



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: Efeitos da fotobiomodulação em microglia submetidas à hipóxia

Palavras-chave do projeto: laser infravermelho, laser de baixa intensidade, neuroinflamação, morte celular

Área do conhecimento do projeto: Neurociência; Engenharia Biomédica

Sumário

1 Resumo	2
2 Introdução e Justificativa	2
3 Objetivos	2
4 Metodologia	3
5 Viabilidade (Opcional)	3
6 Cronograma de atividades	4
Referências	4

1 Resumo

A anóxia neonatal, que corresponde à falta de oxigênio ao nascimento, tem como principal sequela a lesão encefálica hipóxico-isquêmica, afeta de 0,1 a 0,3% das crianças nascidas a termo e aproximadamente 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascimento. Cerca de 20 a 50% dos neonatos que sofrem anóxia neonatal não sobrevivem e, daqueles que sobrevivem, 25% apresentam alguma sequela neurológica permanente como paralisia cerebral, déficits cognitivos, auditivos e visuais. A neuroinflamação, caracterizada pela resposta especializada exacerbada das células gliais, em especial da microglia, é considerada o principal fator que contribui para as lesões encefálicas após a anóxia. Não há tratamentos eficazes conhecidos que visam minimizar as sequelas provocadas pela anóxia neonatal. Neste sentido, a terapia de fotobiomodulação, por seu conhecido papel na modulação de processos inflamatórios, é excelente candidata a recurso terapêutico ou preventivo na lesão causada pela anóxia neonatal. O presente projeto visa, portanto, analisar os efeitos da terapia de fotobiomodulação em microglia submetidas à hipóxia. Desta forma, será possível aprofundar os conhecimentos acerca dos efeitos da terapia de fotobiomodulação na resposta inflamatória ocasionada pela anóxia neonatal.

2 Introdução e Justificativa

A anoxia neonatal corresponde ao quadro clínico de falta de oxigênio ao nascimento, esta condição é frequente em nascimentos prematuros, principalmente quando a prematuridade é acompanhada de baixo peso ao nascimento. A lesão encefálica hipóxico-isquêmica, principal consequência da privação de oxigênio, é menos prevalente em nascidos a termo, acometendo cerca de 0,1 a 0,3% (KURINCZUK; WHITE-KONING; BADAWI, 2010), entretanto estando presente em 60% das crianças prematuras com baixo peso ao nascimento (GLUCKMAN; PINAL; GUNN, 2001; VANNUCCI, 2000; VOLPE, 2009). Aproximadamente 20 a 50% dos neonatos que sofrem anóxia neonatal não sobrevivem e, dentro daqueles que sobrevivem, 25% apresentam alguma sequela neurológica permanente (AGOSTINHO; CUNHA; OLIVEIRA, 2010; WILSON-COSTELLO; FRIEDMAN; MINICH; FANAROFF *et al.*, 2005), como paralisia cerebral, déficits cognitivos, auditivos e visuais (BACK; MILLER, 2014; VANNUCCI, 2000).

O encéfalo é muito sensível à redução dos níveis de oxigênio, pois é responsável por grande parte do consumo energético. Durante o neurodesenvolvimento a privação de oxigênio e reperfusão (ou reoxigenação) no tecido cerebral desencadeia complexas cascatas celulares que podem resultar neuroinflamação subsequente à morte celular em larga escala por apoptose, necrose, autofagia e excitotoxicidade; podendo levar também à morte de células gliais, como astrócitos e células progenitoras de oligodendrócitos (pre-OLs), especialmente em regiões mais vulneráveis, como hipocampo e córtex cerebral (Northington, Chavez-Valdez et al. 2011, Peterson, Larson et al. 2012, Back and Miller 2014).

Microglia/macrófagos, células T e B, NK, mastócitos, células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares atuam na resposta inflamatória ocasionada por hipóxia-isquemia (MAJ; MALLARD; EKLIND; GUSTAFSON-BRYWE *et al.*, 2004; ZHANG; CHENG; CHEN; ZHOU *et al.*, 2015). Após o insulto hipóxico-isquêmico, a microglia residente e os astrócitos promovem a resposta imune de maneira estímulo-dependente, podem expressar e secretar citocinas pró-inflamatórias e causar inflamação prolongada, resultando em neurodegeneração (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2015).

A microglia possui papel fundamental em condições fisiológicas e patológicas, promovendo a homeostase do sistema nervoso central e coordenando a resposta inflamatória em processos neurodegenerativas (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014). Há dois estados de polarização da microglia: a ativação clássica ou M1 e a ativação alternativa ou M2 (COLTON; WILCOCK, 2010; COLTON, 2009). Na ativação clássica (M1), a microglia promove respostas pró-inflamatórias com produção excessiva de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), óxido nítrico sintase neuronal (iNOS) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (AGOSTINHO; CUNHA; OLIVEIRA, 2010; LE; ROWE; XIE; ORTIZ *et al.*, 2001). Na ativação alternativa (M2), a microglia é ativada pela interleucina 4 (IL-4) e pela interleucina 3 (IL-3), por vias seletivas, restaurando a homeostase e tendo papel neuroprotetor (GORDON; TAYLOR, 2005; PONOMAREV; MARESZ; TAN; DITTEL, 2007). Na literatura encontram-se informações de que o fenótipo M1 da microglia tem maiores chances de levar ao aumento de morte neuronal quando comparado ao fenótipo M2; sendo assim, há muitos estudos interessados em investigar a fundo os mecanismos que ativam e controlam a microglia e seus diferentes fenótipos (HU; LI; GUO; WANG *et al.*, 2012).

Ainda não são conhecidas estratégias terapêuticas eficazes para minimizar ou combater as sequelas da anóxia neonatal. Dados clínicos mostram que a hipotermia pode ser neuroprotetora em bebês a termo até 6 horas após a hipóxia-isquemia (EDWARDS; BROCKLEHURST; GUNN; HALLIDAY *et al.*, 2010). Em prematuros, não há terapias neuroprotetoras disponíveis (ALBERTSSON; BI; DUAN; ZHANG *et al.*, 2014).

A fotobiomodulação é uma modalidade terapêutica que utiliza a luz (Laser ou LED) para modular processos biológicos teciduais, celulares e moleculares. Esta terapia, também conhecida como terapia com laser de baixa intensidade, terapia com laser com baixa potência ou fototerapia, é amplamente aplicada na prática clínica de diversas áreas da saúde, com efeitos que visam especialmente analgesia, reparação tecidual e ação anti-inflamatória. A fonte de luz utilizada emite radiação com um comprimento de onda não ionizante, variando entre 600 a 1000 nm (regiões do vermelho e infravermelho próximo), ou seja, a radiação utilizada não possui energia suficiente para causar efeitos com potencial mutagênico. Alguns tipos de terapia que utilizam luz visam promover efeito fototérmico para causar morte celular, remoção tecidual, coagulação; no entanto esta terapia é uma modalidade de tratamento que não envolve calor e não visa causar morte ou efeitos citotóxicos, além de ser indolor ao

paciente(DE FREITAS; HAMBLIN, 2016; SALEHPOUR; FARAJDOKHT; ERFANI; SADIGH-ETEGHAD *et al.*, 2018)

A fotobiomodulação realizada com luz da região do vermelho ao infravermelho tem ampla capacidade de penetração tecidual, possibilitando sua aplicação em diferentes modalidades terapêuticas que vão desde lesões da pele até aplicações músculo-esqueléticas.

A radiação emitida tem grande importância para o mecanismo de ação da fotobiomodulação, pois é a partir da interação da luz e enzimas celulares que ocorrem seus efeitos. O principal ator estudado nesse mecanismo é o citocromo C oxidase (CCO), que é uma enzima localizada no IV complexo mitocondrial e responsável por processos de respiração celular. Esta enzima é um fotoacceptor e age como transdutor de fotossinal da radiação da região do vermelho e infravermelho próximo. A partir da excitação luminosa, a radiação estimula esta enzima, ocorrendo um aumento do potencial da membrana, de ATP, de AMP cíclico, de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico(HAMBLIN, 2018).

Ao energizar o CCO há uma atribuição de elétrons em uma grande quantidade, aumentando também a alocação de prótons e, desta maneira, promovendo o aumento do potencial da membrana mitocondrial. Os ciclos de ATP sintase crescem com o maior fluxo de íons de hidrogênio, de modo a haver uma gradação na catálise de ATP. A excitação da membrana mitocondrial também é atribuída à reversão da inibição no processo de respiração celular, que é causada pela ligação do óxido nítrico aos centros de cobre do grupo heme. Ao absorver a radiação ocorreria a fotodissociação do óxido nítrico da enzima CCO, propiciando a transferência dos elétrons para o oxigênio e aumentando a produção de ATP (DE FREITAS; HAMBLIN, 2016). Alguns experimentos endossam essa hipótese, como a observação de estados redox intercambiáveis quando a CCO é irradiada com luz, demonstrando o papel da luz no ciclo energético celular, ocasionando mudanças em seu estado (KADENBACH, 2020).

Há um crescente interesse no estudo da TFBM no sistema nervoso, onde as pesquisas buscam determinar as condições para aplicação desta fototerapia em diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas e em processos de declínio cognitivo (CARDOSO; DE SOUZA OLIVEIRA TAVARES; ARAUJO; MANSUR *et al.*, 2022). Nesta modalidade de aplicação, a TFBM é feita com radiação com comprimento de onda do vermelho ao infravermelho próximo, por sua maior capacidade de penetração nos tecidos(WANG; LI, 2019). Algumas destas pesquisas buscam avaliar os efeitos na memória, no aprendizado e no sono.

Outros estudos reportam os efeitos da TFBM em processos neuroinflamatórios, especialmente para modulações imunológicas feitas pela luz em células gliais como astrócito (CARSON; THRASH; WALTER, 2006) e microglia (HERTZ, 2014), como também para modulações na expressão de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias(ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012; OPAL; DEPALO, 2000; WANG; DECKERT; XUAN; NISHANTH *et al.*, 2013) Além disso há estudos que direcionam-se para os efeitos da TFBM em doenças neurodegenerativas como nas doenças Parkinson e Alzheimer (TANG; LE, 2016).

O cenário apresentado mostra que a anóxia neonatal é um importante problema de saúde pública, com sequelas graves e permanentes aos afetados, e que existe a necessidade de investigar abordagens terapêuticas eficazes para esta condição. Dentro da complexidade do processo desencadeado pela privação de oxigênio, é esperado que o estudo dos efeitos da fotobiomodulação na microglia possa contribuir para o avanço do conhecimento nesta área.

3 Objetivos

O objetivo geral deste estudo é verificar os efeitos da TFBM na microglia submetida à hipóxia.

O presente projeto possui os seguintes objetivos específicos:

- (I) estabelecer o protocolo de indução da hipóxia em cultura de microglia por meio de avaliação da morte celular 24 h após a privação de oxigênio;
- (II) avaliar os efeitos da radiação infravermelha na morte celular hipocampal 24 h induzida pela hipóxia;
- (III) avaliar os efeitos da radiação infravermelha na resposta inflamatória de microglia submetida à hipóxia.

4 Metodologia

4.1 Cultivo da microglia

Serão utilizadas células da linhagem BV-2, originalmente foram derivadas de micrógia neonatal murina imortalizada por raf/myc. Esta linhagem é o substituto mais frequentemente usado para micrógia primária.

As células BV2 serão mantidas a 37 °C e 6% de CO₂ em uma incubadora umidificada conforme metodologia descrita por Pollock e colaboradores (2020). As células serão mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10% de aminoácido não essencial Cellgro MEM e 10% de penicilina/estreptomicina; e este cultivo será feito em frascos de poliestireno (POLLOCK; CHOLICO; ISHO; DAY *et al.*, 2020).

4.2 Hipóxia

As células BV-2, após obterem confluência de 80-90%, serão expostas ao modelo de hipóxia crônica com 95% N₂, 5% CO₂, 37 °C (CHIARANTIN, 2018), para mimetizar a privação de oxigênio. As células serão colocadas em placas de petri e introduzidas dentro da câmara de hipóxia (Stem Cell TM Technologies, Canadá). A câmara será fechada hermeticamente de acordo com as instruções do fabricante e a entrada conectada em sistema aberto ao cilindro de N₂ em fluxo contínuo de 20 min/L durante 10 min, para retirada total do oxigênio (O₂). Em seguida será fechada a válvula de saída e após o enchimento total da câmara com gás N₂ (em torno de 30 segundos no fluxo 20min/L) a válvula de entrada será fechada. Posteriormente, a câmara será colocada na estufa a 37 °C durante 24 h (CHIARANTIN, 2018).

4.3 Ensaio de azul de tripan

Com o ensaio de Azul de tripan, as células serão lavadas com PBS, tripsinizadas com Tripsina+0,25% EDTA, inativado com 50% SFB, e após isso serão ressuspensas em PBS contendo 10% de azul de tripan. Após isso ocorrerá a contagem manualmente na câmara de Neubauer e serão consideradas as células coradas em azul não-viáveis.

4.4 Imunohistoquímica

Além da técnica do ensaio de azul de tripan, serão realizadas imunocitoquímicas para detecção de Iba-1 e iNOS, Iba1 e Arg1, por dupla imunofluorescência, assim como de TNF-alfa, IL-1beta e HIF-1alfa. Inicialmente, as células BV-2 serão permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após lavagens com PBS 1x, as células permanecerão em solução de bloqueio contendo SFB 10% e Triton X-100 0,1% por 1 hora também a temperatura ambiente. Em seguida, as células serão lavadas e as lamínulas serão incubadas com os anticorpos primários, em suas concentrações ideais pré-determinadas anteriormente em outros experimentos, em câmara úmida 4°C

4.5 Irradiação

Após a indução da hipóxia, as células serão irradiadas com um laser de diodo com meio ativo de arseneto de gálio alumínio (GaAlAs – Ortho Laser, DMC Equipamentos, São Carlos, SP). A radiação emitida possui comprimento de onda de $\lambda=808$ nm e regime temporal contínuo. A ponta do laser será fixada em um suporte de forma que o feixe incida perpendicularmente à superfície da placa. Serão testados 3 momentos de irradiação: imediatamente após a hipóxia, 30 min após e 60 min após.

Inicialmente iremos avaliar alguns parâmetros de irradiação para definir o melhor conjunto de parâmetros para a condição de hipóxia induzida na microglia. Na tabela abaixo são apresentados alguns parâmetros descritos na literatura para cultura de células em condição de hipóxia celular (CHAUDARY; KARNER; WEIDINGER; MEIXNER *et al.*, 2020; STEPANOV; GOLOVYNSKA; GOLOVYNSKYI; GARMANCHUK *et al.*, 2022; ZHANG; MIO; PRATT; LOHR *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Parâmetros de irradiação

Potência radiante (mW)	Irradiância (W/cm ²)	Exposição radiante (J/cm ²)
10-100	25 a 100	3 a 30

5 Viabilidade (Opcional)

Os reagentes, equipamento para indução da hipóxia e para a irradiação estão disponíveis nos laboratórios de pesquisa envolvidos.

Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que envolve avaliações dos danos causados pela anóxia em modelo animal e eficácia do tratamento empregando uma forma de fototerapia.

6 Cronograma de atividades

1. Estabelecer o protocolo de indução da hipóxia em cultura de microglia por meio de avaliação da morte celular 24 h após a privação de oxigênio;
 - a. Obtenção das células BV-2
 - b. Cultivo celular
 - c. Separar grupos controle, hipóxia, hipóxia-fotobiomodulação
2. Avaliar os efeitos da radiação infravermelha na morte celular hipocampal 24 h induzida pela hipóxia
 - a. Hipóxia e Irradiação infravermelho na cultura
 - b. Ensaio azul de tripan
 - c. Imunohistoquímica(TNF-alfa, IL-1beta e HIF-1alfa)
3. Análise dos resultados
 - a. Análise da imunohistoquímica em microscopia de fluorescência
 - b. Contagem de células do ensaio azul de tripan
 - c. Análise dos resultados e redação final

Tabela 1 – Exemplo de cronograma de atividades previstas

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X	X										
1.b.	X	X										
1.c.	X	X										
2.a.			X	X								
2.b.			X	X								
2.c.			X	X								
3.a.					X	X	X					
3.b.						X	X	X	X	X		
3.c.									X	X	X	X

Referências

AGOSTINHO, P.; CUNHA, R. A.; OLIVEIRA, C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, 16, n. 25, p. 2766-2778, 2010.

ALBERTSSON, A. M.; BI, D.; DUAN, L.; ZHANG, X. *et al.* The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury. **J Neuroinflammation**, 11, p. 153, Sep 5 2014.

BACK, S. A.; MILLER, S. P. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? **Ann Neurol**, 75, n. 4, p. 469-486, Apr 2014.

CARDOSO, F. D. S.; DE SOUZA OLIVEIRA TAVARES, C.; ARAUJO, B. H. S.; MANSUR, F. *et al.* Improved Spatial Memory And Neuroinflammatory Profile Changes in Aged Rats Submitted to Photobiomodulation Therapy. **Cell Mol Neurobiol**, 42, n. 6, p. 1875-1886, Aug 2022.

CARSON, M. J.; THRASH, J. C.; WALTER, B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. **Clin Neurosci Res**, 6, n. 5, p. 237-245, Dec 2006.

CHAUDARY, S.; KARNER, L.; WEIDINGER, A.; MEIXNER, B. *et al.* In vitro effects of 635 nm photobiomodulation under hypoxia/reoxygenation culture conditions. **J Photochem Photobiol B**, 209, p. 111935, Aug 2020.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Are "resting" microglia more "m2"? **Front Immunol**, 5, p. 594, 2014.

CHIARANTIN, G. M. D. Efeito Do Dissacarídeo Trissulfatado Da Heparina (Dt) Na Morte Neuronal Desencadeada Pela Sobrecarga Citoplasmática De Cálcio. 2018.

COLTON, C.; WILCOCK, D. M. Assessing activation states in microglia. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, 9, n. 2, p. 174-191, Apr 2010.

COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol**, 4, n. 4, p. 399-418, Dec 2009.

DE FREITAS, L. F.; HAMBLIN, M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. **IEEE J Sel Top Quantum Electron**, 22, n. 3, May-Jun 2016.

EDWARDS, A. D.; BROCKLEHURST, P.; GUNN, A. J.; HALLIDAY, H. *et al.* Neurological outcomes at 18 months of age after moderate hypothermia for perinatal hypoxic ischaemic encephalopathy: synthesis and meta-analysis of trial data. **Bmj**, 340, p. c363, Feb 9 2010.

ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci**, 8, n. 9, p. 1254-1266, 2012.

GLUCKMAN, P. D.; PINAL, C. S.; GUNN, A. J. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn: pathophysiology and potential strategies for intervention. **Semin Neonatol**, 6, n. 2, p. 109-120, Apr 2001.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, 5, n. 12, p. 953-964, Dec 2005.

HAMBLIN, M. R. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. **Photochem Photobiol**, 94, n. 2, p. 199-212, Mar 2018.

HERTZ, L. Book review: "Glial physiology and pathophysiology" by Alexei Verkhratsky and Arthur Butt, Wiley-Blackwell, 2013. 8, 2014-February-11 2014. Book Review.

HU, X.; LI, P.; GUO, Y.; WANG, H. *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, 43, n. 11, p. 3063-3070, Nov 2012.

KADENBACH, B. Regulation of cytochrome c oxidase contributes to health and optimal life. **World J Biol Chem**, 11, n. 2, p. 52-61, Sep 27 2020.

KURINCZUK, J. J.; WHITE-KONING, M.; BADAWI, N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Early Hum Dev**, 86, n. 6, p. 329-338, Jun 2010.

LE, W.; ROWE, D.; XIE, W.; ORTIZ, I. *et al.* Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. **J Neurosci**, 21, n. 21, p. 8447-8455, Nov 1 2001.

MAJ, H.; MALLARD, C.; EKLIND, S.; GUSTAFSON-BRYWE, K. *et al.* Global Gene Expression in the Immature Brain after Hypoxia-Ischemia. 24, n. 12, p. 1317-1332, 2004.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, 117, n. 4, p. 1162-1172, Apr 2000.

POLLOCK, T. B.; CHOLICO, G. N.; ISHO, N. F.; DAY, R. J. *et al.* Transcriptome Analyses in BV2 Microglial Cells Following Treatment With Amino-Terminal Fragments of Apolipoprotein E. 12, 2020-August-13 2020. Original Research.

PONOMAREV, E. D.; MARESZ, K.; TAN, Y.; DITTEL, B. N. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. **J Neurosci**, 27, n. 40, p. 10714-10721, Oct 3 2007.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Antimicrobial peptides and complement in neonatal hypoxia-ischemia induced brain damage. **Front Immunol**, 6, p. 56, 2015.

SALEHPOUR, F.; FARAJDOKHT, F.; ERFANI, M.; SADIGH-ETEGHAD, S. *et al.* Transcranial near-infrared photobiomodulation attenuates memory impairment and hippocampal oxidative stress in sleep-deprived mice. **Brain Res**, 1682, p. 36-43, Mar 1 2018.

STEPANOV, Y. V.; GOLOVYNSKA, I.; GOLOVYNSKYI, S.; GARMANCHUK, L. V. *et al.* Red and near infrared light-stimulated angiogenesis mediated via Ca(2+) influx, VEGF production and NO synthesis in endothelial cells in macrophage or malignant environments. **J Photochem Photobiol B**, 227, p. 112388, Feb 2022.

TANG, Y.; LE, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Mol Neurobiol**, 53, n. 2, p. 1181-1194, Mar 2016.

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

VOLPE, J. J. The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. **Semin Pediatr Neurol**, 16, n. 4, p. 167-178, Dec 2009.

WANG, P.; LI, T. Which wavelength is optimal for transcranial low-level laser stimulation? **J Biophotonics**, 12, n. 2, p. e201800173, Feb 2019.

WANG, X.; DECKERT, M.; XUAN, N. T.; NISHANTH, G. *et al.* Astrocytic A20 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF- κ B- and STAT1-dependent chemokine production in astrocytes. **Acta Neuropathol**, 126, n. 5, p. 711-724, Nov 2013.

WILSON-COSTELLO, D.; FRIEDMAN, H.; MINICH, N.; FANAROFF, A. A. *et al.* Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. **Pediatrics**, 115, n. 4, p. 997-1003, Apr 2005.

ZHANG, P.; CHENG, G.; CHEN, L.; ZHOU, W. *et al.* Cerebral hypoxia-ischemia increases toll-like receptor 2 and 4 expression in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Dev**, 37, n. 8, p. 747-752, Sep 2015.

ZHANG, R.; MIO, Y.; PRATT, P. F.; LOHR, N. *et al.* Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. **J Mol Cell Cardiol**, 46, n. 1, p. 4-14, Jan 2009.