

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM  
DIFERENTES PERÍODOS APÓS A HIPÓXIA-  
ISQUEMIA NEONATAL EM CÓRTEX DE RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Victor Camera Pimentel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM  
DIFERENTES PERÍODOS APÓS A HIPÓXIA-ISQUEMIA  
NEONATAL EM CÓRTEX DE RATOS**

**por**

**Victor Camera Pimentel**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador (a): Profa. Dra. Maria Beatriz Moretto**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM DIFERENTES  
PERÍODOS APÓS A HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM CÓRTEX  
DE RATOS**

elaborada por  
**Victor Camera Pimentel**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Maria Beatriz Moretto, Dra.  
(Presidente/Orientador)

---

Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)

---

Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 14 de julho de 2009.

## **Dedicatória**

Aos meus queridos pais

Obrigado

Por ter me entendido enquanto eu crescia  
e por ter aceitado minhas tão rápidas mudanças.

Por ter me ouvido e ter me dado claras e breves respostas  
às dúvidas e perguntas que eu levava a você.

Por ter me aplaudido quando fui verdadeiro,  
por ter me compreendido quando eu disse mentiras,  
por ter me provado que elas maculam nosso caráter.

Por ter me falado sobre os seus erros e sobre  
as coisas que você aprendeu com eles.  
Isso fez com que eu aceitasse meus próprios  
erros, que também aprendesse e que me perdoasse.

Por prestar atenção e gastar tão grande  
parte do seu tempo comigo.  
Isso me levou a acreditar que sou importante e que tenho muito valor.

Por ter considerado meus sentimentos e necessidades,  
e ter me mostrado muitas vezes  
que elas eram semelhantes às suas.

Pelos elogios e pelos incentivos.  
Foi sempre por isso que eu me senti bom  
e quis continuar sendo digno da sua fé em mim.

Por ajudar a explorar meus talentos e potenciais.  
Por ter me ensinado que para ser feliz  
eu tinha que ser eu mesmo e não como você  
ou igual a outros que você admirava.

Por ser você mesmo e por não desistir da felicidade.  
Com isso eu aprendi a buscar uma vida feliz e bem sucedida.  
Obrigado pai e mãe.

## **Agradecimento especial**

A Prof. Dr (a) Maria Beatriz Moretto,  
que me passou seus conhecimentos e experiências,  
que além de mestre foi amiga, e em sua amizade me  
compreendeu e me incentivou a seguir o caminho que escolhi,  
expresso o meu maior agradecimento e o meu profundo respeito  
A você, o meu simples, mas eterno obrigado.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida.

À minha família; Moacir, Marina, Natália e Bruno, pelo amor, apoio e carinho em todos os momentos, esta conquista é pra vocês.

À professora Maria Beatriz, minha orientadora, por todos os ensinamentos, atenção e dedicação; a minha gratidão.

Aos amigos e colegas do Laboratório 1207, Karine, Faída e Luziane pelos momentos compartilhados e pela amizade durante o período de convívio.

A Francielle, que em tudo me ajudou durante a realização deste trabalho, enfim, uma amizade sempre presente, os meus mais sinceros agradecimentos!!! Obrigado por tudo!!!

Aos alunos de iniciação científica Paula e Marcel, pela dedicação e companheirismo durante este trabalho.

Aos amigos que passaram pelo laboratório: Aline, Eduardo e Mateus.

Aos meus vizinhos de laboratório pelo convívio e pela aptidão em ajudar nas mais diversas situações.

Aos funcionários (em especial a Rosane, Ângela, Viviane, Elton, Paulo, Rozeli) pela amizade e dedicação.

Aos professores da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímica Toxicológica que de alguma maneira contribuiram para a construção do meu conhecimento científico.

Aos professores, Maribel Antonello Rubin e Carlos Fernando de Mello por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A professora Sônia Da Luz do departamento de Patologia por toda ajuda prestada, sendo fundamental para realização deste trabalho, muito Obrigado!

A UFSM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar este curso.

Aos amigos e todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

A minha namorada Jéssica, pelo carinho, ajuda e companheirismo. Não tenho palavras para dizer o quanto você é importante pra mim. Obrigado.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que a mim dedicaram seu tempo e esforço, pelas críticas que me ajudaram e certamente ainda ajudarão a crescer. Se fosse citá-las, correria o risco de omitir algumas, e por isso estendo estes agradecimentos no presente parágrafo.

Então, a todos que fazem parte de minha vida o meu muito obrigado.

# **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

## **ATIVIDADE DA ADENOSINA DEAMINASE EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A HIPÓXIA-ISQUEMIA NEONATAL EM CÓRTEX DE RATOS**

Autor: Victor Camera Pimentel

Orientadora: Maria Beatriz Moretto

Data e Local de defesa: Santa Maria, 14 de julho de 2009.

A lesão hipóxico-isquêmica (HI) neonatal é a complicação imediata à asfixia grave e pode causar dano cerebral. A HI pode apresentar-se em diferentes estágios e manifestações clínicas contribuindo assim intensamente na morbidade e mortalidade neonatal. A neuropatologia do insulto HI neonatal é multi-fatorial e complexa. O dano cerebral hipóxico-isquêmico inicia durante o insulto e estende-se no período de recuperação após a reperfusão, portanto é um processo evolutivo. A adenosina deaminase (ADA) é uma aminohidrolase que participa ativamente do metabolismo das purinas catalisando irreversivelmente a adenosina e 2'desoxiadenosina em inosina e 2'desoxinosina, respectivamente. Os objetivos deste estudo foram avaliar em ratos submetidos à HI neonatal a atividade da ADA no córtex destes animais em diferentes tempos pós-insulto. Também foram avaliados em córtex os efeitos dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A análise histológica foi avaliada através da hematoxilina eosina (HE) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no córtex destes animais. A atividade da ADA aumentou significativamente 8 dias após o insulto no hemisfério esquerdo no córtex. Neste período os níveis de TBARS mostraram-se significativamente aumentados no córtex destes animais. A HE revelou presença de área isquêmica no córtex cerebral 8 dias após a HI. Também evidenciou uma moderada infiltração linfocitária no córtex neste período. Houve proliferação e aumento na expressão da GFAP na periferia da área isquêmica, resultando em astrocitose no córtex dos animais submetidos à HI. Conclui-se que houve uma ativação do sistema imune em decorrência do processo inflamatório causado pelo insulto HI que pode estar correlacionada com a astrocitose e a infiltração linfocitária observada no córtex cerebral dos animais que sofreram o insulto 8 dias após a HI neonatal.

Palavras-chave: hipóxia isquemia, adenosina deaminase, córtex, peroxidação lipídica, GFAP.

# **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Graduating Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

## **ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY IN DIFFERENT PERIODS AFTER NEONATAL HYPOXIC-ISCHEMIC IN CORTEX OF RATS**

Author: Victor Camera Pimentel

Adviser: Maria Beatriz Moretto

Date and place of the defense: Santa Maria, July 14, 2009.

Neonatal hypoxic-ischemic injury (HI) is the direct complication to severe choking and may cause brain damage. HI may be found in different stages and clinical manifestations contributing to neonatal morbidity and mortality. The neuropathology of neonatal HI insult is multi-factorial and complex. Hypoxic-ischemic brain damage begins during the insult and extends during the recovery period after reperfusion, thus, it is an evolutionary process. Adenosine deaminase (ADA) is an aminohidrolase actively involved in the metabolism of purines catalyzing irreversibly adenosine and 2'desoxiadenosine into inosine and 2'desoxinosine, respectively. The objectives of this study were to evaluate the activity of ADA in the cortex of rats subjected to neonatal HI at different post-insult time points. Effects of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels were also assessed in cortex. The histological analysis was evaluated using hematoxylin eosin (HE) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cortex of these animals. The ADA activity was significantly increased 8 days after the insult in the left hemisphere in the cortex. In this period, TBARS levels were significantly increased in the cortex of these animals. HE revealed the presence of ischemic area in the cerebral cortex 8 days after HI. A moderate lymphocytic infiltration was also evidenced in the cortex during this period. A proliferation and an increase in the expression of GFAP in the periphery of the ischemic area was observed, resulting in astrogliosis in the cortex of these animals. In conclusion, an activation of the immune system was observed due to the inflammatory process caused by the HI insult that may be correlated with astrogliosis and lymphocytic infiltration observed in the cerebral cortex of animals that suffered insult 8 days after neonatal HI.

Keywords: hypoxic ischemia, adenosine deaminase, cortex, lipid peroxidation, GFAP.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 - Etapas da indução da lesão hipóxico-isquêmica..	17
FIGURA 2 – Mecanismos bioquímicos da injúria cerebral hipóxico-isquêmica.....	19
FIGURA 3 – Balanço entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs/ROS) e os diferentes tipos de <i>scavengers</i> ..	21
FIGURA 4 – Dano oxidativo a macromoléculas biológicas .....	22
FIGURA 5 – Necrose celular desencadeado pela hipóxia e/ou isquemia.....	23
FIGURA 6 – Células envolvidas na ação e libertação de citocinas na neurodegeneração. ....	26
FIGURA 7 – Diagrama demonstrando a sequência do desenvolvimento neuronal e glial.....	28
FIGURA 8 – Representação esquemática do metabolismo do ATP ao ácido úrico.....	31
FIGURA 9 – Estrutura tridimensional da ADA .....	32
FIGURA 10 – Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina e a 2'-desoxiadenosina .....	33
FIGURA 11 - Deficiência da adenosine deaminase .....	35

### MANUSCRITO

FIGURE 1- Effect of ontogeny on the ADA activity in the cerebral cortex of rats .....	57
FIGURE 2 - ADA activity in the cerebral cortex of rats at different times after neonatal HI..	58
FIGURE 3 - TBARS levels in the cerebral cortex of control, sham and HI rats.....	59
FIGURE 4 (A,B,C,D and E) - Histopathological changes after neonatal hypoxia-ischemia..	60

## **LISTA DE TABELAS**

### **MANUSCRITO**

Table 1 – Weight left and right hemispheres, measured during different times after HI ..... 61

## **LISTA DE ANEXOS**

ANEXO A – Comprovante de aceite do artigo submetido à revista International Journal of Developmental Neuroscience... ..	83
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAE- Aminoácido excitatório  
ADA – Adenosina deaminase  
ADP – Difosfato de adenosina  
AMP – Monofosfato de adenosina  
AMPA – Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole ácido propiônico  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BHE – Barreira hematoencefálica  
CAT – Catalase  
DDP IV – Dipeptidil Peptidase IV  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio  
GFAP – Proteína glial fibrilar ácida  
GPx – Glutathione peroxidase  
HGPRT – Hipoxantina guanina fosforibosil transferase  
HI – Hipóxia-isquemia  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IL – Interleucina  
IMP – Inosina monofosfato  
KA – Kainato  
NK – Célula natural killer  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NOS – Óxido nítrico sintase  
PMN – Polimorfonucleares  
SNC – Sistema nervoso central  
SOD – Superóxido dismutase  
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	02
<b>AGRADECIMENTO ESPECIAL</b> .....	03
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	04
<b>RESUMO</b> .....	05
<b>ABSTRACT</b> .....	06
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	07
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	08
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	09
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>3.1 Hipóxia-isquemia</b> .....	16
<b>3.2 Encefalopatia Hipóxico-isquêmica</b> .....	17
3.3 Mecanismos Fisiopatológicos.....	18
3.3.1 Metabolismo Energético.....	18
3.3.2 Exitotoxicidade.....	20
3.3.3 Estresse Oxidativo.....	20
3.3.4 Mecanismos da Morte Neuronal.....	22
<b>3.4 Processo Inflamatório</b> .....	24
3.4.1 Sistema Imune na Neuroinflamação.....	25
3.5 Neuroglia.....	26
3.5.1 Astrócitos.....	27
<b>3.6 Sistema Purinérgico</b> .....	29
<b>3.7 Adenosina Deaminase</b> .....	31
3.7.1 Isoformas da ADA.....	33
<b>4. MÉTODOS E RESULTADOS</b> .....	36
<b>4.1 Manuscrito</b> .....	37
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	62

<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	65
<b>7. PERPESCTIVAS</b> .....	66
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>9. ANEXOS</b> .....	72

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação foi escrita sob a forma de artigo submetido à publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÃO, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo e relacionados ao manuscrito deste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são relacionadas às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para a qual foi submetido:

Manuscrito – International Journal of Developmental Neuroscience

## 1. INTRODUÇÃO

A hipóxia-isquemia neonatal é um fator de risco importante de uma variedade de distúrbios neurológicos em humanos, como, dificuldades motoras e de aprendizagem, paralisia cerebral, epilepsia e convulsões, podendo até mesmo ocasionar a morte destes indivíduos. Além disso, estes podem apresentar ao longo da vida déficits cognitivos, motores e sensoriais, para os quais atualmente não existe uma terapêutica promissora (HOSSAIN, 2008).

O principal mecanismo atribuído à neuropatologia da HI neonatal é a redução do fluxo sanguíneo cerebral (PERLMAN, 2006). Eventos tóxicos interligados, tais como, a falência energética, a despolarização da membrana, a liberação de aminoácidos excitatórios, o acúmulo de radicais livres e a apoptose ocorrem simultaneamente e contribuem para a disfunção celular e a morte neuronal após o insulto hipóxico-isquêmico (HOSSAIN, 2005). Durante a HI ocorre um aumento na degradação de ATP, conseqüentemente um aumento nos níveis de adenosina, sendo que esta desempenha um papel importante na neuromodulação e neuroproteção após injúria HI.

A adenosina deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) participa ativamente no metabolismo das purinas que possui como produto final a formação de ácido úrico. É distribuída em todo o organismo e tem sido estudada extensivamente no SNC, sendo a principal enzima responsável pela degradação de adenosina no SNC (LATINI & PEDATA, 2001). A ADA é uma enzima predominantemente citosólica, que contribui na manutenção rigorosa dos níveis de adenosina, evitando assim as ações citotóxicas da adenosina e especialmente desoxiadenosina no cérebro (EELLES & SPECTOR, 1983) e tecidos periféricos (FOX & KELLEY, 1978). A ADA também pode ser encontrada associada à superfície externa de células do SNC, e a sua atividade no SNC é mais proeminente na glia, tendo sido também encontrada em sinaptossomas e vesículas sinápticas (RATHBONE et al., 1999).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da ADA em córtex de ratos submetidos à HI neonatal. Além disso, avaliar o estresse oxidativo (TBARS) nestas estruturas. Adicionalmente foram analisadas as possíveis alterações histológicas através da HE e GFAP no córtex destes animais.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Conforme vimos nas páginas anteriores a HI afeta gravemente o SNC. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar estes mecanismos e intervir farmacologicamente para evitar seus efeitos. Considerando o papel neuromodulador da adenosina no SNC, é importante avaliar sua regulação. Desta forma o objetivo geral deste estudo foi:

- Avaliar a atividade da adenosina deaminase em córtex cerebral de ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

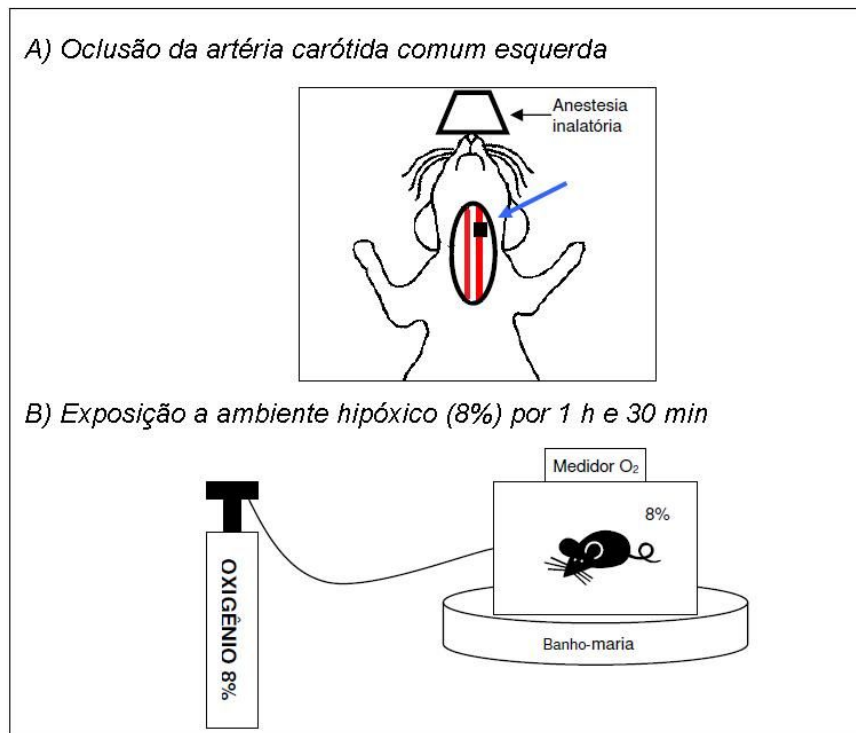
- Avaliar a atividade da adenosina deaminase em córtex cerebral em diferentes tempos após a hipóxia-isquemia neonatal em ratos.
- Determinar o indicador de estresse oxidativo (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS) no córtex destes animais.
- Avaliar histologicamente o córtex dos animais submetidos à HI neonatal.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Hipóxia-isquemia

A hipóxia corresponde à redução de oxigênio completa ou parcial em um ou mais tecidos corporais, incluindo a circulação sanguínea (hipoxemia). A isquemia é a redução ou cessação do fluxo sanguíneo que leva à hipotensão sistêmica, parada cardíaca ou doença vascular oclusiva. Já o termo asfixia refere-se ao estado no qual a troca gasosa placentária e pulmonar é interrompida, levando à progressiva hipoxemia, associada à acidose metabólica e respiratória (JOHNSTON et al., 2000).

Em ratos jovens, a obstrução de apenas uma carótida não resulta em isquemia cerebral focal ou em neuropatologias detectáveis. No entanto, quando a exposição à hipóxia é acompanhada pela ligação da carótida com duração superior a um limiar (60 à 90 min, 8% O<sub>2</sub>), o fluxo cerebral diminui e a lesão cerebral evolui (GROW & BARKS, 2002). Um dos modelos mais utilizados de HI, é o modelo de Levine, adaptado para animais de 7 dias de idade por Rice et al., que é caracterizado por hipoxemia associada a obstrução da artéria carótida (LEVINE, 1960; RICE et al., 1981) (Figura 1). A hipóxia-isquemia (HI) neonatal é considerada um importante fator de risco de uma grande variedade de desordens neurológicas em humanos, até mesmo morte (HOSSAIN, 2008; CHAO et al., 2006), contribuindo intensamente na morbidade e mortalidade neonatal (SIVEIRA & PROCIANOY, 2003).



**Figura 1** - Etapas da indução da lesão hipóxico-isquêmica

### 3.2 Encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é a complicação imediata à asfixia grave e pode causar variados graus de dano cerebral. A asfixia perinatal ainda ocorre em cerca de dois a cinco recém-nascidos para cada 1.000 nascidos vivos (VOLPE, 1992; VANNUCCI, 2000; SILVEIRA & PROCIANOY, 2005). Durante a última década, a asfixia perinatal foi causa de morte em 23% dos óbitos neonatais no Brasil, de acordo com a Organização Mundial da Saúde. A oferta insuficiente de oxigênio e / ou má circulação sanguínea causam danos cerebrais através da ativação de vários agentes citotóxicos, induzindo lesão e morte neuronal (CHOI & ROTHMAN, 1990; MARTIN et al., 1998; JOHNSTON, 2001), sendo que, 20-50% dos recém-nascidos asfixiados com encefalopatia hipóxico-isquêmica morrem no período neonatal, e até 25% dos que sobrevivem a esta injúria acabam desenvolvendo alterações neuropsicológicas permanentes, incluindo retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia ou incapacidade de aprendizagem.

No entanto, os mecanismos que levam aos danos neuronais/óbito desencadeados pela HI e as conseqüências patológicas subjacentes aos diferentes distúrbios neurológicos permanecem mal compreendidos, devido à etiologia envolvida na lesão hipoxico-isquêmica ser multi-fatorial e complexa. A origem desse padrão de distribuição de lesão relaciona-se ao fato do SNC reagir a agressões patológicas de acordo com sua etapa de desenvolvimento, e com as características peculiares a cada etapa (VOLPE, 2001).

### **3.3 Mecanismos fisiopatológicos na HI**

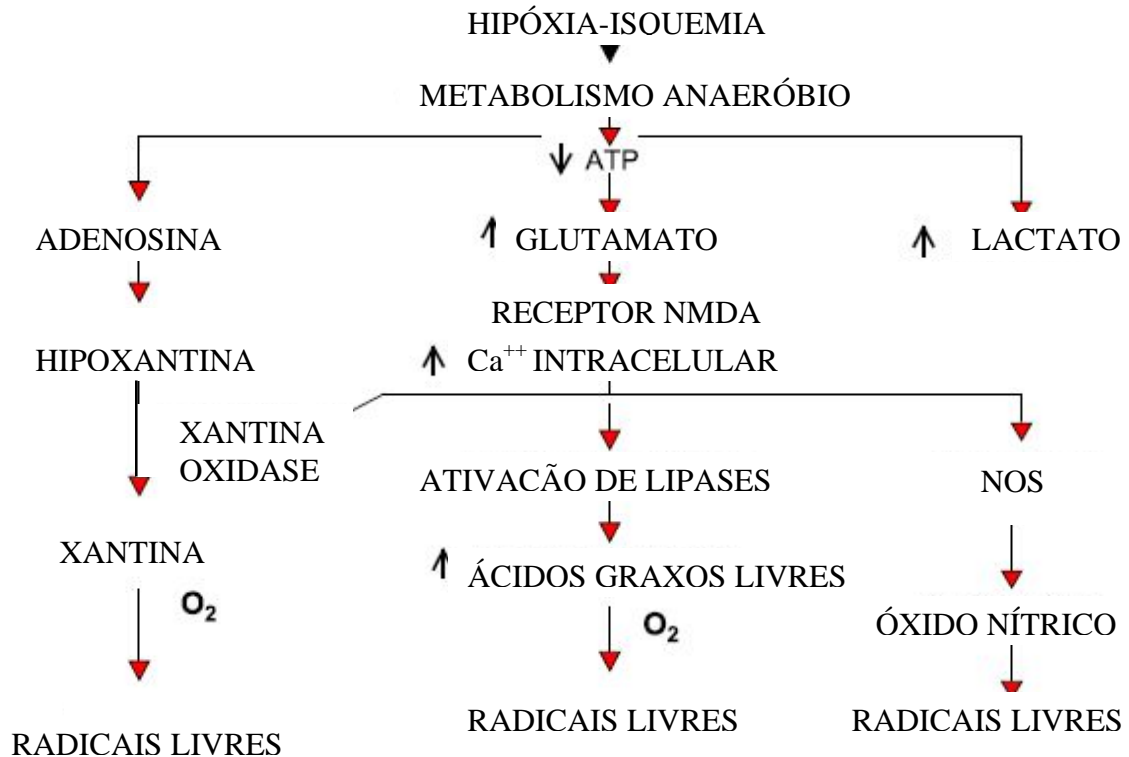
#### **3.3.1 Metabolismo energético**

Em condições fisiológicas normais, o balanço energético cerebral é mantido através da fosforilação oxidativa e produção de trifosfato de adenosina (ATP). A injúria hipóxico-isquêmica gera um desequilíbrio na demanda energética metabólica e celular que resulta em interrupção dos processos celulares (MARRO, 2002) (Figura 2).

A depleção das reservas energéticas que acompanha a HI resulta em despolarização neuronal e glial, e liberação de aminoácidos excitatórios (AAE) para o espaço extracelular (DIRNAGL et al., 1999). Ocorre uma alteração do metabolismo aeróbio para o metabolismo anaeróbio resultando em rápida depleção das reservas de fosfatos de alta energia - incluindo o trifosfato de adenosina (ATP) - acumulação de ácido láctico e incapacidade de manter as funções celulares. A síntese de ATP é dependente das reações de oxi-redução que acontecem a nível mitocondrial. A falta de aporte de oxigênio causa uma diminuição na síntese do ATP celular. O gradiente iônico de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana celular já não pode ser regulada pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase que deixa de funcionar devido a falta de energia, ocorrendo assim a despolarização das membranas, resultando em liberação de neurotransmissores excitatórios, especialmente o glutamato (SHALAK & PERLMAN, 2006).

As taxas do metabolismo energético cerebral são baixas no cérebro imaturo e dizem respeito, principalmente ao nível de maturação neuronal e atividade sináptica durante este período (NEHLIG & PEREIRA DE VASCONCELOS, 1993). Após a HI as concentrações de glicose no cérebro logo diminuem para níveis de difícil detecção, apesar dos níveis plasmáticos se encontrarem quase normais, a fase da insuficiência energética é observada

após 90 minutos de HI (YAGER et al., 1992). Imediatamente após o retorno à normoxia, os níveis de glicose no tecido cerebral normalmente duplicam (VANNUCCI, 1992).



**Figura 2** - Mecanismos bioquímicos da injúria cerebral hipóxico-isquêmica. Trifosfato de adenosina (ATP); N-metil-D-aspartato (NMDA); Óxido Nítrico Sintase (NOS) (Adaptado de SHALAK & PERLMAN, 2006).

A transmissão de impulsos elétricos e reações neuronais exigem uma fonte contínua de energia que é produzida pela glicólise. A via mais importante é a glicólise aeróbica na qual a glicose é convertida à piruvato. Na cadeia respiratória a energia liberada em cada transferência de elétrons é incorporada em moléculas de ATP, sintetizado a partir do precursor difosfato de adenosina (ADP) e fosfato de alta energia. Considerando que, durante hipoxemia moderada, o feto é incapaz de manter o metabolismo cerebral e níveis adequados de ATP através da aceleração da glicólise anaeróbia, uma aguda redução da oferta de oxigênio ao feto leva a ruptura do metabolismo energético no córtex cerebral dentro de poucos minutos. Além disso, a perda do potencial de membrana leva a um influxo maciço de cálcio, levando a danos celulares principalmente através da ativação de proteases, lípases e endonucleases. Alguns dos mecanismos celulares ativados pelo influxo de cálcio que ocorrem durante a isquemia são: alteração do ciclo do ácido araquidônico, afetando a síntese de

prostaglandinas, distúrbios da expressão gênica e síntese protéica, aumento da produção de radicais livres e obstrução do sistema de transporte axonal (BERGER & GARNIER, 1999).

### 3.3.2 Excitotoxicidade

O termo excitotoxicidade se refere à morte celular devido à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos (CHOI e ROTHMAN, 1990; BARKS & SILVERSTEIN, 1992; McLEAN & FERRIERO, 2004). A despolarização da membrana celular resulta em liberação de neurotransmissores excitatórios, o principal deles, o glutamato, que terá sua resposta mediada por seus receptores de membrana específicos: N-metil-D-aspartato (NMDA) e *alfa*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e kainato (KA), resultando em influxo de cálcio, ocasionando a ativação de vias intracelulares citotóxicas (MICHAELIS, 1998; MAHURA, 2003).

A excitotoxicidade glutamatérgica está envolvida em alterações neurológicas agudas como hipóxia, isquemia, traumatismo craniano e epilepsia (MELDRUM, 2000) e em doenças neurodegenerativas crônicas como Alzheimer, Parkinson, Huntington (LIPTON & ROSENBERG, 1994; DELIVORIA-PAPADOPOULUS & MISHRA, 1998; SHALAK e PERLMAN, 2006).

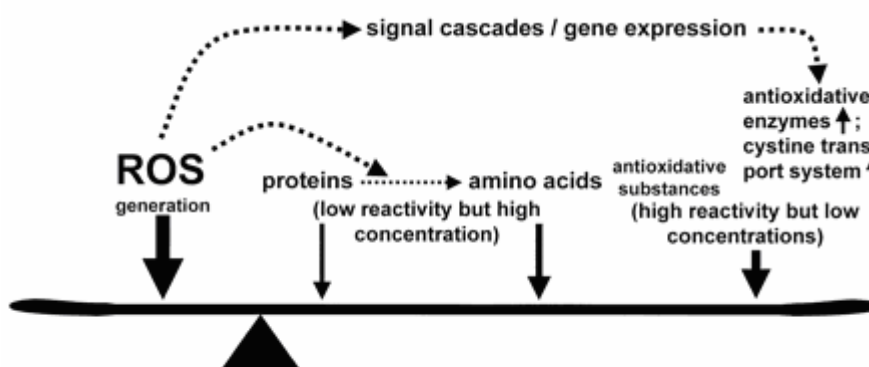
### 3.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi definido em 1991 como “um distúrbio do equilíbrio pró-oxidante/oxidante em favor do pró-oxidante, levando ao dano potencial” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A produção de oxidantes faz parte do metabolismo normal das células aeróbicas. Desse modo, qualquer estímulo que leve à produção excessiva de radicais livres e/ou a depleção de antioxidantes conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção de radicais livres (DROGE, 2002).

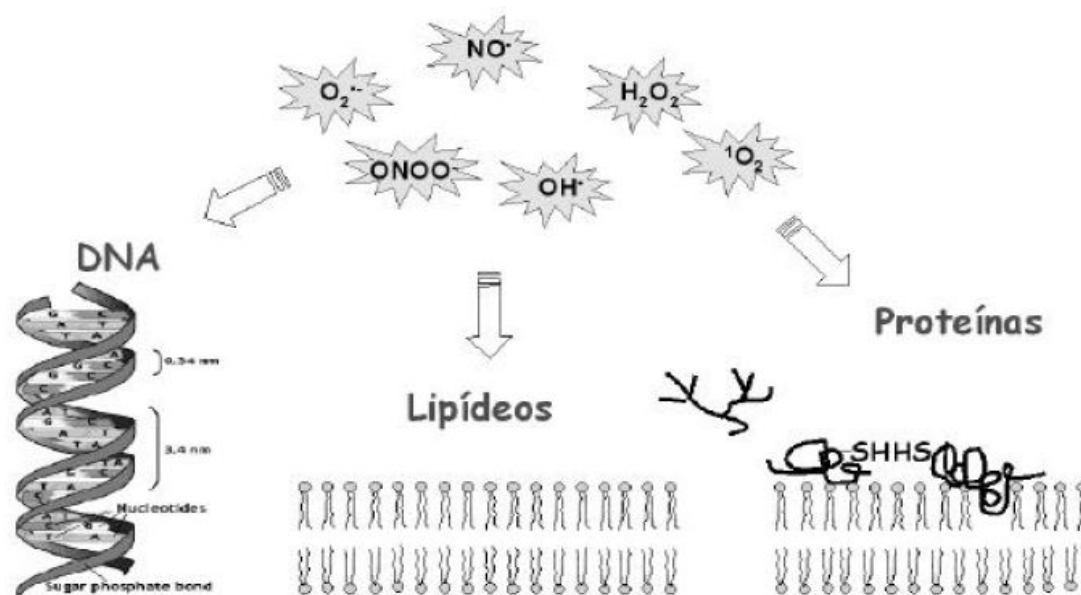
Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado ocupando uma órbita externa. Existem, entretanto, compostos

igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Nas células aeróbicas, os radicais livres são produzidos dentro do citoplasma e mitocôndria. Em condições fisiológicas as espécies reativas de oxigênio são destruídas rapidamente pelos antioxidantes endógenos e sequestradores de radicais livres. O desbalanço entre a produção de EROs/ERNs e sua remoção pelos sistemas de defesa antioxidante é denominado estresse oxidativo (Figura 3).



**Figura 3** - Balanço entre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os diferentes tipos de sequestradores de radicais livres (Adaptado de DROGE, 2002).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica onde ocorre elevada concentração de EROs/ERNs, que causam danos moleculares às estruturas celulares (Figura 4), com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em diversos tecidos e órgãos, tais como cérebro (HALLIWELL, 1994; KEYNES & GARTHWAITE, 2004), fígado, músculo, tecidos adiposo (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLDFARB, 1993) e vascular (DUARTE et al., 1993; FENSTER et al., 2002). No entanto o efeito deletério do estresse oxidativo pode variar consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS et al., 1999).



**Figura 4** - Dano oxidativo a macromoléculas biológicas.

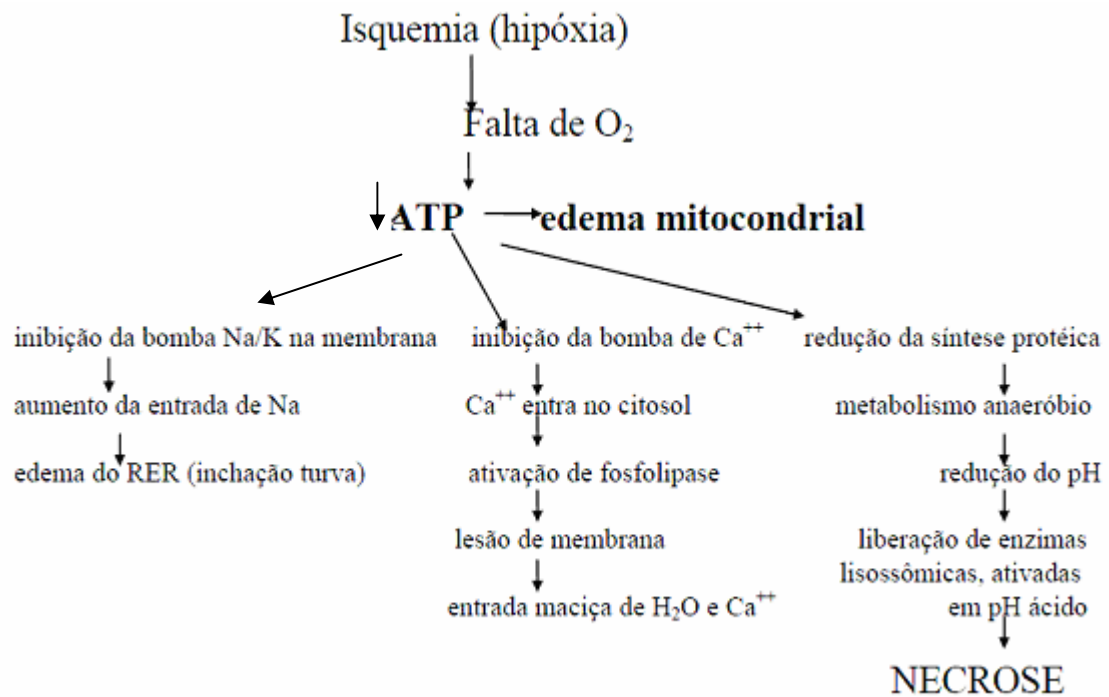
Há duas características principais do cérebro imaturo que o torna especialmente sensível ao dano oxidativo em relação ao cérebro de um adulto: baixas concentrações de antioxidantes e uma alta concentração de ferro livre. Entre as enzimas antioxidantes endógenas cerebrais podemos citar a superóxido dismutase (SOD), que existe como Cu, Zn-SOD (SOD1) no citoplasma e Mn-SOD (SOD2), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (CHAN, 1996; VANNUCCI & HAGBERG, 2004).

### 3.3.4 Mecanismos da morte neuronal

A necrose e a apoptose são duas formas distintas de morte celular (KURE et al., 1991; HERON et al., 1993; LINNIK et al., 1993). Durante a HI, a excitotoxicidade, estresse oxidativo, e a inflamação contribuem para acelerar a morte celular por meio da apoptose ou necrose, dependendo da região do cérebro que é afetada e a gravidade do insulto (MARTIN et al., 1998; FERRIERO, 2004).

A necrose é um processo passivo caracterizado pelo inchaço celular de suas organelas (edema), com extravasamento do conteúdo intracelular para o espaço extracelular. O resultado deste processo é geralmente uma reação inflamatória, que leva à infiltração celular local, dano vascular, edema, lesão ao tecido adjacente, e eventualmente, fibrose (Figura 5).





**Figura 5** - Necrose celular desencadeado pela hipóxia e/ou isquemia.

A apoptose primeiramente caracterizada por Kerr et al (KERR et al., 1972), é a morte celular definida por mudanças morfológicas nuclear e celular, resultado da ativação de cascatas de sinalização (EDINGER & THOMPSON, 2004). A apoptose é a manifestação morfológica da morte celular programada, utilizada em situações fisiológicas, como no processo de maturação do SNC, no qual neurônios que não desenvolveram sinapses relevantes são descartados (BLASCHKE et al., 1996; KEANE et al., 2001; DE ANDRADE et al., 2009). A apoptose é um processo dependente de ATP que possui origem de duas principais vias, a extrínica (mediada por receptores) e a intrínica (mitocondrial) (BENDER et al., 2005; STEFANIS, 2005; GILL & PEREZ-POLO, 2008).

A apoptose é caracterizada pela retratibilidade celular, compactação de organelas, condensação da cromatina, aparecimento de corpos apoptóticos e fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA)(Picnose). Portanto, a apoptose pode ocorrer nas formas mais leves de dano isquêmico, enquanto a necrose predomina nas formas mais intensas (ANKARCRONA et al., 1995). Estudos sugerem que a apoptose possui um papel proeminente na evolução da injúria HI cerebral no neonato, podendo ser mais importante que a necrose após a HI (HU et al., 2000).

### 3.4 Processo inflamatório

A inflamação é um evento complexo que leva a liberação de fatores solúveis e ativação celular à nível tecidual, podendo ser deflagrada por fatores endógenos como necrose tecidual, ou como resposta a estímulos lesivos: traumas, infecções, isquemia e injúria auto-imune (BENJAMINI, et al.; 2002). Normalmente, o processo inflamatório inicia-se com o reconhecimento do agente agressor e direciona-se como uma complexa série de eventos, para uma tentativa de reconstituir o tecido danificado, ou seja, culminando na sua resolução (ALI et al., 1997). No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002).

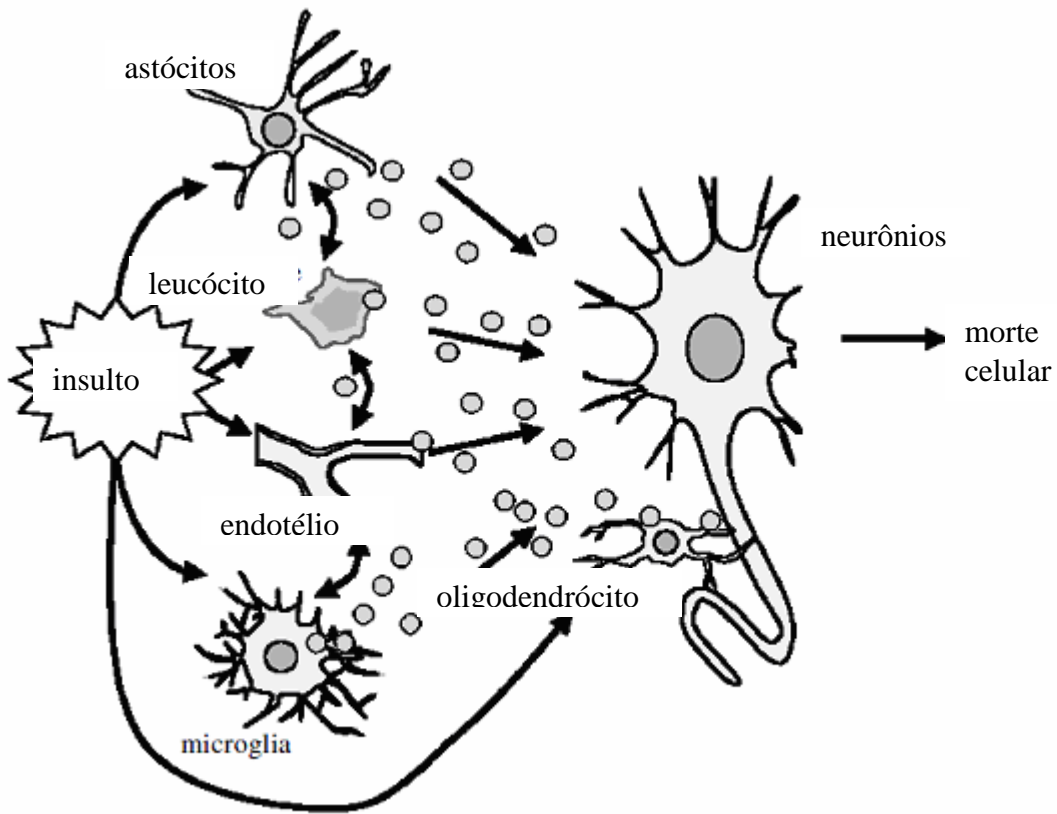
O cérebro apresenta imunidade adaptativa em resposta à injúria. Mediadores inflamatórios liberados pela microglia durante uma resposta imune inata influenciam fortemente neurônios e sua capacidade de processar as informações, tornando a inflamação um dos fatores mais importantes na patogênese da HI cerebral (GROW & BARKS, 2002; SUN et al., 2005). A cascata inflamatória deflagrada pela HI no SNC consiste de grande afluxo de leucócitos no local da injúria. Participam também desta cascata as células da microglia, sendo que a ativação destas ocorre mais rapidamente em recém-nascidos do que em adultos, além da ativação de moléculas específicas de adesão intercelular. As interleucinas são proteínas que têm uma célula primária de produção, entre as quais linfócitos, monócitos e macrófagos, porém também são produzidas por outras células, como fibroblastos, células da microglia, astrócitos e células do músculo liso. As interleucinas não são estocadas nas suas células produtoras e, portanto, sempre que necessário, são sintetizadas e secretadas em resposta a um estímulo. Uma vez liberadas, têm uma vida-média curta, limitada à atividade biológica que possuem, entre estas atividades, uma das principais é a comunicação entre as células (CECCON, 2003). No entanto, outro fator que pode contribuir para a neuroinflamação é a infiltração de células da linhagem imune como fagócitos mononucleares derivados da circulação periférica, linfócitos T, células naturais killer (células NK) e leucócitos polimorfonucleares (PMN) (SCHROETER et al., 1994; JANDER et al., 1995; EMERICH et al., 2002).

### 3.4.1 Sistema imune e neuroinflamação

A resposta imune celular após a injúria tecidual é mediada por polimorfonucleares (PMN), linfócitos e monócitos/macrófagos e as células NK. Os PMN representam cerca de 50-60% dos leucócitos circulantes e são as principais células na resposta primária ao trauma tecidual (PETTY & LO, 2002; ARUMUGAM et al., 2005; LENZ et al., 2007; HARRY & KRAFT, 2008).

Estudos da injúria do SNC tem focado principalmente nos neurônios. No entanto, as células da glia, que constituem a maior parte do volume cerebral, também possuem um papel ativo no SNC em condições normais e patológicas. Fazem parte da glia as células da microglia, que são as primeiras a responder a injúria ao SNC, tornando-se plenamente fagocitárias quando ativadas devido à morte neuronal (KOCHANNEK & HALLENBECK, 1992) (Figura 6).

A microglia quando ativada libera diversas moléculas inflamatórias, particularmente citocinas (HANISCH, 2002). A contribuição dos astrócitos é mais complexa, estas células possuem um papel fisiológico chave no suporte neuronal, já os oligodendrócitos, o terceiro tipo celular, são importantes para mielinização, e como fonte de moléculas inflamatórias específicas (BAUMANN & PHAM-DINH, 2001; DU & DREYFUS, 2002; ALLAN & ROTHWELL, 2003).



**Figure 6** - Células envolvidas na ação e liberação de citocinas na neurodegeneração. Muitos tipos de células podem liberar e responder às citocinas (círculos cinza) e produzir efeitos diretos ou indiretos sobre os neurônios, contribuindo ou limitando a morte celular neuronal em resposta a diferentes insultos (ALLAN & ROTHWELL, 2003).

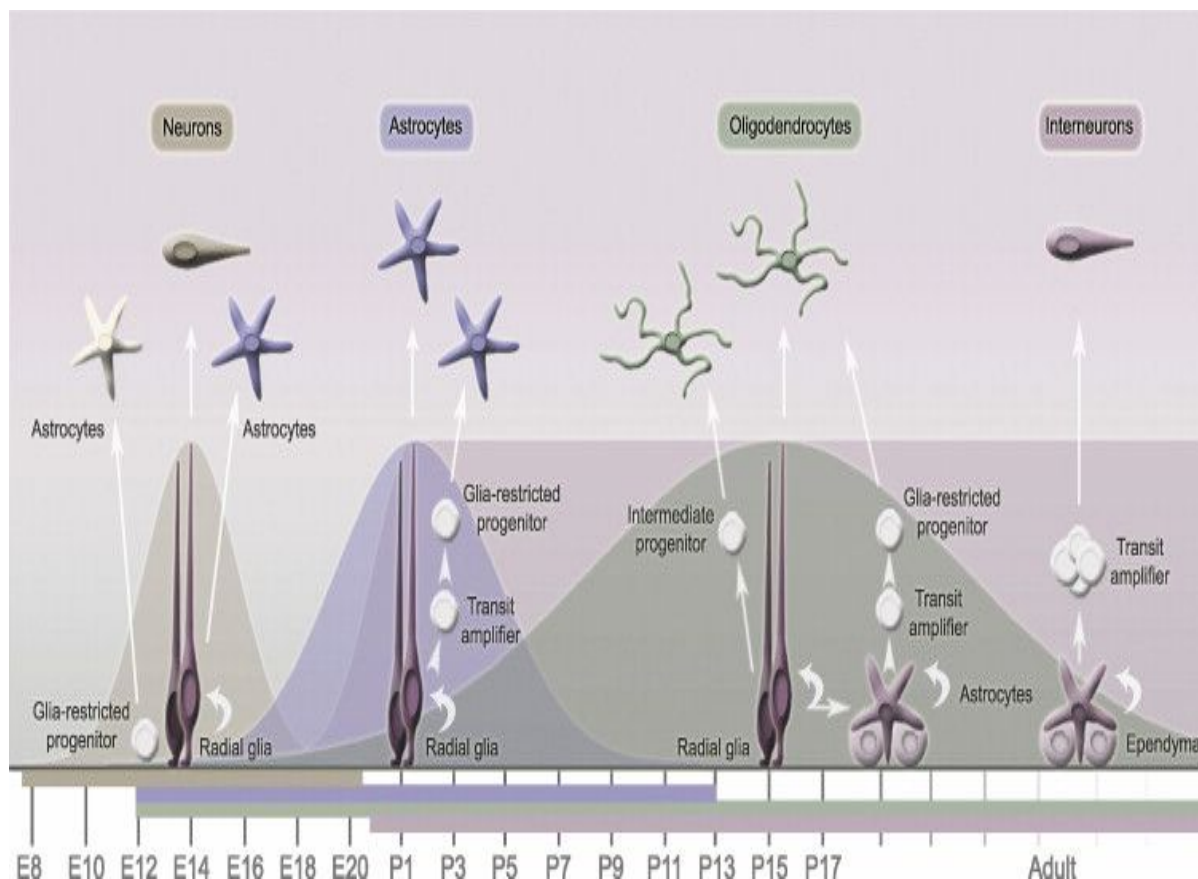
### 3.5 Neuroglia

Tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico, os neurônios relacionam-se com células coletivamente denominadas neuroglia, glia ou gliócitos. O termo neuroglia foi introduzido por Rudolf Virchow, que as retratou como células pequenas de forma arredondada que enchem o espaço extracelular e fazem parte do tecido conjuntivo. Embora o termo neuroglia sobreviva, o nosso conhecimento sobre a diversidade e as propriedades das células neurogliais e, em particular os astrócitos, tem mudado drasticamente (WANG & BORDEY, 2008).

Primeiramente, a neuroglia foi reconhecida como elementos celulares distintos, com funções de sustentação, proteção, isolamento e nutrição neuronal. As células da glia cumprem um papel importante nos processos de degeneração e regeneração (WANG & BORDEY, 2008). As células da neuroglia são subdivididas em classes distintas: astrócitos, oligodendrócitos, e mais recentemente, células NG2 (células precursoras dos oligodendrócitos). Essas são as células mais frequentes do tecido nervoso, podendo a proporção entre neurônios e células gliais variar de 1:10 a 1:50 (MACHADO, 2003). Os astrócitos e os oligodendrócitos são coletivamente denominados como macróglia e os microgliócitos como micróglia (KARASEK et al., 2004). Hoje, o termo glia é comumente utilizado para se referir a neuroglia, células de Schwann e microglia. Ocasionalmente, células ependimais são incluídas neste termo (WANG & BORDEY, 2008).

### 3.5.1 Astrócitos

Os astrócitos representam as maiores células gliais, sendo caracterizados por inúmeros prolongamentos, restando pequena massa citoplasmática ao redor do núcleo esférico ou ovóide, central e vesiculoso, sendo estes primeiramente visualizados por Otto Deiters em 1865 (KARASEK et al., 2004). Nos mamíferos, a gliogênese, que corresponde à geração de astrócitos e oligodendrócitos, começa tardiamente no período embrionário e continua durante o período neonatal e pós-natal (Figura 7).



**Figura 7** - Diagrama demonstrando a sequência do desenvolvimento neuronal e glial. A geração de diferentes células neuronais e gliais ocorrem em períodos distintos. Nos roedores, a neurogênese apresenta-se acentuada no 14º dia da fase embrionária (E14), astrocitogênese no 2º dia pós-natal (P2) e a oligodendrocitogênese no 14º dia pós-natal. A geração de interneurônios inicia durante a fase embrionária e continua durante o período pós-natal (LIU & RAO, 2004; CARMEN et al., 2007).

Os astrócitos possuem funções importantes na manutenção da homeostase neuronal. Estas funções incluem suporte metabólico aos neurônios (JONES, 2009), homeostase iônica (METEA et al., 2007) e recaptção de neurotransmissores excitatórios (principalmente glutamato) (ALVAREZ-DÍAZ et al., 2007), sinaptogênese, angiogênese e manutenção da BHE (RIDET et al., 1997; WANG & BORDEY, 2008). Funcionalmente, os astrócitos atuam na manutenção do espaço extracelular, fornecendo substrato para os neurônios. No entanto, evidências recentes mostram que os astrócitos podem contribuir ativamente na atividade e plasticidade sináptica (RODRIGUEZ et al., 2009).

Durante insultos agudos e crônicos ocorre uma reação glial específica, conhecida como astrogliose reativa, representada por uma complexa remodelagem morfofuncional dos astrócitos (PEKKNY & NILSSON, 2005). A astrogliose reativa é uma reação defensiva do cérebro que tem por objetivo: isolar a área lesionada do restante do tecido do SNC, reconstruir

a BHE, facilitar a regeneração axonal ao redor da região lesionada (PEKONY et al., 1999; BUTT et al, 2005; PEKONY et al., 2007). Os astrócitos ao redor da lesão sofrem proliferação e hipertrofia com a finalidade de substituir a arquitetura tecidual existente, dando origem há uma cicatriz glial permanente conhecida como processo cicatricial (astrogliose anisomórfica). Nos astrócitos mais distantes da lesão, as mudanças reativas são muito mais leves, embora as células astrogliais modifiquem sua aparência e sofram múltiplas alterações bioquímicas e imunológicas, não ocorre distorção da arquitetura normal do tecido do SNC, mas sim permitem a sinaptogênese (astrogliose isomórfica, ou seja, preservação da morfologia).

Nos mamíferos, os astrócitos podem expressar três tipos de proteínas: nestina, vimentina e GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida). A nestina e a vimentina são as principais proteínas encontradas em astrócitos imaturos, enquanto que a vimentina, juntamente com a GFAP são expressas em astrócitos maduros. Os astrócitos ativados na gliose reativa, por sua vez, expressam nestina, vimentina e GFAP (ELIASSON et al., 1999). Os astrócitos são geralmente identificados pela presença destes filamentos intermediários (fibras gliais), que são mais proeminentes nos astrócitos presentes na substância branca cerebral do que na cinzenta (PRIVAT e RATABOUL, 2007). Dentre estes a GFAP pode ser considerada uma das principais proteínas, a qual pode ser identificada através de métodos imunistoquímicos (HOLLEY et al., 2003).

### **3.6 Sistema purinérgico**

O sistema purinérgico é caracterizado por ser uma via de sinalização importante em diversos tecidos, desencadeando múltiplos efeitos celulares. É considerado um sistema primitivo envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2004).

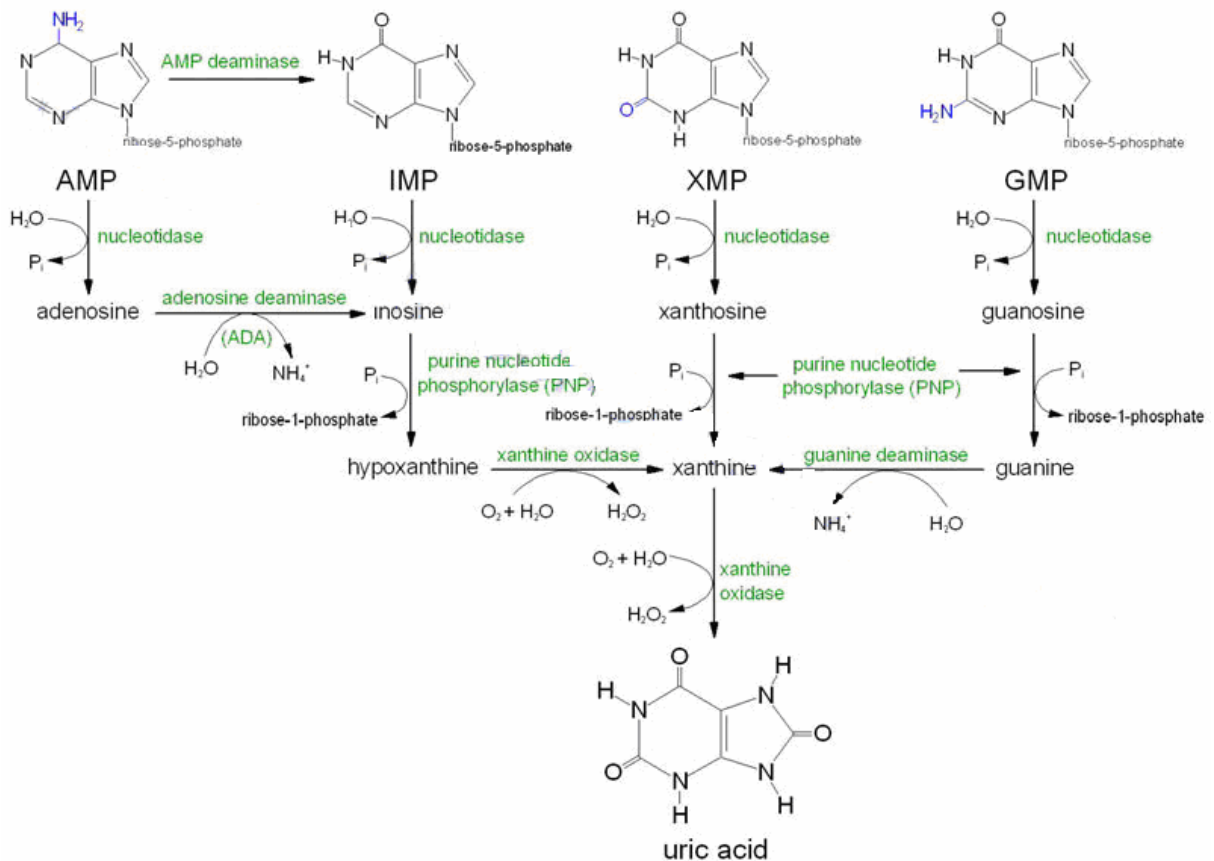
A adenosina é um importante componente do sistema purinérgico sendo encontrada em todos os tecidos. Ela atua modulando diversos processos fisiológicos, incluindo a neuromodulação da transmissão sináptica e neuroproteção em mamíferos (RICHARDSON et al., 1987; RALEVIC & BURSTOCK, 1998; ROMANOWSKA, 2007). A adenosina, após ser formada a partir da degradação do ATP intracelular, é liberada para o espaço extracelular onde irá desempenhar suas diversas ações no SNC através da ligação em receptores específicos

(ZIMMERMANN 2000; CUNHA, 2001; CASTILLO et al., 2008). Estudos mostram que a ativação de receptores de adenosina em células do sistema imune suprime a produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$  (BOUMA et al., 1994; HASKO et al., 1996; SAJJADI et al., 1996) e promove a indução de interleucina-10 (MILLS et al., 2008). A adenosina produzida durante a hipóxia, isquemia, ou em processos inflamatórios reduz a lesão tecidual e promove a sua reparação através de diversos mecanismos mediados por receptores de adenosina (CASTILLO et al., 2008), sendo o principal deles o receptor de adenosina A1, que no SNC é altamente expresso na microglia/macrófagos e neurônios (JOHNSTON et al., 2001; TSUTSUI et al., 2004).

A remoção da adenosina extracelular ocorre em parte pela sua recaptação através de transportadores bidirecionais, e em parte por sua degradação à inosina pela ADA. Contudo, sob condições de estresse metabólico, os níveis de adenosina saturam a adenosina kinase e o excesso de adenosina é metabolizada a inosina pela ADA (OLSSON & PEARSON, 1990; FREDHOLM, 2007), gerando como produto final do metabolismo das purinas o ácido úrico.

O ácido úrico é um produto normal do metabolismo das purinas (Figura 8) sendo excretado através dos rins. A produção elevada de ácido úrico pode ocorrer durante a HI, seguida pela reperfusão. Na presença de hipóxia, a adenosina liberada durante o aumento na degradação de ATP, leva a formação de hipoxantina e em seguida xantina, assim se o oxigênio for reintroduzido aos tecidos durante a reperfusão o ácido úrico será formado (WU & WU, 2008). Além disso, o aumento na produção de ácido úrico também tem sido evidenciado em algumas doenças inflamatórias, provavelmente devido ao aumento da apoptose e necrose das células envolvidas (SATO et al., 2003).





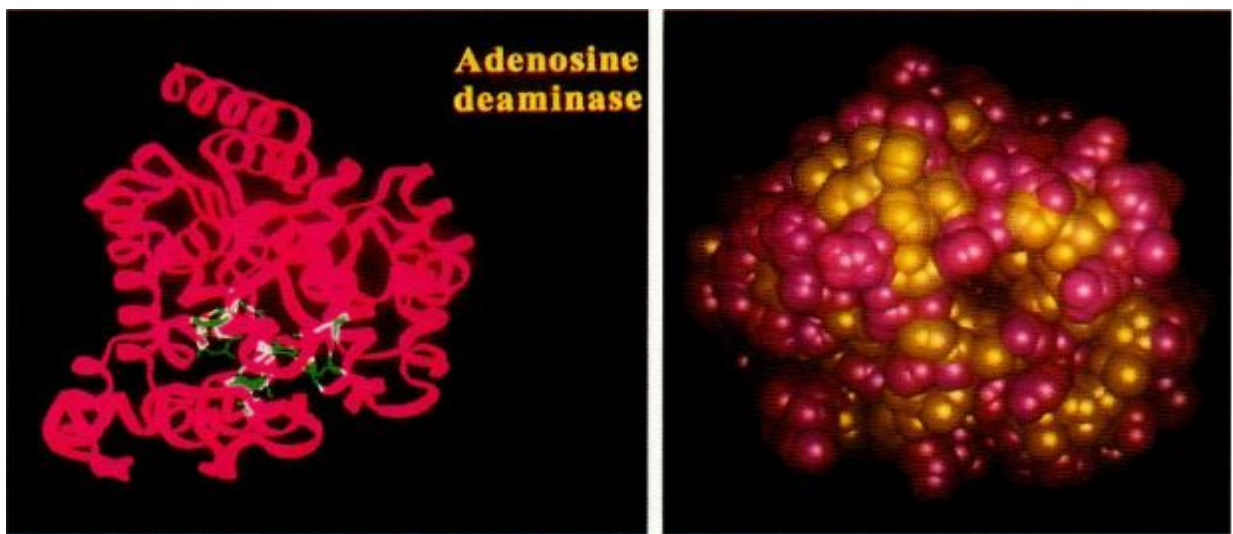
**Figura 8** - Representação esquemática do metabolismo das purinas ao ácido úrico. Monofosfato de adenosina (AMP); Monofosfato de guanósina (GMP); Monofosfato de xantina (XMP); Inosina monofosfato (IMP).

### 3.7 Adenosina Deaminase

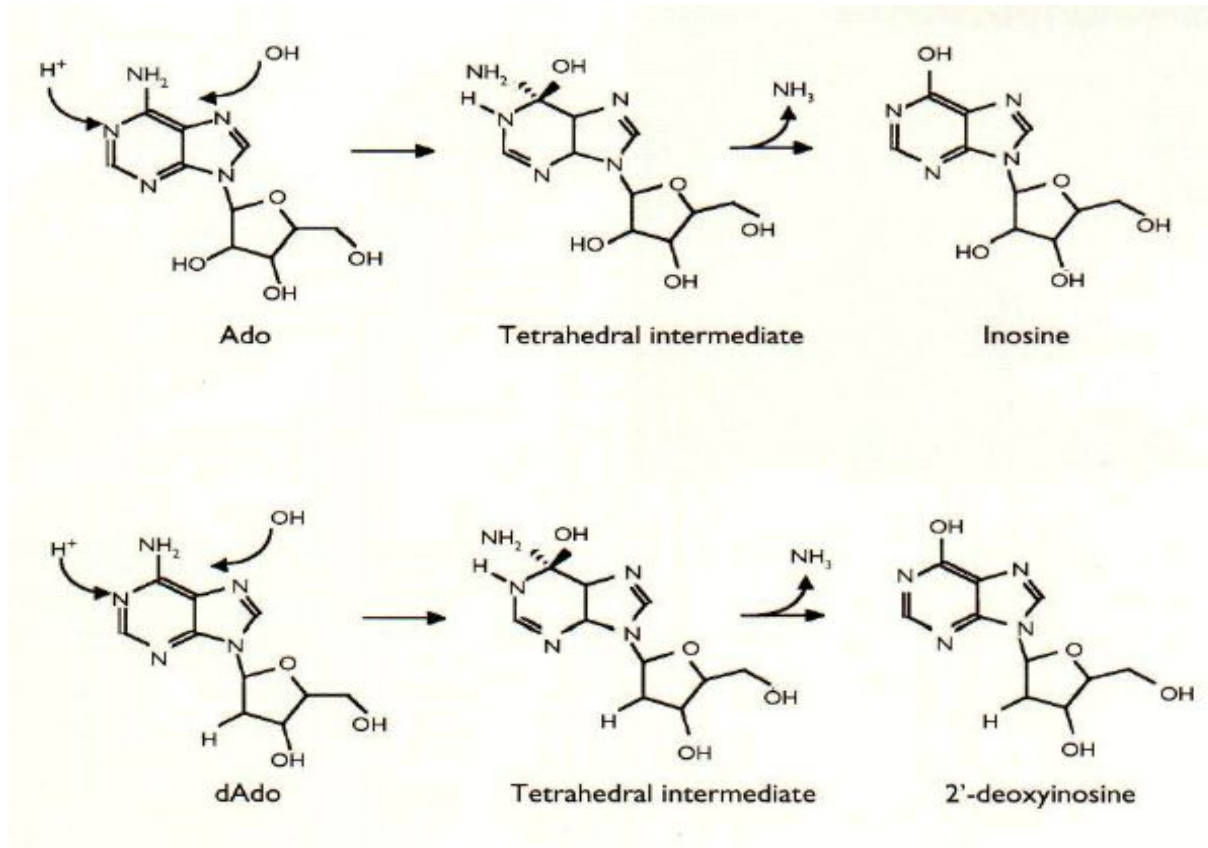
A adenosina deaminase (ADA, Adenosina aminohidrolase EC 3.5.4.4, Figura 9) é uma enzima que participa do catabolismo das purinas, encontrada no citosol e na membrana celular. É responsável por promover a desaminação hidrolítica da adenosina em inosina. Além deste nucleosídeo, a 2'-desoxiadenosina é outro substrato clivado pela ADA, sendo convertido a 2'-desoxinosina (SHANJUKUMAR & SHARMA, 2000) (Figura 10). Altos níveis desta enzima são encontrados no sistema linfóide (linfonodos, baço e timo), podendo também ser encontrada, mas em menor quantidade, nos eritrócitos (CRISTALLI et al., 2001; SABOURY et al., 2003). A ADA possui um importante papel biológico no metabolismo dos nucleotídeos purícos, sendo essencial para a proliferação e diferenciação de células linfóides, particularmente células T, e maturação de monócitos (BOTA et al., 2001), possuindo assim

uma função importante no sistema imune em processos inflamatórios (ANTONIOLI et al., 2008). No cérebro a ADA ocorre principalmente no citosol, podendo ser encontrada também em neurônios e sinaptossomas (FRANCO et al., 1998).

A ADA tem sido objeto de considerável interesse devido ao seu papel na manutenção dos níveis de adenosina, intra e extracelular. Além de sua localização intracelular clássica, a ADA também está presente como uma ecto-enzima (Ecto-ADA) na superfície de muitos tipos celulares incluindo linfócitos e neurônios (FRANCO et al., 1997).



**Figura 9** - Estrutura tridimensional da ADA. As imagens são formadas apartir de dados reportados por Wilson et. al. (1991). A imagem a direita apresenta o sitio ativo no centro da estrutura, e as cadeias laterais polares e não polares estão representadas em rosa e amarelo respectivamente (FRANCO et al., 1998).



**Figura 10** - Reações catalizadas pela ADA, tendo como substrato a adenosina (Ado) e a 2'-desoxiadenosina (d-Ado)(FRANCO et al., 1998).

### 3.7.1 Isoformas da ADA

Em humanos a ADA existe na forma de duas isoenzimas classificadas como: ADA<sub>1</sub> e ADA<sub>2</sub>. Estudos recentes reportam que as isoformas da ADA apresentam características cinéticas distintas, que faz com que ambas desempenhem funções diferentes no organismo (SHAROYAN et al., 2006).

A ADA<sub>1</sub> é uma proteína monômera com uma massa molecular de aproximadamente 40 kDa. A localização da ADA<sub>1</sub> é principalmente citosólica, sendo encontrada em todo o organismo e também na superfície de macrófagos, linfócitos B e em alguns linfócitos T. Esta pode estar combinada com uma glicoproteína dimérica não específica de aproximadamente 200 kDa, designada proteína combinante (cp) (TSUBOI et al., 1995).

O complexo ADA-proteína combinante constitui uma ecto-ADA, a qual é responsável pelo controle dos níveis de adenosina extracelular (SAURA et al., 1996; FRANCO et al.,

1997). Evidências demonstram que esta proteína de ligação é uma glicoproteína multifuncional do tipo II, conhecida como CD26 ou Dipeptidil Peptidase IV (DPPIV), a qual pode ser encontrada na forma solúvel ou integrada à membrana. Além de ser uma proteína de ligação da ADA1, a CD26 possui atividade peptidásica e funciona como uma molécula de adesão a matriz extracelular, podendo influenciar processos de sinalização celular (GORRELL, 2005). O sítio de ligação com a CD26 depende de alguns resíduos de aminoácidos carregados presentes na ADA1, como Arg-142, Glu-139 e Asp-143. (DESROSIERS et al., 2007).

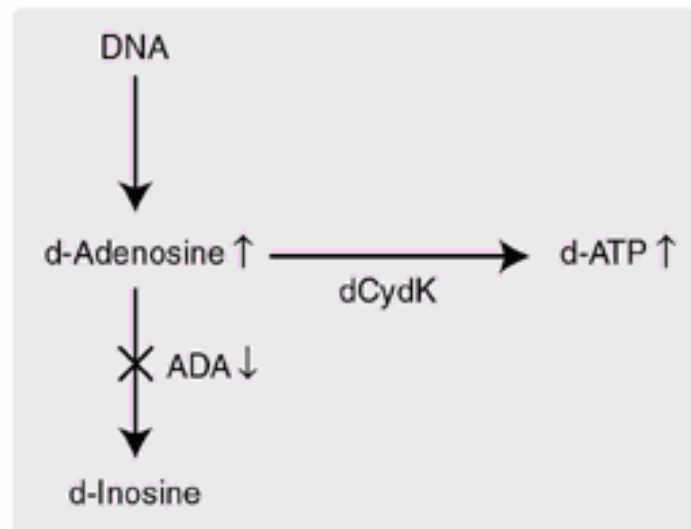
Estudos envolvendo a sinalização mediada pela adenosina no SNC demonstram que além da interação com CD26, a ADA1 pode atuar como uma ecto-enzima ancorada aos receptores de adenosina A1 e A2b, mediando os processos de sinalização deste neuromodulador (CIRUELA et al., 1996; ROMANOWSKLA et al., 2007).

Diferente da ADA1, a ADA2 apresenta diferenças, tanto estruturais quanto cinéticas. Sua massa molecular é de aproximadamente 100 kDa e representa uma menor parte da atividade da ADA em tecidos, sendo abundante no plasma (IWAKI-EGAWA et al., 2004), entretanto, a fonte celular e a função da ADA2 plasmática ainda não estão completamente esclarecidas (KOBAYASHI et al., 1993). Dados recentes têm sugerido que ela pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios (IWAKI-EGAWA et al., 2006).

Defeitos genéticos no metabolismo das purinas em humanos resultam em sérias desordens metabólicas (BLACKBURN et al., 1998). A deficiência ADA no sistema imune está diretamente relacionada com a Síndrome da Imunodeficiência Combinada Severa (SIDSC) e a ausência de linfócitos T e B funcionais em indivíduos afetados (PACHECO et al., 2005). Tal deficiência tem sido atribuída a anormalidades do metabolismo intracelular das purinas e subsequente acumulação de metabólitos tóxicos (SANTISTEBAN et al., 1993).

A deficiência genética da ADA em humanos resulta primariamente em grave linfopenia e imunodeficiência, que pode levar o indivíduo afetado a morte nos primeiros anos de vida. A base metabólica da imunodeficiência está relacionada com a sensibilidade dos linfócitos ao acúmulo de substratos da ADA, adenosina e 2'-desoxiadenosina. Investigações usando camundongos deficientes em ADA suportam a hipótese que as células T e B são sensíveis ao aumento nas concentrações de 2'-desoxiadenosina, que causa morte celular através de mecanismos que envolvem o acúmulo de desoxiadenosina trifosfato (d-ATP) e indução a apoptose. O aumento d-ATP resulta na inibição da ribonucleotideo redutase e superprodução de outros desoxiribonucleotideos, assim, a replicação do DNA é comprometida (Figura 11). Além de defeitos no sistema imune, os portadores exibem

fenótipos em outros sistemas fisiológicos incluindo o sistema renal, neural, esquelético, e pulmonar (COHEN et al., 1978; BLACKBURN & KELLEMS, 2005).



**Figura 11** - Deficiência da adenosine deaminase. A ADA é expressa em todo o organismo. Nas células normais o turnover do DNA é mediado pela ADA catalisando a desaminação de 2'-desoxiadenosina em 2'-desoxinosina. Nas células deficientes de ADA, ocorre um acúmulo de desoxiadenosina, a qual é convertida pela desoxicitidina kinase (dCydK) para desoxiadenosina trifosfato (d-ATP). Esse dois metabolitos possuem um profundo efeito sobre o desenvolvimento dos linfócitos- por meio de efeitos sobre a síntese de DNA, prejudicando a divisão celular levando a célula a apoptose (QASIM et al., 2004).

## **4. MÉTODOS E RESULTADOS**

Os métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, se encontram no próprio manuscrito. A apresentação está baseada na versão aceita para publicação na revista: *International Journal of Developmental Neuroscience*.

#### 4.1 Manuscrito

*Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after neonatal hypoxia ischemia*

*Pimentel, V.C<sup>a</sup>, Bellé, L.P<sup>a</sup>, Pinheiro, F.V<sup>a</sup>, De Bona, K.S<sup>a</sup>, Da Luz, S.C.A<sup>b</sup>, Moretto, M.B<sup>a\*</sup>*

<sup>a</sup>Graduating Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre

<sup>a</sup>Department of Clinical and Toxicological Analysis

<sup>b</sup>Department of Pathology

Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

CORRESPONDENCE ADDRESS:

Maria Beatriz Moretto

[beatriz@smail.ufsm.br](mailto:beatriz@smail.ufsm.br)

***Abstract:***

Hypoxia ischemia (HI) is a common cause of damage in the fetal and neonatal brain. Lifelong disabilities such as cerebral palsy, epilepsy, behavioral and learning disorders are some of the consequences of brain injury acquired in the perinatal periods. Inflammation and formation of free radicals appear to play key roles in neonatal HI. The aim of this study was to describe the chronological sequence of adenosine deaminase (ADA) activity, the oxidative damage changes and astrocyte response using the classic model of neonatal HI. We observed an increase in the activity of ADA and lipid peroxidation in the cerebral cortex eight days after neonatal HI. This was accompanied by a GFAP-positive, and the degree of brain damage was determined histochemically by hematoxylin-eosin (HE). Taking into account the important anti-inflammatory role of adenosine, ADA may provide an efficient means for scavenging cell-surrounding adenosine and play an important part in subsequent events of neonatal HI in association with GFAP reactive gliosis. The present investigation showed that neonatal HI causes the increase of free radicals and significant damage in the cerebral cortex. The increase in ADA activity may reflect the activation of the immune system caused by HI because the morphological analysis exhibited a lymphocytic infiltration.

**Key words:**

Hypoxia ischemia, adenosine deaminase, cortex, lipid peroxidation, GFAP.



## 1. Introduction

Hypoxic-ischemic brain damage in neonates is a major risk factor of a variety of serious human neurological disorders such as motor and learning disabilities, cerebral palsy, epilepsy, seizures or even death. These affected individuals can experience substantial and life long cognitive, sensory and motor disabilities, for which there is still no promising therapy (Johnston, 1997; Lorenz et al., 1998; Northington et al., 2001 a; Hossain, 2008). Therefore, further efforts are needed to understand and prevent neonatal cerebral injury.

Although there are multiple etiologies for neonatal encephalopathy in the newborn period, hypoxia-ischemia (HI) is largely recognized as the major cause of brain damage and subsequent neurological disability (Kadhim et al., 2005). The pathophysiology of brain damage from this injury has been ascribed to various mechanisms and cascades. The cascade of events after hypoxia-ischemia/reperfusion is initiated by energy depletion, accumulation of cytosolic calcium and activation of a variety of calcium-mediated deleterious events. Cell damage is thought to be caused by the post ischemic release of oxygen radicals, inflammatory reactions and an imbalance between the excitatory and inhibitory neurotransmitter systems (Berger and Garnier, 2000; Quiniou et al., 2008; Moretto et al., 2005) which lead to extensive and prolonged cell death (Balduini et al., 2004; Bracci, 2003; Mclean, 2004).

Adenosine, a metabolite of adenosine triphosphate (ATP), is thought to possess a housekeeping role in the nervous system. During cerebral ischemic and traumatic insult adenosine is released in large quantities and exerts a neuroprotective influence. Adenosine deaminase (ADA, adenosine aminohydrolase, EC 3.5.4.4), is a “key” enzyme, to deaminate adenosine (thus maintaining adequate levels of adenosine available for nucleic acid and ATP synthesis). ADA is the catalyzing enzyme that converts the irreversible hydrolytic deamination of adenosine and 2'-deoxyadenosine to inosine and 2'- deoxyinosine, respectively. The enzyme is widely distributed in vertebrate tissues and plays a critical role in

a number of physiological systems (Sharoyan et al., 2006; Franco et al., 2007). ADA is mainly a cytosolic enzyme, thought to maintain a strict control of adenosine levels, preventing cytotoxic actions of adenosine and deoxyadenosine in peripheral tissues (Fox and Kelley, 1978) and CNS (Eells and Spector, 1983). In fact, adenosine promotes tissue protection and repair. Adenosine downregulation of inflammatory and immune responses in injured tissues plays a crucial role in the beneficial effects induced by this nucleoside (Abbracchio and Ceruti, 2007). Although the main function of ADA is the development of the immune system in humans, it seems to be associated with the differentiation of epithelial cells and monocytes, neurotransmission, and maintenance of gestation (Moriwaki et al., 1999).

In recent years, the elucidation of the molecular mechanisms at the basis of these actions has revealed that the combined insult (HI) produces a damaging depletion of energy metabolites in the neonatal brain that causes cellular necrosis and an ongoing process of injury that continues to evolve for days (Palmer et al., 1990; Northington et al., 2001 b). These events elicit the appearance of inflammatory reactions, a potential source of toxic free radicals and of expansion of cerebral damage. Inflammatory responses in the cerebral cortex and activation of astrocytes have been shown in neonatal HI (Benjelloun et al., 1999; Villapol et al., 2008). Therefore, the purpose of this study was firstly, to assess the importance of developmental changes of ADA activity. Secondly, to investigate the ADA activity in different chronological times after HI injury. Thirdly, to evidence the presence of responses caused by the brain damage identified by immunohistochemical and hematoxylin staining. We follow this proceeding in order to clarify the possible association between the damage and the effects of this enzyme (ADA). Finally, we measured the lipid peroxidation eight days after neonatal HI, when the ADA activity was the most evident.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals**

Adenosine was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### **2.2. Animals**

Seven-day-old Wistar male rats, weighing 14-16 g were obtained from the Bioterio Central of the Federal University of Santa Maria. They were fed *ad libitum* and maintained on 12h light/12h dark cycle, at room temperature. The animals were used according to the guidelines of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria which approved the research project (experimental protocol N°. 23081.007419/2007-10).

### **2.3. Hypoxic-ischemic (HI) injury**

The association of unilateral occlusion of the common carotid artery with exposure to a hypoxic atmosphere in order to produce unilateral damage in the rat brain (Moretto et al., 2008). Animals were anesthetized with halothane. The left common carotid artery was permanently occluded with surgical silk thread. After a 2-h recovery period, groups of four pups were placed into a 1500 ml chamber and exposed to an 8% oxygen- 92% nitrogen atmosphere delivered at 5 l/min for 1.5 h, with the chamber partially immersed in a 37 °C water bath to maintain a constant thermal environment. The pups were killed by decapitation according to the protocols cited below, after the HI insult. The brain was removed and the cortex was used in all experimental assays.

#### **2.4. Experimental procedure for enzymatic assays:**

Wistar rats were euthanized and their brains were promptly removed and the cerebral cortex of all rats was carefully separated. Both hemispheres (left and right) were used and processed as described previously by Bellé et al. (2009) with some modifications. In brief, firstly the tissue was homogenized in 8 volumes of 50 mmol/l phosphate buffer pH 7.0, centrifuged (30 min, 14.000 g), and then the supernatant fraction was isolated (Mustafa and Tewari, 1970). All the procedures described above were performed at 0 – 4 °C. Cerebral cortex ADA activities were estimated spectrophotometrically by the method of Giusti (1974), which is based on the direct measurements of the formation of ammonia, produced when ADA acts in excess of adenosine. The homogenates of cortex were added to the reaction mixture containing 50mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). The samples were incubated at 37 °C for 1 h and the reaction was started by addition of the substrate (adenosine). The reaction was stopped by adding the samples on a 106 mM/0.16mM phenol-nitroprusside/mL. The reaction mixtures were immediately mixed to 125mM/11 mM alkaline-hypochlorite (sodium hypochlorite) and vortexed. 75 µM ammonium sulphate was used as ammonium standard.

Protein concentration was measured by the method of Peterson (1977) with bovine serum albumin used as a standard. The values were expressed as U/mg of protein for ADA. All experiments were performed in triplicate and the mean was used for calculation.

#### **2.5. Lipid peroxidation**

The tissues were homogenized in 8 volumes of 10 mM Tris-HCl buffer solution pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 1 000 × g for about 10 min. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels were determined by a modification of the method of Buege and Aust (1978). In brief, 250 µl of cerebral cortex homogenate were mixed thoroughly with

500  $\mu$ l of a stock solution of 10% w/v trichloroacetic acid and 750  $\mu$ l of thiobarbituric acid. The mixture was heated for 15 min in a boiling water bath. After cooling, the red pigment produced was extracted with 1.5 mL of n-butanol and measured in absorbance at 535 nm.

## **2.6. Analysis of Morphologic Changes**

Pups were sacrificed on postnatal day 15 (eight days after HI). The brain was removed and their cortex were separated and weighed separately on an electronic micro balance and were fixed with 10% paraformaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin and sections (5-6  $\mu$ m) for further evaluation. After they were assembled on glass slides and stained with HE (hematoxylin-eosin) and examined under a light microscope.

## **2.7. Immunohistochemical staining**

Astrocytes were stained with labelled streptavidin biotin (LSAB Kit; Dako; Carpinteria, CA). Anti-glia fibrillary acidic protein (anti-GFAP, Dako; Carpinteria, CA) was used for primary antibodies. After reaction with the primary antibody, the tissue specimens reacted in contact with a secondary antibody, biotin-conjugated goat polyclonal anti-mouse IgG (H+L). Sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies in a humid chamber. In the following day, sections were incubated for 2h in the corresponding biotinylated secondary antibodies (Dakopatts, Denmark), followed by washing, and immersing in the solution containing the conjugated streptavidin horseradish peroxidase complex for 30 min. The specimens were colored with 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma; St. Louis, MO). They were also stained lightly with hematoxylin.

## **2.8. Data Analysis**

Results were analyzed by one-way and two-way ANOVA for multiple group comparison. Pos hoc analysis was carried out by Duncan multiple range test.  $P < 0.05$  was considered significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Developmental changes in ADA activities after neonatal HI in the cerebral cortex**

We observed a significant difference among all control groups studied. ADA activity was lower on the 67<sup>th</sup> postnatal day (60 days after HI) than when they were on the 7<sup>th</sup> postnatal (seven days immediately after insult) ( $1.22 \pm 0.12$  for control of left hemisphere and  $13.67 \pm 0.94$  U/mg/mg protein, respectively,  $p < 0.001$ ). ADA activity did not change in the left and right hemispheres within groups control and sham (Figure 1).

#### **3.2. Effect of HI on the ADA activity in the cerebral cortex of rats**

The effect of ADA activity after neonatal HI was observed in different stages of development. Eight days after neonatal HI, ADA activity increased when compared with the control (left hemisphere) ( $9.23 \pm 0.37$  vs.  $3.29 \pm 0.39$  U/mg of protein, respectively,  $p < 0.001$ ). There was no difference of HI and control among the groups (Figure 2).

#### **3.3 Lipid peroxidation**

Cerebral cortex homogenates of the experimental group presented TBARS values that were significantly higher ( $12.71 \pm 1.48$  vs.  $8.13 \pm 0.28$ ,  $p < 0.05$ ) than the control group. These levels increased approximately 36% in brain of rats that suffered HI injury compared to the control group (Figure 3).

### **3.4. Comparison of bilateral cerebral hemisphere weight in different stages**

The weight left and right hemispheres shown significant difference. The cerebral cortex of eight and 60 days after HI injury display a decrease of 40%, and 30%, respectively (Table 1).

### **3.5. Hystologic analysis**

The brains from control rats at eight days after HI showed no morphological changes (Fig. 4 A). The cerebral cortex of rats that suffered common carotid artery ligation exhibited ipsilateral hemispheric lesions to the carotid artery occlusions. The microscopic analysis revealed the presence of extended ischemic area (Fig. 4B) represented by a pale area (loss of glia) with an intense area of cellular activity (astrocyte activation) surrounding the lesion (Fig. 4E). The analysis also showed neurons with small nuclei, cellular volume loss, condensed chromatin, disappearance of nucleolus (Fig. 4C) and the multifocal lymphocytic infiltrated was found in moderate intensity (Fig 4D).

### **3.6. Immunohistochemistry**

Glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry showed a reactive gliosis and astrocytose in the cerebral cortex of left hemisphere that suffered neonatal HI. In the center of the lesion a pale zone was found indicating death by ischemia. It was also found a great number of foam macrophages with rose cytoplasm, which was rounded in shape and well limited, coming originally from microglia or monocytes of blood and indicating the phagocytosis of necrotic cells. In peripheral areas of the lesion we observed an increase of astrocytic population typical of astrocytosis and astrogliose, confirming the reaction to the insult (Fig. 4 E).

#### 4. Discussion

This study presents the most frequently used neonatal hypoxia–ischemia model, which consists of a 7-day postnatal rat model combined with a common carotid artery ligation and a hypoxemia, developed by Rice et al., 1981. There is considerable evidence in the literature that the progression and extension of cerebral ischemia are related to several mechanisms. Many of them involve an inflammatory response component and the roles of inflammation in HI which strongly influence neurons and their ability to process information, making it a leading factor in the HI pathogenesis. Inflammatory reactions from ischemia are the release of pro-inflammatory cytokines, increased expression of endothelial adhesion molecules, activation of microglia and macrophages, and leukocyte infiltration. The synergistic actions of inflammatory events exacerbate brain injury, leading to deterioration of neurological outcomes. Thus, from a clinical perspective, suppressing inflammation represents a legitimate strategy to reduce neonatal HI brain injury (Yin et al., 2007). In line with this, the abnormal production and/or impaired clearance of reactive oxygen species have been implicated as a key mechanism to tissue damage and functional deficits in HI brain injury (Lee et al., 2000). The results indicated pathological changes eight days after neonatal HI in the homeostasis of free radicals with the increase of lipid peroxidation (Figure 3). In this context, it has already been reported that concentrations of thiobarbituric acid reactive substances were significantly higher in different times after HI (Hong et al., 2000, Feng et al., 2004).

This study describes for the first time the ADA activity alterations of brain in developing rats subjected to HI (Figure 2). During hypoxia, extracellular adenosine levels are increased to prevent cellular damage. Adenosine is released from the cells after it has been formed from the degradation of intracellular ATP (Zimmermann, 2000; Cunha, 2001). It has an inhibitory effect on excitatory synaptic transmission (Rudolphi et al., 1992; Von Lubitz, 1999). In fact, adenosine acts through adenosine A1 receptors, decreases glutamate release



and the NMDA receptor activation (Fredholm, 1997; De Mendonça et al., 2000; Dunwiddie and Masino, 2001), exhibiting, in so doing, its neuromodulator and neuroprotective role. Thus, protection against hypoxia and ischemia can be achieved by increasing extracellular levels of adenosine through inhibition of adenosine degradation or reuptake (Miller et al., 1996; Jiang et al., 1997; Fredholm et al., 2005; Boison, 2006). Following brain ischemia or trauma, hypoxia generally increases the intracellular degradation of ATP to adenosine and consequently the extrusion of nucleoside through the membrane transporters. This results in a loss of intracellular energy charge and in a rapid and marked elevation of extracellular adenosine levels (Kobayashi et al., 2000). Consequently, it is possible to suggest that the changes in concentrations of adenosine and its metabolites, including inosine and hypoxanthine during ischemia, may influence ADA activity in the brain.

ADA regulates the amount of adenosine available (Ruiz et al., 2000), making it important to the regulation of adenosine concentration when it is increased by energy depletion as occurs in ischemic tissue. This way, adenosine plays two major roles. Hence, adenosine can act on adenosine receptors to control a number of specific physiological functions and inhibit a glutamate release in nerve cells (Burke and Nadler, 1988). We observed that ADA increased significantly only eight days after neonatal HI (Figure 2). It might be possible to say that the intracellular production of adenosine increased during hypoxia. The enhancement of ADA activity may reflect a tendency to reduce tissue injury, promoting repair (Thorn and Jarvis, 1996).

Therefore, elevated ADA could contribute to limit excessive infiltration of leukocytes and subsequent cellular damage. Regarding the role of ADA in inflammation, the possibility that this enzyme could interact with other cell-surface proteins opens up a new perspective for the research of immunoregulatory mechanisms of inflammatory processes. Thus, adenosine

downregulation of inflammatory and immune responses in injured tissues plays a crucial role in the beneficial effects induced by this nucleoside (Abbracchio and Ceruti, 2007).

Recently, it has been demonstrated that this enzyme binds with the CD26 molecule expressed in some lymphocyte subsets (Frode and Medeiros, 2001). In addition, histological analysis shows a multifocal lymphocytic infiltrate (Figure 4 D). These findings indicate the activation of resident cells, such as lymphocytic, which occurred eight days after HI, as the enhancement of this cell were observed when ADA activity was increased. Furthermore, there is a progressive increase in the overall frequency of cerebral lesions with the passing of days after neonatal HI (Figure 4 B, C).

There is evidence that increased local tissue GFAP immunoreactivity is an extremely sensitive indicator of neuronal injury (Fukamachi et al., 2001; Sizonenko et al., 2008). Furthermore, neonatal HI displays an increase in GFAP mRNA expression and GFAP immunoreactivity in the first 2 weeks after injury (Burtrum and Silverstein, 1994). In fact, these results showed hypertrophy, proliferation and increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the periphery of the lesion (Fig. 4E).

ADA activity is higher in young animals compared with the controls adults (Geiger and Nagy, 1987). In fact, our data confirm the marked changes in the ADA activity pattern during the brain development, because in the controls of group immediately after the injury, when the rats are seven days old, the enzyme activity is higher compared with the control of adults (60 days after the HI) (Figure 1).

The most significant finding of the present study is the pronounced alterations in the relative vulnerability of the cerebral cortex and the increase of ADA activity eight days after HI. In fact, in this group it has also been found the GFAP-positive reactive with astrogliosis, astrogliosis and lymphocytic infiltration.

Therefore this study added the following contributions to the comprehension of HI pathogenesis: i) the significant increase in the ADA activity, ii) increase in the lipid peroxidation eight days after HI injury and iii) progressive changes in the vulnerability of cerebral cortex of rats with lymphocytic infiltrate and reactive gliosis. It's possible that the responses observed in the eight days could be related to the intrinsic properties of glia and/or neurons and certainly with the neuromodulator properties of adenosine. Furthermore, we evidenced developmental changes of ADA activity. By focusing on the the study of pathological changes we might reveal more insights to our existing knowledge on neonatal HI. Regarding the fact that adenosine has the ability to promote tissue protection associated with the role of ADA in inflammatory process; the present findings show a promising route to be explored.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq- PIBIC) and the Fundo de Incentivo à Pesquisa para Professores (FIPE-UFSM).

## References

- Abbracchio, M.P., Ceruti., 2007.P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal.* 3, 315-325.
- Balduini, W., Carloni, S., Mazzoni, E., Cimino, M., 2004.New therapeutic strategies in perinatal stroke. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 3, 315–323.
- Bellé, L.P., De Bona, K.S., Abdalla, F.H., Pimentel, V.C., Pigatto, A.S., Moretto, M.B., 2009. Comparative Evaluation of Adenosine Deaminase Activity in Cerebral Cortex and Hippocampus of Young and Adult Rats: Effect of Garlic Extract (*Allium sativum* L.) on Their Susceptibility to Heavy Metal Exposure. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104, 408–413.
- Benjelloun,N., Renolleau, S., Represa, A., Ben-Ari, Y., Charriaut-Marlangue, C., 1999.Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal Rat.*Stroke* 30, 1916-1923.;
- Berger, R., Garnier, Y., 2000. Perinatal brain injury. *J. Perinat. Med.* 28, 261–285.
- Boison, D., 2006. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: Mechanisms and therapies.*Trends Pharmacol.Sci.* 27, 652–658.
- Bracci, R., Buonocore, G., 2003. Chorioamnionitis: a risk factor for fetal and neonatal morbidity. *Biol. Neonate* 83, 85–96.
- Buege, J.A., Aust, S.D.,1978. Microsomal lipid peroxidation.*Methods Enzymol.* 52, 302-310.

- Burke, S.P., Nadler, J.V., 1988. Regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA-1 area: effects of adenosine and baclofen. *J. Neurochem.* 51, 1541.
- Burtrum, D., Silverstein, F.S., 1994. Hypoxic-Ischemic Brain Injury Stimulates Glial Fibrillary Acidic Protein mRNA and Protein Expression in Neonatal Rats. *Exp. Neurol.* 126, 112-118.
- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38, 107–125.
- De Mendonça, A., Sebastião, A.M., Ribeiro, J. A., 2000. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Rev.* 33, 258–274.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 31–55.
- Eells, J., Spector, R., 1983. Purine and pyrimidine base and nucleoside concentrations in human cerebrospinal fluid and plasma. *Neurochem. Res.* 8, 1451-1457.
- Feng, Y., Fratkins, J.D., LeBlanc, M.H., 2004. Treatment with tamoxifen reduces hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats. *Eur. J. Pharmacol.* 484, 65– 74.
- Fox, I.H., Kelley, W.N., 1978. The role of adenosine deaminase and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 47, 655-686.

- Franco, R., Pacheco, R., Gatell, J.M., Gallart, T., Lluís, C., 2007. Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function. *Crit. Rev. Immunol.* 27, 495-509. Review.
- Fredholm, B.B., 1997. Adenosine and neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.* 40, 259–280.
- Fredholm, B.B., Chen, J. F., Cunha, R.A., Svenningsson, P. Vaugeois, J.M. 2005. Adenosine and brain function, *Int. Rev. Neurobiol.* 63, 191-270.
- Frode, T.S., Medeiros, Y.S., 2001. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy, *Mediators Inflamm.* 10, 223-227.
- Fukamachi, S., Furuta, A., Ikeda, T., Ikenoue, T., Kaneoka, T., Rothstein, J.D. and Iwaki, T., 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res. Dev.* 132, 131–139.
- Geiger, J.D., Nagy, J.I., 1986. Distribution of Adenosine Deaminase Activity in Rat Brain and Spinal Cord. *J. Neurosci.* 6, 2707-2714.
- Giusti, G., 1974. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 3 ed, 1092-1099.
- Hong, J.T., Ryu, S.R., Kim, H.J., Lee, J.K., Lee, S.H., Kim, D.B., Yun, Y.P., Ryu, J.H., Lee, B.M., Kim, P.Y., 2000. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res. Bull.* 53, 743-749.

- Hossain, M.A., 2008. Hypoxic-Ischemic Injury in Neonatal Brain: Involvement of a Novel Neuronal Molecule in Neuronal Cell Death and Potential Target for Neuroprotection. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 93–101.
- Jiang, J.L., van Rhee, A.M., Chang, L., Patchornik, A., Evans, P., Melman, N., Jacobson, K.A., 1997. Structure activity relationships of 4-phenylethynyl-6-phenyl-1,4-dihydropyridines as highly selective A<sub>3</sub> adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 40, 2596–2608.
- Johnston, M.V., 1997. Hypoxic and ischemic disorders of infants and children. Lecture for 38th meeting of Japanese Society of Child Neurology, Tokyo, Japan, July 1996. *Brain Dev.* 19, 235–239.
- Kadhim, H., Sébire, G., Khalifa, M., Evrard, P., Groswasser, J., Franco, P., Kahn, A., 2005. Incongruent cerebral growth in sudden infant death syndrome. *J. Child Neurol.* 20, 244–246.
- Kobayashi, S., Zimmermann, H., Millhorn, D.E., 2000. Chronic hypoxia enhances adenosine release in rat PC12 cells by altering adenosine metabolism and membrane transport. *J. Neurochem.* 74, 621-632.
- Lee, J.M., Grabb, M.C., Zipfel, G.J., Choi, D.W., 2000. Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.* 106, 723-731.
- Lorenz, J.M., Wooliever, D.E., Jetton, J.R., Paneth, N., 1998 .A quantitative review of mortality and developmental disability in extremely premature newborns. *Arch. Pediatr. Adenosineles. Med.* 152, 425–435.

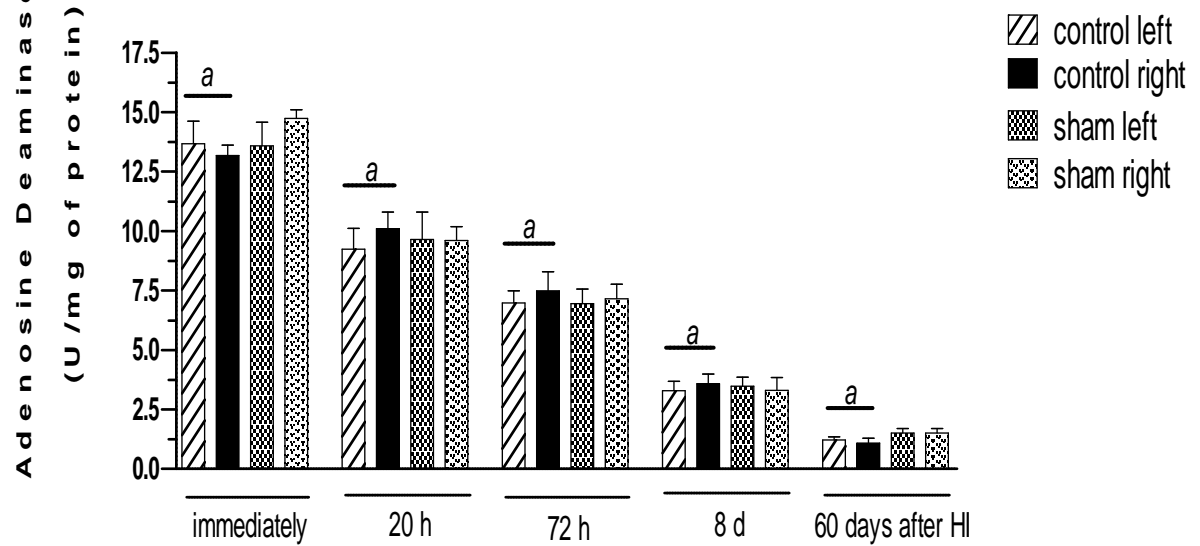
- McClean, C., Ferriero, D., 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Semin. Perinatol.* 28, 425–432.
- Miller, L.P., Jelovich, L.A., Yao, L., DaRe, J., Ugarkar, B., Foster, A.C., 1996. Pre- and peristroke treatment with the adenosine kinase inhibitor, 5'-deoxyiodotubercidin, significantly reduces infarct volume after temporary occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Neurosci. Lett.* 220, 73–76.
- Moretto, M.B., Arteni, N.S., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B., Souza, D.O., Wofchuk, S., 2005. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: Prevention by guanosine. *Exp. Neurol.* 195, 400-406.
- Moretto, M.B., Boff, B., Lavinsky, D., Netto, C.A., Rocha, J.B., Souza, D.O., Wofchuk, S.T., 2008. Importance of Schedule of Administration in the Therapeutic Efficacy of Guanosine: Early Intervention after Injury Enhances Glutamate Uptake in Model of Hypoxia-ischemia. *J. Mol. Neurosci.* Online.
- Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Higashino, K., 1999. Enzymes involved in purine metabolism-- a review of histochemical localization and functional implications. *Histol. Histopathol.* 14, 1321-1340.
- Mustafa, S. J., Tewari, C.P., 1970. Latent adenosine deaminase in mouse brain. I. Exposure in solubilization of the mitochondrial enzyme. *Biochem. Biophys. Acta.* 198, 93-100.
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., Martin, L.J., 2001(a). Neurodegeneration in the thalamus following neonatal hypoxia-ischemia is programmed cell death. *Dev. Neurosci.* 23, 186–191.



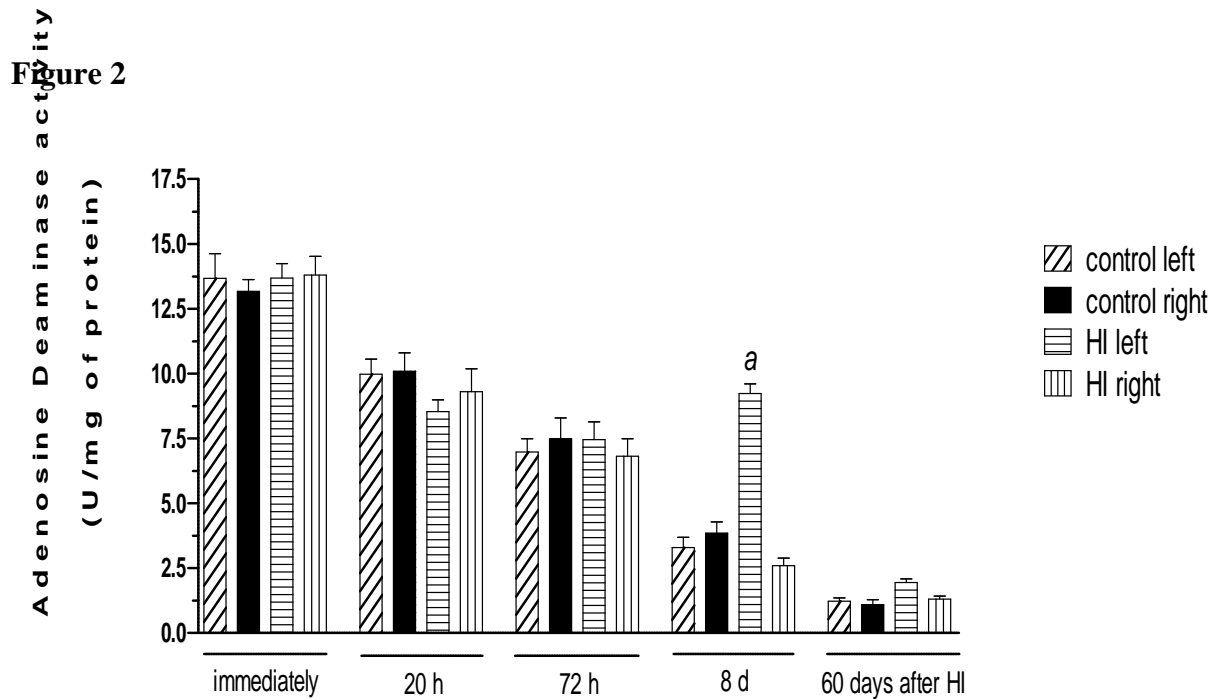
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., Flock, D.L., Martin, L.J., 2001(b). Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia- ischemia is apoptosis. *J. Neurosci.* 21, 1931–1938.
- Palmer, C., Brucklacher, R.M., Christensen, M.A., Vannucci, R.C., 1990. Carbohydrate and energy metabolism during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Journal of Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 227–235.
- Peterson, G.L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346-356.
- Quiniou, C., Kooli, E., Joyal, J.S., Sapiha, P., Sennlaub, F., Lahaie, I., Shao, Z., Hou, X., Hardy, P., Lubell, W., Chemtob, S., 2008. Interleukin-1 and Ischemic Brain Injury in the Newborn: Development of a Small Molecule Inhibitor of IL-1 Receptor. *Semin. Perinatol.* 32, 325-333.
- Rice, J.E., Vannucci, R.C., Brierley, J.B., 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol.* 9, 131-141.
- Rudolphi, K.A., Schubert, P., Parkinson, F.E., Fredholm, B.B., 1992. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab. Rev.* 4, 346–369.
- Ruiz, M.A., Escriche, M., Lluís, C., Franco, R., Martín, M., Andrés, A., Ros, M., 2000. Adenosine A1 receptor in cultured neurons from rat cerebral cortex: colocalization with adenosine deaminase. *J. Neurochem.* 75, 656–664.
- Sharoyan, S., Antonyan, A., Mardanyan, S., Lupidi, G., Cristalli, G., 2006. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *Acta. Biochim. Pol.* 53, 539–546.

- Sizonenko, S.V., Camm, E.J., Dayer, A., Kiss, J.Z., 2008. Glial responses to neonatal hypoxic–ischemic injury in the rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 37–45.
- Thorn, J .A., Jarvis, S.M., 1996. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 27, 613–620.
- Villapol, S., Gelot, A., Renolleau, S., Charriaut-Marlangue, C., 2008. Astrocyte Responses after Neonatal Ischemia: The Yin and the Yang. *Neuroscientist* 14, 339-344.
- Von Lubitz, D.K., 1999. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur. J. Pharmacol.* 365, 9–25.
- Yin, W., Signore, A.P., Iwai, M., Cao, G., Gao, Y., Johnnides, M.J., Hickey, R.W., 2007. Preconditioning suppresses inflammation in neonatal hypoxic ischemia via Akt activation. *Chen. J. Stroke* 38, 1017-1124.
- Zimmermann, H., 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 362, 299–309.

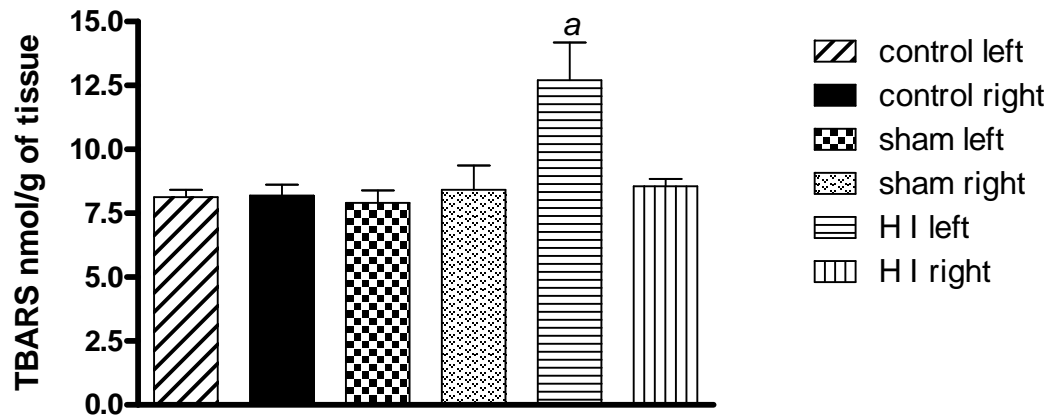
Figure 1



Effect of ontogeny on the ADA activity in the cerebral cortex of rats. <sup>a</sup> = significant difference among control groups ( $p < 0.001$ ). No significant difference between left and right hemispheres within groups control and sham. Data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences from controls, as determined by two-way ANOVA for multiple group comparison. Pos hoc analysis was carried out by Duncan multiple range test.



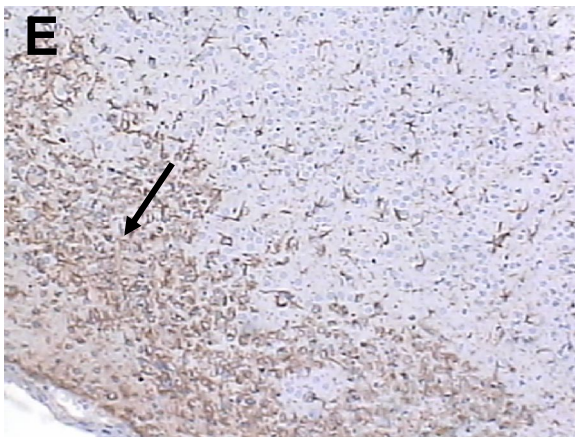
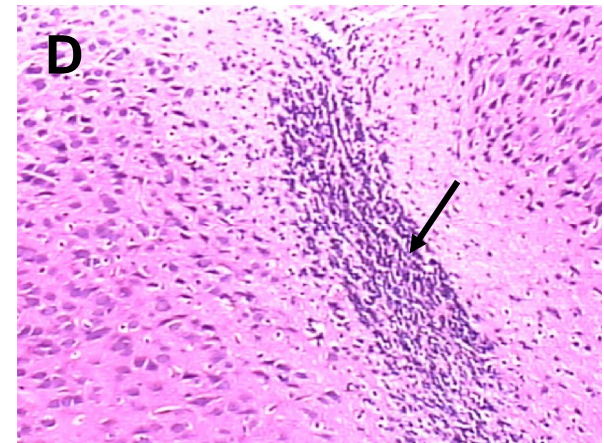
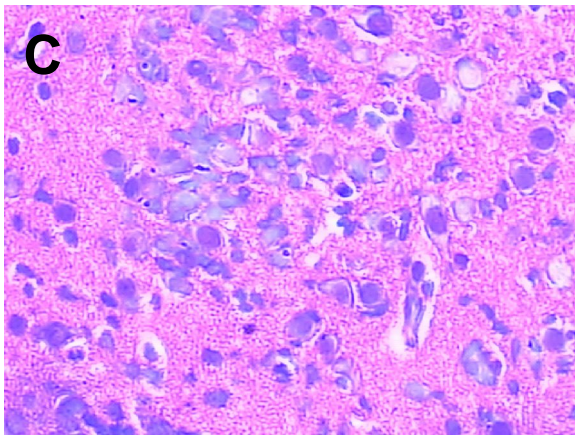
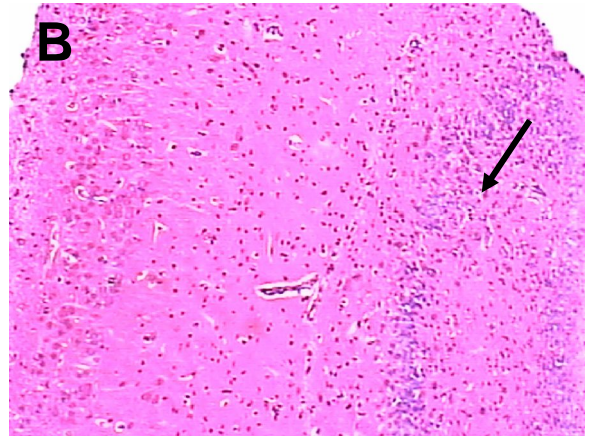
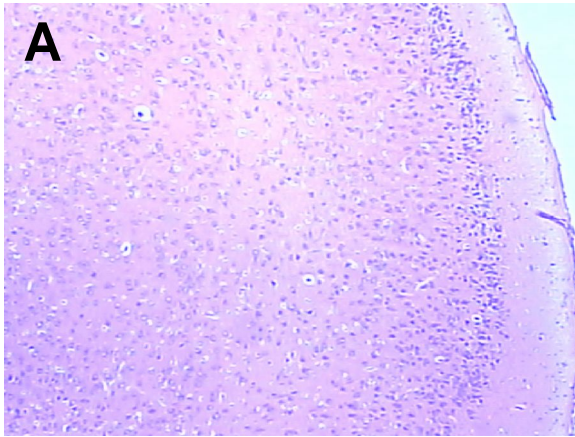
ADA activity in the cerebral cortex of rats at different times after neonatal HI.<sup>a</sup> = significant difference of control 8 days after HI ( $p < 0.01$ ). There was no difference among HI and control in others intervals investigated. The data are presented as means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences from controls, as determined by two-way ANOVA for multiple group comparison. Pos hoc analysis was carried out by Duncan multiple range test.

**Figure 3**

TBARS levels in the cerebral cortex of control, sham and HI rats. Data are means  $\pm$  SEM.

<sup>a</sup> $p < 0.05$ , compared to the respective sham and control rats. Statistically significant differences from controls, as determined by ANOVA followed by Duncan multiple comparison test.

Figure 4 (A, B, C, D and E)



Histopathological changes after neonatal hypoxia-ischemia. (A) General view of the cortex of a fifteen-day-old rat pup showing normal cytoarchitecture (x10). (B) The infarcted zone in ischemic area in the cerebral cortex eight days after HI (x10, H-E staining, black arrow). (C) Neurons with necrosis in ischemic area (x40). (D) Moderate lymphocytes infiltration in the left hemisphere of the cortex (x10, black arrow). (E) Surrounding the lesion, strong immunoreactivity for astrocytes (GFAP) was observed. The density of GFAP-positive cells was significantly increased after HI injury (x10, black arrow). The field of view diameter for each image is 22 mm.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a atividade da ADA em córtex de ratos submetidos à HI neonatal. Evidências mostram que a progressão e extensão da isquemia cerebral estão relacionadas com diversos mecanismos, muitos dos quais envolvem componentes da resposta inflamatória. Além disso, a produção anormal e/ou incapacidade na remoção das EROs tem sido implicadas como um mecanismo chave que contribui para o dano tecidual e deficits funcionais na injúria HI (LEE et al., 2000).

Este estudo descreve pela primeira vez, as alterações na atividade da ADA no cérebro em desenvolvimento em ratos submetidos à HI neonatal. Durante a hipóxia, os níveis extracelulares de adenosina aumentam significativamente, visando prevenir o dano tecidual, sendo esta liberada das células após ter sido formada a partir da degradação de ATP (ZIMMERMANN, 2000; CUNHA, 2001). A adenosina atua sobre receptores de adenosina A1, diminuindo a liberação de glutamato e a ativação de receptores NMDA (FREDHOLM, 1997; DE MENDONÇA et al., 2000; DUNWIDDIE & MASINO, 2001) demonstrando, seu papel neuroprotetor e neuromodulador. Assim, a proteção após a HI, devido ao aumento dos níveis extracelulares de adenosina pode ser alcançada através da inibição da degradação ou recaptação de adenosina (FREDHOLM, 2007; BOISON, 2006).

A ADA é uma aminohidrolase que pode ser encontrada tanto no espaço intra como extracelular. Esta enzima participa do metabolismo das purinas, desaminando a adenosina a inosina, contribuindo assim para a manutenção dos níveis desse nucleosídeo (RUIZ et al., 2000). É uma enzima importante na regulação das concentrações de adenosina, quando a formação desta se encontra aumentada devido à depleção energética que ocorre no tecido isquêmico (DUNWIDDIE 1985; PHILLIS et al., 1987, MEGHJI & NEWBY, 1990; O'FARRELI, 2001).

A atividade da ADA mostrou-se elevada apenas no hemisfério esquerdo (ipsilateral) após 8 dias da HI, no entanto 60 dias após a HI sua atividade voltou aos valores basais. Isto nos mostra que a produção intracelular de adenosina esta aumentada durante a hipóxia, reforçando que a atividade da ADA possa refletir a tendência para reduzir a injúria tecidual e



promover reparação. Conseqüentemente, a ADA pode contribuir para limitar a infiltração excessiva de leucócitos e subseqüentemente dano celular. Quanto ao papel da ADA na inflamação, a possibilidade de que esta enzima possa interagir com outras proteínas da superfície celular, cria uma nova perspectiva na procura de mecanismos imunoregulatórios do processo inflamatório (FRODE & MEDEIROS, 2001). Assim, é possível que a ADA influencie nos níveis de adenosina promovendo proteção tecidual, através da regulação da resposta inflamatória e imune no tecido injuriado (ABBRACCHIO & CERUTI, 2007).

O processo inflamatório iniciado durante o insulto HI pode causar necrose tecidual. Um aspecto crucial na inflamação deflagrada pela HI é a ativação da microglia. Outros eventos incluem a liberação de citocinas, liberação de EROs e ERNs, aumento da excitotoxicidade e indução de moléculas de adesão leucocitária. As ações sinérgicas do evento inflamatório exacerbam a injúria cerebral, levando a deterioração neurológica (YIN, 2007). Observamos através da análise histológica que houve uma moderada infiltração linfocitária multifocal. Estudos tem demonstrado que a ADA liga-se com a CD26, uma molécula expressa em alguns subtipos de linfócitos (FRODE & MEDEIROS, 2001). Isto sugere, que a ativação de linfócitos pode estar ocorrendo neste período após a HI (8 dias após a HI), sendo que neste mesmo período observou-se o aumento na atividade da ADA.

Quando os neurônios são perdidos e o tecido cerebral se encontra danificado, ocorre proliferação astrocitária, os quais participam do processo de reparação histológica. No entanto, estes astrócitos reativos podem produzir radicais livres e mediadores inflamatórios, que são potencialmente prejudiciais às células do SNC (ALVAREZ-DÍAZ et al., 2007). Evidências reforçam que o aumento da imunoreatividade da GFAP tecidual, pode ser considerada como um indicador extremamente sensível da injúria neuronal. A injúria no SNC inicia uma resposta reparativa conhecida por astrogliose, caracterizada por, hipertrofia, proliferação e aumento na expressão da GFAP na periferia da lesão, resultando em astrocitose reativa (SIZONENKO et al., 2008). A astrogliose reativa é um componente chave na resposta celular da injúria do SNC. Estudos demonstram que animais submetidos à modelos de HI aguda ou hipóxia crônica apresentam uma prolongada elevação da expressão da GFAP (ZIMMER et al., 1991).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas existe uma produção constante de EROs acompanhada pela sua contínua inativação, através de antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. A extensão e os tipos de danos causados pelas EROs depende tanto da quantidade como da natureza das mesmas, bem como das defesas antioxidantes das células (DAVIES, 1991). A produção de radicais livres durante a

hipóxia tecidual possui um papel importante na patogênese da injúria tecidual. Além disso, neonatos são particularmente suscetíveis a tal injúria devido a deficiência nos sistemas antioxidantes. O aumento na lipoperoxidação de membranas neuronais ricas em ácidos graxos polinsaturados tem sido documentada após a injúria hipoxico-isquêmica, devido ao aumento na produção de radicais livres (RICE-EVANS & DIPLOCK, 1993). No entanto, os mecanismos envolvidos na geração de radicais livres não estão completamente compreendidos. A peroxidação lipídica tem sido citada como o maior mecanismo das EROs em produzir dano as membranas celulares (ESTERBAUER et al., 1991). Neste estudo podemos observar que 8 dias após a injúria HI, os níveis de lipoperoxidação tecidual ainda se mantiveram aumentados no córtex cerebral (ipsilateral).

Os resultados mais importante no presente estudo são, a pronunciada alteração histopatológica do córtex e o aumento da atividade da ADA 8 dias após a HI neonatal, sendo que neste grupo também observamos imunoreatividade para GFAP, com astrocitose, astrogliose e infiltração de linfócitos.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A atividade da ADA diminui com a idade dos animais estudados;
- A atividade da ADA aumentou significativamente no córtex cerebral (hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida esquerda) apenas 8 dias após a HI neonatal. Após 60 dias do insulto HI a atividade da ADA não apresentou alterações significativas;
- Houve um aumento da peroxidação lipídica no córtex cerebral (hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida esquerda) 8 dias após a injúria HI;
- O modelo animal de HI neonatal em ratos resultou em visível área isquêmica multifocal no hemisfério ipsilateral à oclusão da artéria carótida esquerda, com presença de neurônios necróticos e infiltrado linfocitário;
- A análise imunohistoquímica revelou imunoreatividade para GFAP no córtex cerebral ipsilateral dos animais após 8 dias do insulto HI.

## 7. PERSPECTIVAS

Particularmente, há o interesse em dar continuidade ao estudo aqui apresentado, buscando responder questões ainda não avaliadas neste trabalho.

Ainda abordando o modelo de HI neonatal, temos o interesse de avaliar os seguintes pontos:

Em sinaptossomas de córtex cerebral:

Determinar a atividade das nucleotidases (NTPDase, 5'-nucleotidase), e adenosina deaminase em sinaptossomas obtidos de córtex de ratos em diferentes tempos após HI neonatal.

Em animais submetidos à HI neonatal em diferentes tempos após o insulto:

- 1) Verificar *ex vivo* a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e adenosina deaminase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos submetidos a HI neonatal.
- 2) Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em soro, plasma e sinaptossomas destes animais.
- 3) Analisar parâmetros bioquímicos no soro destes animais .
- 4) Analisar as alterações histológicas no cérebro destes animais nos diferentes tempos após a HI.
- 5) Investigar a ação do resveratrol sobre os parâmetros acima citados. (Itens 1,2,3 e 4).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRACCHIO, M.P.; CERUTI. P1 receptors and cytokine secretion. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 315-325, 2007.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Inflammation in central nervous system injury. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 358, p. 1669–1677, 2003.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R.M.; SNYDERMAN, R.C. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **The Medical Clinics of North America**, v. 81, p. 1-28, 1997.

ALVAREZ-DÍAZ, A.; HILÁRIO, E.; GOÑI DE CÉRIO, F.; VALLS-I-SOLER, A.; ALVAREZ-DÍAZ, F.J. Hypoxic-Ischemic injury in the immature brain – Key vascular and cellular players. **Neonatology**, v. 92, p. 227–235, 2007.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A.; NICOTERA, P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron**, v. 15, p. 961–973, 1995.

ANTONIOLI, L.; FORNAI, M.; COLUCCI, R. GHISU, N.; TUCCORI, M.; DEL TACCA, M.; BLANDIZZI, C. Pharmacological modulation of adenosine system: Novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 14, p. 566-74, 2008.

ARUMUGAM TV, GRANGER DN, MATTSON MP. Stroke and T-Cells. Review. **Neuromolecular Medicine**, v. 7, p. 229–242, 2005.

BARJA DE QUIROGA, G. Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 325-40, 1992.

BARKS, J.D.; SILVERSTEIN, F.S. Excitatory amino acids contribute to the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Brain Pathology**, v. 2, p. 235–243, 1992.

BAUMANN, N.; PHAM-DINH, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 871–927, 2001.

BENDER, L.M.; MORGAN, M.J.; THOMAS, L.R.; LIU, Z.G.; THORBURN, A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 473–481, 2005.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2002. p. 9-21.

BERGER, R.; GARNIER, Y. Pathophysiology of perinatal brain damage. Review. **Brain Research Reviews**, v. 30, p. 107–134, 1999.

BLACKBURN, M.R.; DATTA, S.K.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase-deficient mice generated using a two-stage genetic engineering strategy exhibit a combined immunodeficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 5093–5100, 1998.

BLACKBURN, M.R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: Metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BLASCHKE, A.J.; STALEY, K.; CHUN, J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. **Development**, v. 122, p. 1165-1174, 1996.

BOISON, D. Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 652–658, 2006.

BOTA, A.; GELLA, F.J.; PROFILIS, C.; FÉRARD, G.; HADJIVASSILIOU, A.G.; HORDER, M.; SCHIELE, F.; SEGURA, R.; CANALIAS, F. Production and certification of an enzyme reference material for adenosine deaminase 1 (BCR 647). **Clinica Chimica Acta**, v. 306, p. 79–89, 2001.

BOUMA, M.G.; STAD, R.K.; VAN DEN WILDENBERG, F.A.; BUURMAN, W.A. Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 4159–4168, 1994.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **International Review of Cytology**, v. 240, p. 31–304, 2004.

BUTT, A.M.; HAMILTON, N.; HUBBARD, P.; PUGH, M.; IBRAHIM, M. Synantocytes: the fifth element. **Journal of Anatomy**, v. 207, p. 695–706, 2005.

CARMEN, J.; MAGNUS, T.; CASSIANI-INGONI, R.; SHERMAN, L.; RAO, M.S.; MATTSON, M.P. Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. **Progress in Neurobiology**, v. 82, p. 151–162, 2007.

CASTILLO, C.A.; LEON, D.; RUIZ, M.A.; ALBASANZ, J.L.; MARTIN, M. Modulation of adenosine A1 and A2A receptors in C6 glioma cells during hypoxia: involvement of endogenous adenosine. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 2315–2329, 2008.

CECCON, M.E.J.R. Interleukins in hypoxic-ischemic encephalopathy. **Jornal de Pediatria**, v. 79, 2003.

CHAN, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124–1129, 1996.

CHAO, C.P.; ZALESKI, C.G.; PATTON, A.C. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: multimodality imaging findings. Review. **Radiographics**, v. 26, p. 159–72, 2006.

CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.W. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic ischemic neuronal death. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, p. 171–182, 1990.

CIRUELA, F.; SAURA, C.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase affects ligand-induced signalling by interacting with cell surface adenosine receptors. **FEBS letters**, v. 380, p. 219-223, 1996.

COHEN, A.; HIRSCHHORN, R.; HOROWITZ, S.D.; RUBINSTEIN, A.; POLMAR, S.H.; HONG, R.; MARTIN, D.W. JR. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 472-476, 1978.

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibition. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, p. 105–28, 2001.

CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v. 38, p. 107–125, 2001.

DAVIES, K.J.A. **Oxidative damage & repair**: Chemical, biological and medicinal aspects. Oxford: Pergamon, 1991, p. 910.

DE ANDRADE, A.F.; PAIVA, W.S.; DE AMORIM, R.L.O.; FIGUEIREDO, E.G.; NETO, E.R.; TEIXEIRA, M.J. Mecanismos de lesão cerebral no Traumatismo cranioencefálico; Revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 75-81, 2009.

DE MENDONÇA, A.; SEBASTIÃO, A.M.; RIBEIRO, J.A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? **Brain Research Reviews**, v. 33, p. 258–274, 2000.

DELIVORIA-PAPADOPOULUS M, MISHRA OP. Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. **The Journal of Pediatrics**, v. 132, p. S30-4, 1998.



DESROSIERS, M.D.; CEMBROLA, K.M.; FAKIR, M.J.; STEPHENS, L.A.; JAMA, F.M.; SHAMELI, A.; MEHAL, W.Z.; SANTAMARIA, P.; SHI, Y. Adenosine Deamination Sustains Dendritic Cell Activation in Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, p. 391-7, 1999.

DU, Y.; DREYFUS, C. F. Oligodendrocytes as providers of growth factors. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, p. 647–654, 2002.

DUARTE, J.A.; APPELL, H.J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; SOARES, J.M. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, v. 14, p. 440-3, 1993.

DUNWIDDIE, T.V. The physiological role of adenosine in the central nervous system. **International Review of Neurobiology**, v. 27, p. 63-139, 1985.

DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S.A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 31–55, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EDINGER, A.L.; THOMPSON, C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 663–669, 2004.

EELLES, J.T.; SPECTOR, R. Identification, development and regional distribution of ribonucleotide reductase in adult rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 40, p. 1008–1012, 1983.

ELIASSON, C.; SAHLGREN, C.; BERTHOLD, C.H.; STAKEBERG, J.; CELIS, J.E.; BETSHOLTZ, C.; ERIKSSON, J.E.; PEKKNY, M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 23996–24006, 1999.

EMERICH, D.F.; DEAN, R.L.; BARTUS, R.T. The role of leukocytes following cerebral ischemia: Pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? Review. **Experimental Neurology**, v. 173, p. 168–181, 2002.

ESTERBAUER, H.; SHAUER, R.J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81–128, 1991.

FENSTER, C.P.; WEINSIER, R.L.; DARLEY-USMAR, V.M.; PATEL, R.P. Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress. **Obesity Research**, v. 10, p. 964-8, 2002.

FERRIERO, D.M. Neonatal brain injury. Review. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1985-1995, 2004.

GORREL, M.D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. **Clinical Science**, v. 108, p. 277-292, 2005.

FOX, I.H.; KELLEY, W.N. The role of adenosine and 2-deoxyadenosine in mammalian cells. **Annual Review of Biochemistry**, v. 47, p. 655–686, 1978.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, p. 283–294, 1997.

FRANCO, R.; VALENZUELA, A.; LLUIS, C.; BLANCO, J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**, v.161, p. 27-42, 1998.

FREDHOLM, B.B. Adenosine and neuroprotection. **International Review of Neurobiology**, v. 40, p. 259–280, 1997.

FREDHOLM, B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Review. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1315–1323, 2007.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 223-7, 2001.

GILL, M.B.; PEREZ-POLO, J.R. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. Review. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 2379–2389, 2008.

GOLDFARB, A.H. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, p. 232-6, 1993.

GROW, J.; BARKS, J.D. Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. **Clinics in Perinatology**, v. 29, p. 585-602, 2002.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, p. 253-65, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Oxidative stress**: adaption, damage, repair and death. In: *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 th ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 246-349.

HANISCH, U.K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, p. 140-55, 2002.

HARRY, G.J.; KRAFT, A.D. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4; p. 1265-1277, 2008.

HASKO, G.; SZABO, C.; NEMETH, Z.H.; KVETAN, V.; PASTORES, S.M.; VIZI, E.S. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **Journal of Immunology**, v. 157, p. 4634–4640, 1996.

HERON, A.; POLLARD, H.; DESSI, F.; MOREAU, J.; LASBENNES, F.; BEN-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, p. 1973-1976, 1993.

HOLLEY, J.E.; GVERIC, D.; NEWCOMBE, J.; CUZNER, M.L.; GUTOWSKI, N.J. Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 29, p. 434-44, 2003.

HOSSAIN, M.A. Molecular mediators of hypoxic–ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. Review. **Epilepsy & Behavior**, v. 7, p. 204–213, 2005.

HOSSAIN, M.A. Hypoxic-ischemic injury in neonatal brain: involvement of a novel neuronal molecule in neuronal cell death and potential target for neuroprotection. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, p. 93–101, 2008.

HU, B.R.; LIU, C.L.; OUYANG, Y.; BLOMGREN, K.; SIESJÖ, B.K. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, p. 1294-300, 2000.

IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry**, v. 387; p. 319-321, 2006.

IWAKI-EGAWA, S.; NAMIKI, C.; WANATABE, Y. Adenosine deaminase 2 from chicken liver: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 137, p. 247-254, 2004.

JANDER, S.; KRAEMER, M.; SCHROETER, M.; WITTE, O.W.; STOLL, G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 15, p. 42–51, 1995.

JOHNSTON, M.V. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, p. 229–234, 2001.

JOHNSTON MV, TRESCHER WH, ISHIDA A, NAKAJIMA, W. Novel treatments after experimental brain injury. **Seminars in Neonatology**, v.5, p. 75-86, 2000.

JOHNSTON, M.V.; TRESCHER, W.H.; ISHIDA, A.; NAKAJIMA, W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. **Pediatric Research**, v. 49, p. 735–741, 2001.

KARASEK, M.; SWILTOSAWSKI, J.; ZIELINISKA, A. Ultrastructure of the central nervous system: the basics. Review . **Folia Neuropathologica**, v. 42, p. 1-9, 2004.

KEANE, R.W.; KRAYDIEH, S.; LOTOCKI, G.; ALONSO, O.F.; ALDANA, P.; DIETRICH, W.D. Apoptotic and antiapoptotic mechanism after traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, p. 1189-98, 2001.

KEYNES, R.G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischemic brain injury. **Current Molecular Medicine**, v.4, p. 179-91, 2004.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KOBAYASHI, F.; IKEDA, T.; MARUMO, F.; SATO, C. Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 88, p. 226-271, 1993.

KOCHANEK, P.M.; HALLENBECK, J.M. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. **Stroke**, v. 23, p. 1367-79, 1992.

KURE, S.; TOMINAGA, T.; YOSHIMOTO, T.; TADA, K.; NARISAWA, K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 179, p. 39-45, 1991.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. Review. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, p. 463-484, 2001.

LEE, J.M.; GRABB, M.C.; ZIPFEL, G.J.; CHOI, D.W. Brain tissue responses to ischemia. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, p. 723-731, 2000.

LENZ, A.; FRANKLIN, G.A.; CHEADLE, W.G. Systemic inflammation after trauma. **Injury**, v. 38, p. 1336—1345, 2007.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 36, p. 1–17, 1960.

LINNIK, M.D.; ZOBRIK, R.H.; HATFIELD, M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 24, p. 2002-2009, 1993.

LIPTON S. A.; ROSENBERG P. A. Mechanisms of disease. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 613-622, 1994.

LIU, Y.; RAO, M.S. Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them, **Biology of the Cell**, v. 96, p. 279–290, 2004.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 359p.

MAHURA, I.S. Cerebral ischemia-hypoxia and biophysical mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection effects. **Fiziologicheskii Zhurnal**, v. 49, p. 7-12, 2003.

MARRO, P.J. The etiology and pharmacologic approach to hypoxic-ischemic encephalopathy in the newborn. **NeoReviews**, v.3, p. 99, 2002.

MARTIN, L.J.; AL-ABDULLA, N.A.; BRAMBRINK, A.M.; KIRSCH, J.R.; SIEBER, F.E.; PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral

ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. Review. **Brain Research Bulletin**, v. 46, p. 281-309, 1998.

McLEAN, C.; FERRIERO, D. Mechanisms of hypoxic–ischemic injury in the term infant. **Seminars in Perinatology**, v. 28, p. 425-432, 2004.

MEGHJI, P.; NEWBY, A.C. Sites of adenosine formation, action, and inactivation in the brain. **Neurochemistry International**, v. 16, p. 227-232, 1990.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition**, v.130, p. 1007-1015, 2000.

METEA, M.R.; KOFUJI AND, P.; NEWMAN, E.A. Neurovascular coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2468–2471, 2007.

MICHAELIS, E.K. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 369-415, 1998.

MILLS, J.H.; THOMPSON, L.F.; MUELLER, C.; WAICKMAN, A.T.; JALKANEN, S.; NIEMELA, J.; AIRAS, L.; BYNOE, M.S. CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. **PNAS**, v. 105, p. 9325–9330, 2008.

NISS, A.M.; DICKHUTH, H.H.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. **Exercise Immunology Review**, v. 5, p. 22-56, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NEHLIG, A.; PEREIRA DE VASCONCELOS, A. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. **Progress in Neurobiology**, v. 40, p. 163-221, 1993.

O'FARRELL, P.H. Conserved responses to oxygen deprivation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, p. 671-4, 2001.

OLSSON, R.A.; PEARSON, J.D. Cardiovascular purinoceptors. **Physiological Reviews**, v. 70, p. 761 – 845, 1990.

PACHECO, R.; MARTINEZ-NAVIO, J.M.; LEJEUNE, M.; CLIMENT, N.; OLIVA, H.; GATELL, J.M.; GALLART, T.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. **PNAS**, v. 102, p. 9583–9588, 2005.

PEKNY, M.; JOHANSSON, C.B.; ELIASSON, C.; STAKEBERG, J.; WALLÉN, A.; PERLMANN, T.; LENDAHL, U.; BETSHOLTZ, C.; BERTHOLD, C.H.; FRISÉN, J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. **The Journal of Cell Biology**, v. 145, p. 503-514, 1999.

PEKNY, M., NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, p. 427–434, 2005.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; BOGESTAL, Y.R.; PEKNA, M. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. **International Review of Neurobiology**, v. 82, p. 95–111, 2007.

PERLMAN, J.M. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. **Clinical Therapeutics**, v. 28, p. 1353-1365, 2006.

PRIVAT, A.; RATABOUL, P. **Fibrous and protoplasmic astrocytes**. In: S. Federoff and A. Vernadakis, Editors, *Astrocytes. Development, Morphology, and Regional Specialization of Astrocytes*, Academic Press, Orlando, FL. 2007, p. 105–129.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 413–492, 1998.



RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; GYSBERS, J.W.; ANDREW, C.; HERMAN, M.A.R.; REED, J.K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 663-690, 1999.

RICE, J.E.; VANNUCCI, R.C.; BRIERLEY, J.B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, p. 131-141, 1981.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T. Current status of antioxidant therapy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 77-96, 1993.

RICHARDSON, P.J.; BROWN, S.J.; BAILYES, E.M.; LUZIO, J.P. Ectoenzymes control adenosine modulation of immunoisolated cholinergic synapses. **Nature**, v. 327, p. 232-234, 1987.

RIDET, J.L.; PRIVAT, A.; MALHOTRA, S.K.; GAGE, F.H. REACTIVE astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends in Neurosciences**, v. 20, 570-577, 1997.

RODRIGUEZ, J.J.; OLABARRIA, M.; CHVATAL, A.; VERKHRATSKY, A. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. Review. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 378-385, 2009.

ROMANOWSKA, M.; OSTROWSKA, M.; KOMOSZYNSKI, M.A. Adenosine ecto-deaminase (ecto-ADA) from porcine cerebral cortex synaptic membrane, **Brain Research**, v. 1156, p. 1-8, 2007.

RUIZ, M.A.; ESCRICHE, M.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; MARTIN, M.; ANDRES, A.; ROS, M. Adenosine A(1) receptor in cultured neurons from rat cerebral cortex: colocalization with adenosine deaminase. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, p. 656-664, 2000.

SABOURY, A.A.; DIVSALAR, A.; ATAIE, G.; AMANLOU, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; HAKIMELAHI, G.H. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetry. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, p. 849-855, 2003.

SAJJADI, F.G.; TAKABAYASHI, K.; FOSTER, A.C.; DOMINGO, R.C.; FIRESTEIN, G.S. Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 3435–3442, 1996.

SANTISTEBAN, I.; ARREDONDO-VEGA, F.X.; KELLY, S.; MARY, A.; FISCHER, A.; HUMMELL, T.D.S.; LAWTON, A.; SORENSEN, R.U.; STIEHM, E.R.; URIBE, L.; WEINBERG, K.; HERSHFIELD, M.S. Novel splicing, missense, and deletion mutations in seven adenosine deaminase-deficient patients with late/delayed onset of combined immunodeficiency disease contribution of genotype to phenotype. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, p. 2291-2302, 1993.

SATO, N.; KURASHIMA, K.; UBUKATA, M.; NOBORU, T.; HIDEKAZU, M.; TSUTOMU, Y.; DAIDO, T.; YUTAKA, S.; MINORU, K. Prognostic significance of serum uric acid in patients with chronic obstructive pulmonary disease receiving home oxygen therapy. **Journal of the Japanese Respiratory Society**, v. 41, p. 74-80, 2003.

SAURA, C.; CIRUELA, F.; CASADÓ, V.; CANELA, E.I.; MALLOL, J.; LLUIS, C.; FRANCO, R. Adenosine deaminase interacts with A1 adenosine receptors in pig brain cortical membranes. **Journal of Neurochemistry**, v. 66, p. 1675-82, 1996.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; WITTE, O.W.; STOLL, G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neuroimmunology**, v. 55, p. 195–203, 1994.

SHALAK, M.; PERLMAN, M.B. Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. **Clinical Therapeutics**, v. 28, p. 1353-1365, 2006.

SHAROYAN, S.; ANTONYAN, A.; MARDANYAN, S.; LUPIDI, G.; CRISTALLI, G. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 539–546, 2006.

SHANJUKUMAR, S.L.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, p. 127–34, 2000.

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral- $\alpha$  no liquor de recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 79, p. 297-302, 2003.

SILVEIRA, R.C.; PROCIANOY, R.S. Ischemic brain damage in very low birth weight preterm newborn infants. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p. S23-S32, 2005.

SIZONENKO, S.V.; CAMM, E.J.; DAYER, A.; KISS, J.Z. Glial responses to neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat cerebral cortex. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, p. 37-45, 2008.

STEFANIS, L. Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. **Neuroscientist**, v. 11, p. 50-62, 2005.

TSUBOI, I.; SAGAWA, K.; SHICHIJO, S.; YOKOYAMA, M.M.; OU, D.W.; WIEDERHOLD, M.D. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 2, p. 626-630, 1995.

TSUTSUI, S.; SCHNERMANN, J.; NOORBAKHS, F.; HENRY, S.; YONG, V.W.; WINSTON, B.W.; WARREN, K.; POWER, C. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1521-1529, 2004.

VANNUCCI, R.C. Cerebral carbohydrate and energy metabolism in perinatal hypoxic-ischemic brain damage. **Brain Pathology**, v. 2, p. 229-3, 1992.

VANNUCCI, R. C. Hypoxic-ischemic encephalopathy. **American Journal of Perinatology**, v. 17, p. 113-120, 2000.

VANNUCCI, S.J.; HAGBERG, H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. Review. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, p. 3149-3154, 2004.

VOLPE, J. J. Brain injury in the premature infant – current concepts of pathogenesis and prevention. **Biology of the Neonate**, v. 62, p. 231-242, 1992.

VOLPE, J.J. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 7, p. 56–64, 2001.

YAGER, J. Y.; BRUCKLACHER, R. M.; VANNUCCI, R. C. Cerebral energy metabolism during hypoxia-ischemia and early recovery in immature rats. **The American Journal of Physiology**, v. 262, p. H672-H677, 1992.

YIN, W.; SIGNORE, A.P.; IWAI, M.; CAO, G.; GAO, Y.; JOHNNIDES, M.J.; HICKEY, R.W.; CHEN, J. Preconditioning suppresses inflammation in neonatal hypoxic ischemia via Akt activation. **Stroke**, v. 38, p. 1017-1024, 2007.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T.V.; STOKES, K.Y.; GRANGER, D.N. Role of T lymphocytes and interferon- $\gamma$  in ischemic stroke. **Circulation**, v. 113, p. 2105–2112, 2006.

#### REVIEW

WANG, D.D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Progress in Neurobiology**, v. 86, p. 342-367, 2008.

WU, L.L.; WU, J.T. Serum uric acid is a marker of inflammation and a marker predicting the risk of developing CVD, stroke, renal failure and cancer. Mini Review. **Journal of Biomedical and Laboratory Sciences**, v. 20, No 1~2, 2008.

ZIMMER, C.; SAMPAOLO, S.; SHANKER SHARMA, H.; CERVÓS-NAVARRO, J. Altered glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat brain following chronic hypoxia. **Neuroscience**, v. 40, p. 353, 1991.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 299–309, 2000.

## 9. ANEXOS

**ANEXO A** – Comprovante de aceite do artigo submetido à revista International Journal of Developmental Neuroscience

----- Mensagem Original -----  
Assunto: Your Submission  
De: "Int. J. Developmental Neuroscience" <[regino.perez-polo@utmb.edu](mailto:regino.perez-polo@utmb.edu)>  
Data: Qua, Junho 17, 2009 11:10 am  
Para: [Beatriz@smail.ufsm.br](mailto:Beatriz@smail.ufsm.br)  
-----

Ms. Ref. No.: DN-D-09-00081R1  
Title: Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after hypoxia ischemia neonatal  
International Journal of Developmental Neuroscience

Dear Moretto,

I am pleased to confirm that your paper "Adenosine deaminase activity, lipid peroxidation and astrocyte responses in the cerebral cortex of rats after hypoxia ischemia neonatal" has been accepted for publication in International Journal of Developmental Neuroscience.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

J. Regino Perez-Polo  
Editor-in-Chief  
International Journal of Developmental Neuroscience

Comments from the Editors and Reviewers: