

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA  
DOUTORADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**AVALIAÇÃO DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO  
INTRAVENOSA DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO  
UMBILICAL HUMANO EM MODELO DE HIPÓXIA-ISQUEMIA  
NEONATAL EM RATOS**

Simone de Paula

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de  
Medicina da PUC-RS para a obtenção do título de  
Doutor em Saúde da Criança

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa

Porto Alegre, 2011

---

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

D278a De Paula, Simone

Avaliação dose-resposta da administração intravenosa de células-tronco de cordão umbilical humano em modelo de hipóxia-isquemia neonatal em ratos / Simone de Paula. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

93 f.: gráf. il. tab. Inclui um artigo científico para submissão à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa da Costa.

Doutorado (Tese) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. HIPÓXIA-ISQUEMIA ENCEFÁLICA. 2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS. 3. TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL. 4. RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA IMUNOLÓGICA. 5. DOSAGEM. 6. RATOS WISTAR. 7. RECÉM-NASCIDOS. 8. ASFIXIA NEONATAL. 9. INFUSÕES INTRAVENOSAS. 10. PERCEPÇÃO ESPACIAL. 11. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D. 618.9285

C.D.U. 616-089.811:618.38 (043.2)

N.L.M. WL 355

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia  
Bibliotecária CRB 10/196

---

## **Dedicatória**

Aos meus queridos pais,  
pelo amor incondicional.

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jaderson Costa da Costa, pelo suporte científico, pela confiança no meu trabalho e pela oportunidade de aprendizado e amadurecimento durante a realização desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Pediatria da PUC-RS, em especial aos professores Dr. Renato Machado Fiori, Dr. Humberto Holmer Fiori e Dr. Paulo Márcio Pitrez, pela oportunidade e confiança.

Aos meus queridos, eternos e inseparáveis amigos, Gianina Venturin e Samuel Greggio, por toda ajuda e apoio e pela honra de tê-los como pessoas especiais em minha vida.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Neurociências (IPB, PUC-RS), em especial a Simone Salamoni, Daniela Abreu, Zuzete Pires, Ricardo Breda, Gabriele Zanirati e Pamella Azevedo pela amizade e pelo apoio essencial.

À equipe do Centro de Terapia Celular (IPB, PUC-RS), em especial ao biólogo Daniel Rodrigo Marinowic, pela amizade, pela ajuda e dedicação.

Ao. Dr. Léder Leal Xavier, pelo apoio nas avaliações histológicas.

Aos amigos do Centro de Memória (IPB, PUC-RS), pelas informações e pela ajuda na realização dos testes comportamentais.

À equipe de enfermagem do Centro Obstétrico da PUC-RS, em especial à enfermeira Lisiane, pelo auxílio nas coletas de sangue de cordão umbilical.

Ao professor Dr. Marcelo Pelajo e à equipe do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ-RJ, em especial aos técnicos em microscopia

---



---

Pedro Paulo e Bernardo, pelos ensinamentos em imunofluorescência e microscopia confocal.

A CAPES e à Pandurata Indústria de Alimentos, pelo fornecimento da bolsa de estudo, essencial para a dedicação a esta pesquisa.

Às secretárias Carla e Nelcy, pela disposição em sempre ajudar.

À minha família, em especial aos meus irmãos Mauro, Davi e Ângela pelo incentivo e reconhecimento constantes.

Ao meu amor Gustavo, pelo entusiasmo, companheirismo e admiração.

---

---

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xv

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
1.1	Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal .....	3
1.1.1	Conceitos.....	3
1.1.2	Dados epidemiológicos .....	4
1.1.3	Fisiopatologia .....	4
1.1.4	Modelos animais .....	7
1.1.5	Estudos dose-resposta em terapia celular .....	9
1.2	Justificativa .....	11
1.3	Objetivos .....	13
1.3.1	Objetivo geral .....	13
1.3.2	Objetivos específicos .....	13
1.4	Aspectos éticos .....	14
1.5	Referências .....	15

---

---

## CAPÍTULO II

### ARTIGO DE REVISÃO

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

INTRODUÇÃO .....	20
TRANSPLANTE DE TECIDO NEOCORTICAL FETAL.....	21
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO NEURAIIS .....	21
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL .....	26
TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO DE MEDULA ÓSSEA.....	27
MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NA TERAPIA CELULAR .....	27
ASPECTOS TRANSLACIONAIS .....	29
CONCLUSÕES .....	31
REFERÊNCIAS .....	31

## CAPÍTULO III

### ARTIGO ORIGINAL

*“Acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells dose-dependently hinders brain damage and spatial memory deficits in experimental neonatal hypoxia-ischemia”*

HIGHLIGHTS.....	38
ABSTRACT .....	40
INTRODUCTION .....	41
MATERIALS AND METHODS .....	43
RESULTS.....	50
DISCUSSION .....	56
CONCLUSION.....	59
REFERENCES .....	61

---

---

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSÕES**

<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
-------------------------	-----------

## **CAPÍTULO V**

### **APÊNDICES**

<b>APÊNDICE I – Termo de consentimento livre e esclarecido .....</b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE II – Artigo original publicado em 2009.....</b>	<b>73</b>

---

---

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1</b> - Resumo da fisiopatologia celular da hipóxia-isquemia neonatal.....	5
<b>Figura 2</b> - Modelo de hipóxia-isquemia em ovinos, demonstrando a falência energética tardia.....	6
<b>Figura 3</b> - Morte celular apoptótica no modelo de hipóxia-isquemia neonatal proposto por Rice.....	8

## CAPÍTULO III

<b>Figure 1</b> - A high-dose of HUCBC transplantation demonstrated a significant attenuation of injury-induced spatial memory impairment in hypoxic-ischemic rats.....	51
<b>Figure 2</b> - HUCBC dose-dependently protect against brain atrophy in rats subjected to neonatal hypoxia-ischemia.....	53
<b>Figure 3</b> - Evidence of surviving HUCBC in a rat brain 7 days after intravenous transplantation .....	55

---

---

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> - Revisão das publicações sobre terapia celular em hipóxia-isquemia experimental no período neonatal .....	22
<b>Tabela 2</b> - Principais mecanismos de ação das células-tronco na asfixia perinatal .....	27
<b>Tabela 3</b> - Aspectos relevantes para o uso clínico da terapia celular em asfixia perinatal ...	29

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ΣP</b>	<i>Sum of points</i>
<b>μL</b>	<i>Microliter</i>
<b>μm</b>	<i>Micrometer</i>
<b>a/p</b>	<i>Point area</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BP</b>	<i>Band-pass</i>
<b>BrdU</b>	<i>Bromodeoxyuridine</i>
<b>CA</b>	Corno de Amon
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CH</b>	<i>Contralateral hemisphere</i>
<b>ChABC</b>	Condroitinase ABC
<b>cm</b>	<i>Centimeter</i>
<b>CTCUH</b>	Células-tronco de cordão umbilical humano
<b>CTN</b>	Células-tronco neurais
<b>CPAM</b>	Células progenitoras multipotentes
<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamino-2-phenylindole</i>
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>g</b>	<i>Gram</i>

---

---

<b>GDNF</b>	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>h</b>	<i>Hour</i>
<b>HI</b>	<i>Hipóxia-isquemia neonatal; hypoxia-ischemia</i>
<b>HUCBC</b>	<i>Human umbilical cord blood cells</i>
<b>HuNu</b>	<i>Human nuclei</i>
<b>ip</b>	<i>Intraperitoneal</i>
<b>IH</b>	<i>Ipsilateral hemisphere</i>
<b>IPB</b>	<i>Instituto de Pesquisas Biomédicas</i>
<b>LP</b>	<i>Long-pass</i>
<b>MAB</b>	<i>Mouse anti-human nuclei monoclonal antibody</i>
<b>MWM</b>	<i>Morris Water Maze</i>
<b>n</b>	<i>Sample size</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	<i>Sódio</i>
<b>NA</b>	<i>Numeric aperture</i>
<b>NC</b>	<i>Negative control</i>
<b>NeuN</b>	<i>Neuronal nuclei</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>NIH</b>	<i>National Institute of Health</i>
<b>NT2N</b>	<i>Neuronal cell line</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	<i>Oxygen</i>
<b>P</b>	<i>Statistical significance</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>

---



---

<b>PC</b>	<i>Positive control</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PND</b>	<i>Postnatal day</i>
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyde</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i>
<b>SNC</b>	<i>Sistema Nervoso Central</i>
<b>SDF-1</b>	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
<b>s</b>	<i>Second</i>
<b>T</b>	<i>Distance</i>
<b>TUF</b>	<i>Target Unmasking Fluid</i>
<b>V</b>	<i>Volume estimation</i>

---

---

## RESUMO

**Introdução:** A lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal (HI) é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade neurológica em crianças. O sangue do cordão umbilical humano, rico em células-tronco adultas, é uma fonte potencial para a terapia celular em perinatologia. No entanto, apesar do efeito benéfico mostrado na maioria dos estudos, ainda não há consenso em relação à dose adequada de células-tronco de cordão umbilical humano (CTCUH) no tratamento da HI.

**Objetivo:** Comparar os efeitos comportamentais e morfológicos da administração intravenosa de três diferentes doses de CTCUH 8 semanas após a indução da HI em ratos recém-nascidos. Além disso, objetivou-se verificar a presença das células no cérebro dos animais em estudo 7 dias após o transplante.

**Métodos:** Ratos Wistar de 7 dias de vida foram submetidos à oclusão da artéria carótida direita seguida por exposição a ambiente hipóxico (8% O<sub>2</sub>) por 2 h. Após 24 h, os ratos foram randomizados em 5 grupos experimentais: ratos cirurgia-simulada; ratos HI que receberam veículo (HI + veículo); e ratos HI que receberam 1 x 10<sup>6</sup> (HI + dose baixa), 1 x 10<sup>7</sup> (HI + dose média); or 1 x 10<sup>8</sup> (HI + dose alta) CTCUH na veia jugular. A memória de orientação espacial foi avaliada através do labirinto aquático de Morris e, posteriormente, os ratos foram sacrificados para as avaliações morfológicas quantitativas. Adicionalmente, a presença das CTCUH no cérebro dos animais tratados foi verificada através de técnicas de imunofluorescência e da análise de PCR.

**Resultados:** Oito semanas após o transplante, o teste do labirinto aquático de Morris mostrou uma significativa recuperação da memória de orientação espacial nos ratos do grupo HI + dose alta quando comparados aos animais não tratados (P < 0,05). Além disso, a atrofia cerebral foi significativamente menor nos grupos HI + dose média e alta quando comparados aos animais HI + veículo (P < 0,01; 0,001, respectivamente). CTCUH foram localizadas no cérebro dos ratos que receberam o transplante celular 7 dias após a administração intravenosa.

**Conclusão:** Os resultados mostrados neste estudo revelaram que o transplante intravenoso de CTCUH tem potencial dose-dependente para promover o reparo neuro-tecidual e a estável recuperação cognitiva após lesões hipóxico-isquêmicas.

**Descritores:** células-tronco, hipóxia-isquemia, asfixia, transplante de células-tronco, cordão umbilical, estudo dose-reposta.

---

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is an important cause of mortality and morbidity in infants. Human umbilical cord blood cells (HUCBC) are a potential source of cellular therapy in perinatology. However, despite the beneficial effects of cell-based therapies shown in most studies, there has not been a consensus regarding the optimal dose of HUCBC for HI.

**Objective:** In this study, we compared the long-term effects of intravenous administration of HUCBC at three different doses on spatial memory and brain morphological changes following HI in newborn Wistar rats. In addition, we tested whether the transplanted HUCBC migrate to the injured brain after transplantation.

**Methods:** Seven-day-old animals underwent right carotid artery occlusion and were exposed to 8% O<sub>2</sub> inhalation for 2 h. After 24 h, the animals were randomly assigned into five experimental groups: sham-operated rats, HI rats administered with vehicle (HI + vehicle), and HI rats treated with  $1 \times 10^6$  (HI + low-dose),  $1 \times 10^7$  (HI + medium-dose), or  $1 \times 10^8$  (HI + high-dose) HUCBC into the jugular vein. After 8 weeks of transplantation, spatial memory performance was assessed using the Morris water maze (MWM), and subsequently, the animals were euthanized for brain morphological analysis using stereological methods. In addition, we performed immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR) analyses to identify HUCBC in the rat brain 7 days after transplantation.

**Results:** The MWM test showed a significant spatial memory recovery at the highest HUCBC dose compared to HI + vehicle rats ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the brain atrophy was also significantly lower in the HI + medium- and high-dose groups compared to the HI + vehicle animals ( $P < 0.01$ ;  $0.001$ , respectively). In addition, HUCBC were localized in host brains by immunohistochemistry and PCR analyses 7 days after intravenous administration.

**Conclusion:** These results revealed that HUCBC transplantation has the dose-dependent potential to promote robust tissue repair and stable cognitive improvement after HI brain injury.

**Key-words:** stem cells, hypoxia-ischemia, asphyxia, cord blood stem cell transplantation, dose response relationship.

---

---

# CAPÍTULO I

---

---

# INTRODUÇÃO

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal

### 1.1.1 Conceitos

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal (HI) é a complicação imediata à asfixia grave e pode causar graus variados de dano cerebral. A hipóxia corresponde à falta de oxigênio completa ou parcial em um ou mais tecidos corporais, incluindo a circulação sanguínea (hipoxemia). Já a isquemia é a redução ou cessação do fluxo sanguíneo que leva à hipotensão sistêmica, parada cardíaca ou doença vascular oclusiva.<sup>1</sup>

A causa mais frequente da HI é a severa asfixia intra-útero.<sup>2</sup> Segundo Volpe<sup>3</sup>, aproximadamente 90% das lesões cerebrais perinatais têm origem no período intra-uterino. A asfixia intra-útero, por sua vez, pode ser causada: 1) pela interrupção do fluxo sanguíneo umbilical (ex.: compressão de cordão umbilical); 2) pela insuficiente troca gasosa pela placenta (ex.: descolamento prematuro de placenta); e 3) pela perfusão placentária inadequada do lado materno (ex.: hipotensão materna). Outras situações patológicas que levem à hipóxia e à hipoperfusão tecidual também são fatores etiológicos da HI.<sup>2</sup>

---

### 1.1.2 Dados epidemiológicos

Dos 130 milhões de recém-nascidos que nascem a cada ano no mundo, aproximadamente 4 milhões morrem no período neonatal. Estima-se que 23% destes casos (quase 1 milhão de mortes neonatais por ano) sejam diretamente atribuídos a complicações da asfixia neonatal.<sup>4-6</sup> Em países desenvolvidos como os Estados Unidos, a asfixia afeta de 1-3 por 1000 nascidos vivos.<sup>7</sup> Taxas mais elevadas ocorrem em países em desenvolvimento com recursos diagnósticos e terapêuticos limitados.

De acordo com a classificação de Sarnat e Sarnat<sup>9</sup>, neonatos com leve HI, geralmente não apresentam desfechos desfavoráveis a longo-prazo. No entanto, crianças no estágio moderado apresentam sequelas em 20-25% dos casos, exibindo, na maioria das vezes, déficits motores específicos tais como a diplegia ou a hemiplegia espástica, sem a presença de transtornos cognitivos. Já no quadros graves de HI, mais de 50% das crianças em estágio grave evoluem para óbito, sendo que, dos sobreviventes, a maioria desenvolve severas alterações neurológicas, incluindo dificuldades motoras precoces, déficits cognitivos e epilepsia.<sup>10, 11</sup>

### 1.1.3 Fisiopatologia

O principal mecanismo patogênico atribuído à neuropatologia da HI é a redução do fluxo sanguíneo cerebral. Eventos tóxicos interligados, tais como, a falência energética, a liberação de aminoácidos excitatórios e a apoptose ocorrem

---

simultaneamente e contribuem para a disfunção celular e a morte neuronal após insultos hipóxico-isquêmicos (Figura 1).<sup>12-14</sup>

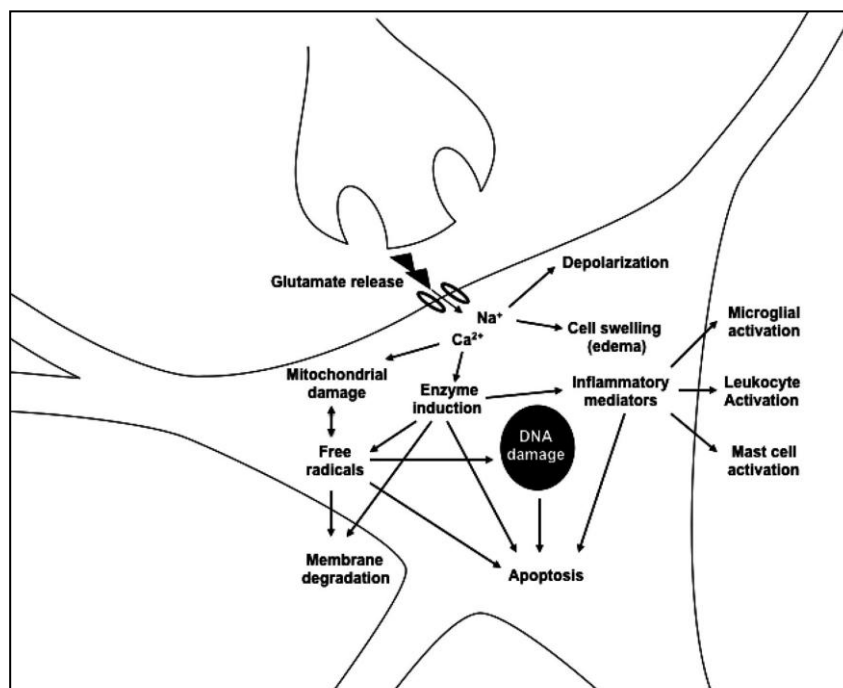


Figura 1 – Resumo da fisiopatologia celular da hipóxia-isquemia neonatal. A redução do fluxo sanguíneo cerebral inicia uma cascata de eventos bioquímicos deletérios que duram horas ou dias. A depleção do oxigênio resulta na redução da síntese de ATP que altera o equilíbrio iônico através da membrana celular. Consequentemente, a falência na bomba de íons transcelulares resulta no acúmulo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) extracelular enquanto que o sódio ( $\text{Na}^+$ ) entra na célula carregando água (edema citotóxico). Posteriormente, ocorre a despolarização da membrana e a liberação de neurotransmissores excitatórios, especificamente o glutamato. O resultante influxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro dos neurônios pós-sinápticos induz à produção de radicais livres e à ativação de enzimas que levam à morte celular (apoptose). *Fonte Sanders et al., 2010.*<sup>15</sup>

De acordo com observações clínicas e experimentais, a HI não é um evento único, mas sim um processo evolutivo. Durante a fase primária de lesão celular há rápida depleção de metabólicos de alta energia, levando à progressiva



despolarização celular.<sup>16</sup> Após o retorno da circulação cerebral e/ou oxigenação, o edema citotóxico inicial e o acúmulo de aminoácidos excitatórios são resolvidos dentro de aproximadamente 30-60 minutos com, pelo menos, parcial recuperação do metabolismo oxidativo. No entanto, o metabolismo cerebral oxidativo pode, então, deteriorar-se secundariamente horas mais tarde em uma fase que pode se estender por dias. Esta fase secundária de lesão celular (Figura 2) é frequentemente marcada pelo início das convulsões no recém-nascido, edema citotóxico secundário, falência da atividade mitocondrial cerebral, e conseqüentemente, morte celular.<sup>12, 16-19</sup>

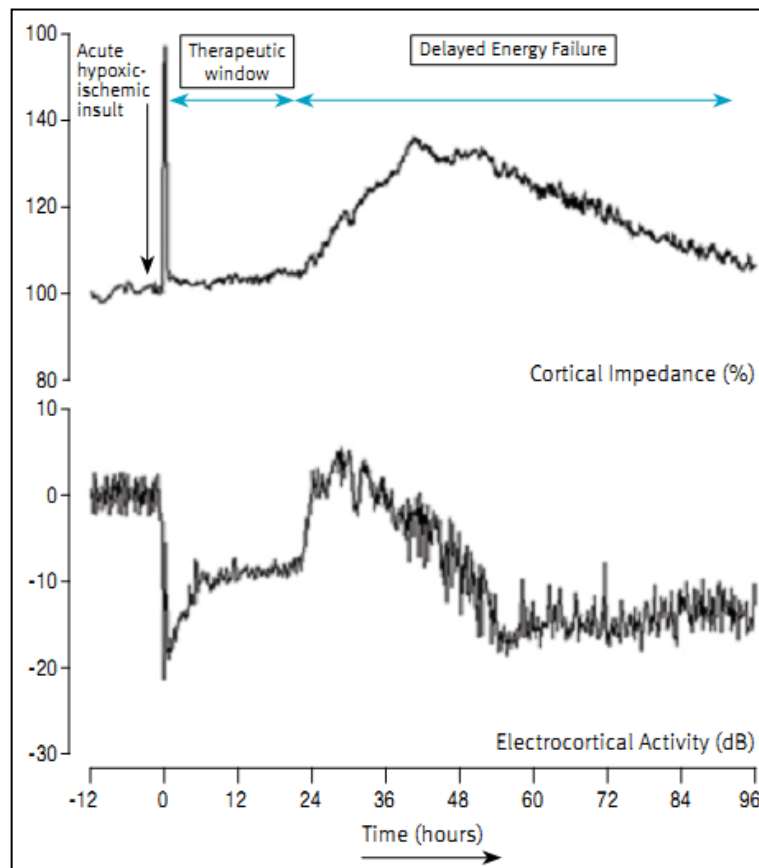


Figura 2 – Modelo de hipóxia-isquemia em ovinos, demonstrando a falência energética tardia. Medidas contínuas da atividade cerebral demonstram a presença de um aumento tardio na impedância cortical e na atividade eletrocortical. Essas alterações refletem a queda tardia do metabolismo energético cerebral juntamente com intensa atividade convulsiva que resulta em edema

citotóxico e falência das bombas iônicas. Abordagens neuroprotetoras durante essa janela terapêutica têm se mostrado mais efetivas. *Fonte Marks et al., 2010.*<sup>20</sup>

#### 1.1.4 Modelos animais

A maioria dos achados bioquímicos e fisiopatológicos sobre a HI são derivados de estudos em modelos experimentais em roedores.<sup>21</sup> Atualmente, o modelo experimental mais utilizado para a investigação da HI é o proposto por Rice et al. (1991), baseado no procedimento de Levine (1960) em ratos adultos.<sup>22-26</sup> Neste modelo, o dano cerebral hipóxico-isquêmico é obtido pela associação da oclusão unilateral da artéria carótida, com subsequente exposição a ambiente hipóxico em ratos com 7 dias de idade. O cérebro de ratos de 7 dias tem sido histologicamente comparado ao desenvolvimento cerebral de fetos humanos com 32-34 semanas de idade, especialmente pelas similaridades relacionadas à proliferação celular e à organização cortical.<sup>24</sup>

As lesões neuropatológicas deste modelo podem ser encontradas no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida, principalmente nas regiões do córtex cerebral, substância branca periventricular e subcortical, estriado (gânglios da base) e hipocampo. A região de CA3 (corno de Amon) no hipocampo é a região mais suscetível, seguida da camada de células granulares, CA1 e hilo.<sup>27</sup> Cronicamente, infarto cístico do córtex cerebral semelhante à formações porencefálicas também tem sido evidente.<sup>28</sup>

---

Os parâmetros fisiológicos deste modelo têm mostrado que, durante o insulto, o filhote de rato torna-se hipóxico e hipocapnético como resultado da hiperventilação. A média da pressão sanguínea cai aproximadamente 25% e há uma redução no fluxo sanguíneo cerebral de 17 a 40%, especialmente nas áreas mais vulneráveis ao dano.<sup>29</sup> Do ponto de vista bioquímico, um dos principais mecanismos responsáveis pela morte celular após o modelo de HI relaciona-se com a ativação de caspases (em particular a caspase-3), uma família de enzimas envolvida na apoptose neuronal (Figura 3).<sup>30</sup>

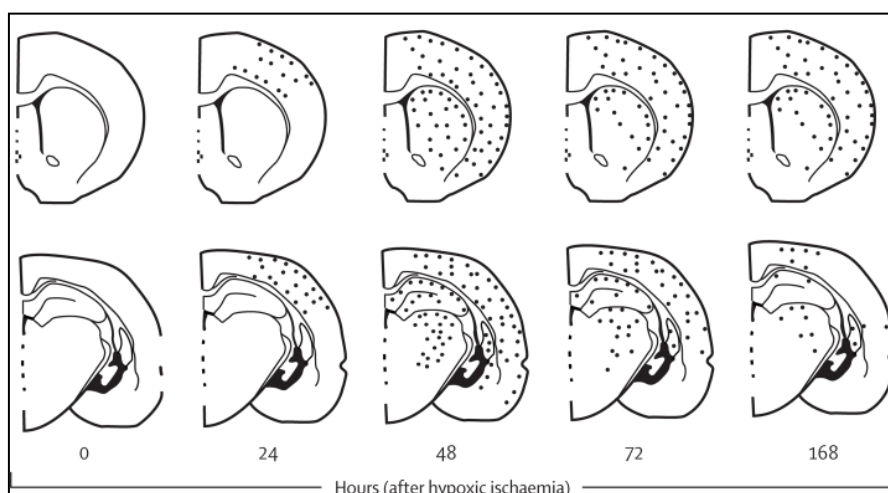


Figura 3 – Morte celular apoptótica no modelo de hipóxia-iscemia neonatal proposto por Rice. Pontos mostram a distribuição temporal e regional da imunorreatividade aumentada à caspase-3 após a lesão cerebral hipóxico-iscêmica. Fonte Nakajima et al. 2000.<sup>30</sup>

Aproximadamente 79% dos filhotes de ratos sobrevivem ao experimento e cerca de 90% dos sobreviventes apresentam danos cerebrais. Infarto do córtex cerebral ipsilateral e do hipocampo estão presentes em 56% e, dependendo da duração da sobrevivência pós-asfixia, achados adicionais também são vistos, incluindo alterações na função neurológica e comportamental.<sup>31</sup>

### 1.1.5 Estudos dose-resposta em terapia celular

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos nos cuidados perinatais, o manejo clínico de recém-nascidos com HI tem sido limitado a medidas de suporte em unidades de terapia intensiva neonatal. Neste contexto, a busca por terapias neuroprotetoras que possam prevenir a progressão da cascata bioquímica originada por eventos hipóxico-isquêmicos constitui-se como um dos principais objetivos das pesquisas neurocientíficas atuais. Recentemente, algumas possibilidades promissoras têm se revelado através de ensaios clínicos e experimentais. Evidências demonstram que a hipotermia resulta em desfechos comportamentais favoráveis quando iniciada dentro de 6 h após o início da lesão em recém-nascidos com HI leve ou moderada. No entanto, observa-se resultados neurológicos limitados nos casos mais graves.<sup>32, 33</sup>

Neste contexto, o uso potencial de células-tronco vem sendo testado em diferentes lesões do SNC.<sup>34-36</sup> Na área da neonatologia, a terapia celular utilizando células-tronco de cordão umbilical humano (CTCUH) apresenta alguns aspectos favoráveis em relação aos demais tipos celulares. A facilidade de coleta, sem riscos para a gestante e o neonato, assim como o grande número de células disponíveis são as principais vantagens para a utilização desta fonte celular. Além disso, o sangue do cordão umbilical pode ser usado terapêuticamente no período perinatal ou criopreservado para o uso tardio.<sup>37, 38</sup>

---

Em recente artigo de revisão (Capítulo II), nosso grupo de pesquisa selecionou os principais estudos sobre terapia celular em modelos animais de HI.<sup>39</sup> A maioria destas investigações pré-clínicas tem demonstrado efeitos terapêuticos benéficos do transplante de células-tronco após lesões cerebrais neonatais. No entanto, os estudos apresentam uma ampla variabilidade de metodologias e concentrações celulares (variando de  $5 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  células) dificultando assim, análises e comparações entre os desfechos encontrados. Além disso, embora esses estudos tenham demonstrado achados promissores, uma publicação do nosso laboratório mostrou que, apesar das evidências de migração celular, uma dose única de  $1 \times 10^7$  CTCUH transplantadas por via intravenosa em animais com severa HI, não resultou em melhores desfechos comportamentais e morfológicos 3 semanas após o transplante.<sup>40</sup> Nossos resultados sugerem que diversas variáveis são necessárias para a otimização do uso clínico da terapia com células-tronco, incluindo via de administração, fonte celular e dosagem.<sup>41</sup>

Atualmente, tem-se preconizado que desenhos experimentais para o estudo de abordagens regenerativas devam incluir dois aspectos principais: (1) a via de administração mais adequada, considerando eficácia e segurança; e (2) análises dose-resposta para avaliar não apenas a dose terapêutica apropriada, mas também a dosagem máxima tolerada.<sup>42</sup>

A avaliação dose-resposta das células-tronco em modelos animais tem sido realizada em alguns estudos sobre lesões do SNC. Em uma recente meta-análise,

---

Janowski et al.<sup>43</sup> demonstraram que há uma associação dose-resposta entre o número de células injetadas e os efeitos funcionais da terapia celular na maioria dos ensaios experimentais sobre neuropatologias.

Um dos pioneiros estudos sobre os efeitos dose-reposta das células-tronco em modelos animais de isquemia foi a publicação de Saporta et al.<sup>44</sup>. Estes autores demonstraram que um efeito dose-dependente da administração intracerebral de neurônios humanos (linhagem NT2N) sobre a recuperação funcional de ratos submetidos a um modelo de isquemia. Posteriormente, Vendrame et al.<sup>45</sup> também demonstraram que a recuperação funcional e histológica de ratos adultos submetidos à isquemia cerebral ocorreu na presença de concentrações celulares elevadas, sugerindo assim, que os efeitos benéficos do transplante intravenoso de CTCUH foi dependente da quantidade de células injetadas. Essas investigações corroboram resultados mais recentes publicados por Stroemer et al.<sup>46</sup> que demonstrou achados similares em animais isquêmicos.

## **1.2 Justificativa**

A hipóxia-isquemia neonatal é a causa mais importante de dano neurológico no recém-nascido. Eventos hipóxicos-isquêmicos no período de imaturidade do SNC podem resultar em severas morbidades no neurodesenvolvimento. Estatísticas sugerem uma incidência de asfixia em 1-3 por 1000 nascimentos a termo em países desenvolvidos como os Estados Unidos.<sup>7</sup> No Brasil, estima-se que a prevalência de

---

asfixia neonatal seja de, aproximadamente, 2% dos nascidos-vivos.<sup>8</sup> A taxa de mortalidade dos recém-nascidos asfixiados no período neonatal é de 20 a 50%, e mais de 25% dos sobreviventes irão exibir incapacidades neuropsicomotoras permanentes, incluindo retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia e dificuldades de aprendizagem.<sup>47, 48</sup>

Apesar da significância clínica da lesão cerebral neonatal e dos avanços científicos na área da perinatologia, o manejo terapêutico dos recém-nascidos asfixiados tem sido limitado a medidas de suporte e não se dirige à restauração do processo de lesão cerebral, visto que o SNC apresenta uma capacidade de regeneração auto-limitada em resposta a um insulto.

Nesse contexto, a terapia celular vem sendo explorada por ser um promissor tratamento para doenças neurológicas graves. Esta inovadora abordagem terapêutica tem sido utilizada na reparação de tecidos e órgãos lesados, através da utilização de células-tronco em alvos terapêuticos considerados incapazes de desenvolver processos regenerativos, tais como o coração e o cérebro. Apesar da ampla variabilidade de métodos e dosagens utilizados, a maioria dos resultados experimentais recentes tem demonstrado efeitos neuroprotetores das células-tronco em modelos de HI.<sup>39</sup> No entanto, dados do nosso grupo de pesquisa mostraram que, apesar das evidências de migração celular, uma dose única de  $1 \times 10^7$  CTCUH injetadas por via intravenosa em animais com severa HI, não resultou em melhores desfechos comportamentais e morfológicos 3 semanas após o transplante.<sup>40</sup>

---

Diversos aspectos podem ter influenciado os resultados encontrados, dentre os quais destacamos a concentração de células injetadas.

Assim, em decorrência dos nossos achados prévios e da escassez de estudos dose-resposta de CTCUH em modelos animais de HI, faz-se necessário estudos experimentais que estabeleçam concentrações celulares eficazes e seguras previamente ao uso clínico da terapia celular em lesões cerebrais neonatais.

### **1.3 Objetivos**

#### 1.3.1 Objetivo geral

O presente estudo objetiva comparar os efeitos comportamentais e morfológicos da administração intravenosa de três diferentes doses de CTCUH 8 semanas após a indução da hipóxia-isquemia neonatal em ratos.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- 1) Comparar a memória de orientação espacial dos animais HI não-tratados (HI + veículo) com os animais HI que receberam  $1 \times 10^6$  (HI + dose baixa),  $1 \times 10^7$  (HI + dose média) ou  $1 \times 10^8$  (HI + dose alta) CTCUH 8 semanas pós-transplante, considerando duas variáveis do teste de memória de orientação espacial *Morris water maze*: latência para alcançar a plataforma e tempo percentual no quadrante alvo.
-



- 2) Comparar as alterações morfológicas dos animais HI não-tratados (HI + veículo) com os animais HI que receberam  $1 \times 10^6$  (HI + dose baixa),  $1 \times 10^7$  (HI + dose média) ou  $1 \times 10^8$  (HI + dose alta) CTCUH 8 semanas pós-transplante, considerando duas variáveis estereológicas: volume absoluto dos hemisférios cerebrais e percentual de perda tecidual.
  
- 3) Verificar a presença das CTCUH no cérebro dos animais em estudo 7 dias após o transplante intravenoso.

#### **1.4 Aspectos éticos**

No presente estudo, os protocolos experimentais utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório. Todos os procedimentos foram realizados tomando os cuidados necessários para reduzir ao máximo o número de animais empregados. Ressalta-se também que os animais receberam cuidados adequados e foram submetidos ao mínimo possível de desconforto e “stress”. Durante os procedimentos foram instituídas sedação e analgesia de acordo com a prática veterinária aceita.

Poucos estudos com células-tronco têm usado animais isogênicos como fonte de progenitores celulares. Em contrapartida, o uso de células-tronco de cordão umbilical humano em modelos animais tem sido amplamente estudado. Nessa pesquisa, a coleta do sangue de cordão umbilical foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice I) e não acarretou riscos

---

para a doadora. Qualquer impedimento para este procedimento foi respeitado pela pesquisadora.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC-RS, registro CEP 09/04761, em 02 de julho de 2009.

### **1.5 Referências**

1. Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113-20.
  2. Berger R, Garnier Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:107-34.
  3. Volpe J. *Neurology of the Newborn*. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000.
  4. Lawn J, Shibuya K, Stein C. No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ* 2005;83:409-17.
  5. Jacobs SE, Tarnow-Mordi WO. Therapeutic hypothermia for newborn infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *J Paediatr Child Health*;46:568-76.
  6. Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365:1147-52.
  7. Wyatt JS, Gluckman PD, Liu PY, et al. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 2007;119:912-21.
  8. Souza F. *Fatores de risco associados a asfixia perinatal no Brasil*. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2003.
  9. Sarnat H, Sarnat M. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* 1976;33:696-705.
  10. Cowan F. Outcome after intrapartum asphyxia in term infants. *Semin Neonatol* 2000;5:127-40.
  11. Perlman JM. Intrapartum hypoxic-ischemic cerebral injury and subsequent cerebral palsy: medicolegal issues. *Pediatrics* 1997;99:851-9.
  12. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 2006;117:S28-33.
  13. Sherman MP. Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1998;102:662.
  14. Vexler ZS, Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001;6:99-108.
-

15. Sanders RD, Manning HJ, Robertson NJ, et al. Preconditioning and postinsult therapies for perinatal hypoxic-ischemic injury at term. *Anesthesiology* 2010;113:233-49.
  16. Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence. *Intensive Care Med* 2004;30:556-75.
  17. Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx* 2006;3:154-69.
  18. Lorek A, Takei Y, Cady EB, et al. Delayed ("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994;36:699-706.
  19. Shalak L, Perlman JM. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. *Early Hum Dev* 2004;80:125-41.
  20. Marks K, Shany E, Shelef I, Golan A, Zmora E. Hypothermia: a neuroprotective therapy for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Isr Med Assoc J* 2010;12:494-500.
  21. Northington FJ. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J* 2006;47:32-8.
  22. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* 2005;27:81-6.
  23. Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981;9:131-41.
  24. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res* 1999;55:158-63.
  25. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960;36:1-17.
  26. Vannucci RC, Vannucci SJ. A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:234-49.
  27. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic-ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005;7:204-13.
  28. Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 2009;40:156-67.
  29. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol* 2004;11:31-46.
  30. Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci* 2000;20:7994-8004.
  31. Raju T. Some animal models for the study of perinatal asphyxia. *Biol Neonate* 1992;62:202-14.
  32. Sahni R, Sanocka UM. Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinatol* 2008;35:717-34, vi.
  33. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD003311.
  34. Joers VL, Emborg ME. Preclinical assessment of stem cell therapies for neurological diseases. *ILAR J* 2009;51:24-41.
-

35. Boucherie C, Hermans E. Adult stem cell therapies for neurological disorders: benefits beyond neuronal replacement? *J Neurosci Res* 2009;87:1509-21.
  36. Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP, Montero-Menei CN. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials* 2010;31:2105-20.
  37. Harris DT. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev* 2008;4:269-74.
  38. 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.
  39. de Paula S, Greggio S, DaCosta JC. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86:451-64.
  40. de Paula S, Vitola AS, Greggio S, 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.
  41. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007;38:817-26.
  42. Wechsler L, Steindler D, Borlongan C, et al. 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.
  43. Janowski M, Walczak P, Date I. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem cells and development* 2010;19:5-16.
  44. Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* 1999;91:519-25.
  45. Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004;35:2390-5.
  46. Stroemer P, Patel S, Hope A, Oliveira C, Pollock K, Sinden J. The Neural Stem Cell Line CTX0E03 Promotes Behavioral Recovery and Endogenous Neurogenesis After Experimental Stroke in a Dose-Dependent Fashion. *Neurorehabil Neural Repair* 2009.
  47. Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004;207:3149-54.
  48. Selway LD. State of the science: hypoxic ischemic encephalopathy and hypothermic intervention for neonates. *Adv Neonatal Care*;10:60-6; quiz 7-8.
-

---

## **CAPÍTULO II**

---

---

# **ARTIGO DE REVISÃO**

Artigo de revisão publicado em agosto de 2010 no Jornal de Pediatria

---



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

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

Simone de Paula<sup>1</sup>, Samuel Greggio<sup>1</sup>, Jaderson Costa DaCosta<sup>2</sup>

### Resumo

**Objetivos:** Apresentar evidências científicas recentes sobre os efeitos do transplante com células-tronco em modelos animais de lesão cerebral hipóxico-ischêmica 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-ischêmica. 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-ischêmica, células-tronco, asfíxia, terapia celular.*

### Introdução

A lesão cerebral hipóxico-ischêmica (HI) do recém-nascido é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade neurológica em crianças. Estatísticas sugerem uma incidência de asfíxia em 2-4 por 1.000 nascimentos a termo. No Brasil, estima-se que a prevalência de asfíxia neonatal seja de, aproximadamente, 2% dos nascidos vivos<sup>1</sup>. Além disso, a taxa de mortalidade dos recém-nascidos asfíxiados 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 aprendizagem<sup>2</sup>.

A causa mais frequente da encefalopatia HI é a asfíxia 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



cerebral<sup>3</sup>. 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-isquêmicos<sup>4</sup>.

Apesar dos avanços tecnológicos e científicos nos cuidados perinatais dos recém-nascidos de risco, o manejo clínico de crianças asfixiadas tem sido limitado à manutenção da oxigenação, ao controle da pressão sanguínea e da homeostase, ao tratamento das convulsões e ao controle da hipertensão intracraniana<sup>5</sup>.

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 HI<sup>4</sup>. Com exceção da hipotermia, que demonstra desfechos satisfatórios apenas em crianças com lesões HI moderadas, essas terapias apresentam resultados limitados<sup>6</sup>.

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 específicas<sup>7</sup>. 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 regenerativo<sup>8</sup>. 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 SNC<sup>9</sup>. 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 raquimedular<sup>10-14</sup>.

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

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

### Transplante de tecido neocortical fetal

Em 1996, Elsayed et al.<sup>15</sup> 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 HI<sup>16</sup>. 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 granular do giro denteado hipocampal<sup>7,9</sup>. 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<sup>9,17</sup>.

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<sup>9,18,19</sup>. Alguns estudos têm demonstrado que astrócitos da zona subventricular que expressam uma proteína glial também podem ser considerados como CTN<sup>20</sup>.

Nesse contexto, Zheng et al.<sup>21</sup> 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 saudáveis, 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



## Capítulo II – Artigo de revisão

Células-tronco na asfíxia perinatal - de Paula S et al.

Jornal de Pediatria - Vol. 86, Nº 6, 2010 453

**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. <sup>15</sup>	Ratos Long-Evans black-hooded; P7-8; 60, 120 ou 120-150 min	Tecido neocortical fetal murino (13 <sup>o</sup> dia embrionário)	Bloco tecidual de 1-2 mm <sup>3</sup> ; 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. <sup>16</sup>	Ratos Wistar; P7; 150 min	Tecido neocortical fetal murino (16 <sup>o</sup> dia embrionário)	5 x 10 <sup>4</sup> 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. <sup>27</sup>	Camundongos CD-1; P7; 120 min	CTN murinas (clone C17.2) em scaffold de PGA; CTN-PGA)	1 ou 2 complexos CTN-PGA (1 x 10 <sup>7</sup> 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. <sup>23</sup>	Camundongos C57Bl/6; P7; 120 min	Cinco linhagens de CTN humanas e murinas	5 x 10 <sup>5</sup> 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. <sup>32</sup>	Ratos Wistar; P14; 120 min	Células BHK-GDNF encapsuladas	1 cápsula (1 x 10 <sup>8</sup> 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. <sup>33</sup>	Ratos Wistar; P9; 120 min	Células BHK-GDNF encapsuladas	1 cápsula (1 x 10 <sup>8</sup> células/mL); ic (TI); 2 dias pré-HI; SI	Melhora no desempenho cognitivo a partir da 6 <sup>a</sup> semana pT	Redução do dano cerebral 17 semanas pT	NA	NA
Zheng et al. <sup>21</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 120 min	Células-tronco astrocíticas multipotentes da zona subventricular murina	5 x 10 <sup>4</sup> células/μL; ic (TI); 24 h após HI; SI	NA	NA	Detecção 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. <sup>36</sup>	Ratos Wistar; P7; 80 min	CTCUH	1 x 10 <sup>7</sup> 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 1; SI = sem imunossupressão; TC = transplante contralateral; TI = transplante ipsilateral; VEI = veículo.

\* Animais tratados versus animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

## Capítulo II – Artigo de revisão

454 *Jornal de Pediatria* - Vol. 86, Nº 6, 2010

Células-tronco na asfixia perinatal - de Paula S et al.

**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. <sup>58</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CPAM de medula óssea murina	2 x 10 <sup>5</sup> 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 hipocámpais de CA2 e CA3 14 dias pT	NA
Park et al. <sup>22</sup>	Camundongos CD-1; P7; 138 min	CTN murinas (clone C17.2)	0,4-1,6 x 10 <sup>5</sup> 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. <sup>29</sup>	Camundongos CD-1; P7; 120-180 min	CTN murinas (clone C17.2) com superexpressão de NT-3 (CTN-NT3)	3 x 10 <sup>5</sup> células/8 µL (ic, TI em 2 locais) e 1,0 x 10 <sup>5</sup> 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. <sup>24</sup>	Camundongos C57Bl/6; P7; 90 min	Células-tronco embrionárias murinas após diferenciação neural <i>in vitro</i>	1 x 10 <sup>4</sup> células/µL; icv (TI); 2-3 dias após HI; SI	Melhora da memória espacial 2 e 8 meses pT	↑ células neuronais na região hipocámpal 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
Daye et al. <sup>30</sup>	Ratos Wistar; P3; 30 min	Células progenitoras neurais murinas com superexpressão de FGF-2	4 x 10 <sup>4</sup> 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 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; VEI = veículo.

\* Animais tratados versus animais controle.

↑ = aumento.

↓ = redução.

## Capítulo II – Artigo de revisão

Células-tronco na asfíxia perinatal - de Paula S et al.

Jornal de Pediatria - Vol. 86, Nº 6, 2010 **455****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. <sup>37</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CPAM de medula óssea murina	2 x 10 <sup>5</sup> 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)	Deteção 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. <sup>28</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 120 min	CTN murinas (14 <sup>o</sup> dia embrionário) ou CTN+ChABC (25 mU)	2,5 x 10 <sup>5</sup> 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. <sup>38</sup>	Ratos Wistar; P7; 120 min	CTCUH	1 x 10 <sup>7</sup> 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	Deteção de poucas células transplantadas 24 h, 1 e 3 semanas pT	NA
Yasuhara et al. <sup>40</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CTCUH ou CTCUH+M (manitol 1.1 mol/L)	1,5 x 10 <sup>4</sup> 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. <sup>37</sup>	Ratos Lister-Hooded; P7; 90 min	CTCUH	2 x 10 <sup>6</sup> células/200 µL; ip; 3 h após HI; SI	Melhora no desenvolvimento dos reflexos sensorio-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. <sup>31</sup>	Ratos Wistar; P3; 30 min	Células progenitoras neurais murinas com superexpressão de FGF-2	2-5 x 10 <sup>4</sup> 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. <sup>56</sup>	Camundongos C57B/6; P9; 45 min	CTM de medula óssea murina	1 x 10 <sup>5</sup> 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. <sup>55</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 210 min	CTM de medula óssea humana	1 x 10 <sup>6</sup> 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	Deteção das células transplantadas igualmente distribuídas em ambos os hemisférios cerebrais 6 semanas pT	Células transplantadas apresentaram marcação de astrócito e microglia (> n <sup>o</sup> ), neurônio e oligodendrócito (< n <sup>o</sup> ), 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; 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. <sup>41</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 150 min	CTM de sangue de cordão umbilical humano	5 x 10 <sup>4</sup> 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. <sup>25</sup>	Ratos Sprague-Dawley; P7; 90 min	CTN humana de células-tronco embrionárias	5 x 10 <sup>4</sup> 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 neurogênese e suporte neurotrófico no hemisfério isquêmico; ↑ brotamento axonal para o hemisfério ipsilateral; ↑ terminais axonais no córtex sensorio-motor, corpo caloso, estriado 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 CXCR4; 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.<sup>22</sup> 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 HI<sup>23</sup>.

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 HI<sup>24</sup>. 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 cérebro<sup>25</sup>.

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<sup>9,26</sup>. Utilizando essa abordagem terapêutica, Park et al.<sup>27</sup> 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 cerebral<sup>28</sup>. 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<sup>22,29</sup>. 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 HI<sup>30</sup>. Adicionalmente, identificou-se que o ambiente perivascular é fundamental para a manutenção dessas células em um estado ativo de imaturidade e proliferação<sup>31</sup>. 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<sup>32,33</sup>.

#### 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 imunossupressores<sup>34,35</sup>.

O primeiro estudo a testar o efeito do transplante de CTCUH em ratos HI foi realizado por Meier et al.<sup>36</sup>. 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 animais<sup>37</sup>. 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 experimental<sup>38</sup>. 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 porte<sup>39</sup>. 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 tratados<sup>40</sup>. 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 analisada<sup>41</sup>. 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 adultos<sup>42-45</sup> e, mais recentemente, em ensaios clínicos, demonstrando resultados promissores<sup>46,47</sup>.

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)<sup>34</sup>. 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<sup>48,49</sup>. 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 diferenciação<sup>50</sup>. Esse tipo celular apresenta uma elevada capacidade de expressar fenótipos neuronais *in vitro*<sup>51,52</sup> e *in vivo*<sup>53,54</sup>.

Recentemente, dois grupos de pesquisa apresentaram seus resultados utilizando CTM de medula óssea em modelo de HI experimental. Lee et al.<sup>55</sup> 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 isquêmico<sup>56</sup>. 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.<sup>57</sup> 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<sup>57,58</sup>.

#### 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 asfíxia perinatal

Mecanismo de ação	Descrição
Transdiferenciação celular	Transformação direta de células-tronco (diversas fontes) em neurônios maduros
Liberação 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, conseqüentemente, 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 liberação 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 documentada<sup>59-61</sup>. Em decorrência desses achados, outros mecanismos têm sido propostos<sup>62</sup>.

#### **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 patológicas<sup>63</sup>. As células-tronco podem servir como veículos de moléculas específicas, funcionando como vetores para a produção e/ou liberação de fatores neurotróficos<sup>29,64</sup>. 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<sup>12,40</sup>. Dados obtidos no estudo de Borlongan et al.<sup>65</sup> 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 ratos<sup>40</sup>. 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<sup>66,67</sup>. No entanto, é possível que as células-tronco transplantadas possam potencializar esses mecanismos intrínsecos de reparação. No estudo de van Velthoven et al.<sup>56</sup>, 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 celular<sup>23</sup>. Nesse contexto, estudos atuais têm demonstrado que diferentes fontes de células-tronco podem inibir a ativação de diversas células imunes. Pluchino

et al.<sup>68</sup> 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 isquêmico<sup>69</sup>.

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<sup>9,63,70</sup>. 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<sup>37,56</sup>. Em contrapartida, Daadi et al.<sup>25</sup> 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 funcional<sup>71</sup>.

#### **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<sup>72,73</sup>. Além disso, tem-se observado a transdiferenciação das células-tronco transplantadas em novos vasos (angiogênese)<sup>34,74</sup>. É provável que também ocorra um evento indireto das células na formação dos vasos sanguíneos. Chen et al.<sup>75</sup> 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 CTN<sup>27</sup>. 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 sinaptogênese<sup>34</sup>. 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<sup>76,77</sup>. 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 lesado<sup>25</sup>.

### 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 comunidade<sup>78</sup>. 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 maior<sup>79</sup>. 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<sup>79,80</sup>. 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 neonatal<sup>57</sup>.

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-transplante<sup>81</sup>. O procedimento de administração intravenosa é menos invasivo, simples e seguro, possibilitando ampla distribuição das células transplantadas para áreas cerebrais HI<sup>38,40,57</sup>. Além disso, permite que estas entrem em contato com sinais quimiotáticos provenientes da lesão cerebral e sejam seletivamente acumuladas no tecido alvo<sup>79,82</sup>. 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 clínico<sup>80</sup>.

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 ratos<sup>55</sup>. 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 penumbra<sup>79</sup>. Entretanto, estudos recentes reportam alta taxa de mortalidade de animais transplantados pela via intra-arterial, sugerindo a formação de oclusões microvasculares e isquemias<sup>79,80,83</sup>. 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-arterial<sup>46</sup>.

A via intraperitoneal também foi utilizada para transplante celular em HI neonatal, demonstrando migração celular da cavidade peritoneal até as regiões de dano cerebral<sup>36,37</sup>. 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.<sup>56</sup> 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.<sup>22</sup>, 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 transplantadas<sup>22</sup>. Já no caso de transplantes tardios, é possível que as células-tronco possam estimular a liberação de fatores tróficos para restaurar as funções perdidas<sup>80</sup>. No entanto, apesar da melhora funcional observada em ratos adultos que receberam células-tronco um mês após isquemia cerebral<sup>84</sup>, 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 manitol<sup>40</sup>. 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 definidos<sup>34</sup>. 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 células<sup>85</sup>. 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<sup>62,86</sup>. No entanto, estudos adicionais necessitam ser realizados para caracterizar as populações celulares e avaliar efetividade e segurança<sup>80,87</sup>.

Avaliação da dose-resposta das células-tronco em modelos animais também necessita ser realizada para embasar o seu uso clínico. Segundo Janowski et al.<sup>81</sup>, 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 asfíxia 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 hipóxica-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, Tsypkyov 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, Neuhoﬀ 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 asfíxia 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, McKecher 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;40:5146-8.

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

---

## CAPÍTULO III

---

---

# **ARTIGO ORIGINAL**

Artigo original submetido à revista *Experimental Neurology* em 10 de maio de 2011

---



Elsevier Editorial System(tm) for Experimental Neurology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells dose-dependently hinders brain damage and spatial memory deficits in experimental neonatal hypoxia-ischemia

Article Type: Regular Paper

Section/Category: Transplantation and Repair

Keywords: stem cells; hypoxia-ischemia; asphyxia; cord blood stem cell transplantation; dose response relationship.

Corresponding Author: Dr Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

First Author: Simone de Paula

Order of Authors: Simone de Paula; Samuel Greggio; Daniel R Marinowic; Denise C Machado, PhD; Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD

Abstract: Despite the beneficial effects of cell-based therapies on brain repair shown in most studies, there has not been a consensus regarding the optimal dose of human umbilical cord blood cells (HUCBC) for neonatal hypoxia-ischemia (HI). In this study, we compared the long-term effects of intravenous administration of HUCBC at three different doses on spatial memory and brain morphological changes following HI in newborn Wistar rats. In addition, we tested whether the transplanted HUCBC migrate to the injured brain after transplantation. Seven-day-old animals underwent right carotid artery occlusion and were exposed to 8% O<sub>2</sub> inhalation for 2 h. After 24 h, the animals were randomly assigned into five experimental groups: sham-operated rats, HI rats administered with vehicle (HI + vehicle), and HI rats treated with 1 x 10<sup>6</sup> (HI + low-dose), 1 x 10<sup>7</sup> (HI + medium-dose), or 1 x 10<sup>8</sup> (HI + high-dose) HUCBC into the jugular vein. After 8 weeks of transplantation, spatial memory performance was assessed using the Morris water maze (MWM), and subsequently, the animals were euthanized for brain morphological analysis using stereological methods. In addition, we performed immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR) analyses to identify HUCBC in the rat brain 7 days after transplantation. The MWM test showed a significant spatial memory recovery at the highest HUCBC dose compared to HI + vehicle rats ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the brain atrophy was also significantly lower in the HI + medium- and high-dose groups compared to the HI + vehicle animals ( $P < 0.01$ ;  $0.001$ , respectively). In addition, HUCBC were localized in host brains by immunohistochemistry and PCR analyses 7 days after intravenous administration. These results revealed that HUCBC transplantation has the dose-dependent potential to promote robust tissue repair and stable cognitive improvement after HI brain injury.

---

May 9, 2011  
Porto Alegre, RS - Brazil

To  
Editor-in-Chief  
Experimental Neurology

Dear Dr. S. Gilman,

Please find the attached manuscript entitled “Acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells dose-dependently hinders brain damage and spatial memory deficits in experimental neonatal hypoxia-ischemia,” authored by Simone de Paula, Samuel Greggio, Daniel Rodrigo Marinowic, Denise Cantarelli Machado and Jaderson Costa DaCosta. We would be very grateful if you would consider this manuscript for publication in Experimental Neurology.

This research was conducted within the international guidelines for animal experimentation and under the terms of our local legislation. This paper is not being published elsewhere. In addition, all authors have read the paper and have agreed to have their names listed as authors.

Sincerely yours,

Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD  
Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)  
Av. Ipiranga 6690, 90610-000  
Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 33203250  
E-mail: [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)

---



**Highlights:**

1. A high dose of HUCBC attenuates spatial memory impairments in hypoxic-ischemic rats.
  2. HUCBC dose-dependently hinders brain lesions in hypoxic-ischemic rats.
  3. HUCBC are detected in host rat brains 7 days after cell transplantation.
  4. HUCBC are a promising treatment for neonatal hypoxia-ischemia.
  5. Dosage is an important factor for the clinical use of HUCBC for neonatal hypoxia-ischemia.
-

Regular Article for *Experimental Neurology*

**Acute intravenous transplantation of human umbilical cord blood cells dose-dependently hinders brain damage and spatial memory deficits in experimental neonatal hypoxia-ischemia**

Simone de Paula<sup>a</sup>, Samuel Greggio<sup>a</sup>, Daniel Rodrigo Marinowic<sup>b</sup>, Denise Cantarelli Machado<sup>b</sup>, Jaderson Costa DaCosta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.*

<sup>b</sup> *Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.*

\* Correspondence author:

Jaderson Costa DaCosta, MD, PhD.

Laboratório de Neurociências e de Sinalização Celular, Instituto do Cérebro  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

Avenida Ipiranga 6690, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: +5551 33203250

Fax: +5551 33203312

E-mail: [jcc@pucrs.br](mailto:jcc@pucrs.br)

---

**Abstract**

Despite the beneficial effects of cell-based therapies on brain repair shown in most studies, there has not been a consensus regarding the optimal dose of human umbilical cord blood cells (HUCBC) for neonatal hypoxia-ischemia (HI). In this study, we compared the long-term effects of intravenous administration of HUCBC at three different doses on spatial memory and brain morphological changes following HI in newborn Wistar rats. In addition, we tested whether the transplanted HUCBC migrate to the injured brain after transplantation. Seven-day-old animals underwent right carotid artery occlusion and were exposed to 8% O<sub>2</sub> inhalation for 2 h. After 24 h, the animals were randomly assigned into five experimental groups: sham-operated rats, HI rats administered with vehicle (HI + vehicle), and HI rats treated with  $1 \times 10^6$  (HI + low-dose),  $1 \times 10^7$  (HI + medium-dose), or  $1 \times 10^8$  (HI + high-dose) HUCBC into the jugular vein. After 8 weeks of transplantation, spatial memory performance was assessed using the Morris water maze (MWM), and subsequently, the animals were euthanized for brain morphological analysis using stereological methods. In addition, we performed immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR) analyses to identify HUCBC in the rat brain 7 days after transplantation. The MWM test showed a significant spatial memory recovery at the highest HUCBC dose compared to HI + vehicle rats ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the brain atrophy was also significantly lower in the HI + medium- and high-dose groups compared to the HI + vehicle animals ( $P < 0.01$ ;  $0.001$ , respectively). In addition, HUCBC were localized in host brains by immunohistochemistry and PCR analyses 7 days after intravenous administration. These results revealed that HUCBC transplantation has the dose-dependent potential to promote robust tissue repair and stable cognitive improvement after HI brain injury.

*Keywords:* stem cells, hypoxia-ischemia, asphyxia, cord blood stem cell transplantation, dose response relationship.

---

**Introduction**

The hypoxia–ischemia (HI) that occurs during the neonatal period is an important cause of mortality and severe neurologic morbidity in children, affecting approximately 1 to 3 cases per 1000 full-term live births in developed countries (Wyatt, et al., 2007). Approximately 50% of infants with severe HI die, and up to 25% of survivors have long-term disabilities, such as epilepsy, cerebral palsy and cognitive impairments (Ferriero, 2004). Despite technological and scientific advances in the perinatal care of at-risk newborns, until recently, the management of newborn infants with HI has been limited to supportive care in the neonatal intensive care unit. Consequently, new neuroprotective strategies have been investigated in experimental studies and clinical trials due to the clinical relevance and socioeconomic impact generated by neonatal brain damage. However, with the exception of hypothermia, which shows satisfactory outcomes in infants with mild or moderate HI injury, these therapies have limited results (Johnston, et al., 2011, Sahni and Sanocka, 2008). As a result, cell based-therapy has been proposed as a novel treatment approach for severe neurological diseases, including HI. In the neonatal context, obtaining stem cells from umbilical cord blood offers low risk or discomfort to the newborn, and the cells can be transplanted after autologous collection. In addition, umbilical cord blood can be used therapeutically during the perinatal period or can be cryopreserved for later use (Harris, 2008, Liao, et al., 2011, Santner-Nanan, et al., 2005).

Current investigations using different cell dosages, delivery routes and types of human umbilical cord blood stem cells (HUCBC) have reported that this therapy is neuroprotective in most animal models of neonatal brain injury (Meier, et al., 2006, Pimentel-Coelho, et al., 2009, Rosenkranz, et al., 2010, Xia, et al., 2010, Yasuhara, et al.,

---

2009). Although these preclinical studies have demonstrated promising results for brain damage, we have recently shown in a rat model of severe neonatal HI that a single dose of  $1 \times 10^7$  transplanted HUCBC can migrate to the brain after intravenous injection but does not improve the cognitive and morphological outcomes 3 weeks post-transplantation (de Paula, et al., 2009). These previous data demonstrated that several variables will need to be explored to optimize the use of cell therapy in children with HI brain damage, including aspects such as timing, route of transplantation, cellular type and dosage (Bliss, et al., 2007, Janowski, et al., 2010).

One of the most important questions in terms of efficacy and tolerance for the clinical approach of stem cell treatment is the number of administered cells (Wechsler, et al., 2009). Some reports have assessed the dose-response association between cell concentration and the functional effects of the treatment on animal models of heart damage (Iwasaki, et al., 2006, Wolf, et al., 2009). However, there are insufficient data showing the relationship between cell dose and long-term neurological outcomes (Garbuzova-Davis, et al., 2008, Omori, et al., 2008, Stroemer, et al., 2009, Vendrame, et al., 2004, Yang, et al., 2011), and there are no dose-ranging studies in neonatal HI. Hence, we conducted a pioneer investigation to compare the effect of intravenous administration of HUCBC at three different doses on spatial memory and brain morphological changes in 60-day-old rats previously subjected to neonatal HI. In addition, we tested whether the transplanted HUCBC migrate to the injured brain 7 days after intravenous administration.

---

## **Materials and methods**

### *Animals*

All experimental procedures were performed in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Animal Care and Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brazil (CEP 09/04761). A total of 50 male Wistar rats were kept under a constant 12:12 h light-dark cycle at room temperature ( $23 \pm 1$  °C) with free access to food and water. After each normal delivery, the litter sizes were adjusted to 8 pups per litter. Pups were kept with their dams until weaning at postnatal day (PND) 21.

### *Experimental Groups*

The animals were randomly assigned to five experimental groups ( $n = 10$  each): sham-operated rats, rats administered with vehicle (HI + vehicle), and rats with  $1 \times 10^6$  (HI + low-dose),  $1 \times 10^7$  (HI + medium-dose), or  $1 \times 10^8$  (HI + high-dose) HUCBC transplanted into the jugular vein 24 h post-HI. An additional cohort of HI animals was injected with HUCBC as described above but was euthanized 7 days after transplantation. In these animals, brain samples were collected for immunofluorescence staining and PCR analyses. All experiments were performed by blinded investigators.

### *Hypoxic-Ischemic Model*

In this study, we used the Levine rat model, modified by Rice et al. (Rice, et al., 1981), 1981), for neonatal rats. On PND 7 (weights ranging from 12 to 15 g), each animal was briefly anesthetized with halothane delivered by a face mask. The right common carotid

---

artery was identified through a midline longitudinal neck incision, isolated from the vagus nerve and permanently double-ligated with a 7.0 surgical silk suture. The entire surgical procedure was completed within 15 min. After the wounds were sutured, the animals were put back into their cages and allowed to recover for 2-4 h in the company of their dams. The rats were then placed in a hypoxia chamber for 2 h, with a constant flow of humidified 8% oxygen balanced with nitrogen. The hypoxia chamber was kept in a water bath to maintain the ambient temperature inside the chamber at a normal range (37–38 °C). Following hypoxic exposure, the pups were returned to their dams for recovery. The sham-operated animals underwent anesthesia and incision only.

#### *HUCBC Preparation and Intravenous Administration*

After obtaining informed consent, HUCBC were collected *ex-utero* from healthy volunteers using sterile syringes containing 5,000 UI of heparin, immediately after full-term delivery. Blood samples were kept at a temperature of 4 °C during the transport and storage procedures, and all units were processed within 24 h after collection. For the separation of mononuclear cells, the obtained material was diluted in RPMI-1640 medium (1:1) (Gibco®, USA). The cells were resuspended and fractionated on a density gradient generated by centrifugation, over Ficoll-Paque solution with a density of 1.077 g/L (Histopaque 1077, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), at  $400 \times g$  for 30 min at 25 °C. The mononuclear fraction over the Ficoll-Paque layer was collected and washed twice with Dubelcco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Gibco®, USA). The cell density was determined with a Neubauer-counting chamber, and the number of viable cells was determined using the Trypan Blue 0.4% exclusion method. For the detection of surface

---

antigens, HUCBC were incubated with conjugated antibodies against CD45, CD105, CD34 and CD117. The labeled cells were collected and analyzed using a cytometer. CD34<sup>+</sup> cells represented, on average, 2.4% of cord blood mononuclear cells after flow cytometric analysis. Twenty-four hours after HI, randomly selected animals received HUCBC ( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  or  $1 \times 10^8$  cells) or vehicle delivered intravenously into the left jugular vein using an ultra-fine insulin syringe with a 31-gauge needle in a volume of 100  $\mu$ L.

#### *Spatial Version of the Morris Water Maze Task*

Spatial memory performance was evaluated 8 weeks after HI exposure or sham operation using the Morris water maze (MWM) as previously described (Da Silva, et al., 2008). The water maze consisted of a black circular pool (200 cm in diameter) conceptually divided into four equal imaginary quadrants. The water temperature was maintained at 21–24 °C. Two centimeters beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform (15 cm in diameter). The water maze was located in a well-lit white room, and cues were placed on the walls around the pool, which could be used by the rats for spatial orientation. Training on the spatial version of the MWM was performed over five consecutive days. On each day, the rats received 8 training trials during which the hidden platform was kept at a constant location. The movements of the animals were monitored during the sessions with a video camera fixed to the ceiling over the center of the maze. A different starting location was used in each trial, which consisted of a swim followed by a 30-s platform sit. The rats that did not find the platform within 60 s were guided to it by the experimenter. To assess long-term memory, 24 h after the final trial, the

---



platform was removed from the maze and the parameters measured were (1) the percentage of time spent in the target quadrant and (2) the latency to reach the original platform position.

#### *Brain Morphological Study*

After completing behavioral tests, the animals were deeply anesthetized with a ketamine and xylazine mixture (90:10 mg/ml; i.p.) and perfused transcardially with saline followed by 4% paraformaldehyde, pH 7.4. The brains were removed from the skull and stored in the same solution for 24 h. Coronal sections of the brains (50  $\mu$ m) were cut using a cryostat (Shandon, United Kingdom), collected at equidistant intervals and stained with cresyl violet using the Nissl method. The cerebellum was excluded from the study. Digitized images of the coronal sections overlaid on a point counting grid were obtained with a high-performance CCD camera installed on an stereoscopic light microscope (DF Vasconcellos MU-M19, Brazil), interfaced with Image Pro-Plus software (Version 6.1, Media Cybernetics, USA), and run on a personal computer. Images of the hemispheres were displayed on a high-resolution video monitor, and the boundaries were defined in accordance with the Paxinos and Watson atlas (Paxinos and Watson, 1986). The Cavalieri method was used to estimate the hemispheric volume by the summation of points multiplied by the distance between sections. With the coronal sections displayed on the point counting grid, we counted the number of points hitting the hemisphere. Volume estimation was performed in 10 equally spaced sections for each rat brain in the affected and control hemispheres. The number of points counted was used for the estimation of hemispheric volume using the following equation:  $V = T.a/p.\Sigma P$ , where  $V$  = volume

---

estimation;  $T$  = distance between the analyzed sections;  $a/p$  = point area ( $1 \text{ mm}^2$ ) and  $\Sigma P$  = the sum of points overlaid in the image (Alles, et al., 2010, Galvin and Oorschot, 2003). The hemispheric volume size was presented in (1) absolute terms ( $\text{mm}^3$ ), and (2) to evaluate the extent of brain injury, we calculated the percentage of brain tissue loss in the ipsilateral hemisphere (left hemisphere - residual ipsilateral hemisphere divided by left hemisphere x 100%), as previously described (You, et al., 2007).

#### *Immunofluorescent Staining and Confocal Laser Scanning*

Migration of HUCBC was performed using the indirect immunofluorescence method. Seven days after intravenous HUCBC transplantation, a subgroup of HI animals ( $n = 6$ ) was anesthetized with a ketamine and xylazine mixture (90:10 mg/ml; i.p.) and perfused transcardially first with a saline solution containing heparin, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The brains were removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde and then processed for paraffin sectioning. A series of four 15- $\mu\text{m}$  thick coronal sections containing the cortex and hippocampus were cut with a microtome. After being deparaffinized, the sections were placed in boiling Target Unmasking Fluid® (TUF, PanPath, Amsterdam, NL) in a microwave oven for 10 min. After cooling at room temperature, nonspecific protein binding was blocked with 2.5% albumine serum bovine for 1 h. For the detection of the grafted human stem cells, the coronal slices were incubated overnight at 4 °C with a primary mouse anti-human nuclear antigen monoclonal antibody (HuNu) (dilution 1:100; Chemicon, Mab-1281). The sections were then washed with 0.1 M PBS and incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody (1:1.000; Invitrogen, USA) at 37 °C in the absence of light

---

for 1 h. Glass coverslips were mounted using ProLong Gold antifade mounting medium with DAPI (Invitrogen, USA) to visualize cell nuclei. Reactivity of the antibody was confirmed in positive samples and negative control sections. Colocalization of DAPI with the human-specific marker HuNu was detected, analyzed, and photographed qualitatively using a confocal laser scanning microscope (LSM 5 Exciter, Carl Zeiss, Germany) coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Zen 5.0 software (Carl Zeiss, Germany). Blue (DAPI) and green (Alexa 488 for HuNu) fluorochromes in the slices were excited by a laser beam at 405 nm (Diode) and 488 nm (Argon), and the emissions were sequentially acquired with 2 separate photomultiplier tubes through LP 420 and BP505-530 nm emission filters, respectively. The areas of interest were scanned with a pinhole under each laser, set to a value of 1.0 Airy unit for the  $\times 63$  oil immersion objective lens (Plan-Neofluar, NA = 1.4). The scanning dimensions were 1024 x 1024 pixels, and the specimens were scanned an average of 4 times with a 12-bit pixel depth. The Z-stacks ( $\pm 15$  optical slices) were obtained at a thickness of 1  $\mu\text{m}$ , and colocalization was evaluated in single optical planes taken through the entire  $z$ -axis of each cell. Only HuNu<sup>+</sup> cells contained entirely within the three dimensions of a stack were included in the analysis.

#### *Polymerase Chain Reaction (PCR) Analysis*

An additional group of HI rats ( $n = 7$ ) was euthanized, and samples were collected 7 days after HUCBC cell intravenous injection. DNA was obtained from the rat brains using the phenol/chloroform method described by Isola et al. (Isola, et al., 1994). PCR analysis was performed to identify the presence of administrated HUCBC in the brains of transplanted animals using complementary primers to the human  $\beta$ -actin gene sequence. We used the

---

forward primer 5'-tcctgtacgcctctggccata-3' and the reverse primer 5'-ccttctgcatcctgttggtgatgcta-3' complementary to the human  $\beta$ -globin DNA sequence and reamplified with the forward primer 5'-tgactggccggaacctgact-3' and the reverse primer 5'-ggtgatgacctggccattggg-3' using the nested PCR technique, resulting in fragments of 535 and 209 bp, respectively. The positive control (DNA from human peripheral blood) and negative control (without any DNA) samples were assayed along with experimental samples in every reaction. Amplified products were detected by gel electrophoresis (2% agarose containing ethidium bromide) for 30 min, at a voltage of 100 V and an amperage of 400 mA. The gels were visualized under an ultraviolet transilluminator (3UV<sup>TM</sup>), and the images were captured using photodocumentation equipment connected to Quantity One software (Bio-Rad, CA, USA).

### **Statistical Analysis**

Statistical analysis was performed using the PrismGraph 5.0 program (GraphPad Software, San Diego, CA). The variables are presented as the means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Behavioral and morphological outcomes were compared between the groups using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Dunnett's (for comparisons with the vehicle control) or Bonferroni's tests, as appropriate. Data were considered significantly different if  $P < 0.05$ .

---

**Results***A high dose of HUCBC transplanted intravenously rescues long-term spatial memory impairments in hypoxic-ischemic rats*

To assess the effects of three different doses of HUCBC on long-term spatial memory deficits, we employed the MWM task. At 8 weeks post-injury, the probe test in the absence of the escape platform revealed that HI + vehicle rats exhibited significant spatial memory deficits (Fig. 1). One-way ANOVA followed by Dunnett's test indicated that the escape latency to swim over the previous position of the escape platform was longer in the HI + vehicle group ( $37.66 \pm 6.99$  s) than in the sham group ( $7.89 \pm 1.19$  s) ( $P < 0.01$ ) (Fig. 1A). Among treatment groups, only the HI + high-dose of HUCBC had a markedly shorter time required to reach the platform location ( $16.86 \pm 3.48$  s) ( $P < 0.05$  versus HI + vehicle). For the second analyzed variable, the HI + vehicle group spent less time swimming in the target quadrant that previously contained the escape platform ( $32.97 \pm 3.91\%$ ) compared to either the sham-operated ( $62.52 \pm 4.17\%$ ) ( $P < 0.001$ ) or HI + high-dose groups ( $48.17 \pm 2.93\%$ ) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1B). No significant differences were observed for either variable when HI + low- and medium-dose animals were compared to HI + vehicle animals, suggesting that only a high dose of HUCBC rescues the learning and memory impairments.

---

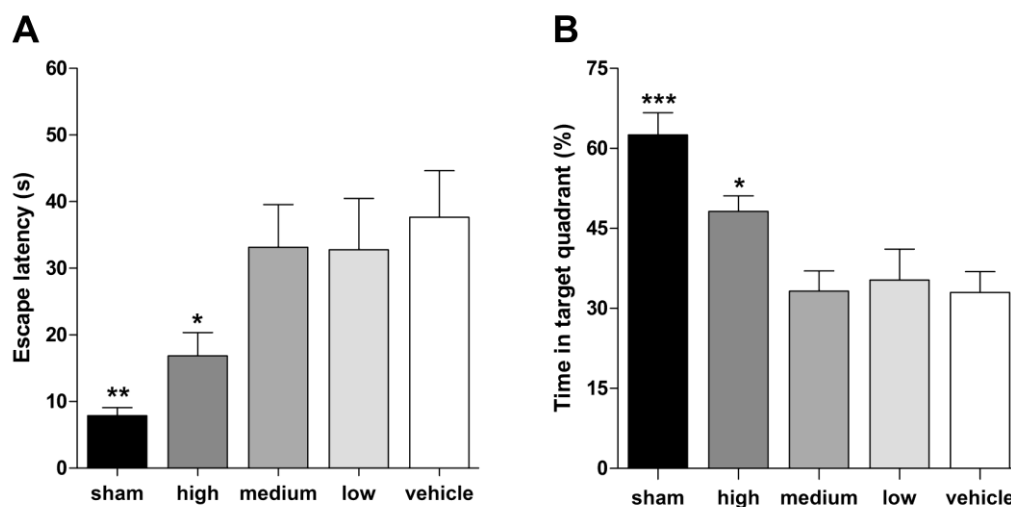


Fig. 1. A high-dose of HUCBC transplantation demonstrated a significant attenuation of injury-induced spatial memory impairment in hypoxic-ischemic rats. (A) The sham-operated and HI + high-dose ( $1 \times 10^8$  cells) groups showed a significantly faster latency of swimming over the previous platform location when compared to HI + vehicle animals. (B) The sham-operated and HI + high-dose groups spent a greater percentage of time searching the quadrant in which the platform had been submerged during training compared to HI + vehicle rats. No significant differences were observed when low- or medium-dose groups were compared to the HI + vehicle group for either variable. The values were presented as the mean  $\pm$  SEM;  $n = 10$  per group. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the Dunnett post hoc test; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  versus HI + vehicle.

### *Intravenously transplanted HUCBC dose-dependently prevent brain lesions after neonatal hypoxia-ischemia in rats*

To determine the brain morphological changes with different doses of HUCBC in a model of neonatal HI, we estimated the volume of each brain hemisphere 8 weeks after lesion induction using the Cavalieri principle (Fig. 2). Absolute hemispheric volume analysis showed significant atrophy of the hemisphere ipsilateral to the carotid occlusion (right

side) in the HI + vehicle group when compared to the contralateral hemisphere ( $296.76 \pm 74.23$  versus  $605.28 \pm 47.39$  mm<sup>3</sup>;  $P < 0.001$ ) (Fig. 2A). Similarly, the HI + low-dose group also had a significantly reduced volume of the right hemisphere compared to the left one ( $451.92 \pm 64.82$  versus  $639.12 \pm 17.14$  mm<sup>3</sup>;  $P < 0.05$ ). No difference was observed between the right and left hemispheres in sham animals ( $641.40 \pm 7.49$  versus  $658.92 \pm 6.23$  mm<sup>3</sup>) or in the HI groups that received only medium ( $560.16 \pm 63.65$  versus  $664.56 \pm 16.74$  mm<sup>3</sup>) or high doses ( $658.20 \pm 22.32$  versus  $658.56 \pm 18.75$  mm<sup>3</sup>) of HUCBC. As shown in Fig. 2B, we also examined cerebral atrophy in terms of the percentage of brain tissue loss, which was calculated using the contralateral (left, non-ischemic) hemisphere as a control. One-way ANOVA followed by Dunnett's test indicated that the percentage of damage in the HI + vehicle group ( $54.90 \pm 9.16\%$ ) was markedly higher than in the sham-operated group ( $3.09 \pm 0.60\%$ ;  $P < 0.001$ ). However, the right hemispheric volume loss caused by HI was significantly lower in rats of the medium-dose ( $18.29 \pm 8.79\%$ ;  $P < 0.01$ ) and high-dose ( $3.21 \pm 0.84\%$ ;  $P < 0.001$ ) groups when compared to vehicle-treated animals, suggesting a protective dose-dependent effect. There was no statistically significant difference between the HI + vehicle and low-dose groups ( $29.70 \pm 9.89\%$ ). Representative samples of Nissl staining from the brain hemispheres of rats after HI insult are shown in Fig. 2C. Examination of brain tissues showed vast ischemic damage with extensive atrophy and the formation of porencephalic cysts in the ipsilateral hemisphere of the HI + vehicle rats.

---

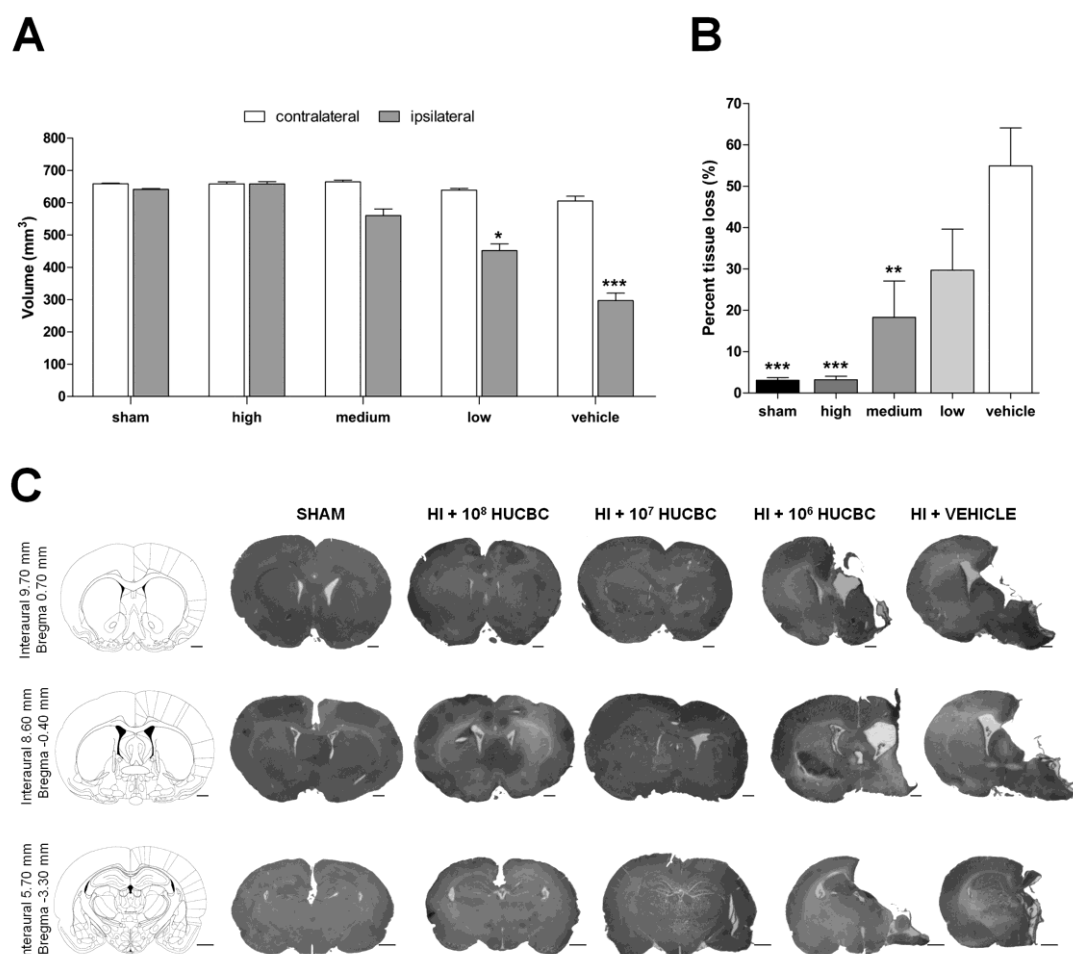


Fig. 2. HUCBC dose-dependently protect against brain atrophy in rats subjected to neonatal hypoxia-ischemia. (A) Absolute volumes of brain hemispheres are shown. The rats in the HI + vehicle and HI + low-dose of HUCBC groups showed a significant decrease in the right hemispheric volume compared to the left. There was no difference between the hemispheric volumes in the medium- and high-dose HI animals. The values were presented as the mean  $\pm$  SEM;  $n = 10$  per group. Differences were analyzed by one-way ANOVA followed by the Bonferroni post hoc test;  $*P < 0.05$ ;  $***P < 0.001$  versus the left hemisphere. (B) Percentage of brain tissue loss is shown in a graph. When compared to sham-operated rats, the HI + vehicle group showed marked brain atrophy that was significantly lower in the medium- and high-dose HUCBC groups, suggesting a relationship between cell dosage and brain damage rescue. There was no statistically significant difference between the HI + vehicle and the HI + low-dose group. All values represent the mean  $\pm$  SEM;  $n = 10$  per group.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  and  $***P < 0.001$  versus the HI + vehicle group using



Dunnett's multiple comparison post hoc test after one-way ANOVA. (C) Digitized images of coronal sections of the rat brains were stained using the Nissl procedure. The first column shows schematic drawings obtained from Paxinos and Watson's atlas. The slices show visible ipsilateral cortical atrophy (right hemisphere) in the HI + vehicle group that was attenuated at the highest doses of HUCBC. Calibration bars = 1 mm.

*HUCBC are detected in the rat brain 7 days post-transplantation as determined by PCR analysis and immunofluorescence staining*

Additional groups of HI rats were euthanized 7 days after HUCBC transplantation for human cell detection in host rat brains using an anti-human nuclear antibody. Double-stained sections were examined using a confocal laser scanning microscope to identify human nuclei positive cells (HuNu) that colabeled with DAPI. Most of the surviving human cells were located in the cortex and the hippocampus of both hemispheres (Fig. 3A and B). Confocal photomicrographs with orthogonal reconstruction of grafted cells (Fig. 3C) revealed merged images of HuNu<sup>+</sup> cells and DAPI in brain parenchyma of all analyzed animals 7 days after transplantation. To confirm the migration of the delivered cells, we performed nested PCR analysis in 7 animals using complementary primers to the human  $\beta$ -globin sequence 7 days after HUCBC transplantation. The expression of the band corresponding to the human gene was detected in the ipsilateral and contralateral hemispheres of 6 rats that received HUCBC via the jugular vein (Fig. 3D). The observations made from immunofluorescence staining and PCR analysis were consistent for all doses.

---

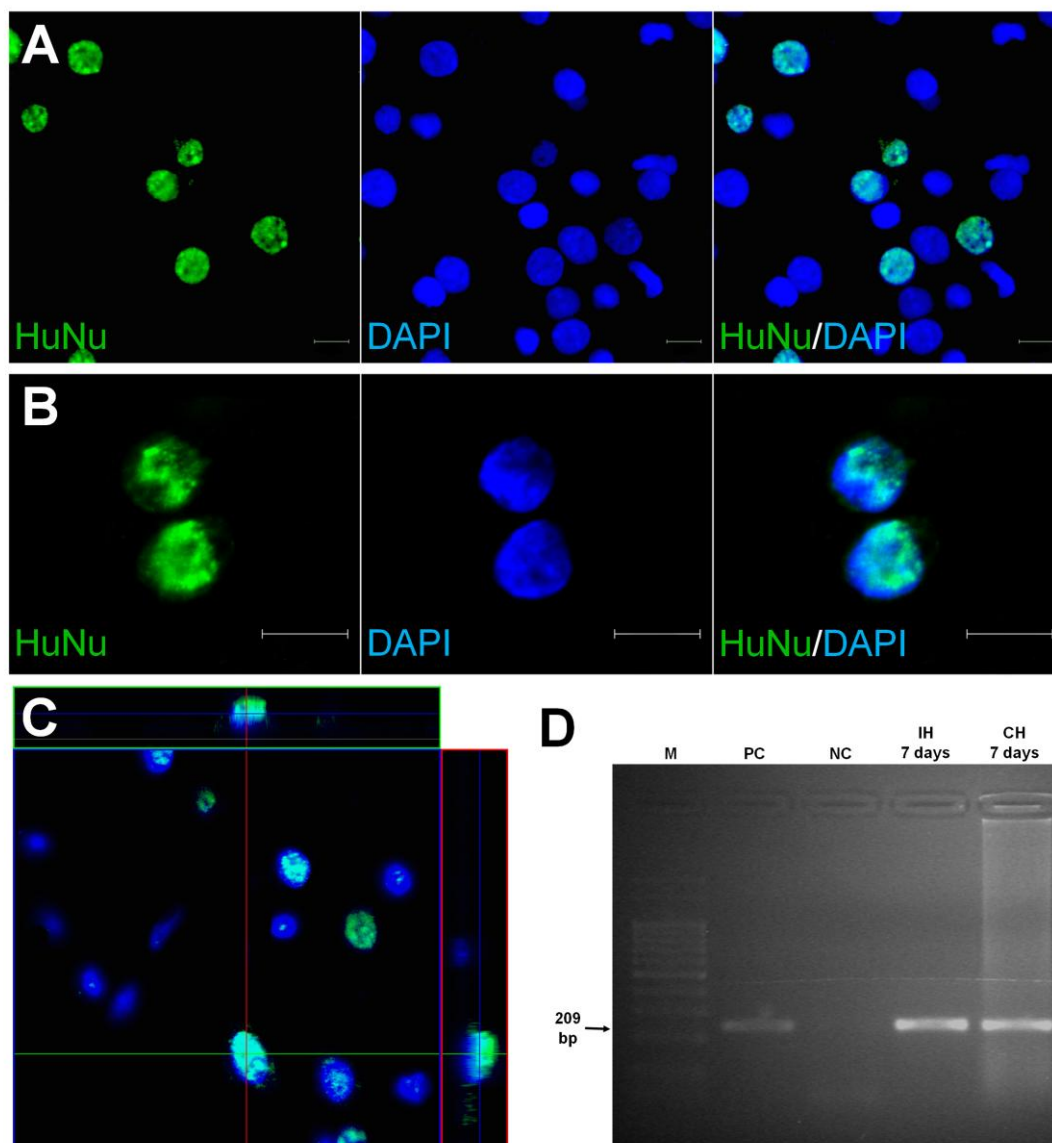


Fig. 3. Evidence of surviving HUCBC in a rat brain 7 days after intravenous transplantation. Laser scanning fluorescent imaging of double-labeled cells and three-dimensional image reconstruction revealed that  $\text{HuNu}^+$  cells (Alexa 488, green) were colocalized with DAPI (blue). (A) The individual channels and their merged image clearly demonstrate the colocalization of DAPI and HuNu in the HI rat brain. (B)  $\text{HuNu}^+$  cells in the graft are shown at higher magnification. The co-labeling of DAPI and  $\text{HuNu}^+$  cells was highly cell-type specific. (C) Representative orthogonal images showing the colocalization of  $\text{HuNu}^+$  cells and DAPI are

presented. Red and green lines indicate corresponding points in the orthogonal planes, confirming the localization of the labeling within the cell after the summation of serial optical sections. (D) PCR analysis was performed to identify human cells in the rat brain. An agarose gel shows the presence of a band corresponding to the human  $\beta$ -globin gene sequence in the ipsilateral and contralateral hemispheres. Positive control (PC); negative control (NC); ipsilateral hemisphere (IH); contralateral hemisphere (CH). Calibration bars = 10  $\mu$ m.

## **Discussion**

The neonatal HI rodent model produces long-term cognitive deficits and severe brain atrophy. We found that after a high-dose of HUCBC ( $1 \times 10^8$  cells) transplanted intravenously, the rats demonstrated a significant attenuation of HI-induced spatial memory impairment 8 weeks after the treatment. Furthermore, medium ( $1 \times 10^7$  cells) and high-dose of cell transplantation hindered the brain lesions caused by HI, which was not observed in low-dose ( $1 \times 10^6$  cells) treated animals. In addition, HUCBC were identified in host rat brains 7 days after intravenous administration using immunofluorescence and PCR analysis.

To investigate cognitive function after HUCBC transplantation, we performed the MWM test, which is an important measure of hippocampal-dependent spatial learning and memory after brain injuries, such as neonatal HI (Golan and Huleihel, 2006). Using this tool, our study revealed that injured animals treated with low and medium doses of HUCBC did not have a reduction of behavioral deficits. These results support our previous investigation that failed to show significant benefits in behavior performance 3 weeks after administration of  $1 \times 10^7$  HUCBC (medium-dose) in HI rats (de Paula, et al., 2009). However, in the current report, the spatial learning and memory of HI animals treated with

---

a high dose of HUCBC was significantly rescued compared to HI + vehicle animals 8 weeks after treatment. Only a few studies have addressed the effects of HUCBC transplantation on the cognitive consequences after neonatal brain damage (Katsuragi, et al., 2005, Ma, et al., 2007). Consistent with our data, Ma et al. (2007) reported that stem cells were effective in reducing behavioral impairments caused by HI, 2 and 8 months after cell transplantation. In addition to functional restoration in the MWM test, the authors also observed a neuropathological recovery in stem cell-treated animals (Ma, et al., 2007).

In the current investigation, we observed that both medium and high-doses of HUCBC provided significant brain damage repair after HI, in contrast to our previous data (de Paula, et al., 2009). This discrepancy might be due to the length of time that was chosen to assess neuronal injury changes. As previously shown in adult rats with ischemic lesions, no beneficial tissue effect of mesenchymal stem cell treatment was observed 29 days after the treatment. However, the authors found a statistically significant decrease in the lesion size in treated animals when evaluated 60 days post-transplantation (Kranz, et al., 2010). In addition, we emphasize that, despite the brain tissue regeneration presented here,  $1 \times 10^7$  HUCBC (medium-dose) were not enough to mediate functional recovery after neonatal HI injury.

Although basic research has shown promising results in the field of cell-based therapy for neonatal brain injury (de Paula, et al., 2010), the optimal dose for intravenous administration of stem cells has not yet been determined. According to a recent meta-analysis on intravenous stem cell delivery, there is a dose-response association between the number of stem cells injected and the functional effects of the treatment in experimental neurological diseases (Janowski, et al., 2010). A pioneer study demonstrated that neural

---

stem cells dose-dependently improved functional outcomes when transplanted into the ischemia-damaged striatum of rats (Saporta, et al., 1999). In addition, Stroemer et al. (2009) observed that neural stem cell transplantation in rats after stroke promoted significant sensorimotor recovery depending on cell dosage (Stroemer, et al., 2009). In line with our study, Yang et al. (2011) demonstrated that the highest doses of bone marrow mononuclear cells led to reduced lesion size and better functional performance in an animal model of stroke (Yang, et al., 2011). The authors of these investigations observed discrete cell survival in the majority of the high-dose treated animals, proposing a neuroprotective paracrine trophic mechanism.

Multiple mechanisms have been proposed to explain the promising behavioral and morphological outcomes observed in cell transplantation reports. However, the specific mechanisms of action responsible for the successful stem cell transplantation in HI brain injury have not yet been established. It has been suggested that HUCBC treatment decreases brain damage and consequently improves neurological deficits, mainly by enhancing paracrine repair processes (Luo, 2011). It is possible that stem cells might serve as vehicles for specific molecules, acting as vectors for the production and/or release of neurotrophic factors. Consistent with *in vitro* studies (Arien-Zakay, et al., 2009) and investigations using adult rats in a stroke model (Li, et al., 2002), Yasuhara et al. (2009) reported an increase in GDNF, NGF and BDNF brain levels in HI rats 3 days post-HUCBC transplantation (Yasuhara, et al., 2009). Neurotrophic support may also be responsible for axonal sprouting and consequently rescue behavior. Using neuroanatomical tracing, Daadi et al. (2010) demonstrated significant contralesional sprouting in HI rats after neural stem cell transplantation (Daadi, et al., 2010). Additionally, some studies have reported that the

---

functional benefits of mononuclear cord blood are related to an increase in endogenous neurogenesis. Bachstetter et al. (2008) demonstrated that intravenous administration of the mononuclear fraction of umbilical cord blood stimulates neurogenesis in the brains of aged rats (Bachstetter, et al., 2008). Some authors have also suggested that transplanted cord mononuclear cells have the ability to modulate the post-injury inflammatory response, thus facilitating the process of endogenous neurogenesis (Vendrame, et al., 2005). However, more studies are needed to confirm these suggested mechanisms.

In the present report, we detected double-labeled HuNu<sup>+</sup> cells 7 days after cell transplantation. Most of the HUCBC were widely dispersed throughout the cortical regions and other structures of both hemispheres. In addition, PCR analysis performed 7 days after HUCBC transplantation showed the presence of human  $\beta$ -globin in the rat brains. Recently, it has been shown that stem cells rapidly migrate to the lesion site within 4–10 days post-transplantation in a rat model of HI (Obenaus, et al., 2011). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) has been reported to be an important player in the recruitment and homing of transplanted HUCBC-derived mononuclear cells to the site of the HI brain lesion in newborn rats (Rosenkranz, et al., 2010).

## **Conclusion**

To our knowledge, this is the first study to demonstrate that acute intravenous administration of HUCBC exerts a dose-dependent effect on long-term behavior and morphological outcomes in HI-injured rats. Thus, these results bring us closer to the clinical applications of cell-based therapy. In summary, our current report reveals the therapeutic dose ( $1 \times 10^8$  mononuclear cells) necessary to promote robust tissue

---

neuroprotection and stable functional improvement. We emphasize that dosage is an important factor in optimizing cellular transplantation. However, other questions as to the follow-up time required for neuroprotection and the additional action mechanisms demand further investigations, as these are essential tools for the translation of basic science to safe and effective clinical therapies after neonatal brain damage.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) and Pandurata Ltda. Jaderson C. DaCosta is researcher of CNPq. Simone de Paula and Samuel Greggio are the recipients of scholarships from CAPES and CNPq, respectively. The authors also thank Gianina Teribele Venturin for critical reading of the manuscript.

---

**References**

1. Alles, Y. C., Greggio, S., Alles, R. M., Azevedo, P. N., Xavier, L. L., and DaCosta, J. C., 2010. A novel preclinical rodent model of collagenase-induced germinal matrix/intraventricular hemorrhage. *Brain Res* 1356, 130-138.
  2. Arien-Zakay, H., Lecht, S., Bercu, M. M., Tabakman, R., Kohen, R., Galski, H., Nagler, A., and Lazarovici, P., 2009. Neuroprotection by cord blood neural progenitors involves antioxidants, neurotrophic and angiogenic factors. *Exp Neurol* 216, 83-94.
  3. Bachstetter, A. D., Pabon, M. M., Cole, M. J., Hudson, C. E., Sanberg, P. R., Willing, A. E., Bickford, P. C., and Gemma, C., 2008. Peripheral injection of human umbilical cord blood stimulates neurogenesis in the aged rat brain. *BMC Neurosci* 9, 22.
  4. Bliss, T., Guzman, R., Daadi, M., and Steinberg, G. K., 2007. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38, 817-826.
  5. Da Silva, W. C., Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., and Cammarota, M., 2008. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus* 18, 29-39.
  6. Daadi, M. M., Davis, A. S., Arac, A., Li, Z., Maag, A. L., Bhatnagar, R., Jiang, K., Sun, G., Wu, J. C., and Steinberg, G. K., 2010. Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke* 41, 516-523.
  7. de Paula, S., Greggio, S., and DaCosta, J. C., 2010. Use of stem cells in perinatal asphyxia: from bench to bedside. *J Pediatr (Rio J)* 86, 451-464.
  8. de Paula, S., Vitola, A. S., Greggio, S., de Paula, D., Mello, P. B., Lubianca, J. M., Xavier, L. L., Fiori, H. H., and Dacosta, J. C., 2009. 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* 65, 631-635.
  9. Ferriero, D. M., 2004. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 351, 1985-1995.
  10. Galvin, K. A., and Oorschot, D. E., 2003. Continuous low-dose treatment with brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3 protects striatal medium spiny neurons from mild neonatal hypoxia/ischemia: a stereological study. *Neuroscience* 118, 1023-1032.
  11. Garbuzova-Davis, S., Sanberg, C. D., Kuzmin-Nichols, N., Willing, A. E., Gemma, C., Bickford, P. C., Miller, C., Rossi, R., and Sanberg, P. R., 2008. Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PLoS One* 3, e2494.
  12. Golan, H., and Huleihel, M., 2006. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 9, 338-349.
-



13. Harris, D. T., 2008. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev* 4, 269-274.
  14. Isola, J., DeVries, S., Chu, L., Ghazvini, S., and Waldman, F., 1994. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145, 1301-1308.
  15. Iwasaki, H., Kawamoto, A., Ishikawa, M., Oyamada, A., Nakamori, S., Nishimura, H., Sadamoto, K., Horii, M., Matsumoto, T., Murasawa, S., Shibata, T., Suehiro, S., and Asahara, T., 2006. Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 113, 1311-1325.
  16. Janowski, M., Walczak, P., and Date, I., 2010. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev* 19, 5-16.
  17. Johnston, M. V., Fatemi, A., Wilson, M. A., and Northington, F., 2011. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet Neurol* 10, 372-382.
  18. Katsuragi, S., Ikeda, T., Date, I., Shingo, T., Yasuhara, T., Mishima, K., Aoo, N., Harada, K., Egashira, N., Iwasaki, K., Fujiwara, M., and Ikenoue, T., 2005. 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* 192, 1028-1037.
  19. Kranz, A., Wagner, D. C., Kamprad, M., Scholz, M., Schmidt, U. R., Nitzsche, F., Aberman, Z., Emmrich, F., Riegelsberger, U. M., and Boltze, J., 2010. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats. *Brain Res* 1315, 128-136.
  20. Li, Y., Chen, J., Chen, X., Wang, L., Gautam, S., Xu, Y., Katakowski, M., Zhang, L., Lu, M., Janakiraman, N., and Chopp, M., 2002. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery *Neurology* 59, 514-523.
  21. Liao, Y., Geyer, M. B., Yang, A. J., and Cairo, M. S., 2011. Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential. *Exp Hematol* 39, 393-412.
  22. Luo, Y., 2011. Cell-based therapy for stroke. *J Neural Transm* 118, 61-74.
  23. Ma, J., Wang, Y., Yang, J., Yang, M., Chang, K. A., Zhang, L., Jiang, F., Li, Y., Zhang, Z., Heo, C., and Suh, Y. H., 2007. Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int*.
  24. Meier, C., Middelanis, J., Wasielewski, B., Neuhoff, S., Roth-Haerer, A., Gantert, M., Dinse, H. R., Dermietzel, R., and Jensen, A., 2006. Spastic paresis after perinatal brain
-

- damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 59, 244-249.
25. Obenaus, A., Dilmac, N., Tone, B., Tian, H. R., Hartman, R., Digicaylioglu, M., Snyder, E. Y., and Ashwal, S., 2011. Long-term magnetic resonance imaging of stem cells in neonatal ischemic injury. *Ann Neurol* 69, 282-291.
  26. Omori, Y., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., and Kocsis, J. D., 2008. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res* 1236, 30-38.
  27. Paxinos, G., and Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney.
  28. Pimentel-Coelho, P. M., Magalhaes, E. S., Lopes, L. M., Deazevedo, L. C., Santiago, M. F., and Mendez-Otero, R., 2009. 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.* 19, 351-358.
  29. Rice, J. E., Vannucci, R. C., and Brierley, J. B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9, 131-141.
  30. Rosenkranz, K., Kumbruch, S., Lebermann, K., Marschner, K., Jensen, A., Dermietzel, R., and Meier, C., 2010. 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* 88, 1223-1233.
  31. Sahni, R., and Sanocka, U. M., 2008. Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Clin Perinatol* 35, 717-734, vi.
  32. Santner-Nanan, B., Peek, M. J., McCullagh, P., and Nanan, R., 2005. Therapeutic potential of stem cells in perinatal medicine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 45, 102-107.
  33. Saporta, S., Borlongan, C. V., and Sanberg, P. R., 1999. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* 91, 519-525.
  34. Stroemer, P., Patel, S., Hope, A., Oliveira, C., Pollock, K., and Sinden, J., 2009. The Neural Stem Cell Line CTX0E03 Promotes Behavioral Recovery and Endogenous Neurogenesis After Experimental Stroke in a Dose-Dependent Fashion. *Neurorehabil Neural Repair*.
  35. Vendrame, M., Cassady, J., Newcomb, J., Butler, T., Pennypacker, K. R., Zigova, T., Sanberg, C. D., Sanberg, P. R., and Willing, A. E., 2004. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 35, 2390-2395.
-

36. Vendrame, M., Gemma, C., de Mesquita, D., Collier, L., Bickford, P. C., Sanberg, C. D., Sanberg, P. R., Pennypacker, K. R., and Willing, A. E., 2005. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 14, 595-604.
  37. Wechsler, L., Steindler, D., Borlongan, C., Chopp, M., Savitz, S., Deans, R., Caplan, L., Hess, D., Mays, R. W., Boltze, J., Boncoraglio, G., Borlongan, C. V., Caplan, L. R., Carmichael, S. T., Chopp, M., Davidoff, A. W., Deans, R. J., Fisher, M., Hess, D. C., Kondziolka, D., Mays, R. W., Norrving, B., Parati, E., Parent, J., Reynolds, B. A., Gonzalez-Rothi, L. J., Savitz, S., Sanberg, P., Schneider, D., Sinden, J. D., Snyder, E., Steinberg, G. K., Steindler, D., Wechsler, L., Weiss, M. D., Weiss, S., Victor, S., and Zheng, T., 2009. 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* 40, 510-515.
  38. Wolf, D., Reinhard, A., Seckinger, A., Katus, H. A., Kuecherer, H., and Hansen, A., 2009. Dose-dependent effects of intravenous allogeneic mesenchymal stem cells in the infarcted porcine heart. *Stem Cells Dev* 18, 321-329.
  39. Wyatt, J. S., Gluckman, P. D., Liu, P. Y., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A. D., Ferriero, D. M., Polin, R. A., Robertson, C. M., Thoresen, M., Whitelaw, A., and Gunn, A. J., 2007. Determinants of outcomes after head cooling for neonatal encephalopathy. *Pediatrics* 119, 912-921.
  40. Xia, G., Hong, X., Chen, X., Lan, F., Zhang, G., and Liao, L., 2010. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates. *J Perinat Med* 38, 215-221.
  41. Yang, B., Strong, R., Sharma, S., Brenneman, M., Mallikarjunarao, K., Xi, X., Grotta, J. C., Aronowski, J., and Savitz, S. I., 2011. Therapeutic time window and dose response of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *J Neurosci Res* 89, 833-839.
  42. 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., and Borlongan, C. V., 2009. Mannitol facilitates neurotrophic factor upregulation and behavioral recovery in neonatal hypoxic-ischemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med*.
  43. You, Z., Yang, J., Takahashi, K., Yager, P. H., Kim, H. H., Qin, T., Stahl, G. L., Ezekowitz, R. A., Carroll, M. C., and Whalen, M. J., 2007. Reduced tissue damage and improved recovery of motor function after traumatic brain injury in mice deficient in complement component C4. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1954-1964.
-

---

# CAPÍTULO IV

---

---

**CONCLUSÕES**

---

## 4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais hipóxico-isquêmicos que receberam a dose intravenosa de  $1 \times 10^8$  CTCUH apresentaram a associação de melhores desfechos morfológicos e comportamentais quando comparados ao grupo de animais hipóxico-isquêmicos não-tratados (HI + veículo). Adicionalmente, poucas células humanas foram detectadas no cérebro dos animais estudados. Especificamente, os achados desta pesquisa mostraram que:

- 1) Os animais hipóxico-isquêmicos que receberam  $1 \times 10^8$  CTCUH por via intravenosa apresentaram melhor performance no teste de memória de orientação espacial que os animais do grupo não-tratado. Considerando as duas variáveis estudadas, os animais do grupo HI + dose alta apresentaram menor latência para alcançar a plataforma e maior tempo no quadrando alvo quando comparados ao grupo HI + veículo.
  - 2) Os animais hipóxico-isquêmicos que receberam  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  CTCUH por via intravenosa apresentaram melhores desfechos morfológicos que os animais do grupo veículo. Considerando as duas variáveis estudadas, os animais HI + dose média e HI + dose alta não apresentaram diferenças significativas entre os hemisférios cerebrais e apresentaram menor percentual de perda tecidual quando comparados ao grupo HI + veículo.
-

- 3) Detectou-se a presença de CTCUH no cérebro dos animais transplantes 7 dias após a injeção intravenosa, principalmente na região cortical.
-

---

# CAPÍTULO V

---



---

## **APÊNDICES**

---

## APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: *Avaliação dose-resposta da administração intravenosa de células mononucleares de cordão umbilical humano em modelo experimental de hipóxia-isquemia neonatal em ratos*

Durante a gravidez, o oxigênio e nutrientes essenciais passam do sangue materno para o bebê através da placenta e do cordão umbilical. Após o parto, o sangue que permanece no cordão umbilical e na placenta é geralmente descartado. Este sangue contém um grande número de células-tronco, que são células jovens, que conseguem se reproduzir em células de seus respectivos tecidos. Pesquisas em andamento buscam utilizar essas células na regeneração de órgãos, como o coração e o cérebro, pois estas células podem se transformar em diversas outras células, tais como, células sangüíneas, musculares e nervosas (neurônios).

O objetivo deste trabalho é avaliar se as células-tronco de cordão umbilical humano podem tratar a lesão cerebral de ratos que sofreram asfixia no período do nascimento.

Para a coleta do sangue, após o nascimento, o cordão umbilical é pinçado (lacrado com uma pinça) e separado do bebê, cortando a ligação entre o bebê e a placenta. A quantidade de sangue (cerca de 70 - 100 ml) que permanece no cordão e na placenta é drenada para uma bolsa de coleta. Em seguida, já no laboratório de processamento, as células-tronco são separadas e preparadas para o congelamento. Durante este procedimento de coleta, não há nenhum risco para a mãe e para o bebê. As equipes de coleta atuam somente com o consentimento do obstetra, garantindo que nada interfira no parto.

Eu, ..... (paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito dos procedimentos e esclareci minhas dúvidas. Sei que minha participação no estudo é voluntária e gratuita e que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A doutoranda Simone de Paula certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes à mim e ao meu bebê serão confidenciais, bem como o seu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações. Concordo que as amostras de sangue de cordão umbilical e placenta obtidas serão utilizadas apenas com finalidade de pesquisa experimental.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece

---



**APÊNDICE II – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO EM 2009**

*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. Pediatric Research, 2009.*

---

## 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

SIMONE DE PAULA, AFFONSO SANTOS VITOLA, SAMUEL GREGGIO, DAVI DE PAULA, PÂMELA BILLIG MELLO, JEREMIAH MISTRELLO LUBIANCA, LÉDER LEAL XAVIER, HUMBERTO HOLMER FIORI, AND JADERSON COSTA DACOSTA

*Laboratório de Neurociências [S.P., A.S.V., S.G., D.P., L.L.X., J.C.D.], Centro de Memória [P.B.M.], Centro de Terapia Celular [J.M.L.], Departamento de Pediatria [H.H.F.], Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil*

**ABSTRACT:** Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is an important cause of mortality and morbidity in infants. Human umbilical cord blood (HUCB) is a potential source of cellular therapy in perinatology. We investigated the effects of HUCB cells on spatial memory, motor performance, and brain morphologic changes in neonate rats submitted to HI. Seven-day-old rats underwent right carotid artery occlusion followed by exposure to 8% O<sub>2</sub> inhalation for 2 h. Twenty-four hours after HI, rats received either saline solution or HUCB cells i.v. After 3 wk, rats were assessed using a Morris Water Maze and four motor tests. Subsequently, rats were killed for histologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction (PCR) analyses. HI rats showed significant spatial memory deficits and a volumetric decrease in the hemisphere ipsilateral to arterial occlusion. These deficits and decreases were not significantly attenuated by the injection of HUCB cells. Moreover, immunofluorescence and PCR analysis revealed few HUCB cells located in rat brain. Intravenous administration of HUCB cells requires optimization to achieve improved therapeutic outcomes in neonatal hypoxic-ischemic injury. (*Pediatr Res* 65: 631–635, 2009)

Neonatal hypoxia-ischemia (HI) is a major cause of mortality and morbidity in infants and occurs in approximately 2–4 per 1000 full-term births. Between 20 and 50% of asphyxiated newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy die within the neonatal period, and up to 25% of the survivors will exhibit neurodevelopment morbidity, such as cerebral palsy, mental retardation, and epilepsy. The most widely used and accepted animal model of neonatal HI is the Levine method as modified by Rice *et al.* (1), which represents a useful tool to study long-term effects of neuroprotective strategies in behavioral changes, especially in learning and memory tasks (2). Although promising neuroprotective strategies have been studied in animal models and clinical trials, current management techniques have reached only limited success (3).

Human umbilical cord blood (HUCB), is rich in adult stem cells and seems to be a potential source for transplantation, especially for perinatal neuronal repair. Studies have shown behavioral and neurologic recovery in stroke (4–7) and HI-insulted animals (8,9) that received i.v. injection of HUCB,

indicating that cells migrate toward ischemic regions and cross the blood brain barrier (BBB), especially in acute periods postischemia (10). The i.v. route is less invasive and a safer access to clinical applications when compared with intracerebral delivery. However, very few transplanted cells are found in the brain when delivered intravascularly. Therefore, evidence suggests that these cells increase endogenous mechanisms of brain repair by trophic factor secretion rather than by replacing the damaged tissue (11,12).

The aim of this study was to assess the effects of HUCB cells on spatial memory, motor performance, and brain morphologic changes in 30-d-old rats after neonatal HI on postnatal d 7. In addition, we tested whether the injected HUCB cells migrate to the injured brain 24 h, and 1 and 3 wk after HI insult.

### METHODS

**Experimental groups.** The animals were randomly divided into three experimental groups: A) sham-operated animals ( $n = 9$ ); B) rats infused with saline solution 24 h after HI injury (HI + saline;  $n = 10$ ); and C) rats infused with HUCB cells 24 h after HI injury (HI + HUCB;  $n = 15$ ). After 3 wk, rats were assessed in Morris Water Maze (MWM) and four motor tests. All evaluations were performed by blinded investigators.

**Neonatal hypoxia-ischemia model.** We used the Levine rat model, modified by Rice *et al.* (1) for neonatal rats. On postnatal d 7, Wistar rats were briefly anesthetized with halothane, and the right common carotid artery was identified, isolated from the vagus nerve, and permanently occluded with 7.0 surgical silk sutures. The entire surgical procedure was completed within 15 min.

After surgery, animals were put back into their cages and allowed to recover for 2–4 h in the company of their mothers. Rats were then placed for 2 h in a hypoxia chamber, with constant flow of humidified 8% oxygen balanced with nitrogen. The environmental temperature was maintained at 37–38°C.

The sham-operated animals were anesthetized with halothane and exposure of the right common carotid artery without ligation and hypoxia. All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the National Institutes of Health (USA).

**Human umbilical cord blood cell separation procedure and administration.** Cord blood collections were obtained *ex utero* using sterile syringes containing anticoagulant from full-term births of healthy donors. All samples ( $n = 5$ ) were collected after obtaining written informed consent forms.

Blood samples were processed within a range of 24 h after collection. HUCB was diluted with RPMI medium 1640 (GIBCO, Langley, OK) and this suspension was fractionated on Histopaque density (Sigma Chemical-Aldrich) at 400 g for 30 min at room temperature. The mononuclear fraction was collected and rinsed twice with phosphate-buffered saline (PBS) contain-

Received October 2, 2008; accepted January 25, 2009.

Correspondence: Jaderison Costa Dacosta, M.D., Ph.D., Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas e Instituto do Cérebro, PUCRS, Av. Ipiranga 6690/220, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil; e-mail: jcc@puers.br

Supported by grants from CNPq, FUNPAR, and Pandurata.

**Abbreviations:** BBB, blood brain barrier; HI, hypoxia-ischemia; HUCB, human umbilical cord blood; MWM, Morris Water Maze

ing 1% of Liqueumine (Roche, Swiss). The cell viability was evaluated using the Trypan Blue Stain 0.4% (GIBCO, Langley, OK) exclusion method. CD 34+ cells represented, on average, 0.05% of cord blood mononuclear cells after flow cytometric analysis.

Twenty-four hours after HI, randomly selected rats received i.v. either HUCB cells or saline solution. Using a micropipette with ultrafine tip (diameter <5  $\mu\text{m}$ ) connected to an insulin syringe, we injected  $1 \times 10^7$  mononuclear cells (6,8) suspended in 100  $\mu\text{L}$  total fluid volume into the external jugular vein.

**Morris water maze.** The spatial memory performance was evaluated 3 wk after HI lesion using an MWM (13,14). The water maze consists of a black circular pool conceptually divided in four equal imaginary quadrants. Two centimeters beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform. The water maze was located in a well-lit white room with several spatial cues.

Training on spatial version of the MWM was carried out over 5 consecutive days. On each day, rats received four training trials in which the hidden platform was kept in a constant location. The mean latency to find the platform was measured for individual animals on each day.

A different starting location was used in each trial, which consisted of a swim followed by a 30 s platform sit. Rats that did not find the platform within 60 s were guided to it by the experimenter. To assess long-term memory, 24 h after the final trial, the platform was removed from the maze and the parameter measured was time spent in the target quadrant.

**Open-field activity.** Rats were placed in a 40  $\times$  30 cm wood box and left to explore the arena freely for a 5-min period. The floor was divided into 12 equal squares by black lines. The number of line crossings, number of rearings, and locomotion time were measured (15).

**Cylinder test.** Forelimb use was analyzed by videotaping movements of each rat during vertical exploration in a transparent cylinder (15  $\times$  30 cm). Each animal was placed in the cylinder and observed for 5 min. The forelimb use asymmetry score was calculated as the percentage of nonimpaired forelimb use subtracted from the percentage of impaired forelimb use (16).

**Grid walking test.** The rats were placed on a stainless steel grid floor elevated 1 m above the floor. For 1-min observation period, the total number of steps was counted as well as the number of foot fault errors (15).

**Tapered/ledged beam walking test.** The beam-walking apparatus consisted of a tapered wooden beam with ledges on each side to permit foot faults without falling. The end of the beam was connected to a black box. A bright light was placed above the start point to motivate the rats to traverse the beam. The score for each trial was calculated as follows: [(vertical slips  $\times$  0.5 + horizontal slips)/(steps + vertical slips + horizontal slips)]  $\times$  100 (17).

**Morphologic study.** The animals were deeply anesthetized with thiopental sodium (0.1 mL/100 g, i.p.) and perfused transcardially with saline followed with 4% paraformaldehyde. The brains were removed from the skull and stored in the same solution for 24 h. Coronal sections of the brain (50  $\mu\text{m}$ ) were cut using a cryostat (Shandon, United Kingdom), with 250  $\mu\text{m}$  intervals, and stained with cresyl violet using the Nissl method. Digitized images of cross-sectional areas were obtained with a video camera installed in an Olympus BX40 microscope, interfaced by a software (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics) run on a personal computer. Images of the hemispheres were displayed onto a high-resolution video monitor and its boundaries were outlined for area measurements in accordance with the Paxinos and Watson atlas (18).

The Cavalieri method was used to estimate the hemispheric volumes ( $\text{mm}^3$ ) by summation of areas multiplied by the distance between sections. The cross-sectional area of the hemisphere was obtained outlining edges of each hemisphere. Volume estimation was performed in about 10 sections for each rat (19,20).

**Immunofluorescent staining.** Rats from the HUCB cell group were killed 24 h ( $n = 2$ ), and 1 ( $n = 2$ ) and 3 ( $n = 2$ ) wk after neonatal HI injury. Brains were removed from the skulls and frozen in liquid nitrogen ( $-70^\circ\text{C}$ ). Coronal sections (15  $\mu\text{m}$ ) were obtained using a cryostat at  $-20^\circ\text{C}$  and postfixed in acetone. To identify grafted human cells, sections were incubated with mouse antihuman nuclear monoclonal antibody (MAb) (MAb-1281; dilution 1:100; Chemicon International) overnight at  $4^\circ\text{C}$ . After washing in 0.1 M PBS, FITC (dilution 1:100; Novocastra Laboratories) was added and incubated at room temperature in the absence of light for 1 h. To specifically stain the nuclei with blue fluorescence, 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Santa Cruz Biotechnology) was used. To detect human cells in rat brain, double-stained sections were examined to identify those MAb-1281 positive cells that colabeled with DAPI, as previously described (6).

Reactivity of these antibodies with human cells had been confirmed in positive samples and negative control sections were processed as per the experimental tissue, but the primary or secondary antibodies were omitted. Slides were examined qualitatively in a Nikon Eclipse E800 fluorescence microscope coupled to a Pro-Series High Performance CCD camera and Image Pro Plus Software 6.1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

**Polymerase chain reaction analysis.** DNA was obtained from the brain and other organs 24 h, and 1 and 3 wk after HUCB cell injection using Trizol Reagent (Carlsbad, CA). To evaluate HUCB cells migration, polymerase chain reaction (PCR) analysis for human  $\beta$ -actin gene was performed using primers (direct 5'-CCTCATGAAGATCCTCAC-3', and reverse 5'-TGGAGAAGAGCTACAAGC-3'), which results in a 161 bp amplicon. Amplicons were analyzed after electrophoresis on 2% agarose gel and visualized with ethidium bromide staining.

**Statistical analysis.** The sample size (nine animals per group) was calculated to provide more than 80% power to detect a reduction in behavioral outcomes of 40% between the groups.

Variables with normal distribution were presented as means  $\pm$  SEM. Comparisons between the groups were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test, and behavioral performance on the training day was analyzed using a two-way ANOVA followed by the Bonferroni test. Variables with abnormal distribution were presented as median (minimum and maximum), and the Kruskal-Wallis test was used after Dunn's comparison. Data were considered significantly different if  $p < 0.05$ .

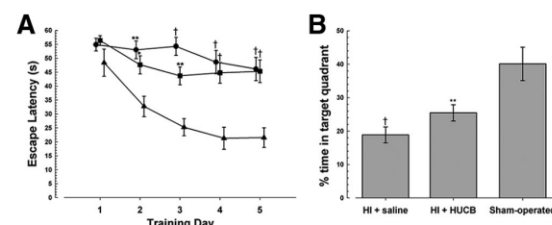
## RESULTS

Eight rats died during different steps of the experiment (19%). These animals were not considered in the final sample size.

To determine whether i.v. administration of HUCB cells can improve cognitive deficits, 30-d-old rats were trained in the spatial version of the MWM. Except on d 1, two-way ANOVA revealed significant differences between the experimental groups during the training period. As shown in Figure 1A, the mean latency of the second to fifth day was shorter in sham-operated rats when compared with the saline and HUCB cell groups, indicating that HI impaired memory performance in the injured animals. During this test, rats that had received i.v. HUCB cells 24 h after HI did not present a statistically significant shorter latency to find the platform on the d 2 to d 4.

Analysis of the probe trials (Fig. 1B) using one-way ANOVA followed by the Tukey test also showed that the sham-operated group spent significantly more time in the target quadrant when compared with HI animals treated with HUCB cells ( $p = 0.008$ ) and saline ( $p < 0.001$ ). No statistically significant difference was found between the transplanted HI rats and the saline group in terms of the latency to swim over the previous location of the escape platform ( $p = 0.25$ ).

To analyze the motor performance of the experimental groups, we performed four motor tests. Table 1 shows that open-field activity, cylinder, grid walking, and ledged beam walking tests did not reveal significant differences between the HUCB, saline, and sham-operated groups.



**Figure 1.** MWM performed 3 wk after HI injury. (A) Mean escape latency during the 5 d of training for sham-operated ( $\blacktriangle$ ;  $n = 9$ ), HI + saline ( $\bullet$ ;  $n = 10$ ) and HI + HUCB ( $\blacksquare$ ;  $n = 15$ ) rats. (B) Mean percentage of time spent in the target quadrant during a 60-s probe test in the absence of the escape platform carried out 24 h after the fifth training day for rats that received saline or HUCB cells as in A. *Post hoc* test shows HI + saline vs. sham:  $p < 0.001$ ; HI + HUCB vs. sham:  $p = 0.008$ ; HI + saline vs. HI + HUCB:  $p = 0.25$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; † $p < 0.001$  vs. sham-operated rats.



## UMBILICAL CELLS AFTER HYPOXIA-ISCHEMIA

633

**Table 1.** Motor performance in three groups within the study

Test/group	HI + HUCB	HI + saline	Sham-operated	<i>p</i>
Locomotion time (s): mean ± SEM	107.09 ± 5.61	99.75 ± 5.39	109.13 ± 4.76	0.44
No. rearing: mean ± SEM	31.64 ± 3.08	35.75 ± 2.01	29.38 ± 2.01	0.21
No. crossings: mean ± SEM	115.55 ± 6.55	113.17 ± 5.50	124.63 ± 4.47	0.40
Cylinder test (%): median (minimum–maximum)	12.90 (–2.7 to 69.23)	13.17 (–7.14 to 53.85)	2.94 (–1.37 to 11.32)	0.06
Grid walking (%): median (minimum–maximum)	16.67 (4 to 21.43)	11.24 (7.14 to 21.43)	5.72 (0 to 33.33)	0.07
Ledged beam walking (%): means ± SEM	10.94 ± 1.01	8.62 ± 0.59	10.98 ± 1.47	0.15

Variables with normal distribution are presented as means ± SEM and are compared using one-way ANOVA. Otherwise, variables are presented as median (minimum and maximum) and are compared using the Kruskal-Wallis test.

We also examined whether HI resulted in morphologic deficits and if i.v. administration of HUCB cells attenuated neuronal loss. The results of the morphologic assessment in animals treated only with saline solution showed that neonatal HI lesion caused a significant decrease in the volume of the hemisphere ipsilateral to carotid occlusion (right) when compared with the contralateral hemisphere ( $p < 0.001$ ) 3 wk after injury (Fig. 2A). The group that received HUCB cells also presented significantly reduced volume in the right hemisphere when compared with the left hemisphere ( $p < 0.01$ ). Figure 2B shows that there is no statistically significant difference between the HI + saline and HI animals treated with HUCB cells in terms of the relative difference between left and right hemispheric

volume (hemisphere volume ratio = left hemisphere volume/right hemisphere volume) ( $p = 0.095$ ).

Qualitative analysis of HUCB cell migration detected few MAb-1281 immunoreactive cells in either the ipsilateral or contralateral hemispheres 24 h, and 1 and 3 wk after HI injury (Fig. 3A–J). To confirm the distribution of HUCB cells after i.v. administration, PCR analysis using human  $\beta$ -actin was performed (Fig. 3J). The expression of human  $\beta$ -actin was detected in the ipsilateral and contralateral hemispheres 24 h, and 1 and 3-wk postinjury.

## DISCUSSION

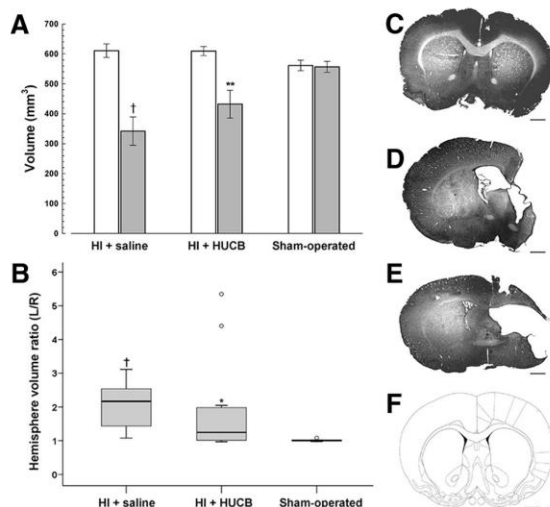
This study showed that neonatal HI brain injury induced significant long-term spatial memory deficits and extensive brain hemisphere atrophy. In those animals that received i.v. administration of HUCB cells 24 h after HI induction, the degree of behavioral and morphologic impairment was not significantly reduced. Importantly, the administration of human cells did not worsen the outcomes in HI rats.

As with other investigations, our study showed that, in spite of severe brain damage, motor function tests were insufficiently sensitive to detect neuromotor alterations in all HI rats (2). In contrast to human neonates, pups that underwent HI injury did not show obvious postural or locomotor abnormalities due to a higher degree of plasticity in immature rat brain (21). However, studies have demonstrated that injured brain regions required for memory and learning processing result in significantly decreased spatial memory (2). Our results showed that the MWM test was sensitive to brain damage in neonatal HI rats.

Several groups have reported that HUCB cells delivered either intracerebrally or i.v. dramatically enhance functional recovery after ischemic injury in adult rats. The mechanisms behind such reported neuroprotection are not known, but may include cytokines and trophic factors produced by HUCB cells (6,7,22–24). However, some authors do not confirm these results (25).

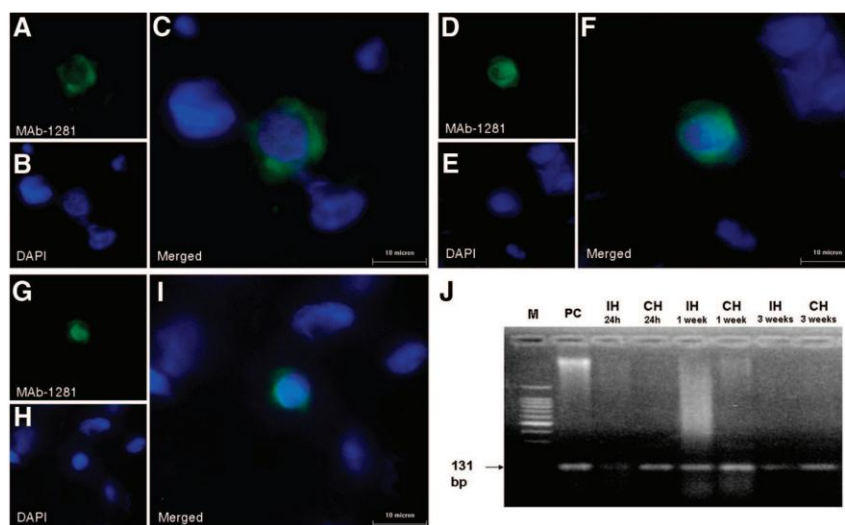
Although there are few reported studies on the use of cellular therapy in neonatal brain damage models, there is a wide range of methods used (8,9,26,27). Ma *et al.* used a HI mouse model similar to ours when studying the effect of stem cell transplantation. They showed that the transplanted cells significantly improved the learning and memory deficits 8 mo posttransplantation. However, this study used mice embryonic stem cells injected directly into the lesion site (26).

The route of delivery may contribute to contrasting data. To date, no study had used the acute transplant (24 h after insult)



**Figure 2.** (A) The estimated volumes of brain hemispheres, using the Cavalieri method in sham-operated ( $n = 9$ ), HI + saline ( $n = 10$ ) and HI + HUCB ( $n = 15$ ) rats 3 wk after HI injury. There is a significant decrease in the right hemisphere volume (gray columns) in HI + saline ( $p < 0.001$ ) and HI + HUCB groups ( $p < 0.01$ ), when compared with the left side (white columns). Data expressed as means ± SEM. ANOVA was used followed by a Tukey test ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $†p < 0.001$ ) (B) Hemispheric volume ratio determined by division of the left hemisphere by the right hemisphere, showing a tendency to reduction in HUCB cell group when compared with saline animals. Data are expressed as median (minimum and maximum). Circles represent outliers. Post hoc analysis shows HI + saline vs. sham:  $p < 0.001$ ; HI + HUCB vs. sham:  $p = 0.02$ ; HI + saline vs. HI + HUCB:  $p = 0.095$ . (C–F) We can observe digitized images of coronal sections of the rat brains stained using the Nissl procedure. (C) Sham-operated. (D) HI + saline. (E) HI + HUCB. (F) Schematic drawings obtained from Paxinos and Watson's atlas (interaural 9.70 mm; bregma 0.70 mm). Calibration bars = 1 mm.





**Figure 3.** (A–F) Digitized images of rat brain showing the immunoreaction to human nuclei antibody (MAb-1281). Use of immunofluorescence FITC (green) shows few MAb-1281 immunoreactive cells in rat brain at (A) 24 h, and (D) 1 and (G) 3 wk after HI injury. (B, E, H) Nuclei visualized by DAPI staining (blue). (C, F, I) Colocalization of immunofluorescent labels DAPI and MAb-1281 was observed. (J) Representative PCR analysis results for human  $\beta$ -actin of rats after 24-h, and 1- and 3-wk postinjury. Positive control (PC) = human DNA extracted from human hippocampus. IH, ipsilateral hemisphere; CH, contralateral hemisphere.

of adult stem cells into neonatal rat by i.v. delivery. Intravenous administration has the advantage of being less invasive but raises the problem of cell homing to organs and target site (11). Yasuhara *et al.* (9) demonstrated that both intracerebral and i.v. injection of multipotent adult progenitor cells resulted in behavioral improvement in HI rats although the percentage of graft survival was small. However, Borlongan *et al.* (28) showed that in contrast with intracerebral transplantation, i.v. delivery of bone marrow stem cells produced only limited functional effects in stroke rats. In our study, the nonsignificant functional recovery could also be explained by the small number of MAb1281-positive cells found in rat brain.

We chose to administer the cells 24 h after injury to target acute ischemic processes, such as the inflammation and BBB opening. The optimal time for transplantation after injury is also a critical factor in initiating the repair process. Acute delivery of cells will be critical once the ischemic brain elicits a strong inflammatory response about 24 h postinsult (10,22,28). Also, the BBB may be more accessible at 24–72 h postischemia and combined opening of the BBB and the high expression of chemokines could have facilitated the present mononuclear cell graft migration toward and survival within the ischemic area (29). However, Borlongan *et al.* reported that BBB opening produced by middle cerebral artery occlusion was not permissive enough to allow CNS entry of graft-derived trophic factors. In that study, improved behavioral functions were observed only in rats treated with cord blood stem cells associated with mannitol (4). Previously, we evaluated the BBB permeability in five rats 24 h after HI. Mild leakage was observed in these animals after trypan blue injection (data not shown).

Our morphologic analyses showed that neonatal HI resulted in an extensive infarcted area and that i.v. injection of HUCB cells was unable to significantly reduce the severity of the morphologic damage. We used a dose of  $1 \times 10^7$  HUCB cells in accordance with previous studies (8). However, few reports

about stem cell therapy in brain damage have studied specific dose range (6).

Our study has some limitations. Seven-day-old rats are considered to be similar to human newborns with regard to brain maturation, and the animal is highly suitable for long-term behavioral evaluations. However, Levine rat model results in variable degrees of damage due to individual differences in brain susceptibility among animals (2,30). We hypothesized that the large extension of the hemispheric brain lesion obtained in our study could have contributed to the fact that we did not observe repair after the infusion of  $1 \times 10^7$  HUCB cells. It is possible that rats with smaller brain injury will have a different response to i.v. injection of HUCB cells.

Only a low number of HUCB cells were detected in rat brain 24 h, and 1 and 3 wk after neonatal HI, as reported in other investigations (4,6,8,22). Despite controversies, immunosuppressive treatment may be a key determinant for homing of HUCB cells i.v. infused into rats (31). Several investigations suggest that T cell-mediated immune reaction plays a significant role in graft rejection and that interspecies incompatibility contributes significantly to phagocytosis of xenogeneic cells (32). Although xenoreactivity to human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium has been demonstrated (33), these findings contrast with the results of Saito *et al.* (34). Indeed, xenotransplantation of human bone marrow stem cells ameliorates neurologic deficits after grafting into ischemic brain of rats (35). Also, the results obtained by Chen *et al.* (22) with HUCB cells in rats with stroke suggest an immunologic tolerance to human cells. Although we do not have evidence of host immune response to the transplanted cells, the administration of human cells could have played a role in the negative results obtained in this study.

In addition, the unilateral carotid artery permanent occlusion results in reduction of cerebral blood flow within the various structures of the hemisphere ipsilateral to the vascular occlusion (30). We speculated that low perfusion in distal field



regions may hamper migration of HUCB cells to injured structures, which could also explain our immunohistochemical, behavioral, and morphologic results.

In conclusion, this study suggests that, according to our experimental design, HI neonatal rats with severe brain damage that received i.v. administration of HUCB cells showed nonsignificant improvement to functional and morphologic outcomes. Aspects such as dose, timing, peripheral route of HUCB cell delivery, immunosuppression, and use of associated therapies need to be investigated in depth before cellular therapy is clinically applied to optimize neuroprotection and, consequently, neurobehavioral outcomes.

**Acknowledgments.** The authors thank Tiago Giuliani for assistance with the immunohistochemical procedure, Dr. Mário Wagner for help in the statistical analysis, and Dr. Martin Cammarota for critical reading of this manuscript.

#### REFERENCES

- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB 1981 The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131–141
- Golan H, Huleihel M 2006 The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 9:338–349
- Vannucci RC 2000 Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 17:113–120
- Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR 2004 Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 35:2385–2389
- Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE 2005 Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells* 23:1560–1570
- Vendrame M, Cassidy J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE 2004 Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 35:2390–2395
- Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, Sanberg PR, Pennypacker KR, Willing AE 2005 Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 14:595–604
- Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoft S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinsch HR, Dermietzel R, Jensen A 2006 Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 59:244–249
- Yasuhara T, Hara K, Maki M, Mays RW, Deans RJ, Hess DC, Carroll JE, Borlongan CV 2008 Intravenous grafts recapitulate the neurorestoration afforded by intracerebrally delivered multipotent adult progenitor cells in neonatal hypoxic-ischemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1804–1810
- Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, Bickford PC, Klasko SK, El-Badri NS 2005 Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci* 1049:67–83
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK 2007 Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 38:817–826
- Guzman R, Choi R, Gera A, De Los Angeles A, Andres RH, Steinberg GK 2008 Intravascular cell replacement therapy for stroke. *Neurosurg Focus* 24:E15
- Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, Kiray M, Genc S, Duman N, Koroglu TF, Ozkan H, Genc K 2004 Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 153:77–86
- Rossato JI, Bevilacqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M 2007 On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14:36–46
- Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, Lengvari I 2005 Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 157:157–165
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST 2000 CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39:777–787
- Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK 2004 Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 28:365–378
- Paxinos G, Watson C 1986 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, Sydney
- Avendano C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E 1995 Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 673:83–92
- Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztein D, Chazan R, Viola G, Xavier L, Achaval M, Netto CA 2004 Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 1002:94–99
- Yager JY, Wright S, Armstrong EA, Jahraus CM, Saucier DM 2006 The influence of aging on recovery following ischemic brain damage. *Behav Brain Res* 173:171–180
- Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M 2001 Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32:2682–2688
- Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M 2002 Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 11:275–281
- Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR 2003 Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 73:296–307
- Makinen S, Kekkarainen T, Nystedt J, Liimatainen T, Huhtala T, Narvanen A, Laine J, Jolkkonen J 2006 Human umbilical cord blood cells do not improve sensorimotor or cognitive outcome following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 1123:207–215
- Ma J, Wang Y, Yang J, Yang M, Chang KA, Zhang L, Jiang F, Li Y, Zhang Z, Heo C, Suh YH 2007 Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 51:57–65
- Yasuhara T, Matsukawa N, Yu G, Xu L, Mays RW, Kovach J, Deans RJ, Hess DC, Carroll JE, Borlongan CV 2006 Behavioral and histological characterization of intrahippocampal grafts of human bone marrow-derived multipotent progenitor cells in neonatal rats with hypoxic-ischemic injury. *Cell Transplant* 15:231–238
- Borlongan CV, Evans A, Yu G, Hess DC 2005 Limitations of intravenous human bone marrow CD133+ cell grafts in stroke rats. *Brain Res* 1048:116–122
- Neumann H 2006 Microglia: a cellular vehicle for CNS gene therapy. *J Clin Invest* 116:2857–2860
- Vannucci RC, Vannucci SJ 2005 Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* 27:81–86
- Irons H, Lind JG, Wakade CG, Yu G, Hadman M, Carroll J, Hess DC, Borlongan CV 2004 Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. *Cell Transplant* 13:283–294
- Wennersten A, Holmin S, Al Nimer F, Meijer X, Wahlberg LU, Mathiesen T 2006 Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp Neurol* 199:339–347
- Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringden O, Sylvén C, Le Blanc K 2004 Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Res* 127:1293–1300
- Saito T, Kuang JQ, Bittira B, Al-Khaldi A, Chiu RC 2002 Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg* 74:19–24
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC 2002 Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174:11–20