

Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside

O uso de células-tronco na asfixia perinatal: do laboratório à prática clínica

Simone de Paula¹, Samuel Greggio¹, Jaderson Costa DaCosta²

Resumo

Objetivos: Apresentar evidências científicas recentes sobre os efeitos do transplante com células-tronco em modelos animais de lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal e abordar os aspectos translacionais relevantes à aplicação clínica da terapia celular nesse contexto.

Fonte dos dados: Para a seleção dos artigos, utilizou-se a base de dados PubMed e Scopus. O critério de seleção de artigos foi a especificidade em relação ao tema estudado, preferencialmente a partir do ano de 2000. Também foram revisados artigos clássicos de anos anteriores que se aplicavam ao propósito desta revisão.

Síntese dos dados: Células-tronco de diferentes fontes exógenas podem exibir propriedades neuroprotetoras em modelos experimentais de hipóxia-isquemia neonatal. Na maioria dos experimentos animais, os benefícios morfológicos e funcionais observados foram independentes da diferenciação neural, sugerindo mecanismos de ação associados, tais como a liberação de fatores tróficos e a modulação inflamatória.

Conclusões: Baseado nos estudos experimentais analisados, a terapia celular pode tornar-se uma promissora abordagem terapêutica no tratamento de crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica. No entanto, estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de elucidar os possíveis mecanismos de ação dessas células e definir estratégias clínicas seguras e efetivas.

J Pediatr (Rio J). 2010;86(6):451-464: Encefalopatia hipóxico-isquêmica, células-tronco, asfixia, terapia celular.

Introdução

A lesão cerebral hipóxico-isquêmica (HI) do recém-nascido é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade neurológica em crianças. Estatísticas sugerem uma incidência de asfixia em 2-4 por 1.000 nascimentos a termo. No Brasil, estima-se que a prevalência de asfixia neonatal seja de, aproximadamente, 2% dos nascidos vivos¹. Além disso, a taxa de mortalidade dos recém-nascidos asfisiados no

Abstract

Objectives: To present recent scientific evidence on the effects of stem cell transplantation in animal models of neonatal hypoxic-ischemic brain injury and address the translational relevance of cell therapy for clinical application in this context.

Sources: The PubMed and Scopus databases were used to select articles. The selection criterion was the specificity of articles regarding the subject studied, preferably articles published from 2000 onward. We also reviewed classic articles from previous years that were applicable to this review.

Summary of the findings: Stem cells from different exogenous sources may exhibit neuroprotective properties in experimental models of neonatal hypoxia-ischemia. In most animal experiments, the morphological and functional benefits observed were independent of neural differentiation, suggesting associated mechanisms of action, such as the release of trophic factors and inflammatory modulation.

Conclusions: Based on the experimental studies analyzed, cell therapy may become a promising therapeutic approach in the treatment of children with hypoxic-ischemic encephalopathy. However, further studies are warranted to elucidate potential mechanisms of action of these cells and to define safe and effective clinical strategies.

J Pediatr (Rio J). 2010;86(6):451-464: Hypoxic-ischemic encephalopathy, stem cells, asphyxia, cell therapy.

período neonatal é de 20-50%, sendo que mais de 25% dos sobreviventes podem exibir incapacidades neuropsicológicas permanentes, tais como retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldades de aprendizagem².

A causa mais frequente da encefalopatia HI é a asfixia intraútero severa, e o principal mecanismo patogênico atribuído à sua neuropatologia é a redução do fluxo sanguíneo

1. Mestre, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS.

2. Doutor, Professor titular, Neurologia, Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, RS. Diretor, Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), PUCRS, Porto Alegre, RS.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.

Como citar este artigo: de Paula S, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J)*. 2010;86(6):451-464.

Artigo submetido em 02.06.10, aceito em 09.08.10.

doi:10.2223/JPED.2035

cerebral³. Eventos neurotóxicos associados, tais como falência energética, despolarização da membrana, liberação de aminoácidos excitatórios, acúmulo de radicais livres e apoptose ocorrem simultaneamente e contribuem para a disfunção celular e para a morte neuronal após insultos hipóxico-isquêmicos⁴.

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos nos cuidados perinatais dos recém-nascidos de risco, o manejo clínico de crianças asfíxiadas tem sido limitado à manutenção da oxigenação, ao controle da pressão sanguínea e da homeostase, ao tratamento das convulsões e ao controle da hipertensão intracraniana⁵.

Novas estratégias neuroprotetoras vêm sendo investigadas em estudos experimentais e em ensaios clínicos em decorrência da significância clínica e do impacto socioeconômico originados pelo dano cerebral neonatal. Bloqueadores de cálcio, inibidores de aminoácidos excitatórios e de radicais livres, o uso de óxido nítrico, de fatores de crescimento, neuropeptídeos e a hipotermia são algumas das abordagens terapêuticas atuais que objetivam interromper a cascata de eventos neuroquímicos iniciada pela HI⁴. Com exceção da hipotermia, que demonstra desfechos satisfatórios apenas em crianças com lesões HI moderadas, essas terapias apresentam resultados limitados⁶.

Nesse contexto, a terapia celular vem sendo explorada por ser uma atual e promissora abordagem de tratamento para doenças neurológicas graves. As células-tronco representam uma unidade natural do desenvolvimento embrionário e da reparação tecidual, sendo um subconjunto de células imaturas, indiferenciadas e não especializadas que apresentam a capacidade de autorrenovação e diferenciação em linhagens celulares específicas⁷. Tais células têm sido encontradas em todos os órgãos e tecidos pós-natais, inclusive no sistema nervoso central (SNC), previamente conhecido pela presença de progenitores celulares e de potencial regenerativo⁸. Recentes descobertas revolucionaram a biologia das células-tronco e têm demonstrado o potencial clínico dessas células em uma variedade de doenças humanas. Inicialmente usado no tratamento de doenças hematológicas malignas e distúrbios autoimunes, o transplante de células imaturas e indiferenciadas tem sido proposto atualmente como fonte potencial de novas células e de fatores tróficos para minimizar o dano celular e regenerar tecidos necróticos decorrentes de lesões no SNC⁹. Estudos experimentais demonstram que o transplante de células-tronco tem melhorado a funcionalidade em modelos experimentais de isquemia cerebral, doença de Parkinson, doença de Huntington, epilepsia e traumatismo raquimedular¹⁰⁻¹⁴.

Basicamente, duas categorias de células-tronco têm sido utilizadas em estudos experimentais de HI neonatal: as células-tronco neurais, provenientes de tecido neuronal embrionário ou adulto; e as células-tronco somáticas de origem não neuronal, nas quais se destacam as provenientes do sangue da medula óssea e do cordão umbilical.

O objetivo desta revisão é apresentar o estado da arte dos estudos experimentais de terapia celular em modelo animal de HI neonatal (Tabela 1), abordando os possíveis mecanismos de ação desse recurso terapêutico e os aspectos

transacionais relevantes à aplicação clínica do transplante de células-tronco na encefalopatia hipóxico-isquêmica.

Transplante de tecido neocortical fetal

Em 1996, Elsayed et al.¹⁵ realizaram o primeiro estudo sobre o uso de recursos celulares no tratamento da HI experimental. Nessa investigação, os autores avaliaram os efeitos do transplante intracerebral de um bloco de tecido neocortical fetal realizado 7 dias após a indução da HI em filhotes de ratos. Embora tenham demonstrado que os transplantes obtiveram uma implantação satisfatória em 63% dos casos, o estudo não demonstrou efeitos terapêuticos significativos sobre a atrofia cerebral. Adicionalmente, o respectivo trabalho não realizou uma avaliação funcional dos animais transplantados. Outro grupo de pesquisa também realizou transplante intracerebral de tecido neocortical fetal 3 dias após a indução da HI¹⁶. Em vez de usar um bloco tecidual, os autores utilizaram uma suspensão celular a fim de facilitar o procedimento de transplante. Os resultados demonstraram uma melhora da coordenação e assimetria motora nos animais tratados. No entanto, mesmo com a identificação de 72% dos transplantes após 10-12 semanas pós-implantação, os autores observaram ausência de restabelecimento da citoarquitetura cortical.

Transplante de células-tronco neurais

As células-tronco neurais (CTN) são células com capacidade de autorrenovação e potencialidade restrita para gerar células de linhagens neuronais e gliais. Tais células podem ser isoladas de diferentes regiões do sistema nervoso embrionário ou extraídas de duas regiões específicas do cérebro adulto: a zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro dentado hipocampal^{7,9}. Estudos mostram que as CTN podem migrar e sobreviver em áreas cerebrais lesadas, assim como podem ser induzidas a se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, indicando uma possível alternativa de reposição dos tipos celulares afetados na HI^{9,17}.

Depois de isoladas, as CTN podem proliferar *in vitro*, em resposta à presença de fatores de crescimento específicos, formando agrupamentos celulares denominados de neuroesferas. Basicamente, essas estruturas são formadas por CTN multipotentes e progenitores neurais com desenvolvimento mais comprometido^{9,18,19}. Alguns estudos têm demonstrado que astrócitos da zona subventricular que expressam uma proteína glial também podem ser considerados como CTN²⁰.

Nesse contexto, Zheng et al.²¹ demonstraram que células-tronco astrocíticas multipotentes provenientes da zona subventricular de camundongos migram para a região cortical e periventricular isquêmica e expressam sinais de diferenciação neuronal e astrocítica nos animais HI submetidos ao transplante intracerebral. Em contrapartida, quando o transplante foi efetuado em animais sadios, as células permaneceram no local em que foram injetadas e mantiveram o seu perfil celular astrocítico. Esses dados indicam que o tecido cerebral HI apresenta processos fisiológicos capazes

Tabela 1 - Revisão das publicações sobre terapia celular em hipóxia-isquemia experimental no período neonatal

Referência	Modelo de HI (animal, idade e duração da hipóxia)	Tipo celular	Transplante (concentração, via, tempo e imunossupressão)	Resultados funcionais*	Resultados morfológicos, celulares e moleculares*	Migração celular	Diferenciação celular
Elsayed et al. ¹⁵	Ratos Long-Evans black-hooded; P7-8; 60, 120 ou 120-150 min	Tecido neocortical fetal murino (13 ^o dia embrionário)	Bloco tecidual de 1-2 mm ³ ; ic (TI); 7 dias após HI; SI	NA	Nenhum efeito sobre a atrofia cerebral. Presença de conectividade axonal entre o transplante e as áreas adjacentes corticais do tecido receptor	Transplantes com desenvolvimento satisfatório (63%) e pobre (19%), localizados no córtex ou em áreas adjacentes 6 semanas pT	NA
Jansen et al. ¹⁶	Ratos Wistar; P7; 150 min	Tecido neocortical fetal murino (16 ^o dia embrionário)	5 x 10 ⁴ células/μL; ic (TI); 3 dias após HI; SI	Melhora da coordenação (3-8 semanas pT) e assimetria motora (9 semanas pT)	Ausência de restabelecimento da citoarquitetura cortical; o transplante expressou marcadores neuroquímicos e ausência de marcação glial; presença de astrócitos circundantes ao transplante. (9-11 semanas pT)	Identificação de 72% dos transplantes localizados em áreas adjacentes ao corpo caloso do córtex sensorio-motor 9-11 semanas pT	NA
Park et al. ²⁷	Camundongos CD-1; P7; 120 min	CTN murinas (clone C17.2) em <i>scaffold</i> de PGA; CTN-PGA)	1 ou 2 complexos CTN-PGA (1 x 10 ⁷ células/mL; 100-200 μL); ic (TI); 7 dias após HI; SI	↓ rotação unilateral	Redução do dano cerebral; formação de interconexões entre CTN/PGA e o tecido receptor; neovascularização; ↓ infiltração de monócitos e cicatriz astrogliar; restabelecimento de projeções neuronais de longa distância	O transplante apresentou uma implantação satisfatória na cavidade infartada cerebral 2-6 semanas pT	Células transplantadas apresentaram marcação de neurônio (5%) e oligodendrócito, na penumbra cortical da lesão, 2 semanas pT
Imitola et al. ²³	Camundongos C57Bl/6; P7; 120 min	Cinco linhagens de CTN humanas e murinas	5 x 10 ⁵ células/mL; ic (TC); 3 dias após HI; ciclosporina	NA	CTN expressam CXCR4; ↑ expressão de SDF-1α na região cerebral infartada (células astrocíticas e endoteliais); interação da via SDF-1α/CXCR4	Correlação positiva entre a presença de células transplantadas na região isquêmica e a expressão de SDF-1α	Células transplantadas com marcação neuronal na penumbra cortical da lesão
Katsuragi et al. ³²	Ratos Wistar; P14; 120 min	Células BHK-GDNF encapsuladas	1 cápsula (1 x 10 ⁸ células/mL); ic (TI); 2 dias pré-HI; SI	NA	↑ GDNF sérico; ↓ incidência e severidade do dano neuronal (7 dias pT)	Células BHK-GDNF mantiveram-se viáveis 7 dias pT	NA
Katsuragi et al. ³³	Ratos Wistar; P9; 120 min	Células BHK-GDNF encapsuladas	1 cápsula (1 x 10 ⁸ células/mL); ic (TI); 2 dias pré-HI; SI	Melhora no desempenho cognitivo a partir da 6 ^a semana pT	Redução do dano cerebral 17 semanas pT	NA	NA
Zheng et al. ²¹	Ratos Sprague-Dawley; P7; 120 min	Células-tronco astrocíticas multipotentes da zona subventricular murina	5 x 10 ⁴ células/μL; ic (TI); 24 h após HI; SI	NA	NA	Deteção das células transplantadas na região cortical e periventricular isquêmica em até 21 dias pT	Células transplantadas apresentaram marcação de astrócito e neurônio 3-21 dias pT
Meier et al. ³⁶	Ratos Wistar; P7; 80 min	CTCUH	1 x 10 ⁷ células/500 μL; ip; 24 h após HI; SI	Melhora no desempenho locomotor 21 dias pT	Nenhum efeito sobre a atrofia cerebral em 21 dias pT	Presença das células transplantadas ao redor da lesão cerebral 21 dias pT	Ausência de células transplantadas com marcação para astrócito e neurônio 21 dias pT

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; BHK-GDNF = células renais de filhotes de hamster (BHK) transfectadas com DNA complementar de fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF); CPAM = células progenitoras adultas multipotentes; ChABC = condroitinase ABC; CTCUH = células-tronco de cordão umbilical humano; CTM = células-tronco mesenquimais; CTN = células-tronco neurais; CXCR4 = receptor de quimiocina CXC 4; FGF-2 = fator de crescimento de fibroblasto 2; GDNF = fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; HI = hipóxia-isquemia; ic = via intracerebral; ica = via intracardíaca; icv = via intracerebroventricular; ip = via intraperitoneal; iv = via intravenosa; NA = não avaliado; NGF = fator de crescimento neural; NT3 = neurotrofina -3; P = dia pós-natal; PGA = ácido poliglicólico; pT = pós-transplante; SDF-1 = fator derivado do estroma 1; T-PX = transplante no dia pós-natal X; SI = sem imunossupressão; TC = transplante contralateral; TI = transplante ipsilateral; VEH = veículo.

* Animais tratados *versus* animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

Tabela 1 - Revisão das publicações sobre terapia celular em hipóxia-isquemia experimental no período neonatal (*continuação*)

Referência	Modelo de HI (animal, idade e duração da hipóxia)	Tipo celular	Transplante (concentração, via, tempo e imunossupressão)	Resultados funcionais*	Resultados morfológicos, celulares e moleculares*	Migração celular	Diferenciação celular
Yasuhara et al. ⁵⁸	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CPAM de medula óssea murina	2 x 10 ⁵ células/3 µL; ic (TI); 7 dias após HI; ciclosporina A	Melhora da assimetria, mas não da coordenação motora, 14 dias pT	NA	Deteção das células transplantadas nas regiões hipocampais de CA2 e CA3 14 dias pT	NA
Park et al. ²²	Camundongos CD-1; P7; 138 min	CTN murinas (clone C17.2)	0,4-1,6 x 10 ⁵ células/4 µL; ic; 1 (TI), 3 (TI ou TC), 7 (TI), 14 (TI) ou 35 (TI) dias após HI; SI	NA	NA	TC: migração celular através do corpo caloso e outras comissuras inter-hemisféricas para a área infartada; TI: as células permaneceram no local da lesão, com melhor implantação quando transplantadas entre 3 e 7 dias após HI	TI versus TC (3 dias após HI): células transplantadas apresentaram marcação de neurônio (~5 versus 0%), oligodendrócito (~4 versus ~1%), astrócito (~23 versus ~15%) e células progenitoras neurais (~18 versus ~6%) no neocórtex (1 mês pT)
Park et al. ²⁹	Camundongos CD-1; P7; 120-180 min	CTN murinas (clone C17.2) com superexpressão de NT-3 (CTN-NT3)	3 x 10 ⁵ células/8 µL (ic, TI em 2 locais) e 1,0 x 10 ⁵ células/2 µL (icv, TC); 3 dias após HI; SI	NA	Expressão aumentada de NT-3	Presença das células nos locais de transplante 2-4 semanas pT	Células transplantadas com marcação neuronal (colinérgico, GABAérgico e glutamatérgico) na penumbra (81,4%) e área infartada (10-20%), e para oligodendrócito (0,4%) e glia (1%); células transplantadas com marcação neuronal no hemisfério contralateral (~90%) (2-4 semanas pT)
Ma et al. ²⁴	Camundongos C57Bl/6; P7; 90 min	Células-tronco embrionárias murinas após diferenciação neural <i>in vitro</i>	1 x 10 ⁴ células/µL; icv (TI); 2-3 dias após HI; SI	Melhora da memória espacial 2 e 8 meses pT	↑ células neuronais na região hipocampal de CA1 8 meses pT	Deteção das células transplantadas no hipocampo e córtex cerebral 2 e 8 meses pT	Células transplantadas apresentaram marcação de neurônio, mas não de astrócito, 8 meses pT
Dayer et al. ³⁰	Ratos Wistar; P3; 30 min	Células progenitoras neurais murinas com superexpressão de FGF-2	4 x 10 ⁴ células/0,5 µL; ic (TI); 1 e 3 dias após HI; SI	NA	Preservação do estado de imaturidade e proliferação celular é inversamente proporcional à expressividade de FGF-2 nas células transplantadas	Deteção das células transplantadas no córtex isquêmico infragranular e na margem entre córtex e corpo caloso 2 semanas pT	A grande maioria das células transplantadas apresentou marcação de neurônio imaturo; em menor número, houve marcação para astrócito, oligodendrócito e neurônio

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; BHK-GDNF = células renais de filhotes de hamster (BHK) transfectadas com DNA complementar de fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF); CPAM = células progenitoras adultas multipotentes; ChABC = condroitinase ABC; CTCUH = células-tronco de cordão umbilical humano; CTM = células-tronco mesenquimais; CTN = células-tronco neurais; CXCR4 = receptor de quimiocina CXC 4; FGF-2 = fator de crescimento de fibroblasto 2; GDNF = fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; HI = hipóxia-isquemia; ic = via intracerebral; ica = via intracardiaca; icv = via intracerebroventricular; ip = via intraperitoneal; iv = via intravenosa; NA = não avaliado; NGF = fator de crescimento neural; NT3 = neurotrofina -3; P = dia pós-natal; PGA = ácido poliglicólico; pT = pós-transplante; SDF-1 = fator derivado do estroma 1; T-PX = transplante no dia pós-natal X; SI = sem imunossupressão; TC = transplante contralateral; TI = transplante ipsilateral; VEH = veículo.

* Animais tratados *versus* animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

Tabela 1 - Revisão das publicações sobre terapia celular em hipóxia-isquemia experimental no período neonatal (*continuação*)

Referência	Modelo de HI (animal, idade e duração da hipóxia)	Tipo celular	Transplante (concentração, via, tempo e imunossupressão)	Resultados funcionais*	Resultados morfológicos, celulares e moleculares*	Migração celular	Diferenciação celular
Yasuhara et al. ⁵⁷	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CPAM de medula óssea murina	2 x 10 ⁵ células/3 µL; iv ou ic (TI); 7 dias após HI; SI	Melhora da coordenação e assimetria motora 14 dias pT (iv e ic)	Redução da morte neuronal na região hipocampal de CA3 14 dias pT (iv e ic)	Detecção das células transplantadas nas regiões hipocampais isquêmicas de CA2 e CA3 14 dias pT (iv e ic). Localizavam-se também em vasos sanguíneos no hipocampo (iv)	Células transplantadas apresentaram marcação neuronal 14 dias pT (iv e ic)
Sato et al. ²⁸	Ratos Sprague-Dawley; P7; 120 min	CTN murinas (14 ^o dia embrionário) ou CTN+ChABC (25 mU)	2,5 x 10 ⁵ células/5 µL; icv (TI); 24 h após HI; SI	NA	↓ dano cerebral (CTN+ChABC < CTN = VEH); ↑ peso cerebral (CTN+ChABC > CTN = VEH) (7 dias pT)	Presença das células transplantadas na lesão isquêmica e áreas adjacentes 7 dias pT	NA
de Paula et al. ³⁸	Ratos Wistar; P7; 120 min	CTCUH	1 x 10 ⁷ células/100 µL; iv; 24 h após HI; SI	Nenhum efeito sobre o déficit da memória espacial 3 semanas pT	Nenhum efeito sobre a atrofia cerebral 3 semanas pT	Detecção de poucas células transplantadas 24 h, 1 e 3 semanas pT	NA
Yasuhara et al. ⁴⁰	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CTCUH ou CTCUH+M (manitol 1.1 mol/L)	1,5 x 10 ⁴ células/200 µL; iv; 7 dias após HI; SI	Melhora da coordenação e assimetria motora 7 e 14 dias pT (CTCUH < CTCUH+M)	↑ níveis cerebrais de GDNF, BDNF e NGF 3 dias pT (CTCUH < CTCUH+M); ↑ densidade dendrítica na região hipocampal de CA1 14 dias pT	Presença de poucas células transplantadas no hipocampo isquêmico 14 dias pT	NA
Pimentel-Coelho et al. ³⁷	Ratos Lister-Hooded; P7; 90 min	CTCUH	2 x 10 ⁶ células/200 µL; ip; 3 h após HI; SI	Melhora no desenvolvimento dos reflexos sensório-motores 4 dias pT	↓ morte neuronal e expressão de caspase 3 no estriado isquêmico 2 dias pT; ↓ ativação microglial no córtex 7 dias pT	Presença de poucas células transplantadas no córtex e estriado isquêmico 2 dias pT	NA
Jenny et al. ³¹	Ratos Wistar; P3; 30 min	Células progenitoras neurais murinas com superexpressão de FGF-2	2-5 x 10 ⁴ células/1 µL; ic (TI); 4 dias após HI; SI	NA	Formação de agrupamentos celulares com superexpressão de FGF-2 em áreas perivasculares	Presença das células transplantadas em áreas de lesão cortical e próximas a vasos sanguíneos 7 dias pT	Células transplantadas apresentaram marcação de neurônio imaturo 7 dias pT
van Velthoven et al. ⁵⁶	Camundongos C57Bl/6; P9; 45 min	CTM de medula óssea murina	1 x 10 ⁵ células/2 µL; ic (TI); 3 dias (T-P12) ou 10 dias (T-P19) após HI; SI	Melhora da assimetria motora em 7 e 18 dias pT (T-P12), ou em 11 e 18 pT (T-P19)	T-P12: ↓ lesão cerebral (18 dias pT); ↑ neuro- e oligodendrogênese, e ↓ proliferação microglial no hipocampo e córtex isquêmico (7 e 18 dias pT); ↑ proliferação de astrócitos no hipocampo, e ↓ no córtex isquêmico (7 dias pT). T-P19: ↓ lesão cerebral (18 dias pT)	Menos de 1% das células em proliferação no hemisfério isquêmico originaram-se daquelas transplantadas	NA
Lee et al. ⁵⁵	Ratos Sprague-Dawley; P7; 210 min	CTM de medula óssea humana	1 x 10 ⁶ células/µL; ica; 3 dias após HI; SI	Apesar de nenhum efeito sobre o déficit na coordenação motora, houve ↓ assimetria motora 20 dias pT	Nenhum efeito sobre a atrofia cerebral 6 semanas pT	Detecção das células transplantadas igualmente distribuídas em ambos os hemisférios cerebrais 6 semanas pT	Células transplantadas apresentaram marcação de astrócito e microglia (> n ^o), neurônio e oligodendrócito (< n ^o), igualmente distribuídas em ambos os hemisférios cerebrais 6 semanas pT

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; BHK-GDNF = células renais de filhotes de hamster (BHK) transfectadas com DNA complementar de fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF); CPAM = células progenitoras adultas multipotentes; ChABC = condroitinase ABC; CTCUH = células-tronco de cordão umbilical humano; CTM = células-tronco mesenquimais; CTN = células-tronco neurais; CXCR4 = receptor de quimiocina CXC 4; FGF-2 = fator de crescimento de fibroblasto 2; GDNF = fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; HI = hipóxia-isquemia; ic = via intracerebral; ica = via intracardíaca; icv = via intracerebroventricular; ip = via intraperitoneal; iv = via intravenosa; NA = não avaliado; NGF = fator de crescimento neural; NT3 = neurotrofina -3; P = dia pós-natal; PGA = ácido poliglicólico; pT = pós-transplante; SDF-1 = fator derivado do estroma 1; T-PX = transplante no dia pós-natal X; SI = sem imunossupressão; TC = transplante contralateral; TI = transplante ipsilateral; VEH = veículo.

* Animais tratados *versus* animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

Tabela 1 - Revisão das publicações sobre terapia celular em hipóxia-isquemia experimental no período neonatal (*continuação*)

Referência	Modelo de HI (animal, idade e duração da hipóxia)	Tipo celular	Transplante (concentração, via, tempo e imunossupressão)	Resultados funcionais*	Resultados morfológicos, celulares e moleculares*	Migração celular	Diferenciação celular
Xia et al. ⁴¹	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CTM de sangue de cordão umbilical humano	5 x 10 ⁴ células/μL; ic (TI); 3 dias após HI; ciclosporina	Melhora da função neurológica 14, 21 e 28 dias pT	Atenuação do dano cerebral 28 dias pT	Presença das células transplantadas no córtex e dispersão para hipocampo 7 dias pT	Células transplantadas apresentaram marcação de astrócito, mas não de neurônio, 7 dias pT
Daadi et al. ²⁵	Ratos Sprague-Dawley; P7; 90 min	CTN humana de células-tronco embrionárias	5 x 10 ⁴ células/μL; ic (TI em 3 locais); 24 h após HI; SI	Melhora da coordenação e assimetria motora 28-30 dias pT	Nenhum efeito sobre a atrofia cerebral; superexpressão de genes envolvidos na neuro-/gliogênese e suporte neurotrófico no hemisfério isquêmico; ↑ brotamento axonal para o hemisfério ipsilateral; ↑ terminais axonais no córtex sensorio-motor, corpo caloso, estriato e tálamo ipsilateral; ↑ células microgliais no estriado isquêmico, mas não no córtex (1 mês pT)	Permanência das células transplantadas, com dispersão para o estriado isquêmico, em 1 mês pT	Células transplantadas apresentaram marcação de CTN, neurônio e astrócito 1 mês pT

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro; BHK-GDNF = células renais de filhotes de hamster (BHK) transfectadas com DNA complementar de fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial (GDNF); CPAM = células progenitoras adultas multipotentes; ChABC = condroitinase ABC; CTCUH = células-tronco de cordão umbilical humano; CTM = células-tronco mesenquimais; CTN = células-tronco neurais; CXCR4 = receptor de quimiocina CXC 4; FGF-2 = fator de crescimento de fibroblasto 2; GDNF = fator neurotrófico derivado de linhagem celular glial; HI = hipóxia-isquemia; ic = via intracerebral; ica = via intracardíaca; icv = via intracerebroventricular; ip = via intraperitoneal; iv = via intravenosa; NA = não avaliado; NGF = fator de crescimento neural; NT3 = neurotrofina -3; P = dia pós-natal; PGA = ácido poliglicólico; pT = pós-transplante; SDF-1 = fator derivado do estroma 1; T-PX = transplante no dia pós-natal X; SI = sem imunossupressão; TC = transplante contralateral; TI = transplante ipsilateral; VEH = veículo.

* Animais tratados *versus* animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

de atrair células-tronco astrocíticas para o local de lesão, assim como de induzir a neurodiferenciação.

Em um elegante trabalho, Park et al.²² apresentaram interessantes observações do comportamento de CTN quando transplantadas no cérebro de camundongos neonatos submetidos à HI. Quando transplantadas no hemisfério contralateral à lesão HI, as CTN migraram através do corpo caloso e de outras comissuras inter-hemisféricas para a área infartada. Já quando o transplante foi feito no hemisfério ipsilateral, as células permaneceram no local da lesão. Em ambos os casos, as CTN diferenciaram-se no sítio isquêmico, apresentando marcação para neurônio, oligodendrócitos, astrócitos e células progenitoras neurais. Além disso, esse mesmo grupo de pesquisa elucidou os mecanismos inflamatórios envolvidos na migração da CTN frente à lesão HI²³.

Células-tronco embrionárias da camada interna do blastocisto de embriões também apresentam a capacidade de diferenciar-se em neurônios através de protocolos de cultura específicos, podendo ser consideradas fontes celulares alternativas para o tratamento de lesões cerebrais. Dois estudos utilizaram células-tronco embrionárias neurodiferenciadas em modelo de HI. No primeiro deles, demonstrou-se que o trans-

plante de células-tronco embrionárias neurodiferenciadas *in vitro* resultou na melhora da memória espacial em ratos HI²⁴. No entanto, embora tenha ocorrido aumento de células neuronais no hipocampo isquêmico, não há evidências claras de que o sucesso nos desfechos encontrados esteja relacionado à repopulação neuronal, à diferenciação ou à liberação de fatores tróficos pelas células administradas. Em outro trabalho recentemente publicado, verificou-se o restabelecimento da coordenação e simetria motora de ratos HI após transplante de células-tronco embrionárias humanas neurodiferenciadas. No entanto, os autores constataram ausência de efeito reparador sobre o dano estrutural do cérebro²⁵.

O ambiente isquêmico remanescente pode influenciar na restauração tecidual em decorrência da agressividade do processo HI. As lesões HI podem se associar à volumosa necrose tecidual, resultando em um cisto porencefálico. Tal situação oferece um microambiente prejudicado para o abrigo de células transplantadas devido à carência de aporte sanguíneo e matriz extracelular adequada. Através de estudos na área da engenharia tecidual, uma nova abordagem de tratamento tem sido proposta com o uso de matrizes (*scaffolds*) biodegradáveis dentro da cavidade

infartada, a fim de intensificar a formação de conexões entre o enxerto e o tecido hospedeiro^{9,26}. Utilizando essa abordagem terapêutica, Park et al.²⁷ demonstraram uma implantação satisfatória dos *scaffolds* associada à redução da cavidade cerebral infartada e ao déficit motor em ratos submetidos à HI. Surpreendentemente, constatou-se a formação de interconexões entre o implante e o tecido receptor, além do restabelecimento de projeções neuronais de longa distância anteriormente prejudicadas pelo processo HI.

Outros compostos também podem ser associados à terapia celular com o objetivo de prover suporte ao desenvolvimento de CTN em modelo de HI. Um exemplo disso é a utilização de condroitinase ABC (ChABC) associada ao transplante intracerebroventricular de CTN em ratos neonatos submetidos à HI que resultou na redução acentuada do dano cerebral²⁸. Devido à capacidade de promover plasticidade cerebral, os autores sugerem que a ChABC teria facilitado a adesão e migração de CTN para áreas isquêmicas.

Considerando CTN como possíveis vetores de fatores tróficos, alguns trabalhos utilizam células-tronco geneticamente modificadas para expressar níveis aumentados dessas substâncias. Utilizando CTN que superexpressam neurotrofina-3 (CTN/NT-3) no cérebro de ratos HI, os pesquisadores observaram aumento da porcentagem de diferenciação neuronal de 5 para 10-20% na área infartada e > 80% na penumbra, quando comparado à linhagem de CTN não geneticamente modificada. Os autores sugerem que a produção da NT3 pelas CTN possa ter atuado de maneira autócrina e parácrina, ligando-se às células adjacentes do tecido hospedeiro e estimulando a neurogênese endógena^{22,29}. Outros estudos também têm demonstrado que CTN que superexpressam fatores tróficos específicos migram para a região lesada e formam nichos de células imaturas e proliferativas disponíveis para o reparo celular após HI³⁰. Adicionalmente, identificou-se que o ambiente perivascular é fundamental para a manutenção dessas células em um estado ativo de imaturidade e proliferação³¹. Estudos também mostram que a utilização de um vetor celular para liberar determinados fatores tróficos reduz a incidência e extensão do dano cerebral e cognitivo em estudos experimentais de HI^{32,33}.

Transplante de células-tronco de cordão umbilical

Células-tronco de cordão umbilical humano (CTCUH) têm sido usadas em alguns estudos experimentais de lesão HI em decorrência de sua capacidade de diferenciação em neurônios e células gliais *in vitro* e *in vivo*. No entanto, há poucos estudos usando células de sangue de cordão umbilical não humano em modelos animais de doenças neurológicas, havendo divergências do uso concomitante de imunossuppressores^{34,35}.

O primeiro estudo a testar o efeito do transplante de CTCUH em ratos HI foi realizado por Meier et al.³⁶. Os autores demonstraram que a injeção intraperitoneal de CTCUH 24 h após a lesão HI em roedores neonatos resultou em melhora do padrão de marcha dos animais. Pode-se também constatar que as células-tronco migraram para a região da lesão cerebral, porém não se observou redução da atrofia cerebral

e transdiferenciação das células transplantadas. Utilizando a mesma via de administração dessas células, um grupo de pesquisadores demonstrou que a injeção intraperitoneal de CTCUH, 3 h após a lesão HI, tem a capacidade de melhorar os reflexos primitivos desses animais³⁷. Além disso, os autores demonstraram redução da morte celular no estriado e um efeito anti-inflamatório no córtex. No entanto, foi possível verificar a presença de poucas células transplantadas no estriado e córtex isquêmicos dos animais tratados.

No mesmo ano, nosso grupo de pesquisa publicou um estudo sobre os efeitos da administração intravenosa de CTCUH em HI experimental³⁸. No entanto, nossos resultados demonstraram apenas uma tendência para a redução dos déficits comportamentais e morfológicos nos ratos tratados 30 dias após o transplante. Além disso, poucas células transplantadas foram identificadas no cérebro dos animais tratados. Aspectos como dose, tempo de seguimento para a avaliação e via de administração podem ter influenciado nos desfechos do estudo.

Paralelamente, também desenvolvemos um modelo experimental de hipóxia-isquemia em suínos neonatos para o estudo da terapia celular em animais de médio porte³⁹. Os suínos recém-nascidos que receberam CTCUH através da artéria carótida comum apresentaram melhores escores neurológicos quando comparados aos animais apenas submetidos ao modelo de HI ou ao grupo transplantado via artéria umbilical. Adicionalmente, foi possível identificar a presença das células transplantadas apenas em alguns animais do grupo transplantado por via artéria carótida.

Um interessante estudo demonstrou que a injeção intravenosa de CTCUH, 7 dias após a lesão HI, melhorou a coordenação e assimetria motora dos ratos tratados⁴⁰. Além disso, foram detectados níveis aumentados de fatores de crescimento no hemisfério cerebral ipsilateral à lesão 3 dias pós-transplante. Nesse estudo, os autores também incluíram um grupo de animais HI que receberam a mesma dose de CTCUH associado ao uso de manitol, substância que aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os resultados desse grupo experimental demonstraram que o manitol potencializou ainda mais os efeitos funcionais e a expressão dos fatores tróficos, em comparação ao grupo apenas transplantado com CTCUH.

A viabilidade terapêutica de células-tronco mesenquimais, provenientes de cordão umbilical humano em modelo experimental de HI, também foi recentemente analisada⁴¹. O transplante foi efetuado 3 dias após HI através da via intracerebral. Os animais tratados apresentaram uma melhora progressiva da função neurológica, associada à atenuação do dano cerebral. Além disso, verificou-se a presença das células transplantadas no córtex, com dispersão em direção ao hipocampo, 7 dias pós-transplante, apresentando diferenciação astrocítica, mas não neuronal.

Em contexto clínico, pesquisadores da Universidade Duke iniciaram estudo fase I com transplante autólogo de células-tronco de cordão umbilical em recém-nascido a termo com encefalopatia HI de grau moderado a severo (NCT00593242). As crianças serão acompanhadas para avaliação de neurodesenvolvimento e submetidas a exames de ressonância mag-

nética. Até o presente momento, o ensaio clínico encontra-se na fase de recrutamento de pacientes compatíveis com os critérios de seleção do estudo.

Transplante de células-tronco de medula óssea

Estudos utilizando células-tronco da medula óssea também têm sido amplamente utilizados em modelos animais de lesão isquêmica cerebral, como em ratos adultos⁴²⁻⁴⁵ e, mais recentemente, em ensaios clínicos, demonstrando resultados promissores^{46,47}.

O sangue da medula óssea contém, pelo menos, duas populações celulares com um grande potencial para o uso clínico: as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (CTM)³⁴. A descoberta de que células-tronco hematopoiéticas também possuíam a capacidade de se transdiferenciar em linhagem neuronal ampliou o espectro de utilização dessa fonte de células imaturas^{48,49}. Especificamente, as CTM são derivadas do estroma medular e são definidas conforme a presença de marcadores de superfície específicos, comportamento *in vitro* e potencial de diferenciação⁵⁰. Esse tipo celular apresenta uma elevada capacidade de expressar fenótipos neuronais *in vitro*^{51,52} e *in vivo*^{53,54}.

Recentemente, dois grupos de pesquisa apresentaram seus resultados utilizando CTM de medula óssea em modelo de HI experimental. Lee et al.⁵⁵ utilizaram a via intracardíaca para o transplante 72 h após a lesão. Os autores observaram a presença dos implantes celulares igualmente distribuídos em ambos os hemisférios cerebrais 6 semanas após o transplante. Tais células expressaram mais frequentemente marcadores de astrócito e microglia, além de marcadores de neurônio e oligodendrócitos, em menor número. Adicionalmente, observou-se melhora da assimetria motora nos ratos HI 40 dias após o transplante, embora não tenha sido constatada a reparação do dano isquêmico tecidual.

Já em outro estudo, demonstrou-se que a injeção intracerebral de CTM, 72 h após lesão, aumentou a proliferação e a diferenciação neuronal no hemisfério isquêmico⁵⁶. Os

desfechos histológicos e motores também foram favoráveis 10 e 21 dias após o tratamento. No entanto, menos de 1% dos novos neurônios eram derivados das células transplantadas. O estudo sugere que as CTM tenham favorecido a formação endógena de novas células neuronais a partir da redução da atividade inflamatória microglial.

Utilizando uma fração purificada das CTM, denominada de células progenitoras adultas multipotentes (CPAM), Yasuhara et al.⁵⁷ demonstraram que a administração intracerebral ou intravenosa de CPAM de medula óssea de camundongo, 7 dias após HI, resultou em melhora motora dos animais transplantados. Curiosamente, houve equivalência na recuperação do déficit motor entre os animais que receberam transplante alogênico (entre animais geneticamente diferentes, porém da mesma espécie) e aqueles que receberam transplante singênico (entre animais geneticamente idênticos). Associada à perda neuronal diminuída, detectou-se também a presença de CPAM nas regiões hipocâmpais isquêmicas e a marcação neuronal 14 dias pós-transplante^{57,58}.

Mecanismos de ação envolvidos na terapia celular em hipóxia-isquemia experimental

Compreender os mecanismos de ação envolvidos no processo de neuroregeneração pelas células-tronco é fundamental para otimizar os benefícios clínicos da terapia celular. Diversos fatores (resumidos na Tabela 2) podem ser responsáveis pelos resultados positivos apresentados em estudos recentes de HI experimental. No entanto, apesar dos benefícios significativos demonstrados nesses trabalhos, as variáveis responsáveis pelo sucesso do transplante de células-tronco em HI ainda não foram estabelecidas.

Transdiferenciação celular

A primeira hipótese estudada para justificar os efeitos benéficos da terapia celular em doenças neurológicas foi a da transformação direta de células-tronco em neurônios maduros, processo denominado de transdiferenciação. No entanto,

Tabela 2 - Principais mecanismos de ação das células-tronco na asfixia perinatal

Mecanismo de ação	Descrição
Transdiferenciação celular	Transformação direta de células-tronco (diversas fontes) em neurônios maduros
Liberção de fatores tróficos	Células-tronco podem funcionar como vetores para a produção e/ou liberação de fatores neurotróficos
Estimulação da neurogênese endógena	É possível que as células-tronco transplantadas possam potencializar esses mecanismos intrínsecos de reparação
Modulação do processo inflamatório	Células-tronco podem inibir a ativação de diversas células imunes e, consequentemente, aumentar a neurogênese e a produção de fatores tróficos
Estimulação da angiogênese	Tem-se observado a transdiferenciação das células-tronco em novos vasos (angiogênese), o aumento da vascularização nas áreas de penumbra e a formação indireta de novos vasos através da liberaçõ de fatores de crescimento
Indução da neuroplasticidade	Aumento nas conexões aferentes e eferentes entre o local da lesão e as regiões cerebrais, restaurando as atividades sinápticas locais através da sinaptogênese

os estudos com HI têm mostrado que a recuperação funcional dos animais tratados tem ocorrido independente da presença de células-tronco com expressão de marcadores neuronais nas áreas isquêmicas. A transdiferenciação de células-tronco adultas de origem mesodérmica em células derivadas da camada ectodérmica ainda permanece em debate. Em estudos *in vitro*, a transdiferenciação é detectada através da positividade de marcadores específicos de neurônios e células gliais. No entanto, a caracterização de propriedades eletrofisiológicas dessas células transdiferenciadas ainda está pouco documentada⁵⁹⁻⁶¹. Em decorrência desses achados, outros mecanismos têm sido propostos⁶².

Liberação de fatores tróficos

Os fatores tróficos constituem uma família de polipeptídeos essenciais para a sobrevivência e a diferenciação de neurônios normais em desenvolvimento, além de terem um papel importante na neuroproteção de neurônios maduros sob condições patológicas⁶³. As células-tronco podem servir como veículos de moléculas específicas, funcionando como vetores para a produção e/ou liberação de fatores neurotróficos^{29,64}. Interagindo com seus receptores, é possível que as células-tronco possam liberar fatores de crescimento e citocinas, inibindo processo de apoptose, aumentando a angiogênese e/ou estimulando a diferenciação de células precursoras endógenas^{12,40}. Dados obtidos no estudo de Borlongan et al.⁶⁵ reportaram um aumento de 15% na produção de fatores tróficos no sangue circulante de ratos adultos submetidos à isquemia cerebral após transplante de CTCUH. Recentemente, o mesmo grupo demonstrou resultados similares após o transplante de células-tronco em um modelo de HI neonatal em ratos⁴⁰. Embora exista a liberação endógena de fatores tróficos pelo tecido neuronal frente a lesões isquêmicas, esse mecanismo compensatório é insuficiente para promover a regeneração tecidual e/ou recuperação funcional. Portanto, os autores desses estudos sugerem que o aumento de fatores tróficos específicos seja, provavelmente, em decorrência do transplante de células-tronco.

Estimulação da neurogênese endógena

Diversos estudos demonstraram aumento da neurogênese endógena frente às lesões HI neonatais^{66,67}. No entanto, é possível que as células-tronco transplantadas possam potencializar esses mecanismos intrínsecos de reparação. No estudo de van Velthoven et al.⁵⁶, verificou-se que o transplante de células-tronco em animais HI reduziu a proliferação microglial e aumentou a neurogênese. Os autores sugerem que as células transplantadas tiveram a capacidade de modular a resposta inflamatória pós-HI, favorecendo o processo de neurogênese endógena.

Modulação do processo inflamatório

Apesar de benéfico para o recrutamento e migração de células-tronco até o local da lesão, o processo inflamatório determinado por lesões cerebrais parece ser restritivo para a diferenciação celular²³. Nesse contexto, estudos atuais têm demonstrado que diferentes fontes de células-tronco podem inibir a ativação de diversas células imunes. Pluchino

et al.⁶⁸ mostraram que células-tronco neurais promoveram a neuroproteção através de citocinas anti-inflamatórias e de moléculas imunomodulatórias. Em outro estudo, a injeção intravenosa de CTCUH aumentou a sobrevivência do tecido neuronal e reduziu a infiltração de leucócitos e a expressão de proteínas pró-inflamatórias no cérebro isquêmico⁶⁹.

No SNC, as células microgliais constituem a primeira linha de defesa imunológica e compreendem um dos principais processos inflamatórios que contribuem ao dano cerebral. Essa população celular libera uma variedade de citocinas e fatores de crescimento e reagem rapidamente no tecido cerebral lesado para promover a fagocitose e apresentar antígenos para as células T. No entanto, a ativação microglial está comumente associada à diminuição da produção de fatores tróficos e com redução da neurogênese^{9,63,70}. Pode-se observar que, em dois estudos de terapia celular em HI experimental, o transplante de células-tronco reduziu a expressão de microglia no córtex e hipocampo isquêmico e, conseqüentemente, melhorou os desfechos funcionais nos animais tratados^{37,56}. Em contrapartida, Daadi et al.²⁵ verificaram aumento de proliferação de células microgliais no estriato de animais HI transplantados com CTN. Esses dados sustentam a ideia de que as células microgliais desempenham um papel pró- e anti-inflamatório, dependendo do seu estado de ativação e fenótipo funcional⁷¹.

Estimulação da angiogênese

Alguns estudos com lesões isquêmicas em ratos adultos têm mostrado que há um aumento da vascularização nas áreas de penumbra poucos dias após o transplante de células-tronco^{72,73}. Além disso, tem-se observado a transdiferenciação das células-tronco transplantadas em novos vasos (angiogênese)^{34,74}. É provável que também ocorra um evento indireto das células na formação dos vasos sanguíneos. Chen et al.⁷⁵ mostraram que células-tronco do estroma da medula óssea promoveram angiogênese na região isquêmica através de um aumento dos níveis endógenos de fator de crescimento endotelial vascular. Até o presente momento, existe apenas um estudo indicando neovascularização no tecido cerebral de animais HI transplantados com CTN²⁷. Os autores sugerem que tenha ocorrido a elaboração de sinais angiogênicos pós-transplante, propiciando a formação de um parênquima novo e vascularizado no local do cisto porencefálico.

Indução da neuroplasticidade

Eventos neuroplásticos incluem um aumento nas conexões aferentes e eferentes entre o local da lesão e as regiões cerebrais, restaurando as atividades sinápticas locais através da sinaptogênese³⁴. Recentemente, tem-se observado a expressão de proteínas sinápticas em ratos adultos com lesão cerebral isquêmica que receberam transplante de células-tronco, indicando a formação de contatos sinápticos^{76,77}. Confirmando tal possibilidade, um estudo recente demonstrou que células-tronco neurais, transplantadas via intracerebral de ratos HI, aumentou o número de terminais axonais no córtex sensorio-motor, corpo caloso, estriato e tálamo ipsilaterais, assim como brotamento axonal acentuado em direção ao hemisfério lesado²⁵.

Aspectos translacionais da terapia celular em asfixia perinatal

A pesquisa translacional pode ser definida como um processo que parte da medicina baseada em evidências em direção a soluções sustentáveis para problemas de saúde da comunidade⁷⁸. Os estudos pré-clínicos constituem o primeiro passo no desenvolvimento de novas terapias. No entanto, a transferência dos conhecimentos adquiridos através de estudos *in vitro* e em modelos animais de HI para o uso clínico da terapia celular requer atenção para as diferenças entre as espécies e a análise crítica dos resultados experimentais. Além disso, aspectos ainda pouco elucidados (Tabela 3), tais como, a via de administração, o número de células transplantadas, o tipo de célula utilizada e o momento de intervenção pós-lesão são variáveis importantes que poderão influenciar significativamente a resposta clínica. Portanto,

após o esclarecimento de questões fundamentais para a segurança do tratamento, é possível que estudos clínicos de fase I possam ser iniciados para avaliar essa abordagem terapêutica inovadora.

A escolha da via de administração pode ser um fator crucial para o sucesso da terapia celular quando se considera que o benefício do tratamento dependa da migração e localização das células transplantadas na região cerebral comprometida. Atualmente, a melhor rota de transplante de células-tronco para o tratamento de neuropatologias ainda não está definida. No entanto, concorda-se que a rota ideal seria aquela que apresentasse alta eficiência e especificidade, com o mínimo de efeitos adversos. Estudos em modelos animais de HI têm utilizado uma variedade de métodos de administração, incluindo a via intraperitoneal, intravenosa e intracerebral.

Tabela 3 - Aspectos relevantes para o uso clínico da terapia celular em asfixia perinatal

Aspecto	Vantagens	Desvantagens
Via de administração		
Venosa	Menos invasiva e mais segura	Necessidade de sinais quimiotáticos Células podem migrar para outros órgãos Necessidade de avaliar efeitos adversos
Arterial	Maior direcionamento das células-tronco para os locais lesados Técnica de rotina	Risco de microembolismos e isquemias
Intracraniana	Facilita migração das células-tronco no sítio da lesão isquêmica	Mais invasiva, risco de lesões
Intraperitoneal	Técnica prática, simples e menos invasiva	Células necessitam viajar longas distâncias Poucos estudos
Fonte e tipo celular		
Embrião ou feto	Elevado poder de diferenciação e proliferação	Entraves ético-religiosos Dificuldade de obtenção Inviável para o uso em fase aguda de lesão
Cordão umbilical (mononucleares)	Facilidade de obtenção Elevada quantidade de células Possibilidade de transplante autólogo	Pouca caracterização das células-transplantadas
Medula óssea (mononucleares)	Elevada quantidade de células Possibilidade de transplante autólogo	Pouca caracterização das células-transplantadas Técnica dolorosa e inviável para recém-nascidos
Células-tronco neurais	Células da mesma origem embrionária Amplamente estudadas Padrão-ouro para o tratamento de lesões cerebrais	Migração restrita Morte celular Dificuldade de obtenção e uso imediato
Tempo pós-transplante		
Agudo	Atua de forma neuroprotetora Presença de sinais quimiotáticos e permeabilidade vascular Resultados pré-clínicos consistentes	Limita ao uso de tipos celulares pouco processados (cultura) Inviável para casos já estabelecidos
Crônico	Possibilidade do uso em pacientes com sequelas estabelecidas	Ausência de sinais quimiotáticos apropriados Ausência de permeabilidade vascular Escassez de estudos

Através do transplante intracerebral, é possível atingir diretamente uma área cerebral específica. Apesar da precisão da técnica, o procedimento é invasivo e diversas aplicações seriam necessárias para abranger uma lesão isquêmica, resultando em um comprometimento cerebral ainda maior⁷⁹. Injeções intracerebroventriculares também constituem uma abordagem intracraniana de administração das células-tronco. No entanto, apesar de permitir uma distribuição celular difusa, essa via não é capaz de atingir lesões afastadas dos ventrículos e esbarra nas mesmas questões que o transplante intracerebral. Além disso, as células transplantadas podem permanecer aderidas nas paredes dos ventrículos e causar hidrocefalia obstrutiva^{79,80}. Embora a maioria dos estudos experimentais de terapia celular em HI neonatal utilize o transplante intracerebral, é mais provável que outras vias de administração menos invasivas sejam estabelecidas para a prática clínica. Em contexto experimental demonstrouse equivalência na recuperação motora e morfológica do transplante intravenoso e intracerebral de células-tronco em modelo animal de HI neonatal⁵⁷.

Uma recente metanálise demonstrou que transplante celular pela via intravenosa é capaz de melhorar os desfechos de modelos animais de neuropatologias, sendo que a inibição do processo apoptótico é a principal modificação molecular cerebral pós-transplante⁸¹. O procedimento de administração intravenosa é menos invasivo, simples e seguro, possibilitando ampla distribuição das células transplantadas para áreas cerebrais HI^{38,40,57}. Além disso, permite que estas entrem em contato com sinais quimiotáticos provenientes da lesão cerebral e sejam seletivamente acumuladas no tecido alvo^{79,82}. No entanto, apenas um número reduzido de células-tronco atinge o local de lesão cerebral por permanecerem retidas nos pulmões, rins, fígado e baço. Em decorrência disso, toxicidade e crescimento ectópico em outros órgãos necessitam ser avaliados antes do uso clínico⁸⁰.

Uma maneira de evitar a circulação corporal sistêmica seria optar pelo transplante das células-tronco por um acesso intra-arterial. Dados recentes mostram migração igualmente distribuída e desfechos neurológicos favoráveis através do uso dessa abordagem terapêutica em modelo de HI em ratos⁵⁵. Essa rota desvia a captação pelos órgãos sistêmicos, permitindo que uma concentração maior de células-tronco atinja o sítio isquêmico, uma vez que os vasos tenham reperusão. Caso os vasos estejam permanentemente ocluídos, as células transplantadas permanecerão distribuídas apenas na região da penumbra⁷⁹. Entretanto, estudos recentes reportam alta taxa de mortalidade de animais transplantados pela via intra-arterial, sugerindo a formação de oclusões microvasculares e isquemias^{79,80,83}. Na prática médica, o método de acesso intra-arterial é comumente utilizado em técnicas intervencionistas de cateterismo vascular. Em um ensaio clínico brasileiro de terapia celular em pacientes com isquemia crônica (NCT00473057), foram observados resultados promissores pós-transplante autólogo de células-tronco da medula óssea utilizando a via intra-arterial⁴⁶.

A via intraperitoneal também foi utilizada para transplante celular em HI neonatal, demonstrando migração celular da cavidade peritoneal até as regiões de dano cerebral^{36,37}. Os resultados do estudo sugerem a presença de sinais qui-

miotáticos precisos e a necessidade de quebra da barreira hematoencefálica para que ocorra migração celular em distâncias tão longas. Apesar da praticidade do procedimento, necessita-se um número maior de estudos que dêem suporte para esta via de transplante alternativa.

A escolha do intervalo de tempo entre o estabelecimento da lesão HI e a intervenção também é importante, pois ao longo do tempo, o ambiente cerebral adapta-se drasticamente frente a uma lesão HI. Em decorrência disso, a maioria dos estudos utilizando a administração sistêmica de células-tronco em HI utiliza estágios agudos de lesão. Células-tronco injetadas precocemente podem auxiliar na preservação e na sobrevivência do tecido neuronal. Adicionalmente, van Velthoven et al.⁵⁶ sugerem que o transplante celular seja realizado entre 2 e 3 dias pós-HI, momento em que o cérebro apresenta maior capacidade de proliferação celular e ativação de mecanismos de reparo endógeno. No trabalho de Park et al.²², a janela terapêutica para transplante celular eficaz abrangeu 3-7 dias pós-HI, devido à elevada atividade metabólica, bioquímica e molecular deste período que poderia facilitar a migração das células transplantadas²². Já no caso de transplantes tardios, é possível que as células-tronco possam estimular a liberação de fatores tróficos para restaurar as funções perdidas⁸⁰. No entanto, apesar da melhora funcional observada em ratos adultos que receberam células-tronco um mês após isquemia cerebral⁸⁴, não há estudos que demonstrem benefícios terapêuticos em modelos animais de HI crônica, limitando a aplicabilidade clínica em lesões hipóxico-isquêmicas estabelecidas em decorrência da ausência de sinais quimiotáticos e permeabilidade vascular apropriados.

A permeabilização da barreira hematoencefálica também pode facilitar a entrada de células-tronco ou de fatores neurotróficos no SNC, especialmente quando forem utilizadas vias periféricas de transplante. Entretanto, recentemente, demonstrou-se que o número de células-tronco no hipocampo isquêmico dos animais HI transplantados pela via intravenosa, não diferiu significativamente quando comparados os animais que receberam apenas células-tronco com aqueles em que foi associado o manitol⁴⁰. Em contrapartida, os animais transplantados e administrados com manitol apresentaram maior concentração cerebral de alguns fatores tróficos. Também se verificou melhora acentuada dos desfechos comportamentais e histológicos com o uso de células-tronco e manitol, possivelmente através do efeito parácrino dessas células. Essas evidências indicam a importância da permeabilização da barreira hematoencefálica em terapia celular, mas também questionam se a neuroproteção é realmente dependente da migração e diferenciação celular.

O tipo e fonte celular mais adequados para o tratamento das lesões HI neonatais ainda necessitam ser definidos³⁴. O uso de CTN é considerado padrão-ouro para o tratamento de doenças neurológicas. No entanto, os resultados de muitos estudos demonstram que morte celular, migração restrita e rápida diferenciação em células gliais limitam a aplicabilidade das CTN no reparo neuronal. Além disso, um dos maiores obstáculos para o uso clínico desse tipo celular em lesões cerebrais neonatais é a sua dificuldade de obtenção. É provável que tecidos de biópsia ou de material extraído de tecido *post-mortem* sejam insuficientes para a produção de quantidades

significativas dessas células⁸⁵. As questões ético-religiosas envolvidas na extração de material embrionário e fetal e as preocupações com os riscos de resposta imunológica ou de formação de tumores malignos também inibem a aplicabilidade clínica dessas células. A neurodiferenciação *in vitro* para futura utilização dessas células em recém-nascidos com HI adiciona preocupação com os potenciais riscos de contaminação, reação imunológica aos fatores adicionados ao meio de cultivo celular e dificuldade de uso em transplantes agudos. Desvantagens similares relacionadas a segurança e dificuldade de uso imediato também são apresentadas pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea e cordão umbilical, amplamente usadas em HI experimental.

Em contrapartida, o processamento de células-tronco mononucleares provenientes do sangue de cordão umbilical e da medula óssea é relativamente simples e rápido. No contexto da área neonatal, as células-tronco mononucleares derivadas de sangue de cordão umbilical apresentam algumas vantagens em relação à aspiração da medula óssea. A obtenção de células-tronco de sangue de cordão umbilical não oferece nenhum risco e desconforto para o recém-nascido, podendo ser transplantadas após coleta autóloga. Além disso, o sangue do cordão umbilical pode ser usado terapêuticamente no período perinatal ou criopreservado para o uso tardio^{62,86}. No entanto, estudos adicionais necessitam ser realizados para caracterizar as populações celulares e avaliar efetividade e segurança^{80,87}.

Avaliação da dose-resposta das células-tronco em modelos animais também necessita ser realizada para embasar o seu uso clínico. Segundo Janowski et al.⁸¹, há uma associação dose-resposta entre o número de células injetadas e os efeitos do tratamento de neuropatologias em estudos experimentais. No entanto, a dose ideal de células-tronco é, em parte, dependente da via de administração, assim como do tipo celular usado, do momento de intervenção e a quantidade de células transplantadas que atingem a lesão cerebral. Do ponto de vista clínico, desfechos relacionados à segurança do transplante celular, tais como a formação tecidual ectópica e anormalidades comportamentais, devem ser incorporados na metodologia das investigações e no seguimento dos pacientes. Também é importante considerar metodologias seguras e efetivas para o monitoramento não invasivo da migração das células transplantadas e, conseqüentemente, estabelecer uma compreensão adequada das respostas do paciente ao tratamento proposto.

Conclusões

A pesquisa básica vem apresentando resultados promissores na área da lesão cerebral neonatal. Apesar da variabilidade dos métodos empregados, a maioria dos estudos citados nessa revisão indica que as células-tronco podem apresentar propriedades neuroprotetoras, resultando em melhores desfechos funcionais nos animais tratados. Certamente, o sucesso da terapia celular em roedores pode ser considerado o primeiro passo no desenvolvimento de uma abordagem terapêutica para um futuro uso clínico. No entanto, cabe ressaltar que as doenças cerebrais humanas apresentam mecanismos mais complexos de dano e regeneração

do que em animais de experimentação. Portanto, questões relacionadas à dose e ao tipo celular, à via de administração e ao momento adequado de intervenção necessitam ser definidas. Embora não determinante para a aplicação clínica, investigações adicionais sobre os mecanismos de ação das células-tronco em HI também constituem uma ferramenta importante na determinação da segurança e efetividade do transplante.

Agradecimentos

Os autores agradecem à PUCRS e à CAPES pelas contribuições para o desenvolvimento desta linha de pesquisa.

Referências

1. Souza FM. Fatores associados à asfixia perinatal no Brasil: estudo populacional com base no Sistema de Informações de Nascidos Vivos. [Tese de Doutorado em saúde da criança e da mulher]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003.
2. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol.* 2004;207:3149-54.
3. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics.* 2006;117: S28-33.
4. Procianny RS, Silveira RC. Síndrome hipóxico-isquêmica. *J Pediatr (Rio J).* 2001;77 Suppl 1:S63-70.
5. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol.* 2000;17:113-20.
6. Sahni R, Sanocka UM. Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinatol.* 2008;35:717-34, vi.
7. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:605-31.
8. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.
9. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol.* 2009;515:125-44.
10. Costa-Ferro ZS, Vitola AS, Pedroso MF, Cunha FB, Xavier LL, Machado DC, et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. *Seizure.* 2010;19:84-92.
11. Dunnett SB, Rosser AE. Cell therapy in Huntington's disease. *NeuroRx.* 2004;1:394-405.
12. Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol.* 2005;18:59-64.
13. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature.* 2002;418:50-6.
14. Koda M, Okada S, Nakayama T, Koshizuka S, Kamada T, Nishio Y, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport.* 2005;16:1763-7.
15. Elsayed MH, Hogan TP, Shaw PL, Castro AJ. Use of fetal cortical grafts in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* 1996;137:127-41.
16. Jansen EM, Solberg L, Underhill S, Wilson S, Cozzari C, Hartman BK, et al. Transplantation of fetal neocortex ameliorates sensorimotor and locomotor deficits following neonatal ischemic-hypoxic brain injury in rats. *Exp Neurol.* 1997;147:487-97.

17. Hess DC, Borlongan CV. *Stem cells and neurological diseases*. Cell Prolif. 2008;41 Suppl 1:94-114.
18. Rice CM, Scolding NJ. *Adult stem cells-reprogramming neurological repair?* Lancet. 2004;364:193-9.
19. Kornblum HI. *Introduction to neural stem cells*. Stroke. 2007;38:810-6.
20. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell. 1999;97:703-16.
21. Zheng T, Rossignol C, Leibovici A, Anderson KJ, Steindler DA, Weiss MD. *Transplantation of multipotent astrocytic stem cells into a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy*. Brain Res. 2006;1112:99-105.
22. Park KI, Hack MA, Ourednik J, Yandava B, Flax JD, Stieg PE, et al. *Acute injury directs the migration, proliferation, and differentiation of solid organ stem cells: evidence from the effect of hypoxia-ischemia in the CNS on clonal "reporter" neural stem cells*. Exp Neurol. 2006;199:156-78.
23. Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, et al. *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. 2004;101:18117-22.
24. Ma J, Wang Y, Yang J, Yang M, Chang KA, Zhang L, et al. *Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells*. Neurochem Int. 2007;51:57-65.
25. Daadi MM, Davis AS, Arac A, Li Z, Maag AL, Bhatnagar R, et al. *Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury*. Stroke. 2010;41:516-23.
26. Orive G, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF. *Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration*. Nat Rev Neurosci. 2009;10:682-92.
27. Park KI, Teng YD, Snyder EY. *The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue*. Nat Biotechnol. 2002;20:1111-7.
28. Sato Y, Nakanishi K, Hayakawa M, Kakizawa H, Saito A, Kuroda Y, et al. *Reduction of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic rats by intracerebroventricular injection of neural stem/progenitor cells together with chondroitinase ABC*. Reprod Sci. 2008;15:613-20.
29. Park KI, Himes BT, Stieg PE, Tessler A, Fischer I, Snyder EY. *Neural stem cells may be uniquely suited for combined gene therapy and cell replacement: Evidence from engraftment of Neurotrophin-3-expressing stem cells in hypoxic-ischemic brain injury*. Exp Neurol. 2006;199:179-90.
30. Dayer AG, Jenny B, Sauvain MO, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. *Expression of FGF-2 in neural progenitor cells enhances their potential for cellular brain repair in the rodent cortex*. Brain. 2007;130:2962-76.
31. Jenny B, Kanemitsu M, Tsuykov O, Potter G, Salmon P, Zraggen E, et al. *Fibroblast growth factor-2 overexpression in transplanted neural progenitors promotes perivascular cluster formation with a neurogenic potential*. Stem Cells. 2009;27:1309-17.
32. Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Ikenoue T. *Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats*. Am J Obstet Gynecol. 2005;192:1137-45.
33. Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Mishima K, et al. *Implantation of encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting cells prevents long-lasting learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats*. Am J Obstet Gynecol. 2005;192:1028-37.
34. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. *Cell transplantation therapy for stroke*. Stroke. 2007;38:817-26.
35. Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, et al. *Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair*. Ann N Y Acad Sci. 2005;1049:67-83.
36. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuhooff S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. *Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells*. Pediatr Res. 2006;59:244-9.
37. Pimentel-Coelho PM, Magalhães ES, Lopes LM, deAzevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R. *Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum*. Stem Cells Dev. 2010;19:351-8.
38. de Paula S, Vitola AS, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, et al. *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. 2009;65:631-5.
39. de Paula D. *Células-tronco de cordão umbilical em modelo experimental de asfixia neonatal em suínos [Tese]*. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2010.
40. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, et al. *Mannitol facilitates neurotrophic factor upregulation and behavioral recovery in neonatal hypoxic-ischemic rats with human umbilical cord blood grafts*. J Cell Mol Med. 2009 Feb 4.
41. Xia G, Hong X, Chen X, Lan F, Zhang G, Liao L. *Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates*. J Perinat Med. 2010;38:215-21.
42. Borlongan CV, Evans A, Yu G, Hess DC. *Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats*. Brain Res. 2005;1048:116-22.
43. Brenneman M, Sharma S, Harting M, Strong R, Cox CS Jr, Aronowski J, et al. *Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats*. J Cereb Blood Flow Metab. 2010;30:140-9.
44. Liu Z, Li Y, Zhang ZG, Cui X, Cui Y, Lu M, et al. *Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats*. J Cereb Blood Flow Metab. 2010;30:1288-95.
45. Chen JR, Cheng GY, Sheu CC, Tseng GF, Wang TJ, Huang YS. *Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke*. J Anat. 2008;213:249-58.
46. Barbosa da Fonseca LM, Gutfilen B, Rosado de Castro PH, Battistella V, Goldenberg RC, Kasai-Brunswick T, et al. *Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection*. Exp Neurol. 2010;221:122-8.
47. Correa PL, Mesquita CT, Felix RM, Azevedo JC, Barbirato GB, Falcao CH, et al. *Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke*. Clin Nucl Med. 2007;32:839-41.
48. Eglitis MA, Mezey E. *Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice*. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:4080-5.
49. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. *Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow*. Science. 2000;290:1779-82.
50. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy. 2006;8:315-7.
51. Alexanian AR, Maiman DJ, Kurpad SN, Gennarelli TA. *In vitro and in vivo characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment*. Stem Cells Dev. 2008;17:1123-30.
52. Barnabe GF, Schwindt TT, Calcagnotto ME, Motta FL, Martinez G Jr, de Oliveira AC, et al. *Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties*. PLoS One. 2009;4:e5222.
53. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. *Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:1364-9.

54. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-9.
55. Lee JA, Kim BI, Jo HC, Choi CW, Kim EK, Kim HS, et al. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2010;67:42-6.
56. van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. *Brain Behav Immun*. 2010;24:387-93.
57. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Mays RW, Deans RJ, Hess DC, et al. Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28:1804-10.
58. Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, et al. Behavioral and histological characterization of intrahippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic injury. *Cell Transplant*. 2006;15:231-8.
59. Fernandes KJ, Kobayashi NR, Gallagher CJ, Barnabe-Heider F, Aumont A, Kaplan DR, et al. Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Exp Neurol*. 2006;201:32-48.
60. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des*. 2005;11:1255-65.
61. Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull*. 2005;68:95-102.
62. Santner-Nanan B, Peek MJ, McCullagh P, Nanan R. Therapeutic potential of stem cells in perinatal medicine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005;45:102-7.
63. Boucherie C, Hermans E. Adult stem cell therapies for neurological disorders: benefits beyond neuronal replacement? *J Neurosci Res*. 2009;87:1509-21.
64. Muller FJ, Snyder EY, Loring JF. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:75-84.
65. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004;35:2385-9.
66. Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res*. 2005;58:600-6.
67. Plane JM, Liu R, Wang TW, Silverstein FS, Parent JM. Neonatal hypoxic-ischemic injury increases forebrain subventricular zone neurogenesis in the mouse. *Neurobiol Dis*. 2004;16:585-95.
68. Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature*. 2005;436:266-71.
69. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev*. 2005;14:595-604.
70. Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13632-7.
71. Schwartz M. Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:385-94.
72. Senior K. Angiogenesis and functional recovery demonstrated after minor stroke. *Lancet*. 2001;358:817.
73. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*. 2002;90:284-8.
74. Carroll JE, Borlongan CV. Adult stem cell therapy for acute brain injury in children. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008;7:361-9.
75. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*. 2003;92:692-9.
76. Zhang C, Saatman KE, Royo NC, Soltesz KM, Millard M, Schouten JW, et al. Delayed transplantation of human neurons following brain injury in rats: a long-term graft survival and behavior study. *J Neurotrauma*. 2005;22:1456-74.
77. Shen LH, Li Y, Chen J, Zhang J, Vanguri P, Borneman J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*. 2006;137:393-9.
78. Lean ME, Mann JI, Hoek JA, Elliot RM, Schofield G. Translational research. *BMJ*. 2008;337:a863.
79. Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008;39:1569-74.
80. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke Participants. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke*. 2009;40:510-5.
81. Janowski M, Walczak P, Date I. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev*. 2010;19:5-16.
82. Guzman R, Choi R, Gera A, De Los Angeles A, Andres RH, Steinberg GK. Intravascular cell replacement therapy for stroke. *Neurosurg Focus*. 2008;24:E15.
83. Li L, Jiang Q, Ding G, Zhang L, Zhang ZG, Li Q, et al. Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30:653-62.
84. Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27:6-13.
85. Crook JM, Kobayashi NR. Human stem cells for modeling neurological disorders: accelerating the drug discovery pipeline. *J Cell Biochem*. 2008;105:1361-6.
86. Harris DT. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev*. 2008;4:269-74.
87. Borlongan CV. Cell therapy for stroke: remaining issues to address before embarking on clinical trials. *Stroke*. 2009;40:S146-8.

Correspondência:
 Jaderson Costa DaCosta
 Laboratório de Neurociências, InsCer, PUCRS
 Avenida Ipiranga, 6690, Prédio 60, 2º andar, sala 07
 Jardim Botânico
 CEP 90619-900 – Porto Alegre, RS
 Tel.: (51) 3320.3250
 Fax: (51) 3320.3312