

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Victor Hugo Tognetti Manguiera da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
NEUROINFLAMATÓRIA HIPOCAMPAL APÓS A ANÓXIA
NEONATAL**

Santo André

2024

VICTOR HUGO TOGNETTI MANGUEIRA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA
NEUROINFLAMATÓRIA HIPOCAMPAL APÓS A ANÓXIA
NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do ABC para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Me. Débora Sterzeck Cardoso
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Honda Takada

Santo André

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Silva, Victor Hugo Tognetti Mangueira
Caracterização da Resposta Neuroinflamatória Hipocampal após a
Anóxia Neonatal / Victor Hugo Tognetti Mangueira da Silva. — 2024.

28 fls. : il.

Orientação de: Débora Sterzeck Cardoso
Coorientação de: Silvia Honda Takada

Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal do ABC,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Santo André, 2024.

1. asfixia perinatal. 2. lesão hipóxico-isquêmica. 3.
neuroinflamação. 4. hipocampo. 5. anóxia neonatal. I. Sterzeck
Cardoso, Débora. II. Honda Takada, Silvia. III. Bacharelado em
Ciências Biológicas, 2024. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à minha mãe, que me apoiou e permitiu que eu pudesse me dedicar aos estudos apesar de dificuldades. Em segundo lugar, dedico a todas as pessoas que tiveram algum impacto positivo em minha trajetória.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, irmã e avó, que foram figuras importantes de força e dedicação, sempre estiveram me apoiando e tornaram possível que eu chegasse até aqui.

Às minhas amigadas que me deram o suporte, inspiração e o amor necessário para que fosse capaz de superar os desafios no caminho.

E à doutoranda Débora Sterzeck Cardoso e à professora Silvia Honda Takada, por terem me aceito e acolhido ao grupo de pesquisa em um momento difícil para mim, por terem me orientado e me ensinado e por terem feito tudo isso com gentileza, dedicação e carinho.

Resumo

A asfixia perinatal consiste na privação do aporte de oxigênio e caracteriza-se como uma das intercorrências neonatais mais comuns, mundialmente acometendo cerca de 0,1 a 0,3% de crianças nascidas a termo e 60% de crianças prematuras, dentre as quais aproximadamente 50% não sobrevivem e 25% das sobreviventes demonstram sequelas neurológicas, como paralisia cerebral e déficits sensoriais. A principal lesão dessa intercorrência é a encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), cuja progressão está diretamente relacionada à neuroinflamação. O modelo de anóxia neonatal desenvolvido por Takada e colaboradores em 2011, utilizado nesse projeto, destaca-se por ser não-invasivo e por incorporar aspectos relevantes à fisiopatologia da asfixia perinatal em humanos. Sendo o hipocampo uma das estruturas mais vulneráveis ao evento anóxico e, neste modelo, apresentando alterações em seu volume, neurogênese e morte celular, se mostra uma estrutura particularmente interessante de se analisar. Portanto, neste projeto tivemos como objetivo avaliar os níveis de importantes citocinas e quimiocinas inflamatórias no hipocampo de camundongos neonatos 72h após serem submetidos à anóxia neonatal. Foram analisadas nove citocinas, das quais seis são consideradas como pró-inflamatórias (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α) e três classificadas como anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13), de acordo com a literatura e o papel que cada uma desempenha na resposta imunológica. Os níveis de expressão dessas citocinas foram analisados através da técnica de fluorescência Luminex, utilizando-se Milliplex Magnetic Beads. A partir dessa análise foi possível identificar uma diminuição nos níveis de IL-6 apresentados pelos animais submetidos à anóxia em relação aos animais controle e não foram observadas alterações nas demais citocinas. De modo geral, o trabalho cumpriu com seu objetivo de avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias no hipocampo 72h após anóxia neonatal, alcançando um resultado diferente do esperado, mas que possibilita futuras explorações para melhor elucidar diferentes aspectos da asfixia perinatal e suas consequências.

Palavras-chave: asfixia perinatal; lesão hipóxico-isquêmica; neuroinflamação; hipocampo.

Abstract

Perinatal asphyxia consists of a deprivation of oxygen supply and is characterized as one of the most common neonatal complications, affecting around 0.1 to 0.3% of children born at term and 60% of premature children worldwide, among which approximately 50% do not survive and 25% of survivors demonstrate neurological sequelae, such as cerebral palsy and sensory deficits. The main injury of this intercurrent is hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), whose progression is directly related to neuroinflammation. The neonatal anoxia model developed by Takada and collaborators in 2011, used in this project, stands out for being non-invasive and for incorporating relevant aspects to the pathophysiology of perinatal asphyxia in humans. As the hippocampus is one of the most vulnerable structures to anoxic events and, in this model, presents changes in its volume, neurogenesis and cell death, it is a particularly interesting structure to analyze. Therefore, in this project we aimed to evaluate the levels of important inflammatory cytokines and chemokines in the hippocampus of neonatal mice 72h after being subjected to neonatal anoxia. Nine cytokines were analyzed, of which six are considered pro-inflammatory (GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-17 and TNF- α) and three are classified as anti-inflammatory (IL-4, IL-10 and IL-13), according to the literature and the role that each plays in the immune response. The expression levels of these cytokines were analyzed using the Luminex fluorescence technique, using Milliplex Magnetic Beads, and the statistical analysis was performed using the Prism Graph 6 software. From this analysis it was possible to identify a decrease in the levels of IL-6 presented by animals subjected to anoxia in relation to control animals and no changes were observed in other cytokines. In general, the work fulfilled its objective of evaluating the levels of inflammatory cytokines in the hippocampus 72h after neonatal anoxia, achieving a different result than expected, but which allows future explorations to better elucidate different aspects of perinatal asphyxia and its consequences.

Keywords: perinatal asphyxia; hypoxic-ischemic injury; neuroinflammation; hippocampus.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAMPs	Padrões Moleculares Associados à Dano (Damage-Associated Molecular Patterns)
EHI	Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica
ERK1	Extracellular Signal-Regulated Kinases 1
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
HMGB1	High Mobility Group Box-1
HSPs	Heat Shock Proteins
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
NAMPs	Padrões Moleculares Associados à Neurodegeneração (Neurodegeneration-Associated Molecular Patterns)
NGF	Nerve Growth Factor
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões (Pattern Recognition Receptors)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVO.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

a. Asfixia perinatal

A asfixia perinatal consiste na interrupção do aporte de oxigênio para os tecidos do neonato em decorrência da falha de iniciar ou sustentar a respiração durante a gravidez, no momento do parto, ou nos primeiros momentos de vida do recém-nascido (Gillam-Krakauer and Gowen Jr 2023). Este evento pode ser caracterizado como parcial ou total baseando-se no nível de privação de oxigênio, sendo chamados de hipóxia ou anóxia, respectivamente. As causas por trás de tal ocorrência podem variar, incluindo desde complicações durante o parto, problemas de saúde materna, prematuridade, ou até mesmo o conjunto de diferentes fatores (Millar et al., 2017; Northington; Chavez-Valdez; Martin, 2011; Volpe, 2012).

Devido ao seu alto consumo energético, microambiente sensível a mudanças e tecidos com alta densidade de receptores celulares, o encéfalo é uma região particularmente sensível ao déficit de oxigênio e, assim, denomina-se encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) quando seus tecidos são acometidos por este evento em fase perinatal (Northington; Chavez-Valdez; Martin, 2011; Volpe, 2012). Além do tecido encefálico sofrer com o período de falha na oxigenação, o mesmo pode vir a ser danificado durante o processo de reoxigenação, no qual o fluxo de oxigênio retorna de forma súbita e ocasiona uma rápida reperfusão tecidual. Portanto, a asfixia perinatal é tida como a maior causa de lesões encefálicas em neonatos humanos, acometendo aproximadamente 0,2% dos neonatos nascidas a termo e 60% dos neonatos prematuros, e tida como a terceira maior causa de mortes neonatais, de acordo com a OMS (Kumar et al., 2019; Martins, 2022). As principais consequências da lesão hipóxico-isquêmica são déficits cognitivos, paralisia cerebral, déficits de memória, epilepsia, déficits sensoriais (principalmente auditivos e visuais), déficits motores e comportamentais (Kumar et al., 2019; Millar et al., 2017; Volpe, 2012) que impactam a vida dos sobreviventes de modo permanente.

b. Lesão hipóxico-isquêmica

A lesão hipóxico-isquêmica é decorrente do disparo de uma série de diferentes cascatas bioquímicas que resultam em morte neuronal e de células gliais, gerando lesões na substância branca e cinzenta do encéfalo. Apesar de ocorrerem frequentemente em pacientes, a localização e extensão dessas lesões podem diferir de acordo com o indivíduo e tempo de privação, e são associadas com alterações no neurodesenvolvimento dos pacientes (Back; Miller, 2014; Millar et al., 2017; Northington; Chavez-Valdez; Martin, 2011).

Além disso, a lesão hipóxico-isquêmica neonatal apresenta um quadro que progride com a passagem do tempo, de forma que a mesma possa ser dividida em três etapas distintas, as quais são caracterizadas pelos eventos que ocorrem e pelo intervalo de tempo entre a ocorrência do insulto e o

início destes eventos que podem ser bioquímicos, neuroinflamatórios, celulares e teciduais (Back; Miller, 2014; Nair; Kumar, 2018).

Ainda durante o período de privação e nos primeiros momentos que a seguem, é possível observar flutuações do fluxo sanguíneo, queda na produção de ATP e acidose sistêmica decorrente de maior produção de lactato, as quais resultam em eventos como edema, excitotoxicidade regional, geração de radicais livres e a primeira onda de morte celular; tais eventos caracterizam a fase primária ou aguda da lesão. A severidade desta fase está diretamente ligada ao tempo e intensidade da asfíxia. Além disso, a fase aguda também influencia a progressão das etapas subsequentes da lesão, portanto o acompanhamento e a compreensão da mesma e de seus eventos se mostra extremamente importante (Millar et al., 2017; Nair; Kumar, 2018).

Após ressuscitação, ocorre a fase de reoxigenação, identificada como fase latente da lesão. Nela ocorre a recuperação transitória dos níveis de glicose e ATP. A fase latente dura de 6 a 12 horas após a fase primária e é conhecida como a "janela terapêutica" para estratégias, como a hipotermia terapêutica (Gunn et al. 1999). Entretanto, a duração dessa fase depende da gravidade da asfíxia, de modo que o período latente é mais curto em insultos mais graves (Iwata et al. 2007).

A segunda fase caracteriza-se pela perda de autorregulação cerebral, pela permeabilização mitocondrial e, conseqüentemente, pela segunda onda de morte celular; esses eventos são resultantes da neuroinflamação, excitotoxicidade e estresse oxidativo do meio, e a fase ocorre tipicamente entre 6 e 48 horas após o insulto anóxico inicial (Nair; Kumar, 2018).

Por último, a terceira fase da lesão é caracterizada por alterações no número de células, redução da plasticidade neuronal e por déficits na mielinização, as quais são ocasionadas por mudanças epigenéticas, alterações sinaptogênicas, neuroinflamação persistente e por prejuízos na neurogênese e crescimento axonal. Esta fase pode persistir desde meses até anos (Nair; Kumar, 2018; Robertson; Perlman, 2006).

c. Neuroinflamação

A evolução da lesão hipóxico-isquêmica, e conseqüentemente de suas sequelas, está intimamente ligado à neuroinflamação, a qual é um processo dinâmico caracterizado pela ativação de células do sistema nervoso, como as microglias e astrócitos, e pela infiltração de células periféricas para o sistema nervoso central, como os monócitos, sendo ambas atividades de grande importância para que os mecanismos patofisiológicos associados da asfíxia perinatal tenham efeito. Sendo assim, apesar do "protagonismo" associado à microglia, a neuroinflamação é caracterizada pelo crosstalking entre diferentes tipos celulares, principalmente astrócitos (Albertsson et al., 2014; Kumar et al., 2019).

A microglia é um tipo celular residente no sistema nervoso central e apresenta um papel essencial em condições fisiológicas e patológicas, atuando na defesa via resposta inflamatória ou neuroprotetora, além de ser intrínseca para a promoção da homeostase do sistema. O comportamento empregado pela microglia é dependente do seu estado de polarização, sendo a ativação clássica (M1)

responsável por respostas inflamatórias, enquanto a ativação alternativa (M2) é responsável pelas capacidades neuroprotetoras e homeostáticas (Brochu et al., 2011; Colton; Wilcock, 2012; Cui et al., 2020; Yao et al., 2013). É relevante ressaltar que, apesar de didática e ainda utilizada na literatura, a classificação dicotômica em fenótipos M1 e M2 foi adotada para descrever de forma simplificada os resultados *in vitro* obtidos previamente à caracterização funcional e ontogênica da microglia e não corresponde de forma precisa com o espectro fenotípico microglial que pode ser observado *in vivo* (Dubbelaar et al., 2018; Sandvig et al., 2018). Assim, a partir de novos estudos e do conhecimento obtido em relação à microglia, tal divisão tem sido questionada, levando em consideração que as microglias podem apresentar até mesmo heterogeneidade fenotípica de acordo com a região na qual se situam, demonstrando um espectro de características morfológicas e funcionais adicionais com base em seus perfis de expressão gênica (Dubbelaar et al., 2018; Ransohoff, 2016; Wlodarczyk et al., 2017).

A ativação microglial ocorre de maneira estímulo-dependente, atuando de forma reativa à lesões teciduais e estímulos inflamatórios sofridos pelo encéfalo, e acarreta na produção e liberação excessiva de fatores pró-inflamatórios, como interleucina (IL) -1 β , fator de necrose tumoral (TNF- α), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Yao et al. 2013; Brochu 2011; Kumar 2018). Essa resposta de ativação microglial pode ser de natureza diversa, sendo decorrente da detecção de Padrões Moleculares Associados à Patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMPs), Padrões Moleculares Associados à Dano (Damage-Associated Molecular Patterns - DAMPs), Padrões Moleculares Associados à Neurodegeneração (Neurodegeneration-Associated Molecular Patterns - NAMPs), ou um conjunto de diferentes tipos de detecção por parte dos Receptores de Reconhecimento de Padrões (Pattern Recognition Receptors - PRRs). Assim, é interessante considerar a ativação microglial como um espectro de eventos dependentes do tipo de estímulo reconhecido e da situação que se encontra o seu microambiente (Dubbelaar et al., 2018; Town; Nikolic; Tan, 2005).

Quando uma resposta inflamatória é iniciada pela detecção de DAMPs de forma independente de infecção patogênica, ocorre o que se conhece por inflamação estéril, a qual pode ativar tanto células imunes quanto células não-imunes (Gong et al., 2020). Portanto, com base no amplo espectro de diferentes respostas estímulo-dependentes por parte da microglia, a ativação microglial deve ser reconhecida por sua plasticidade e por como tais propriedades se relacionam com o papel etiológico das células microgliais no desenvolvimento de fenômenos neuroinflamatórios ou neurodegenerativos (Dubbelaar et al., 2018; Town; Nikolic; Tan, 2005).

Ao considerar o evento de privação de oxigênio ocorrendo de forma isolada, têm-se então um evento estéril, acarretado pelo reconhecimento de fatores produzidos e liberados pelas células danificadas, como High Mobility Group Box-1 (HMGB1), Heat Shock Proteins (HSPs), proteína S100, componentes da matriz extracelular e ácidos nucleicos, principalmente pela ausência de oxigênio e então pelo processo de reoxigenação. Entretanto, é comum que a asfixia ocorra em conjunto com um quadro de infecção perinatal, situação na qual o evento passa a ser também um

evento infeccioso (Gong et al., 2020; Nair; Kumar, 2018; Oberbarnscheidt; Zecher; Lakkis, 2011). Assim, após o insulto hipóxico-isquêmico, a microglia se torna ativa, adquirindo um fenótipo mais característico de M1 e promovendo uma resposta inflamatória prolongada, a qual resulta em neurodegeneração, morte neuronal e de oligodendrócitos, ruptura da barreira hematoencefálica imatura, redução da substância cinzenta e lesão na substância branca (Brochu et al., 2011; Kumar et al., 2019; Yao et al., 2013).

Logo, torna-se interessante a avaliação de fatores inflamatórios, como as citocinas, potencialmente liberadas após alterações principalmente microgлияis provocadas pela asfixia perinatal.

d. Anóxia neonatal

A fim de permitir a recapitulação e exploração dos eventos patofisiológicos da lesão hipóxico-isquêmica e investigação de potenciais terapêuticos, pesquisadores desenvolveram inúmeros modelos animais. O modelo animal de anóxia neonatal padronizado em 2011 é um desses casos (Takada et al. 2011).

Este modelo é utilizado desde sua padronização em ratos pelo grupo de pesquisa e, considerando a preferência pela utilização de camundongos em pesquisas biomédicas devido a seu menor tamanho e relativa facilidade de manipulação genômica, recentemente o modelo foi padronizado em camundongos com algumas modificações, que consistem em adaptação do tempo de permanência na câmara e fluxo de nitrogênio que os animais são exposto - de 11,5 L/min por 25 minutos em ratos para 10 L/min por 12 min em camundongos – e a idade em que o estímulo foi realizado – de P1/2 (6 a 8g) em ratos para P3/4 (1,8 a 2,5g) em camundongos. Tal modelo destaca-se por ser um procedimento não-invasivo que promove asfixia global e apresenta hipoxemia e hipercapnia entre seus resultados, analogamente aos efeitos vistos em humanos em condições de asfixia neonatal (Takada et al., 2011). Além da intervenção não cirúrgica, o estágio de neurodesenvolvimento comparável de roedores até 6 dias de vida à recém-nascidos humanos prematuros é uma vantagem desse modelo (Semple et al. 2013).

Em análises anteriores foi evidenciado que, quando adultos, os ratos submetidos a tal modelo apresentavam déficits de memória, aprendizagem prejudicada e aumento do comportamento ansioso, além de terem sido observados diferentes tipos de morte celular nos encéfalos desses animais, com foco em estruturas susceptíveis morfologicamente distintas (Takada et al., 2011, 2015). Dessa forma, o modelo em questão incorpora aspectos fisiopatológicos da asfixia perinatal relevantes da intercorrência em humanos.

2. JUSTIFICATIVA

Embora a elucidação da alteração nos níveis de citocinas inflamatórias mediada pela ativação microglial esteja presente em outros modelos de privação de oxigênio neonatal (Vannucci; Vannucci, 2005; Vannucci; Back, 2005), no evento anóxico incidido em momento que o neurodesenvolvimento do sistema nervoso de roedores é semelhante ao de recém nascidos prematuros, os níveis de citocinas ainda não foram mensurados.

Logo, visto que a privação de oxigênio é um problema de saúde pública mundial que está comumente associado à prematuridade e que, entre outros déficits, pode ocasionar prejuízos de memória e aprendizado aos sobreviventes, este projeto é de grande relevância, pois contribui para a elucidação de uma possível neuroinflamação decorrente do evento anóxico. Ademais, por empregar um modelo de anóxia neonatal recente e utilizado pelo grupo de pesquisa (Takada et al., 2011), este projeto possibilitou avaliação da possível ativação microglial e resposta inflamatória baseada na dosagem de citocinas na recente adaptação deste modelo em camundongos.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a neuroinflamação no modelo de anóxia neonatal no hipocampo de camundongos, região encefálica com notória participação em processos mnemônicos que poderiam ser prejudicados por eventos neuroinflamatórios.

De modo específico, 72 horas após submetermos os camundongos neonatos à anóxia neonatal, nós avaliamos os níveis de fatores pró e anti-inflamatórios por imunoensaio Multiplex.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

a. Animais

Foram utilizados neonatos provenientes de casais de camundongos (*Mus musculus*, linhagem C57BL/6), mantidos no biotério da Universidade Federal do ABC - campus São Bernardo do Campo, com temperatura constante ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12:12h, início do claro às 7:00h, e água e comida ad libitum. O peso para a anóxia foi entre 1,8 e 2,5 g, que corresponde às idades de P3 ou P4 em camundongos. Os procedimentos descritos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do ABC (CEUA – UFABC, Protocolo n° 3980261118).

b. Anóxia neonatal

Para que fosse induzida a privação de oxigênio nos animais, foi realizada a adaptação e utilização do modelo de anóxia neonatal previamente padronizado e validado em ratos com a idade de 1 a 2 dias de vida (Takada et al., 2011).

Para camundongos C57BL/6, padronizamos previamente o modelo em animais de 3 a 4 dias de vida (P3 - P4), pesando entre 1,8 e 2,5 g. Roedores de 0 a 6 dias de vida apresentam desenvolvimento encefálico comparável a prematuros humanos (Semple et al., 2013).

Os neonatos foram mantidos por 12 minutos numa câmara semi-hermética de policarbonato, saturada completamente com nitrogênio gasoso 100% a um fluxo de 10 L/minuto e aquecidos a 37°C. Após a recuperação dos animais (recuperação da coloração, da respiração e da movimentação ativa), eles foram devolvidos para a mãe, onde permaneceram até o momento da coleta, 72 horas depois do estímulo.

O grupo controle foi exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permaneceram no ar ambiente.

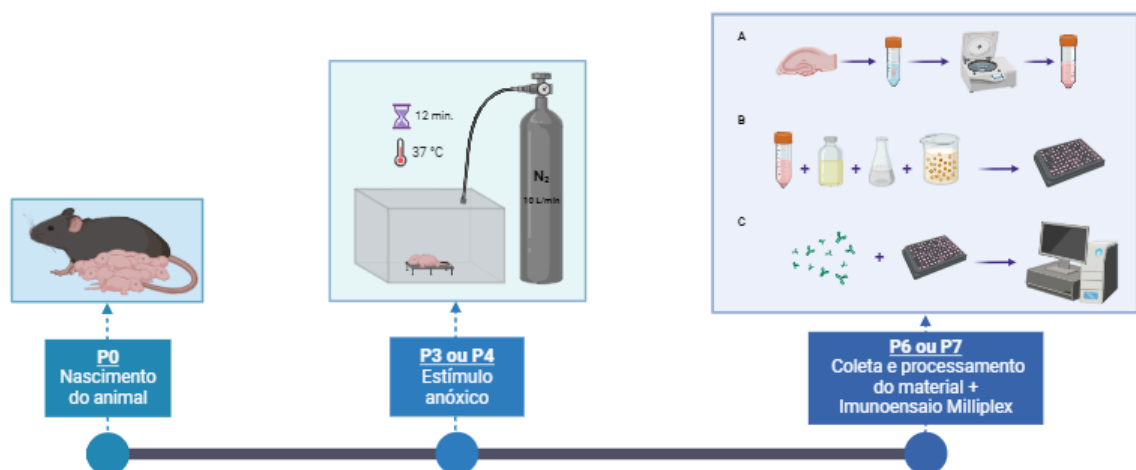
c. Processamento do material

Para realização do imunoenensaio multiplex, 72 horas após o estímulo, os hipocampus dos animais dos grupos controle e anóxia foram rapidamente dissecados e homogeneizados em uma solução de inibidores de protease (cOMplete mini tablet, Roche) dissolvido em 10 ml de solução tampão PBS. Para remoção dos materiais insolúveis, os homogenatos foram centrifugados por 20 minutos a 14,000 G e 4°C. Após isso, o método BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, catalog #23225) foi utilizado para determinar a concentração de proteína, com a albumina de soro bovino sendo utilizada como padrão, seguindo o protocolo do fabricante.

d. Imunoensaio de citocinas Milliplex

Os níveis de IL1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 IL-17, TNF- α , interferon (IFN)- γ , e GM-CSF no hipocampo foram analisadas através da técnica de fluorescência Luminex, utilizando-se Milliplex Magnetic Beads (MCYTOMAG-70 K, Merck Millipore, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Uma solução contendo tampão de ensaio, solução de matriz, a mistura com as beads, e a amostra ou padrão (25 μ L de cada composto, resultando em uma solução final de 100 μ L) foi brevemente adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços e incubada “overnight” em um agitador orbital a 4°C. Após a lavagem, 25 μ L de anticorpo de detecção foi adicionado e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Foram então adicionados 25 μ L de estreptavidina-ficoeritrina em cada um dos poços e foi feita a incubação em agitador orbital por 30 minutos a temperatura ambiente. A placa foi lavada e foram adicionados 150 μ L de sheath fluid em cada poço. Os níveis de fluorescência em cada padrão, controle de qualidade e amostra foram detectados com MAGPIX® System (Luminex Corporation, USA). Os dados foram analisados em sequência utilizando-se o Milliplex Analyst Manager software (Merck Millipore, Germany). As concentrações das citocinas foram obtidas por interpolação da curva padrão utilizando diluição gradual de 5 pontos dos padrões de proteína. Curvas padrão foram geradas para cada analito com o Milliplex Analyst Manager software (Merck Millipore, Germany) e as concentrações das amostras foram calculadas usando a curva padrão.

Figura 1 - Diagrama ilustrando o desenho experimental do estudo



Linha do tempo mostrando o momento do nascimento do animal (P0), o momento no qual foi realizada a anóxia neonatal (P3 ou 4) e o momento em que foi realizada e a coleta do material (P6 ou P7), bem como imagens ilustrativas do modelo de anóxia neonatal e da metodologia Milliplex para análise de citocinas. Figura criada no BioRender.com.

e. Análise dos dados

A análise estatística para os dados obtidos em relação aos 12 animais estudados, 6 controle e 6 anóxia, foi realizada no software Prism Graph 6. Para tal, os valores determinados para a quantificação total de proteínas e de citocinas de cada animal foram tabulados e então foi feita a normalização do nível de expressão das citocinas de interesse em cada amostra pelo valor total de proteína da respectiva amostra. Além disso, os valores foram normalizados em relação à média dos controles. Para valores que apresentam distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk, os dados foram analisados por Teste T não pareado bicaudal. Em casos de distribuição anormal, os dados foram analisados por teste de Mann-Whitney. Foram considerados valores significativos aqueles com $P < 0,05$ (*). Os resultados foram expressos pela média \pm SEM.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dado que eventos de privação de oxigênio neonatal podem desencadear a ativação de células microgliais e a produção de fatores neuroinflamatórios, foi então mensurado o nível tecidual de citocinas importantes para a caracterização de um possível quadro neuroinflamatório após a anóxia neonatal. As análises foram realizadas 72 horas após a anóxia neonatal, ou seja, em animais com 6 ou 7 dias de vida.

Neste estudo o hipocampo foi a região utilizada para esta avaliação, pois é uma das regiões do sistema nervoso central mais sensíveis à asfíxia neonatal, pois, mesmo em estímulos não isquêmicos, como a anóxia neonatal, o hipocampo é acometido devido a sua vascularização com anastomoses capilares reduzidas (Erdem, Yasargil e Roth, 1993). Além disso, modelos em roedores com hipóxia-isquemia e anóxia neonatal, as lesões do hipocampo foram associadas a um pior desempenho em testes de memória (Kumar et al. 2019; Orso et al. 2021; Takada et al. 2015). Logo, o hipocampo demonstrou ser uma região encefálica vulnerável ao evento anóxico e a caracterização dos níveis de citocinas no mesmo importante para a descrição do modelo.

Figura 2 - Avaliação de citocinas inflamatórias após anóxia neonatal

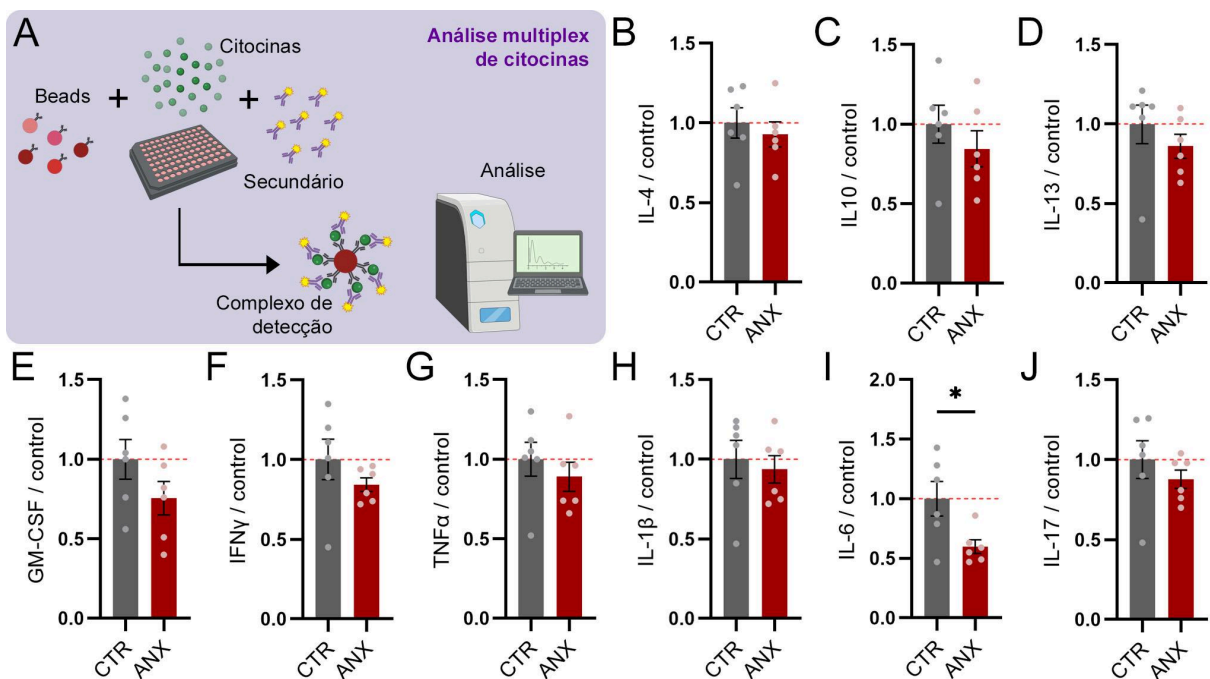


Diagrama ilustrando o fluxo de trabalho do imunoenensaio multiplex de citocinas (A). Gráficos com os níveis das citocinas anti-inflamatórias - IL-4, IL-10 e IL-13 - em relação ao grupo controle (B, C, e D). Gráficos com os níveis das citocinas pró-inflamatórias - GM-CSF, IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 - em relação ao grupo controle (E - J). Teste T não pareado ou Mann-Whitney. * P < 0,5. Média \pm SEM. CTR: controle. ANX: anóxia.

Foram analisadas 6 citocinas que, de acordo com a literatura e o papel que cada uma desempenha na resposta imunológica, são principalmente consideradas pró-inflamatórias - GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 (Figura 2: E - J).

A partir do teste T não pareado foi possível identificar que os animais controle apresentaram níveis de IL-6 maiores dos que os animais submetidos à anóxia (ctr: $1,000 \pm 0,1450$; anx: $0,5983 \pm 0,05776$; $T(10) = 2,573$; $P = 0,0277$, Figura 2I).

Quanto às demais citocinas pró-inflamatórias, não foram detectadas diferenças significativas. Também não foi possível identificar diferenças significativas nos níveis de expressão das três citocinas majoritariamente classificadas como anti-inflamatórias que foram analisadas neste trabalho - IL-4, IL-10 e IL-13 (Figura 2.B-D).

A IL-6 é uma molécula conhecida por seu potencial dualístico, podendo tanto promover ações para a sobrevivência neuronal após injúrias quanto desencadeando reações de degeneração neuronal e morte celular (Kummer et al., 2021). Ainda no sistema nervoso, a IL-6 desempenha um importante papel no processo de neurodesenvolvimento, principalmente em relação à neurogênese e diferenciação neuronal, com níveis adequados de IL-6 sendo essenciais para a manutenção de um conjunto numeroso e saudável de células tronco neurais (Kummer et al., 2021; Borsini et al., 2015). Além disso, a IL-6 atua como um fator neurotrópico e com ação pró-regenerativa das neurotrofinas, como o *nerve growth factor* (NGF), com a qual promove a co-sinalização para ativação das *extracellular signal-regulated kinases 1* (ERK1), conjunto de moléculas envolvidas em processos de divisão celular em células diferenciadas (Rao; Reddy, 1994; Kummer et al., 2021).

Entretanto, evidências apontam que concentrações elevadas de IL-6 durante a fase perinatal e pós-natal podem estar associadas com detrimientos ao neurodesenvolvimento de indivíduos afetados, prejudicando as capacidades motoras e comportamentais, além de provocar outras sequelas comuns à indivíduos acometidos por eventos perinatais, como asfíxia perinatal e ativação imune materna (Jiang et al., 2018; Borsini et al., 2015; Gumusoglu et al., 2017). Ademais, a ação da IL-6 está associada com alterações na ativação e na morfologia microglial, em conjunto com o estresse decorrente de eventos e encefalopatias pré-natais, e tem um papel essencial para que as células microgлияis sofram alterações persistentes, apesar de não estar atrelada à gliogênese (Gumusoglu et al., 2017; Jiang et al., 2018;). Dessa forma, fica demonstrado o quão importante e delicado é um nível adequado da expressão de IL-6 durante a fase de neurodesenvolvimento, já que níveis baixos prejudicam a neurogênese em decorrência das células progenitoras neurais estarem significativamente diminuídas, enquanto níveis altos estão atrelados à problemas de desenvolvimento (Kummer et al., 2021; Jiang et al., 2018;).

Além disso, ao analisar as possíveis causas para uma diminuição nos níveis de expressão de IL-6 é importante ressaltar que, apesar da produção de IL-6 decorrente da ativação microglial após insulto isquêmico ser relatada em diversos estudos (Choi et al., 2013; Pan; Wu, 2012), ainda não é claro se esse quadro é exclusivamente ou sequer majoritariamente devido ao evento de privação de oxigênio e reoxigenação, sendo a redução ou ausência do aporte de glicose outra possível causa para

tal produção. Considerando que a privação de oxigênio e a privação de glicose podem induzir a produção de fatores inflamatórios através de vias distintas, existe também a possibilidade de que tais eventos possam atuar de forma neutra, sinérgica ou antagônica à regulação da expressão de determinados fatores, como IL-6 (Choi et al., 2013; Pan; Wu, 2012). Assim, seriam necessárias novas investigações para determinar com exatidão qual, ou quais, destas possibilidades teriam atuado, ou não, para a obtenção dos resultados que foram observados neste trabalho.

De modo inesperado, os resultados obtidos na análise não correspondem com os resultados esperados para um quadro neuroinflamatório, no qual a expectativa seria observar um aumento expressivo na concentração de citocinas caracterizadas como pró-inflamatórias. Assim, tais resultados apontam para a possibilidade de que o modelo aqui empregado (1) não atue através de mecanismos neuroinflamatórios no tempo estudado (72 horas após a anóxia neonatal) ou até mesmo para a possibilidade de que (2) o evento neuroinflamatório não seja desencadeado pelo modelo de anóxia em questão.

Logo, embora resultados anteriores do grupo de pesquisa utilizando camundongos submetidos ao modelo de anóxia neonatal aqui descrito tenham apresentado aumento na degeneração celular hipocampal 24 horas após o estímulo (dados não publicados); e que em ratos a anóxia neonatal cause importantes alterações celulares, morfológicas, como a diminuição do volume hipocampal, e comportamentais, como déficits no aprendizado de ratos submetidos à tarefas de memória espacial que são intimamente correlacionadas ao hipocampo (Cruz-Ochoa et al., 2019; Kumar et al., 2017; Takada et al., 2015, 2016), nossos resultados sugerem que estes déficits observados previamente sejam causados por outros mecanismos patofisiológicos desencadeados pela anóxia neonatal que atuem de forma independente aos processos neuroinflamatórios. Entretanto, ressaltamos que os níveis de citocinas durante eventos de privação de oxigênio, ativação imune materna e outros eventos patológicos é dinâmico.

Justamente por conta do dinamismo apresentado pelos eventos neuroinflamatórios e aspectos associados à eles, se mostra desafiador apontar com precisão qual seria o *time-point* ideal para a detecção de fatores considerados como inflamatórios, já que os perfis de respostas imunológicas e neuroinflamatórias podem variar consideravelmente de acordo com os parâmetros individuais do corpo afetado, a intensidade e a natureza do evento que desencadeia a resposta, os níveis de ativação microglial e condições às quais o indivíduo acometido é submetido em razão do evento em questão, principalmente quando se analisa a fase aguda do evento e da inflamação (Kumar et al., 2004; de Oliveira et al., 2021). Logo, o momento escolhido para a análise pode ter sido um fator crucial para os resultados obtidos.

Outra possibilidade a ser explorada para explicar os resultados aqui obtidos seria a de que o modelo de anóxia neonatal utilizado neste projeto não desencadeia de fato uma resposta neuroinflamatória. Portanto, faria sentido a não alteração nos níveis de expressão das citocinas pró-inflamatórias analisadas, apesar do modelo em questão incorporar aspectos relevantes à

fisiopatologia da asfíxia perinatal e das diversas evidências apresentadas de que o mesmo provoca condições e reações associadas à encefalopatia hipóxico-isquêmica. Isso seria então um possível indicador de que, mesmo sem uma resposta neuroinflamatória, é possível reproduzir aspectos patofisiológicos da encefalopatia hipóxico-isquêmica.

Se este realmente for o caso, considerando que a neuroinflamação está intimamente ligado ao processo de evolução da lesão hipóxico-isquêmica, e conseqüentemente de suas sequelas, seria interessante fazer uma série de análises em relação à progressão e desenvolvimento da encefalopatia hipóxico-isquêmica sob diferentes condições e diferentes *time-points*, verificando de que forma a resposta neuroinflamatória estaria impactando no quadro geral e, portanto, desenvolver possíveis técnicas preventivas focadas em impedir ou minimizar esse processo.

Dessa forma, uma alternativa aos recentes resultados obtidos é a combinação de estratégias de ativação imune materna com o atual modelo de anóxia neonatal, caracterizando então um modelo de duplo estímulo neonatal. Este tipo de modelo é frequentemente utilizado com o propósito de mimetizar a associação de intercorrências neonatais que podem ocorrer a um feto humano, como a infecção materna, as conseqüentes alterações e condicionamentos ao sistema imunológico do feto e a maior probabilidade de eventos hipóxico-isquêmicos promoverem uma resposta imunológica exacerbada pela sinergia das intercorrências. Para o estudo dessas circunstâncias, é comum a utilização de modelos nos quais as fêmeas grávidas são inoculadas com lipopolissacarídeo (LPS), tipo de molécula caracterizada como endotoxina e principal constituinte da membrana de bactérias gram-negativas, de forma com que seja garantida a infecção materna e ativação de seu sistema imune, e então a aplicação de um modelo de privação de oxigênio nos animais neonatos dessas fêmeas previamente inoculadas (Van Tilborg et al., 2018; Zhou, 2008).

6. CONCLUSÃO

Considerando que apenas no Brasil, em um período de um ano, um total de aproximadamente 20 mil crianças são acometidas por eventos de privação de oxigênio ao nascer e sabendo que a asfixia perinatal, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), representa a causa de 23% dos óbitos de recém-nascidos em todo o mundo (Martins, 2022), a elucidação dos mecanismos patofisiológicos associados à asfixia perinatal e à encefalopatia hipóxico-isquêmica se mostra uma questão de extrema importância para a saúde pública.

Portanto, a caracterização da neuroinflamação no hipocampo de camundongos decorrente da aplicação do modelo de anóxia neonatal por meio da quantificação e comparação dos níveis de expressão de fatores pró e anti-inflamatórios através da utilização do imunensaio Multiplex executada neste trabalho, vai de encontro com a necessidade de compreender a asfixia perinatal, a EHI e a lesão hipóxico-isquêmica, além de buscar formas de amenizar os efeitos prejudiciais decorrentes delas.

Em suma, o presente projeto foi importante para a caracterização dos mecanismos patofisiológicos desencadeados pelo modelo de anóxia neonatal utilizado pela equipe ao analisar de que forma determinados eventos isolados podem atuar e contribuir para a asfixia perinatal, a EHI e as sequelas relacionadas a tal. Sendo possível verificar que, quando utilizado de forma isolada, este modelo não permite que recapitulemos no hipocampo de camundongos a resposta neuroinflamatória característica e esperada como consequência de processos desencadeados por eventos de privação de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, A. M. et al. The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2014.
- BACK, S. A.; MILLER, S. P. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? **Annals of Neurology**, v. 75, n. 4, p. 469–486, 2014.
- BORSINI, A.; ZUNSZAIN, P. A.; THURET, S.; PARIANTE, C. M. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. **Trends in Neurosciences**. Review, Volume 38, Issue 3, P145-157. 2015.
- BROCHU, M. E. et al. Developmental regulation of the neuroinflammatory responses to LPS and/or hypoxia-ischemia between preterm and term neonates: An experimental study. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, p. 1–14, 2011.
- CHOI, S. J. et al. Hypoxia Antagonizes Glucose Deprivation on Interleukin 6 Expression in an Akt Dependent, but HIF-1/2 α Independent Manner. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–10, 2013.
- DE OLIVEIRA, L. G.; ANGELO, Y. de S.; IGLESIAS, A. H.; PERON, J. P. S. Unraveling the Link Between Mitochondrial Dynamics and Neuroinflammation. **Frontiers in Immunology**. 12:624919. 2021.
- COLTON, C. A.; WILCOCK, D. M. Assessing Activation States in Microglia. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 174–191, 2012.
- CRUZ-OCHOA, N. A. et al. Neonatal anoxia impairs long-term energy metabolism and somatic development of Wistar rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 79, p. 76–85, 2019.
- CUI, W. et al. Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. May, p. 1–16, 2020.
- DUBBELAAR, M. L. et al. The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. July, p. 1753, 2018.
- ERDEM, A.; YASARGIL, G.; ROTH, P. Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. **J Neurosurg**, 79: 256-65. 1993.
- GILLAM-KRAKAUER, M.; GOWEN JR, C. W. 2023. Birth Asphyxia. StatPearls (Treasure Island (FL)). **StatPearls Publishing**; 2024.
- GONG, T. et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, 2020.
- GUMUSOGLU, S. B.; FINE, R. S.; MURRAY, S. J.; BITTLE, J. L.; STEVENS, H. E. The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. **Brain Behav Immun**. Oct;65:274-283. 2017.

GUNN, A. J.; BENNET, L.; GUNNING, M. I. ; GLUCKMAN, P. D.; GUNN, T. R. Cerebral hypothermia is not neuroprotective when started after postischemic seizures in fetal sheep. **Pediatr Res**, 46: 274-80. 1999.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063–3070, 2012.

IWATA, O.; IWATA, S.; THORNTON, J. S.; DE VITA, E.; BAINBRIDGE, A.; HERBERT, L.; SCARAVILLI, F.; PEEBLES, D.; WYATT, J. S.; CADY, E. B.; ROBERTSON, N. J. "Therapeutic time window" duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. **Brain Res**, 1154: 173-80. 2007.

JIANG, N. M.; COWAN, M.; MOONAH, S. N.; PETRI JR, W. A. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. **Trends in Molecular Medicine**. Volume 24, Issue 9, P794-804. 2018.

KUMAR, A. J. et al. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p. 242–250, 2017.

KUMAR, A. J. et al. Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 73, p. 50–58, 2019.

KUMAR, R.; CLERMONT, G.; VODOVOTZC, Y.; CHOW, C. C. The dynamics of acute inflammation. **Journal of Theoretical Biology**. v230, 145–155. 2004.

KUMMER, K. K.; ZEIDLER, M.; KALPACHIDOU, T.; KRESS, M. Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function. **Cytokine**, Volume 144, 2021.

MARTINS, F. Primeira Infância: Asfixia perinatal é a terceira causa de morte neonatal no mundo. Ministério da Saúde - Site 'gov.br'. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/dezembro/asfixia-perinatal-e-a-terceira-causa-de-morte-neonatal-no-mundo>>. Acesso em: 27 mar. 2024.

MILLAR, L. J. et al. Neonatal hypoxia ischaemia: Mechanisms, models, and therapeutic challenges. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–36, 2017.

NAIR, J.; KUMAR, V. Current and Emerging Therapies in the Management of Hypoxic Ischemic Encephalopathy in Neonates. **Children**, v. 5, n. 7, p. 99, 2018.

NORTHINGTON, F. J. Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. **ILAR Journal**, v. 47, n. 1, p. 32–38, 2006.

NORTHINGTON, F. J.; CHAVEZ-VALDEZ, R.; MARTIN, L. J. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 5, p. 743–758, 2011.

OBERBARNSCHEIDT, M. H.; ZECHER, D.; LAKKIS, F. G. The innate immune system in transplantation. **Seminars in Immunology**, v. 23, n. 4, p. 264–272, 2011.

PAN, H.; WU, X. Hypoxia attenuates inflammatory mediators production induced by *Acanthamoeba* via Toll-like receptor 4 signaling in human corneal epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 420, n. 3, p. 685–691, 2012.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. **Nature Neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 987–991, 2016.

RAO, V. N.; REDDY, E. S. elk-1 proteins interact with MAP kinases. **Oncogene**. Jul;9(7):1855-60. 1994.

ROBERTSON, C. M. T.; PERLMAN, M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. **Paediatrics and Child Health**, v. 11, n. 5, p. 278–282, 2006.

SANDVIG, I. et al. **Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks.** [s.l: s.n.]. v. 47

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106–107, p. 1–16, 2013.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, n. October, p. 247–259, 2015.

TAKADA, S. H. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 331–338, 2016.

TOWN, T.; NIKOLIC, V.; TAN, J. The microglial “activation” continuum: From innate to adaptive responses. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, p. 1–10, 2005.

VAN TILBORG, E. et al. Combined fetal inflammation and postnatal hypoxia causes myelin deficits and autism-like behavior in a rat model of diffuse white matter injury. **Glia**, v. 66, n. 1, p. 78–93, 2018.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage: Evolution of an Animal Model. **Developmental Neuroscience**; 27 (2-4): 81–86. 2005.

VANNUCCI, S. J.; BACK, S. A. The Vannucci Model of Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rodent: 40 years Later. **Developmental Neuroscience**; 44 (4-5): 186–193. 2022.

VOLPE, J. J. Neonatal encephalopathy: An inadequate term for hypoxic-ischemic encephalopathy. **Annals of Neurology**, v. 72, n. 2, p. 156–166, 2012.

WLODARCZYK, A. et al. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 22, p. 3292–3308, 2017.

YAO, L. et al. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: Role of TLR4 in hypoxic microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

ZHOU, H. Mechanistic links between maternal bacterial infection and cerebral palsy. **Molecular Biology**, v. 3, n. April, p. 14–23, 2008.