microglia na zona subventricular, no córtex, no estriado e na cápsula externa. A terapia celular levou a uma redução da ativação das células microgliais no córtex ipsilateral à isquemia, em comparação aos animais não tratados.
- Por fim, ocorreu uma resposta da medula óssea à hipóxia-isquemia neonatal, caracterizada por um aumento do número de células CD34⁺ e CD133⁺ na fase aguda da lesão. Um possível envolvimento dessas células em mecanismos de reparo ou regeneração ainda permanece desconhecido.

7 BIBLIOGRAFIA:

ADHAMI, F., YU, D., YIN, W., SCHLOEMER, A., BURNS, K. A., LIAO, G., DEGEN, J. L., CHEN, J. e KUAN, C. Y. **Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia.** Am J Pathol, v.172, n.6, p.1704-1716. 2008.

ALMLI, C. R., LEVY, T. J., HAN, B. H., SHAH, A. R., GIDDAY, J. M. e HOLTZMAN, D. M. **BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia.** Exp Neurol, v.166, n.1, p.99-114. 2000.

ALVAREZ-DOLADO, M., PARDAL, R., GARCIA-VERDUGO, J. M., FIKE, J. R., LEE, H. O., PFEFFER, K., LOIS, C., MORRISON, S. J. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes.** Nature, v.425, n.6961, p.968-973. 2003.

ALY, H., HASSANEIN, S., NADA, A., MOHAMED, M. H., ATEF, S. H. e ATIEA, W. **Vascular endothelial growth factor in neonates with perinatal asphyxia.** Brain Dev, v.31, n.8, p.600-604. 2009.

ARVIN, K. L., HAN, B. H., DU, Y., LIN, S. Z., PAUL, S. M. e HOLTZMAN, D. M. **Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury.** Ann Neurol, v.52, n.1, p.54-61. 2002.

ASAHARA, T. **Cell therapy and gene therapy using endothelial progenitor cells for vascular regeneration.** Handb Exp Pharmacol, n.180, p.181-194. 2007.

ASHEUER, M., PFLUMIO, F., BENHAMIDA, S., DUBART-KUPPERSCHMITT, A., FOUQUET, F., IMAI, Y., AUBOURG, P. e CARTIER, N. **Human CD34+ cells**

differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.10, p.3557-3562. 2004.

AUFFRAY, C., FOGG, D., GARFA, M., ELAIN, G., JOIN-LAMBERT, O., KAYAL, S., SARNACKI, S., CUMANO, A., LAUVAU, G. e GEISSMANN, F. **Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior.** Science, v.317, n.5838, p.666-670. 2007.

AUFFRAY, C., SIEWEKE, M. H. e GEISSMANN, F. **Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells.** Annu Rev Immunol, v.27, p.669-692. 2009.

BACK, S. A., HAN, B. H., LUO, N. L., CHRICTON, C. A., XANTHOUDAKIS, S., TAM, J., ARVIN, K. L. e HOLTZMAN, D. M. **Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia.** J Neurosci, v.22, n.2, p.455-463. 2002.

BACK, S. A., RIDDLE, A. e MCCLURE, M. M. **Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth.** Stroke, v.38, n.2 Suppl, p.724-730. 2007.

BADAWI, N., KURINCZUK, J. J., KEOGH, J. M., ALESSANDRI, L. M., O'SULLIVAN, F., BURTON, P. R., PEMBERTON, P. J. e STANLEY, F. J. **Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study.** BMJ, v.317, n.7172, p.1554-1558. 1998.

BADAWI, N., KURINCZUK, J. J., KEOGH, J. M., ALESSANDRI, L. M., O'SULLIVAN, F., BURTON, P. R., PEMBERTON, P. J. e STANLEY, F. J. **Antepartum risk factors**

for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. BMJ, v.317, n.7172, p.1549-1553. 1998.

BARBOSA DA FONSECA, L. M., BATTISTELLA, V., DE FREITAS, G. R., GUTFILEN, B., DOS SANTOS GOLDENBERG, R. C., MAIOLINO, A., WAJNBERG, E., ROSADO DE CASTRO, P. H., MENDEZ-OTERO, R. e ANDRE, C. **Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in a patient with chronic stroke.** Circulation, v.120, n.6, p.539-541. 2009.

BARNABE, G. F., SCHWINDT, T. T., CALCAGNOTTO, M. E., MOTTA, F. L., MARTINEZ, G., JR., DE OLIVEIRA, A. C., KEIM, L. M., D'ALMEIDA, V., MENDEZ-OTERO, R. e MELLO, L. E. **Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties.** PLoS One, v.4, n.4, p.e5222. 2009.

BARTHA, A. I., FOSTER-BARBER, A., MILLER, S. P., VIGNERON, D. B., GLIDDEN, D. V., BARKOVICH, A. J. e FERRIERO, D. M. **Neonatal encephalopathy: association of cytokines with MR spectroscopy and outcome.** Pediatr Res, v.56, n.6, p.960-966. 2004.

BARTLEY, J., SOLTAU, T., WIMBORNE, H., KIM, S., MARTIN-STUDDARD, A., HESS, D., HILL, W., WALLER, J. e CARROLL, J. **BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury.** BMC Neurosci, v.6, p.15. 2005.

BERGER, R., GARNIER, Y. e JENSEN, A. **Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies.** J Soc Gynecol Investig, v.9, n.6, p.319-328. 2002.

BIBER, K., NEUMANN, H., INOUE, K. e BODDEKE, H. W. **Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia.** Trends Neurosci, v.30, n.11, p.596-602. 2007.

BLOMGREN, K. e HAGBERG, H. **Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain.** Free Radic Biol Med, v.40, n.3, p.388-397. 2006.

BONA, E., ANDERSSON, A. L., BLOMGREN, K., GILLAND, E., PUKA-SUNDBALL, M., GUSTAFSON, K. e HAGBERG, H. **Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats.** Pediatr Res, v.45, n.4 Pt 1, p.500-509. 1999.

BORLONGAN, C. V., HADMAN, M., SANBERG, C. D. e SANBERG, P. R. **Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke.** Stroke, v.35, n.10, p.2385-2389. 2004.

BRAZEL, C. Y., NUNEZ, J. L., YANG, Z. e LEVISON, S. W. **Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone.** Neuroscience, v.131, n.1, p.55-65. 2005.

BULLER, K. M., CARTY, M. L., REINEBRANT, H. E. e WIXEY, J. A. **Minocycline: a neuroprotective agent for hypoxic-ischemic brain injury in the neonate?** J Neurosci Res, v.87, n.3, p.599-608. 2009.

BUTOVSKY, O., ZIV, Y., SCHWARTZ, A., LANDA, G., TALPALAR, A. E., PLUCHINO, S., MARTINO, G. e SCHWARTZ, M. **Microglia activated by IL-4 or**

IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. Mol Cell Neurosci, v.31, n.1, p.149-160. 2006.

CANADAY, D. H., CHAKRAVARTI, S., SRIVASTAVA, T., TISCH, D. J., CHERUVU, V. K., SMIALEK, J., HARDING, C. V. e RAMACHANDRA, L. **Class II MHC antigen presentation defect in neonatal monocytes is not correlated with decreased MHC-II expression.** Cell Immunol, v.243, n.2, p.96-106. 2006.

CARDENAS, A., MORO, M. A., HURTADO, O., LEZA, J. C. e LIZASOAIN, I. **Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis.** Brain Res Brain Res Rev, v.50, n.1, p.1-6. 2005.

CHAN, W. Y., KOHSAKA, S. e REZAIE, P. **The origin and cell lineage of microglia: new concepts.** Brain Res Rev, v.53, n.2, p.344-354. 2007.

CHIARETTI, A., ANTONELLI, A., GENOVESE, O., FERNANDEZ, E., GIUDA, D., MARIOTTI, P. e RICCARDI, R. **Intraventricular nerve growth factor infusion improves cerebral blood flow and stimulates doublecortin expression in two infants with hypoxic-ischemic brain injury.** Neurol Res, v.30, n.3, p.223-228. 2008.

CHUNG, D. J., CHOI, C. B., LEE, S. H., KANG, E. H., LEE, J. H., HWANG, S. H., HAN, H., LEE, J. H., CHOE, B. Y., LEE, S. Y. e KIM, H. Y. **Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia.** J Neurosci Res, v.87, n.16, p.3554-3567. 2009.

COSTA, M. R., BUCHOLZ, O., SCHROEDER, T. e GOTZ, M. **Late origin of glia-restricted progenitors in the developing mouse cerebral cortex.** Cereb Cortex, v.19 Suppl 1, p.i135-143. 2009.

COVEY, M. V. e LEVISON, S. W. **Leukemia inhibitory factor participates in the expansion of neural stem/progenitors after perinatal hypoxia/ischemia.** Neuroscience, v.148, n.2, p.501-509. 2007.

COWAN, F., RUTHERFORD, M., GROENENDAAL, F., EKEN, P., MERCURI, E., BYDDER, G. M., MEINERS, L. C., DUBOWITZ, L. M. e DE VRIES, L. S. **Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy.** Lancet, v.361, n.9359, p.736-742. 2003.

COWELL, R. M., XU, H., GALASSO, J. M. e SILVERSTEIN, F. S. **Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain.** Stroke, v.33, n.3, p.795-801. 2002.

CRUZ, A. C. S. **Prevalência de asfixia perinatal e encefalopatia hipóxico-isquêmica em recém-nascidos de termo considerando dois critérios diagnósticos e o tipo de assistência obstétrica.** 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L., CAPLAN, A. I. e NARDI, N. B. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** Stem Cells, v.26, n.9, p.2287-2299. 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L., CHAGASTELLES, P. C. e NARDI, N. B. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** J Cell Sci, v.119, n.Pt 11, p.2204-2213. 2006.

DASARI, V. R., VEERAVALLI, K. K., SAVING, K. L., GUJRATI, M., FASSETT, D., KLOPFENSTEIN, J. D., DINH, D. H. e RAO, J. S. **Neuroprotection by cord blood stem cells against glutamate-induced apoptosis is mediated by Akt pathway.** Neurobiol Dis, v.32, n.3, p.486-498. 2008.

DAVALOS, D., GRUTZENDLER, J., YANG, G., KIM, J. V., ZUO, Y., JUNG, S., LITTMAN, D. R., DUSTIN, M. L. e GAN, W. B. **ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo.** Nat Neurosci, v.8, n.6, p.752-758. 2005.

DE PAULA, S., VITOLA, A. S., GREGGIO, S., DE PAULA, D., MELLO, P. B., LUBIANCA, J. M., XAVIER, L. L., FIORI, H. H. e DACOSTA, J. C. **Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells.** Pediatr Res, v.65, n.6, p.631-635. 2009.

DE PINA-BENABOU, M. H., SZOSTAK, V., KYROZIS, A., REMPE, D., UZIEL, D., URBAN-MALDONADO, M., BENABOU, S., SPRAY, D. C., FEDEROFF, H. J., STANTON, P. K. e ROZENTAL, R. **Blockade of gap junctions in vivo provides neuroprotection after perinatal global ischemia.** Stroke, v.36, n.10, p.2232-2237. 2005.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A., DA COSTA REIS, J., DIAZ PAREDES, B., MORAES, L., JASMIN, GIRALDI-GUIMARAES, A. e MENDEZ-OTERO, R.

Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. Brain Res, v.1306, p.149-158, 2010.

DOETSCH, F., CAILLE, I., LIM, D. A., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.** Cell, v.97, n.6, p.703-716. 1999.

DOETSCH, F., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.** J Neurosci, v.17, n.13, p.5046-5061. 1997.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. e HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-317. 2006.

DU, L., BAYIR, H., LAI, Y., ZHANG, X., KOCHANEK, P. M., WATKINS, S. C., GRAHAM, S. H. e CLARK, R. S. **Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway.** J Biol Chem, v.279, n.37, p.38563-38570. 2004.

DUNAC, A., FRELIN, C., POPOLO-BLONDEAU, M., CHATEL, M., MAHAGNE, M. H. e PHILIP, P. J. **Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34+ cell mobilization.** J Neurol, v.254, n.3, p.327-332. 2007.

EDWARDS, A. D., BROCKLEHURST, P., GUNN, A. J., HALLIDAY, H., JUSZCZAK, E., LEVENE, M., STROHM, B., THORESEN, M., WHITELAW, A. e AZZOPARDI, D. **Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data.** Bmj, v.340, p.c363. 2010.

EGUCHI, M., MASUDA, H. e ASAHARA, T. **Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis.** Clin Exp Nephrol, v.11, n.1, p.18-25. 2007.

ELKABES, S., DICICCO-BLOOM, E. M. e BLACK, I. B. **Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function.** J Neurosci, v.16, n.8, p.2508-2521. 1996.

ENGLAND, T. J., GIBSON, C. L. e BATH, P. M. **Granulocyte-colony stimulating factor in experimental stroke and its effects on infarct size and functional outcome: A systematic review.** Brain Res Rev, v.62, n.1, p.71-82. 2009.

ERICES, A., CONGET, P. e MINGUELL, J. J. **Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.** Br J Haematol, v.109, n.1, p.235-242. 2000.

FAN, C. G., ZHANG, Q. J., TANG, F. W., HAN, Z. B., WANG, G. S. e HAN, Z. C. **Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors.** Neurosci Lett, v.380, n.3, p.322-325. 2005.

FATEMI, A., WILSON, M. A. e JOHNSTON, M. V. **Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant.** Clin Perinatol, v.36, n.4, p.835-858. 2009.

FELLING, R. J., SNYDER, M. J., ROMANKO, M. J., ROTHSTEIN, R. P., ZIEGLER, A. N., YANG, Z., GIVOGRI, M. I., BONGARZONE, E. R. e LEVISON, S. W. **Neural**

stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. J Neurosci, v.26, n.16, p.4359-4369. 2006.

FENG, Y., FRATKIN, J. D. e LEBLANC, M. H. **Inhibiting caspase-8 after injury reduces hypoxic-ischemic brain injury in the newborn rat.** Eur J Pharmacol, v.481, n.2-3, p.169-173. 2003.

FENG, Y., RHODES, P. G. e BHATT, A. J. **Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor following hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats.** Pediatr Res, v.64, n.4, p.370-374. 2008.

FERRIERO, D. M. **Neonatal brain injury.** N Engl J Med, v.351, n.19, p.1985-1995. 2004.

FERRIERO, D. M., HOLTZMAN, D. M., BLACK, S. M. e SHELDON, R. A. **Neonatal mice lacking neuronal nitric oxide synthase are less vulnerable to hypoxic-ischemic injury.** Neurobiol Dis, v.3, n.1, p.64-71. 1996.

FOLLETT, P. L., DENG, W., DAI, W., TALOS, D. M., MASSILLON, L. J., ROSENBERG, P. A., VOLPE, J. J. e JENSEN, F. E. **Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate.** J Neurosci, v.24, n.18, p.4412-4420. 2004.

FOLLETT, P. L., ROSENBERG, P. A., VOLPE, J. J. e JENSEN, F. E. **NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter.** J Neurosci, v.20, n.24, p.9235-9241. 2000.

GALIMI, F., SUMMERS, R. G., VAN PRAAG, H., VERMA, I. M. e GAGE, F. H. **A role for bone marrow-derived cells in the vasculature of noninjured CNS.** Blood, v.105, n.6, p.2400-2402. 2005.

GIBSON, M. E., HAN, B. H., CHOI, J., KNUDSON, C. M., KORSMEYER, S. J., PARSADANIAN, M. e HOLTZMAN, D. M. **BAX contributes to apoptotic-like death following neonatal hypoxia-ischemia: evidence for distinct apoptosis pathways.** Mol Med, v.7, n.9, p.644-655. 2001.

GINET, V., PUYAL, J., CLARKE, P. G. e TRUTTMANN, A. C. **Enhancement of autophagic flux after neonatal cerebral hypoxia-ischemia and its region-specific relationship to apoptotic mechanisms.** Am J Pathol, v.175, n.5, p.1962-1974. 2009.

GIRALDI-GUIMARAES, A., REZENDE-LIMA, M., BRUNO, F. P. e MENDEZ-OTERO, R. **Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats.** Brain Res. 2009.

GODFREY, W. R., SPODEN, D. J., GE, Y. G., BAKER, S. R., LIU, B., LEVINE, B. L., JUNE, C. H., BLAZAR, B. R. e PORTER, S. B. **Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function.** Blood, v.105, n.2, p.750-758. 2005.

GRAHAM, E. M., RUIS, K. A., HARTMAN, A. L., NORTHINGTON, F. J. e FOX, H. E. **A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the**

causation of neonatal encephalopathy. Am J Obstet Gynecol, v.199, n.6, p.587-595. 2008.

GRAHAM, E. M., SHELDON, R. A., FLOCK, D. L., FERRIERO, D. M., MARTIN, L. J., O'RIORDAN, D. P. e NORTHINGTON, F. J. **Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury.** Neurobiol Dis, v.17, n.1, p.89-98. 2004.

GUCUYENER, K., ATALAY, Y., ARAL, Y. Z., HASANOGLU, A., TURKYILMAZ, C. e BIBEROGLU, G. **Excitatory amino acids and taurine levels in cerebrospinal fluid of hypoxic ischemic encephalopathy in newborn.** Clin Neurol Neurosurg, v.101, n.3, p.171-174. 1999.

HAGBERG, H., GILLAND, E., BONA, E., HANSON, L. A., HAHIN-ZORIC, M., BLENNOW, M., HOLST, M., MCRAE, A. e SODER, O. **Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats.** Pediatr Res, v.40, n.4, p.603-609. 1996.

HAGBERG, H., MALLARD, C., ROUSSET, C. I. e XIAOYANG, W. **Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria.** J Child Neurol, v.24, n.9, p.1141-1146. 2009.

HAGBERG, H., WILSON, M. A., MATSUSHITA, H., ZHU, C., LANGE, M., GUSTAVSSON, M., POITRAS, M. F., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., NORTHINGTON, F. e JOHNSTON, M. V. **PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury.** J Neurochem, v.90, n.5, p.1068-1075. 2004.

HALLORAN, D. R., MCCLURE, E., CHAKRABORTY, H., CHOMBA, E., WRIGHT, L. L. e CARLO, W. A. **Birth asphyxia survivors in a developing country.** J Perinatol, v.29, n.3, p.243-249. 2009.

HAN, B. H., XU, D., CHOI, J., HAN, Y., XANTHOUDAKIS, S., ROY, S., TAM, J., VAILLANCOURT, J., COLUCCI, J., SIMAN, R., GIROUX, A., ROBERTSON, G. S., ZAMBONI, R., NICHOLSON, D. W. e HOLTZMAN, D. M. **Selective, reversible caspase-3 inhibitor is neuroprotective and reveals distinct pathways of cell death after neonatal hypoxic-ischemic brain injury.** J Biol Chem, v.277, n.33, p.30128-30136. 2002.

HANISCH, U. K. e KETTENMANN, H. **Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.** Nat Neurosci, v.10, n.11, p.1387-1394. 2007.

HAU, S., REICH, D. M., SCHOLZ, M., NAUMANN, W., EMMRICH, F., KAMPRAD, M. e BOLTZE, J. **Evidence for neuroprotective properties of human umbilical cord blood cells after neuronal hypoxia in vitro.** BMC Neurosci, v.9, p.30. 2008.

HAYAKAWA, K., NAKANO, T., IRIE, K., HIGUCHI, S., FUJIOKA, M., ORITO, K., IWASAKI, K., JIN, G., LO, E. H., MISHIMA, K. e FUJIWARA, M. **Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice.** J Cereb Blood Flow Metab. 2009.

HAYASHI, T., IWAI, M., IKEDA, T., JIN, G., DEGUCHI, K., NAGOTANI, S., ZHANG, H., SEHARA, Y., NAGANO, I., SHOJI, M., IKENOUE, T. e ABE, K. **Neural precursor**

cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury.

Brain Res, v.1038, n.1, p.41-49. 2005.

HEDTJARN, M., LEVERIN, A. L., ERIKSSON, K., BLOMGREN, K., MALLARD, C. e HAGBERG, H. **Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury.** J

Neurosci, v.22, n.14, p.5910-5919. 2002.

HEDTJARN, M., MALLARD, C., ARVIDSSON, P. e HAGBERG, H. **White matter injury in the immature brain: role of interleukin-18.** Neurosci Lett, v.373, n.1,

p.16-20. 2005.

HOLTZMAN, D. M., SHELDON, R. A., JAFFE, W., CHENG, Y. e FERRIERO, D. M. **Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic**

injury. Ann Neurol, v.39, n.1, p.114-122. 1996.

HUANG, Z., HUANG, P. L., MA, J., MENG, W., AYATA, C., FISHMAN, M. C. e MOSKOWITZ, M. A. **Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase**

knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J Cereb Blood Flow Metab, v.16, n.5, p.981-987. 1996.

IMITOLA, J., RADDASSI, K., PARK, K. I., MUELLER, F. J., NIETO, M., TENG, Y. D.,

FRENKEL, D., LI, J., SIDMAN, R. L., WALSH, C. A., SNYDER, E. Y. e KHOURY, S.

J. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. Proc Natl Acad

Sci U S A, v.101, n.52, p.18117-18122. 2004.

ISHIDA, A., TRESCHER, W. H., LANGE, M. S. e JOHNSTON, M. V. **Prolonged**

suppression of brain nitric oxide synthase activity by 7-nitroindazole protects

against cerebral hypoxic-ischemic injury in neonatal rat. Brain Dev, v.23, n.5, p.349-354. 2001.

IVACKO, J., SZAFLARSKI, J., MALINAK, C., FLORY, C., WARREN, J. S. e SILVERSTEIN, F. S. **Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain.** J Cereb Blood Flow Metab, v.17, n.7, p.759-770. 1997.

JAN, R. H., WEN, S. H., SHYR, M. H. e CHIANG, B. L. **Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood.** Pediatr Transplant, v.12, n.8, p.868-873. 2008.

JARLESTEDT, K., ROUSSET, C. I., FAIZ, M., WILHELMSSON, U., STAHLBERG, A., SOURKOVA, H., PEKNA, M., MALLARD, C., HAGBERG, H. e PEKNY, M. **Attenuation of reactive gliosis does not affect infarct volume in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice.** PLoS One, v.5, n.4, p.e10397. 2010

JIANG, K., CHEN, Y. e JARVIS, J. N. **Cord blood and adult T cells show different responses to C1q-bearing immune complexes.** Cell Immunol, v.229, n.1, p.62-67. 2004.

JIANG, L., NEWMAN, M., SAPORTA, S., CHEN, N., SANBERG, C., SANBERG, P. R. e WILLING, A. E. **MIP-1alpha and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke.** Curr Neurovasc Res, v.5, n.2, p.118-124. 2008.

JIANG, L., WOMBLE, T., SAPORTA, S., CHEN, N., SANBERG, C. D., SANBERG, P. R. e WILLING, A. E. **Human umbilical cord blood cells decrease microglial survival in vitro.** Stem Cells Dev, v.19, n.2, p.221-228.

JIN, K. L., MAO, X. O. e GREENBERG, D. A. **Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.18, p.10242-10247. 2000.

JIN, K., ZHU, Y., SUN, Y., MAO, X. O., XIE, L. e GREENBERG, D. A. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.18, p.11946-11950. 2002.

JIN-QIAO, S., BIN, S., WEN-HAO, Z. e YI, Y. **Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury.** Brain Dev, v.31, n.5, p.331-340. 2009.

KATSURAGI, S., IKEDA, T., DATE, I., SHINGO, T., YASUHARA, T. e IKENOUE, T. **Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats.** Am J Obstet Gynecol, v.192, n.4, p.1137-1145. 2005.

KAZANIS, I. **The subependymal zone neurogenic niche: a beating heart in the centre of the brain: how plastic is adult neurogenesis? Opportunities for therapy and questions to be addressed.** Brain, v.132, n.Pt 11, p.2909-2921. 2009.

KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLUTER, H. e BIEBACK, K. **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.** Stem Cells, v.24, n.5, p.1294-1301. 2006.

KILIC, U., KILIC, E., JARVE, A., GUO, Z., SPUDICH, A., BIEBER, K., BARZENA, U., BASSETTI, C. L., MARTI, H. H. e HERMANN, D. M. **Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways.** J Neurosci, v.26, n.48, p.12439-12446. 2006.

KIM, B. R., SHIM, J. W., SUNG, D. K., KIM, S. S., JEON, G. W., KIM, M. J., CHANG, Y. S., PARK, W. S. e CHOI, E. S. **Granulocyte stimulating factor attenuates hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting apoptosis in neonatal rats.** Yonsei Med J, v.49, n.5, p.836-842. 2008.

KIM, J. P., LEE, Y. H., LEE, Y. A. e KIM, Y. D. **A comparison of the kinetics of nucleated cells and CD34+ cells in neonatal peripheral blood and cord blood.** Biol Blood Marrow Transplant, v.13, n.4, p.478-485. 2007.

KIM, J. W., KIM, S. Y., PARK, S. Y., KIM, Y. M., KIM, J. M., LEE, M. H. e RYU, H. M. **Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord.** Ann Hematol, v.83, n.12, p.733-738. 2004.

KONING, N., SWAAB, D. F., HOEK, R. M. e HUITINGA, I. **Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions.** J Neuropathol Exp Neurol, v.68, n.2, p.159-167. 2009.

KUIDA, K., HAYDAR, T. F., KUAN, C. Y., GU, Y., TAYA, C., KARASUYAMA, H., SU, M. S., RAKIC, P. e FLAVELL, R. A. **Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9.** Cell, v.94, n.3, p.325-337. 1998.

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v.227, n.5259, p.680-5. 1970

LAI, A. Y. e TODD, K. G. **Hypoxia-activated microglial mediators of neuronal survival are differentially regulated by tetracyclines.** Glia, v.53, n.8, p.809-816. 2006.

LAPIDOT, T., DAR, A. e KOLLET, O. **How do stem cells find their way home?** Blood, v.106, n.6, p.1901-1910. 2005.

LAWN, J. E., COUSENS, S. e ZUPAN, J. **4 million neonatal deaths: when? Where? Why?** Lancet, v.365, n.9462, p.891-900. 2005.

LAWRENCE, S., TANG, Y., FRANK, M. B., DOZMOROV, I., JIANG, K., CHEN, Y., CADWELL, C., TURNER, S., CENTOLA, M. e JARVIS, J. N. **A dynamic model of gene expression in monocytes reveals differences in immediate/early response genes between adult and neonatal cells.** J Inflamm (Lond), v.4, p.4. 2007.

LECHPAMMER, M., MANNING, S. M., SAMONTE, F., NELLIGAN, J., SABO, E., TALOS, D. M., VOLPE, J. J. e JENSEN, F. E. **Minocycline treatment following hypoxic/ischaemic injury attenuates white matter injury in a rodent model of periventricular leucomalacia.** Neuropathol Appl Neurobiol, v.34, n.4, p.379-393. 2008.

LEE, J. A., KIM, B. I., JO, C. H., CHOI, C. W., KIM, E. K., KIM, H. S., YOON, K. S. e CHOI, J. H. **Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model.** Pediatr Res, v.67, n.1, p.42-46.

LEONARDO, C. C., EAKIN, A. K., AJMO, J. M., COLLIER, L. A., PENNYPACKER, K. R., STRONGIN, A. Y. e GOTTSCHALL, P. E. **Delayed administration of a matrix metalloproteinase inhibitor limits progressive brain injury after hypoxia-ischemia in the neonatal rat.** J Neuroinflammation, v.5, p.34. 2008.

LEONARDO, C. C., HALL, A. A., COLLIER, L. A., AJMO, C. T., JR., WILLING, A. E. e PENNYPACKER, K. R. **Human umbilical cord blood cell therapy blocks the morphological change and recruitment of CD11b-expressing, isolectin-binding proinflammatory cells after middle cerebral artery occlusion.** J Neurosci Res, v.88, n.6, p.1213-1222. 2009.

LI, K., YAU, F. W., FOK, T. F., SO, K. W., LI, C. K. e YUEN, P. M. **Haematopoietic stem and progenitor cells in human term and preterm neonatal blood.** Vox Sang, v.80, n.3, p.162-169. 2001.

LI, L., LUNDKVIST, A., ANDERSSON, D., WILHELMSSON, U., NAGAI, N., PARDO, A. C., NODIN, C., STAHLBERG, A., APRICO, K., LARSSON, K., YABE, T., MOONS, L., FOTHERINGHAM, A., DAVIES, I., CARMELIET, P., SCHWARTZ, J. P., PEKNA, M., KUBISTA, M., BLOMSTRAND, F., MARAGAKIS, N., NILSSON, M. e PEKNY, M. **Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab, v.28, n.3, p.468-481. 2008.

LIAO, S. L. e CHEN, C. J. **Differential effects of cytokines and redox potential on glutamate uptake in rat cortical glial cultures.** Neurosci Lett, v.299, n.1-2, p.113-116. 2001.

LIESZ, A., SURI-PAYER, E., VELTKAMP, C., DOERR, H., SOMMER, C., RIVEST, S., GIESE, T. e VELTKAMP, R. **Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke.** Nat Med, v.15, n.2, p.192-199. 2009.

LINDSTROM, K., HALLBERG, B., BLENNOW, M., WOLFF, K., FERNELL, E. e WESTGREN, M. **Moderate neonatal encephalopathy: pre- and perinatal risk factors and long-term outcome.** Acta Obstet Gynecol Scand, v.87, n.5, p.503-509. 2008.

LIU, X. H., KWON, D., SCHIELKE, G. P., YANG, G. Y., SILVERSTEIN, F. S. e BARKS, J. D. **Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage.** J Cereb Blood Flow Metab, v.19, n.10, p.1099-1108. 1999.

LOGITHARAJAH, P., RUTHERFORD, M. A. e COWAN, F. M. **Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants: antecedent factors, brain imaging, and outcome.** Pediatr Res, v.66, n.2, p.222-229. 2009.

LOW, J. A. **Determining the contribution of asphyxia to brain damage in the neonate.** J Obstet Gynaecol Res, v.30, n.4, p.276-286. 2004.

LUBICS, A., REGLODI, D., TAMAS, A., KISS, P., SZALAI, M., SZALONTAY, L. e LENGVARI, I. **Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury.** Behav Brain Res, v.157, n.1, p.157-165. 2005.

MADLAMBAYAN, G. e ROGERS, I. **Umbilical cord-derived stem cells for tissue therapy: current and future uses**. *Regen Med*, v.1, n.6, p.777-787. 2006.

MAJKA, M., JANOWSKA-WIECZOREK, A., RATAJCZAK, J., EHRENMAN, K., PIETRZKOWSKI, Z., KOWALSKA, M. A., GEWIRTZ, A. M., EMERSON, S. G. e RATAJCZAK, M. Z. **Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner**. *Blood*, v.97, n.10, p.3075-3085. 2001.

MANNING, S. M., TALOS, D. M., ZHOU, C., SELIP, D. B., PARK, H. K., PARK, C. J., VOLPE, J. J. e JENSEN, F. E. **NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia**. *J Neurosci*, v.28, n.26, p.6670-6678. 2008.

MARTI-FABREGAS, J., ROMAGUERA-ROS, M., GOMEZ-PINEDO, U., MARTINEZ-RAMIREZ, S., JIMENEZ-XARRIE, E., MARIN, R., MARTI-VILALTA, J. L. e GARCIA-VERDUGO, J. M. **Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke**. *Neurology*, v.74, n.5, p.357-365.

MATIJASEVICH, A., SANTOS, I. S., BARROS, A. J., MENEZES, A. M., ALBERNAZ, E. P., BARROS, F. C., TIMM, I. K. e VICTORA, C. G. **Perinatal mortality in three population-based cohorts from Southern Brazil: trends and differences**. *Cad Saude Publica*, v.24 Suppl 3, p.S399-408. 2008.

MEIER, C., MIDDELANIS, J., WASIELEWSKI, B., NEUHOFF, S., ROTH-HAERER, A., GANTERT, M., DINSE, H. R., DERMIETZEL, R. e JENSEN, A. **Spastic paresis**

after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res*, v.59, n.2, p.244-249. 2006.

MENDEZ-OTERO, R., DE FREITAS, G. R., ANDRE, C., DE MENDONCA, M. L., FRIEDRICH, M. e OLIVEIRA-FILHO, J. **Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy.** *Regen Med*, v.2, n.4, p.417-423. 2007.

MERKLE, F. T., TRAMONTIN, A. D., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.50, p.17528-17532. 2004.

MIDDELDORP, J., BOER, K., SLUIJS, J. A., DE FILIPPIS, L., ENCHA-RAZAVI, F., VESCOVI, A. L., SWAAB, D. F., ARONICA, E. e HOL, E. M. **GFAPdelta in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex.** *Development*, v.137, n.2, p.313-321. 2010.

MILLER, J. T., BARTLEY, J. H., WIMBORNE, H. J., WALKER, A. L., HESS, D. C., HILL, W. D. e CARROLL, J. E. **The neuroblast and angioblast chemotaxic factor SDF-1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury.** *BMC Neurosci*, v.6, p.63. 2005.

MILLER, S. P., RAMASWAMY, V., MICHELSON, D., BARKOVICH, A. J., HOLSHOUSER, B., WYCLIFFE, N., GLIDDEN, D. V., DEMING, D., PARTRIDGE, J. C., WU, Y. W., ASHWAL, S. e FERRIERO, D. M. **Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy.** *J Pediatr*, v.146, n.4, p.453-460. 2005.

MIRZADEH, Z., MERKLE, F. T., SORIANO-NAVARRO, M., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Neural stem cells confer unique pinwheel**

architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain.

Cell Stem Cell, v.3, n.3, p.265-278. 2008.

MOHRI, I., TANIIKE, M., TANIGUCHI, H., KANEKIYO, T., ARITAKE, K., INUI, T., FUKUMOTO, N., EGUCHI, N., KUSHI, A., SASAI, H., KANAOKA, Y., OZONO, K., NARUMIYA, S., SUZUKI, K. e URADE, Y. **Prostaglandin D2-mediated microglia/astrocyte interaction enhances astrogliosis and demyelination in twitcher.** J Neurosci, v.26, n.16, p.4383-4393. 2006.

MOLD, J. E., MICHAELSSON, J., BURT, T. D., MUENCH, M. O., BECKERMAN, K. P., BUSCH, M. P., LEE, T. H., NIXON, D. F. e MCCUNE, J. M. **Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero.** Science, v.322, n.5907, p.1562-1565. 2008.

MORO, M. A., CARDENAS, A., HURTADO, O., LEZA, J. C. e LIZASOAIN, I. **Role of nitric oxide after brain ischaemia.** Cell Calcium, v.36, n.3-4, p.265-275. 2004.

MURAMATSU, K., SHELDON, R. A., BLACK, S. M., TAUBER, M. e FERRIERO, D. M. **Nitric oxide synthase activity and inhibition after neonatal hypoxia ischemia in the mouse brain.** Brain Res Dev Brain Res, v.123, n.2, p.119-127. 2000.

MUROHARA, T. **Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors.** Trends Cardiovasc Med, v.11, n.8, p.303-307. 2001.

NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. e PITTET, M. J. **The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with**

divergent and complementary functions. J Exp Med, v.204, n.12, p.3037-3047. 2007.

NAKANISHI, N., TU, S., SHIN, Y., CUI, J., KUROKAWA, T., ZHANG, D., CHEN, H. S., TONG, G. e LIPTON, S. A. **Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor.** J Neurosci, v.29, n.16, p.5260-5265. 2009.

NASCIMENTO, L. F. C. e GOTLIEB, S. L. D. **Fatores de risco para o baixo peso ao nascer, com base em informações da declaração de nascido vivo em Guaratinguetá, SP, no ano de 1998.** Informe Epidemiológico do SUS, v.10, n.3, p.113-120. 2001.

NELSON, K. B. **Is it HIE? And why that matters.** Acta Paediatr, v.96, n.8, p.1113-1114. 2007.

NESS, J. M., HARVEY, C. A., STRASSER, A., BOUILLET, P., KLOCKE, B. J. e ROTH, K. A. **Selective involvement of BH3-only Bcl-2 family members Bim and Bad in neonatal hypoxia-ischemia.** Brain Res, v.1099, n.1, p.150-159. 2006.

NEWMAN, M. B., WILLING, A. E., MANRESA, J. J., SANBERG, C. D. e SANBERG, P. R. **Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair.** Exp Neurol, v.199, n.1, p.201-208. 2006.

NIJBOER, C. H., GROENENDAAL, F., KAVELAARS, A., HAGBERG, H. H., VAN BEL, F. e HEIJNEN, C. J. **Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway.** J Cereb Blood Flow Metab, v.27, n.2, p.282-292. 2007.

NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. e HELMCHEN, F. **Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo.** Science, v.308, n.5726, p.1314-1318. 2005.

NORTHINGTON, F. J., FERRIERO, D. M., FLOCK, D. L. e MARTIN, L. J. **Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis.** J Neurosci, v.21, n.6, p.1931-1938. 2001.

NORTHINGTON, F. J., FERRIERO, D. M., GRAHAM, E. M., TRAYSTMAN, R. J. e MARTIN, L. J. **Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis.** Neurobiol Dis, v.8, n.2, p.207-219. 2001.

NORTHINGTON, F. J., ZELAYA, M. E., O'RIORDAN, D. P., BLOMGREN, K., FLOCK, D. L., HAGBERG, H., FERRIERO, D. M. e MARTIN, L. J. **Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain.** Neuroscience, v.149, n.4, p.822-833. 2007.

NUNES, M. L., MARTINS, M. P., BAREA, B. M., WAINBERG, R. C. e COSTA, J. C. **Neurological outcome of newborns with neonatal seizures: a cohort study in a tertiary university hospital.** Arq Neuropsiquiatr, v.66, n.2A, p.168-174. 2008.

OHTAKI, H., YLOSTALO, J. H., FORAKER, J. E., ROBINSON, A. P., REGER, R. L., SHIODA, S. e PROCKOP, D. J. **Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of**

inflammatory/immune responses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.38, p.14638-14643. 2008.

OKEREAFOR, A., ALLSOP, J., COUNSELL, S. J., FITZPATRICK, J., AZZOPARDI, D., RUTHERFORD, M. A. e COWAN, F. M. **Patterns of brain injury in neonates exposed to perinatal sentinel events.** Pediatrics, v.121, n.5, p.906-914. 2008.

ONG, J., PLANE, J. M., PARENT, J. M. e SILVERSTEIN, F. S. **Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat.** Pediatr Res, v.58, n.3, p.600-606. 2005.

PACZKOWSKA, E., LARYSZ, B., RZEUSKI, R., KARBICKA, A., JALOWINSKI, R., KORNACEWICZ-JACH, Z., RATAJCZAK, M. Z. e MACHALINSKI, B. **Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction.** Eur J Haematol, v.75, n.6, p.461-467. 2005.

PAROLINI, O., ALVIANO, F., BAGNARA, G. P., BILIC, G., BUHRING, H. J., EVANGELISTA, M., HENNERBICHLER, S., LIU, B., MAGATTI, M., MAO, N., MIKI, T., MARONGIU, F., NAKAJIMA, H., NIKAIDO, T., PORTMANN-LANZ, C. B., SANKAR, V., SONCINI, M., STADLER, G., SURBEK, D., TAKAHASHI, T. A., REDL, H., SAKURAGAWA, N., WOLBANK, S., ZEISBERGER, S., ZISCH, A. e STROM, S. C. **Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells.** Stem Cells, v.26, n.2, p.300-311. 2008.

PARSADANIAN, A. S., CHENG, Y., KELLER-PECK, C. R., HOLTZMAN, D. M. e SNIDER, W. D. **Bcl-xL is an antiapoptotic regulator for postnatal CNS neurons.** J Neurosci, v.18, n.3, p.1009-1019. 1998.

PASTERNAK, J. F. e GOREY, M. T. **The syndrome of acute near-total intrauterine asphyxia in the term infant.** Pediatr Neurol, v.18, n.5, p.391-398. 1998.

PEREZ, A., BELLON, J. M., GURBINDO, M. D. e MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. **Impairment of stimulation ability of very-preterm neonatal monocytes in response to lipopolysaccharide.** Hum Immunol, v.71, n.2, p.151-157.

PIN, T. W., ELDRIDGE, B. e GALEA, M. P. **A review of developmental outcomes of term infants with post-asphyxia neonatal encephalopathy.** Eur J Paediatr Neurol, v.13, n.3, p.224-234. 2009.

PLANE, J. M., LIU, R., WANG, T. W., SILVERSTEIN, F. S. e PARENT, J. M. **Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse.** Neurobiol Dis, v.16, n.3, p.585-595. 2004.

PUKA-SUNDEVALL, M., GILLAND, E. e HAGBERG, H. **Cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: involvement of mitochondrial permeability transition?** Dev Neurosci, v.23, n.3, p.192-197. 2001.

QIU, L., ZHU, C., WANG, X., XU, F., ERIKSSON, P. S., NILSSON, M., COOPER-KUHN, C. M., KUHN, H. G. e BLOMGREN, K. **Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab, v.27, n.4, p.785-794. 2007.

RAMIREZ-CASTILLEJO, C., SANCHEZ-SANCHEZ, F., ANDREU-AGULLO, C., FERRON, S. R., AROCA-AGUILAR, J. D., SANCHEZ, P., MIRA, H., ESCRIBANO, J. e FARINAS, I. **Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal.** Nat Neurosci, v.9, n.3, p.331-339. 2006.

RANSOM, B., BEHAR, T. e NEDERGAARD, M. **New roles for astrocytes (stars at last).** Trends Neurosci, v.26, n.10, p.520-522. 2003.

REN, L., LUBRICH, B., BIBER, K. e GEBICKE-HAERTER, P. J. **Differential expression of inflammatory mediators in rat microglia cultured from different brain regions.** Brain Res Mol Brain Res, v.65, n.2, p.198-205. 1999.

REZAIIE, P., DEAN, A., MALE, D. e ULFIG, N. **Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester.** Cereb Cortex, v.15, n.7, p.938-949. 2005.

ROCHEFORT, G. Y., DELORME, B., LOPEZ, A., HERAULT, O., BONNET, P., CHARBORD, P., EDER, V. e DOMENECH, J. **Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia.** Stem Cells, v.24, n.10, p.2202-2208. 2006.

ROCHEFORT, N., QUENECH'DU, N., WATROBA, L., MALLAT, M., GIAUME, C. e MILLERET, C. **Microglia and astrocytes may participate in the shaping of visual callosal projections during postnatal development.** J Physiol Paris, v.96, n.3-4, p.183-192. 2002.

ROMANKO, M. J., ZHU, C., BAHR, B. A., BLOMGREN, K. e LEVISON, S. W. **Death effector activation in the subventricular zone subsequent to perinatal hypoxia/ischemia.** J Neurochem, v.103, n.3, p.1121-1131. 2007.

ROSENKRANZ, K., KUMBRUCH, S., LEBERMANN, K., MARSCHNER, K., JENSEN, A., DERMIETZEL, R. e MEIER, C. **The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to the 'homing' of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain.** J Neurosci Res, v.88, n.6, p.1223-1233.

ROTHSTEIN, R. P. e LEVISON, S. W. **Gray matter oligodendrocyte progenitors and neurons die caspase-3 mediated deaths subsequent to mild perinatal hypoxic/ischemic insults.** Dev Neurosci, v.27, n.2-4, p.149-159. 2005.

SACCHETTI, B., FUNARI, A., MICHIEZI, S., DI CESARE, S., PIERSANTI, S., SAGGIO, I., TAGLIAFICO, E., FERRARI, S., ROBEY, P. G., RIMINUCCI, M. e BIANCO, P. **Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment.** Cell, v.131, n.2, p.324-336. 2007.

SANBERG, P. R., PARK, D. H., KUZMIN-NICHOLS, N., CRUZ, E., HOSSNE, N. A., JR., BUFFOLO, E. e WILLING, A. E. **Monocyte Transplantation for Neural and Cardiovascular Ischemia Repair.** J Cell Mol Med. 2009.

SCHMUED, L. C., STOWERS, C. C., SCALLET, A. C. e XU, L. **Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons.** Brain Res, v.1035, n.1, p.24-31. 2005.

SCHULZKE, S. M., RAO, S. e PATOLE, S. K. **A systematic review of cooling for neuroprotection in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy - are we there yet?** BMC Pediatr, v.7, p.30. 2007.

SHAH, P. S. e PERLMAN, M. **Time courses of intrapartum asphyxia: neonatal characteristics and outcomes.** Am J Perinatol, v.26, n.1, p.39-44. 2009.

SHELDON, R. A., CHRISTEN, S. e FERRIERO, D. M. **Genetic and pharmacologic manipulation of oxidative stress after neonatal hypoxia-ischemia.** Int J Dev Neurosci, v.26, n.1, p.87-92. 2008.

SHEN, C. M., LIN, S. C., NIU, D. M. e KOU, Y. R. **Labour increases the surface expression of two Toll-like receptors in the cord blood monocytes of healthy term newborns.** Acta Paediatr, v.98, n.6, p.959-962. 2009.

SHEN, Q., GODERIE, S. K., JIN, L., KARANTH, N., SUN, Y., ABRAMOVA, N., VINCENT, P., PUMIGLIA, K. e TEMPLE, S. **Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells.** Science, v.304, n.5675, p.1338-1340. 2004.

SHEN, Q., WANG, Y., KOKOVAY, E., LIN, G., CHUANG, S. M., GODERIE, S. K., ROYSAM, B. e TEMPLE, S. **Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions.** Cell Stem Cell, v.3, n.3, p.289-300. 2008.

SHERMAN, L. S. e BACK, S. A. **A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS.** Trends Neurosci, v.31, n.1, p.44-52. 2008.

SHEVELL, M. I. **The "Bermuda triangle" of neonatal neurology: cerebral palsy, neonatal encephalopathy, and intrapartum asphyxia.** Semin Pediatr Neurol, v.11, n.1, p.24-30. 2004.

SIE, L. T., VAN DER KNAAP, M. S., OOSTING, J., DE VRIES, L. S., LAFEBER, H. N. e VALK, J. **MR patterns of hypoxic-ischemic brain damage after prenatal, perinatal or postnatal asphyxia.** Neuropediatrics, v.31, n.3, p.128-136. 2000.

SONDELL, M., LUNDBORG, G. e KANJE, M. **Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system.** J Neurosci, v.19, n.14, p.5731-5740. 1999.

SOULET, D. e RIVEST, S. **Microglia.** Curr Biol, v.18, n.12, p.R506-508. 2008.

SPASSKY, N., MERKLE, F. T., FLAMES, N., TRAMONTIN, A. D., GARCIA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis.** J Neurosci, v.25, n.1, p.10-18. 2005.

SUN, L., LEE, J. e FINE, H. A. **Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury.** J Clin Invest, v.113, n.9, p.1364-1374. 2004.

SUTMULLER, R. P., MORGAN, M. E., NETEA, M. G., GRAUER, O. e ADEMA, G. J. **Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation.** Trends Immunol, v.27, n.8, p.387-393. 2006.

SVEDIN, P., HAGBERG, H., SAVMAN, K., ZHU, C. e MALLARD, C. **Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia.** J Neurosci, v.27, n.7, p.1511-1518. 2007.

TAGUCHI, A., MATSUYAMA, T., NAKAGOMI, T., SHIMIZU, Y., FUKUNAGA, R., TATSUMI, Y., YOSHIKAWA, H., KIKUCHI-TAURA, A., SOMA, T., MORIWAKI, H., NAGATSUKA, K., STERN, D. M. e NARITOMI, H. **Circulating CD34-positive cells provide a marker of vascular risk associated with cognitive impairment.** J Cereb Blood Flow Metab, v.28, n.3, p.445-449. 2008.

TAGUCHI, A., NAKAGOMI, N., MATSUYAMA, T., KIKUCHI-TAURA, A., YOSHIKAWA, H., KASAHARA, Y., HIROSE, H., MORIWAKI, H., NAKAGOMI, T., SOMA, T., STERN, D. M. e NARITOMI, H. **Circulating CD34-positive cells have prognostic value for neurologic function in patients with past cerebral infarction.** J Cereb Blood Flow Metab, v.29, n.1, p.34-38. 2009.

TAGUCHI, A., SOMA, T., TANAKA, H., KANDA, T., NISHIMURA, H., YOSHIKAWA, H., TSUKAMOTO, Y., ISO, H., FUJIMORI, Y., STERN, D. M., NARITOMI, H. e MATSUYAMA, T. **Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model.** J Clin Invest, v.114, n.3, p.330-338. 2004.

TANIGUCHI, H., MOHRI, I., OKABE-ARAHORI, H., ARITAKE, K., WADA, K., KANEKIYO, T., NARUMIYA, S., NAKAYAMA, M., OZONO, K., URADE, Y. e TANIIKE, M. **Prostaglandin D2 protects neonatal mouse brain from hypoxic ischemic injury.** J Neurosci, v.27, n.16, p.4303-4312. 2007.

TEN, V. S., BRADLEY-MOORE, M., GINGRICH, J. A., STARK, R. I. e PINSKY, D. J. **Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy.** Behav Brain Res, v.145, n.1-2, p.209-219. 2003.

THORED, P., HELDMANN, U., GOMES-LEAL, W., GISLER, R., DARSALIA, V., TANEERA, J., NYGREN, J. M., JACOBSEN, S. E., EKDAHL, C. T., KOKAIA, Z. e LINDVALL, O. **Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke.** Glia, v.57, n.8, p.835-849. 2009.

TODORICH, B., PASQUINI, J. M., GARCIA, C. I., PAEZ, P. M. e CONNOR, J. R. **Oligodendrocytes and myelination: the role of iron.** Glia, v.57, n.5, p.467-478. 2009.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T. e GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, p.4350-4. 1979

TRABACCA, A. e DICUONZO, F. **Images in clinical medicine. Living with one hemisphere--a large porencephalic cyst.** N Engl J Med, v.361, n.16, p.1584. 2009.

TRAMONTIN, A. D., GARCIA-VERDUGO, J. M., LIM, D. A. e ALVAREZ-BUYLLA, A. **Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment.** Cereb Cortex, v.13, n.6, p.580-587. 2003.

TRAN, P. B., BANISADR, G., REN, D., CHENN, A. e MILLER, R. J. **Chemokine receptor expression by neural progenitor cells in neurogenic regions of mouse brain.** J Comp Neurol, v.500, n.6, p.1007-1033. 2007.

TROYER, D. L. e WEISS, M. L. **Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population.** Stem Cells, v.26, n.3, p.591-599. 2008.

TSUJI, M., WILSON, M. A., LANGE, M. S. e JOHNSTON, M. V. **Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model.** Exp Neurol, v.189, n.1, p.58-65. 2004.

UCCELLI, A., MORETTA, L. e PISTOIA, V. **Mesenchymal stem cells in health and disease.** Nat Rev Immunol, v.8, n.9, p.726-736. 2008.

VAN DEN BERGE, S. A., MIDDELDORP, J., ELEANA ZHANG, C., CURTIS, M. A., LEONARD, B. W., MASTROENI, D., VOORN, P., VAN DE BERG, W. D., HUITINGA, I. e HOL, E. M. **Longterm quiescent cells in the aged human subventricular neurogenic system specifically express GFAP-delta.** Aging Cell. 2010.

VAN VELTHOVEN, C. T., KAVELAARS, A., VAN BEL, F. e HEIJNEN, C. J. **Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration.** Brain Behav Immun, v.24, n.3, p.387-393.

VANNUCCI, R. C. **Hypoxic-ischemic encephalopathy.** Am J Perinatol, v.17, n.3, p.113-120. 2000.

VANNUCCI, R. C., CONNOR, J. R., MAUGER, D. T., PALMER, C., SMITH, M. B., TOWFIGHI, J. e VANNUCCI, S. J. **Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage.** J Neurosci Res, v.55, n.2, p.158-163. 1999.

VANNUCCI, R. C., TOWFIGHI, J. e VANNUCCI, S. J. **Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat.** J Cereb Blood Flow Metab, v.24, n.10, p.1090-1097. 2004.

VENDRAME, M., CASSADY, J., NEWCOMB, J., BUTLER, T., PENNYPACKER, K. R., ZIGOVA, T., SANBERG, C. D., SANBERG, P. R. e WILLING, A. E. **Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume.** Stroke, v.35, n.10, p.2390-2395. 2004.

VENDRAME, M., GEMMA, C., DE MESQUITA, D., COLLIER, L., BICKFORD, P. C., SANBERG, C. D., SANBERG, P. R., PENNYPACKER, K. R. e WILLING, A. E. **Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke.** Stem Cells Dev, v.14, n.5, p.595-604. 2005.

VENDRAME, M., GEMMA, C., PENNYPACKER, K. R., BICKFORD, P. C., DAVIS SANBERG, C., SANBERG, P. R. e WILLING, A. E. **Cord blood rescues stroke-induced changes in splenocyte phenotype and function.** Exp Neurol, v.199, n.1, p.191-200. 2006.

VEXLER, Z. S. e FERRIERO, D. M. **Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury.** Semin Neonatol, v.6, n.2, p.99-108. 2001.

VILLAPOL, S., GELOT, A., RENOLLEAU, S. e CHARRIAUT-MARLANGUE, C. **Astrocyte responses after neonatal ischemia: the yin and the yang.** Neuroscientist, v.14, n.4, p.339-344. 2008.

WAINWRIGHT, M. S., GRUNDHOEFER, D., SHARMA, S. e BLACK, S. M. **A nitric oxide donor reduces brain injury and enhances recovery of cerebral blood flow after hypoxia-ischemia in the newborn rat.** *Neurosci Lett*, v.415, n.2, p.124-129. 2007.

WANG, M., CRISOSTOMO, P. R., HERRING, C., MELDRUM, K. K. e MELDRUM, D. R. **Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v.291, n.4, p.R880-884. 2006.

WANG, X., CARLSSON, Y., BASSO, E., ZHU, C., ROUSSET, C. I., RASOLA, A., JOHANSSON, B. R., BLOMGREN, K., MALLARD, C., BERNARDI, P., FORTE, M. A. e HAGBERG, H. **Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury.** *J Neurosci*, v.29, n.8, p.2588-2596. 2009.

WANG, Y., DENG, Y. e ZHOU, G. Q. **SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model.** *Brain Res*, v.1195, p.104-112. 2008.

WEI, X., DU, Z., ZHAO, L., FENG, D., WEI, G., HE, Y., TAN, J., LEE, W. H., HAMPEL, H., DODEL, R., JOHNSTONE, B. H., MARCH, K. L., FARLOW, M. R. e DU, Y. **IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats.** *Stem Cells*, v.27, n.2, p.478-488. 2009.

WEST, T., ATZEVA, M. e HOLTZMAN, D. M. **Caspase-3 deficiency during development increases vulnerability to hypoxic-ischemic injury through caspase-3-independent pathways.** Neurobiol Dis, v.22, n.3, p.523-537. 2006.

YAGER, J. Y. e ASHWAL, S. **Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage.** Pediatr Neurol, v.40, n.3, p.156-167. 2009.

YAGER, J. Y., ARMSTRONG, E. A. e BLACK, A. M. **Treatment of the term newborn with brain injury: simplicity as the mother of invention.** Pediatr Neurol, v.40, n.3, p.237-243. 2009.

YAN, Y. P., SAILOR, K. A., LANG, B. T., PARK, S. W., VEMUGANTI, R. e DEMPSEY, R. J. **Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia.** J Cereb Blood Flow Metab, v.27, n.6, p.1213-1224. 2007.

YANG, D., NEMKUL, N., SHEREEN, A., JONE, A., DUNN, R. S., LAWRENCE, D. A., LINDQUIST, D. e KUAN, C. Y. **Therapeutic administration of plasminogen activator inhibitor-1 prevents hypoxic-ischemic brain injury in newborns.** J Neurosci, v.29, n.27, p.8669-8674. 2009.

YANG, Z., COVEY, M. V., BITEL, C. L., NI, L., JONAKAIT, G. M. e LEVISON, S. W. **Sustained neocortical neurogenesis after neonatal hypoxic/ischemic injury.** Ann Neurol, v.61, n.3, p.199-208. 2007.

YANG, Z., YOU, Y. e LEVISON, S. W. **Neonatal hypoxic/ischemic brain injury induces production of calretinin-expressing interneurons in the estriado.** J Comp Neurol, v.511, n.1, p.19-33. 2008.

YASUHARA, T., HARA, K., MAKI, M., MAYS, R. W., DEANS, R. J., HESS, D. C., CARROLL, J. E. e BORLONGAN, C. V. **Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats.** J Cereb Blood Flow Metab, v.28, n.11, p.1804-1810. 2008.

YASUHARA, T., HARA, K., MAKI, M., XU, L., YU, G., ALI, M. M., MASUDA, T., YU, S. J., BAE, E. K., HAYASHI, T., MATSUKAWA, N., KANEKO, Y., KUZMIN-NICHOLS, N., ELLOVITCH, S., CRUZ, E. L., KLASKO, S. K., SANBERG, C. D., SANBERG, P. R. e BORLONGAN, C. V. **Mannitol facilitates neurotrophic factor upregulation and behavioral recovery in neonatal hypoxic-ischemic rats with human umbilical cord blood grafts.** J Cell Mol Med. 2009.

YATA, K., MATCHETT, G. A., TSUBOKAWA, T., TANG, J., KANAMARU, K. e ZHANG, J. H. **Granulocyte-colony stimulating factor inhibits apoptotic neuron loss after neonatal hypoxia-ischemia in rats.** Brain Res, v.1145, p.227-238. 2007.

YOSHIHARA, T., TAGUCHI, A., MATSUYAMA, T., SHIMIZU, Y., KIKUCHI-TAURA, A., SOMA, T., STERN, D. M., YOSHIKAWA, H., KASAHARA, Y., MORIWAKI, H., NAGATSUKA, K. e NARITOMI, H. **Increase in circulating CD34-positive cells in patients with angiographic evidence of moyamoya-like vessels.** J Cereb Blood Flow Metab, v.28, n.6, p.1086-1089. 2008.

YU, S. W., WANG, H., DAWSON, T. M. e DAWSON, V. L. **Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity.** Neurobiol Dis, v.14, n.3, p.303-317. 2003.

ZAFEIRIOU, D. I., TSIKOULAS, I. G., KREMENOPOULOS, G. M. e KONTOPOULOS, E. E. **Moro reflex profile in high-risk infants at the first year of life.** Brain Dev, v.21, n.3, p.216-217. 1999.

ZHU, C., WANG, X., HAGBERG, H. e BLOMGREN, K. **Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia.** J Neurochem, v.75, n.2, p.819-829. 2000.

ZHU, C., WANG, X., XU, F., BAHR, B. A., SHIBATA, M., UCHIYAMA, Y., HAGBERG, H. e BLOMGREN, K. **The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia.** Cell Death Differ, v.12, n.2, p.162-176. 2005.

ZHU, C., XU, F., WANG, X., SHIBATA, M., UCHIYAMA, Y., BLOMGREN, K. e HAGBERG, H. **Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia.** J Neurochem, v.96, n.4, p.1016-1027. 2006.

ANEXO

Artigos relacionados ao trabalho desenvolvido durante esta Tese de Doutorado e publicados na revista "*Stem Cells and Development*" em 2010.

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](#)