

# A função multimodal do fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) na isquemia cerebral. Uma nova aplicação terapêutica?

Angelo Luiz Maset<sup>1</sup>, Oswaldo Tadeu Greco<sup>2</sup>, Lilian Piron Ruiz<sup>3</sup>,  
Mario Roberto Lago<sup>4</sup>, Milton Artur Ruiz<sup>3</sup>

Associação Portuguesa de Beneficência de São José do Rio Preto, SP, Brasil. Instituto de Moléstias Cardiovasculares de São José do Rio Preto, SP. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP

## RESUMO

O fator estimulador de células granulocitárias (G-CSF) é uma glicoproteína descrita há mais de 20 anos, possui aprovação da FDA (Food and Drug Administration) e do Ministério da Saúde no Brasil para tratamento de estados neutropênicos e no transplante de medula óssea. O G-CSF estimula os precursores dos granulócitos e regula crucialmente a sobrevivência de neutrófilos maduros, pós-mitóticos, por meio da inibição da apoptose. Além do efeito sistêmico, mais recentemente, tem-se demonstrado uma surpreendente atividade do G-CSF no sistema nervoso central. A administração de G-CSF mobiliza células-tronco progenitoras da medula óssea para o sangue periférico, atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e se dirige à área acometida do cérebro. A atividade do G-CSF no sistema nervoso central tem sido caracterizada como multimodal, pois, além do efeito mobilizador de células da medula óssea, demonstrou-se uma ação direta neuroprotetora mediante diferentes mecanismos, tais como a atividade antiapoptótica em neurônios, regeneração da vascularização, efeito antiinflamatório e estimulação da neurogênese endógena. O objetivo deste relato é o de discutir essas nuances e uma possível aplicabilidade do G-CSF na isquemia cerebral.

## PALAVRAS-CHAVE

Isquemia cerebral. Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). Agentes neuroprotetores.

## ABSTRACT

**Granulocyte-colony stimulating factor and neuroprotection. A possible multimodal therapeutic option?**

The granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a glycoprotein described almost twenty years ago; it is approved by the FDA (Food and Drug Administration) and Anvisa (section of Brazilian Health Ministry) for the treatment of neutropenic states and in bone marrow transplants. G-CSF stimulates granulocyte precursors and it has a crucial role in the survival of mature, post-mitotic neutrophils, through apoptosis inhibition. Beyond its systemic effect, G-CSF has an important and formerly unrecognized role in the central nervous system. G-CSF administration mobilizes bone marrow stem cells to the peripheral blood, and cross the blood-brain-barrier to the target the lesion. G-CSF's Central Nervous System activity has been characterized as a multimodal action: it seems, among the claimed effects, that G-CSF has a direct neuroprotective action through different mechanisms, such as anti-apoptotic activity on neurons; an angiogenic effect in the penumbra area; stimulation of endogenous neurogenesis; a possible anti-inflammatory effect, and mobilization of bone-marrow derived cells that migrate to the brain. Herein we review and discuss the literature in animals and the ongoing work in human beings.

## KEY WORDS

Brain ischaemia. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Neuroprotective agents.

1 Neurocirurgião da Associação Portuguesa de Beneficência de São José do Rio Preto, SP.

2 Cardiologista do Instituto de Moléstias Cardiovasculares de São José do Rio Preto, SP.

3 Hematologista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), SP.

4 Biomédico do Instituto de Moléstias Cardiovasculares de São José do Rio Preto, SP.

## Introdução

Até recentemente, o conceito científico convencional em relação ao sistema nervoso central (SNC) era de que ele fosse um sistema não-regenerante; no entanto, dados cumulativos tornaram esse conceito obsoleto<sup>2,4,6,23,38,42,47</sup>. Na última década, começaram a surgir evidências de que a neurogênese no SNC em mamíferos é um processo fisiológico contínuo<sup>2,32-34</sup> e não limitado à fase precoce da vida. À luz desses novos conhecimentos, várias abordagens utilizando-se de terapia celular para muitos tipos de acometimentos do SNC estão em curso neste momento<sup>1,3,5,7,15,28,54,58</sup>. Uma delas é a utilização do fator estimulador de células granulocitárias (G-CSF) como fator mobilizador de células-tronco endógenas. O princípio da terapia celular no SNC é o de restaurar a função do cérebro humano danificado pelas diversas doenças, substituindo os tipos celulares neurais afetados por novas células, ou protegendo as células neurais ainda presentes interrompendo o processo de perda neuronal, minimizando, assim, a perda funcional cerebral.

Os avanços no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da isquemia cerebral propiciaram inúmeras tentativas terapêuticas que abordaram, e abordam, mecanismos isolados de lesão; a grande maioria dessas tentativas foi desalentadora<sup>51</sup>. Na complexa cascata de eventos fisiopatológicos associados com a isquemia cerebral aguda, uma abordagem multimodal, isto é, uma abordagem que atuasse simultaneamente em múltiplas vertentes dessa cascata, teoricamente teria mais chance de sucesso do que abordagens isoladas.

Essa comunicação tem o objetivo de relatar a experiência internacional com o G-CSF na isquemia cerebral como um agente modulador multimodal. Uma revisão sobre os conceitos básicos de células-tronco em língua portuguesa na literatura neurocirúrgica pode ser encontrada em Schwindt e cols.<sup>55</sup>.

## Neurogênese na isquemia cerebral

No início desta década, vários estudos demonstraram fortes evidências de que os precursores neurais endógenos iniciam uma resposta compensatória ao acidente vascular cerebral (AVC) que resulta na produção de novos tipos celulares, ocorrendo esse fenômeno inclusive no cérebro adulto. Jin e cols.<sup>23</sup>, em 2001, demonstraram, em modelos focais de isquemia cerebral onde existe injúria no hemisfério ipsilateral à oclusão arterial, que a incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) aumentou em oito vezes na zona subgranular

(SGZ) ipsilateral, sete dias após a isquemia, quando comparado com o grupo controle. Surpreendentemente, a SGZ contralateral também aumentou em quatro vezes a incorporação de BrdU quando comparado ao grupo controle, persistindo a marcação duas semanas após o *ictus* isquêmico. Nakatomi e cols.<sup>42</sup> demonstraram a existência de regeneração de células piramidais no hipocampo. Importante, no entanto, foi a demonstração de que essas células regeneradas se integraram ao circuito neuronal, sendo isso um pré-requisito para a restauração da função cerebral. Eles estudaram as propriedades eletrofisiológicas das novas sinapses por meio das colaterais de Schaffer, 120 dias após isquemia cerebral, em três grupos distintos de ratos: um grupo controle, um grupo somente com isquemia e um terceiro grupo submetido à isquemia cerebral e tratado com fator de crescimento de fibroblastos (FGF) imediatamente após a isquemia cerebral ter sido provocada. Os resultados demonstraram que ocorreram potenciais pós-sinápticos excitatórios com marcada atenuação nos animais que sofreram isquemia (ambos os grupos). Observou-se, no entanto, uma atenuação bem menor nos animais tratados com FGF; o *slope* da curva dos animais tratados com FGF se aproximou do grupo controle, a tal ponto que não houve diferença estatística. Esse trabalho demonstrou a grande capacidade regenerativa de células progenitoras neurais piramidais no cérebro adulto. Arvidsson e cols.<sup>2</sup>, do grupo de Lindvall, demonstraram que o acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI), causado pela oclusão transitória em ratos adultos, causou um aumento considerável na proliferação celular na zona subventricular. Os novos neurônios gerados após o AVCI migraram para a área lesada do estriado, onde expressaram marcadores para neurônios maduros e em desenvolvimento. Assim, houve a comprovação de que o AVCI induziu a diferenciação de novos neurônios com o fenótipo da maioria dos neurônios destruídos. Esse dado comprovou que o cérebro adulto possui capacidade de auto-reparo após a lesão causadora de morte neuronal. Assim, se ocorre proliferação celular em determinados sítios anatômicos após o AVCI, e se esses neurônios migram para a região do *ictus* isquêmico, diferenciando-se com a expressão fenotípica dos neurônios lesados, cabe a pergunta: Por que esses pacientes não se recuperam? Aparentemente, um dos motivos é o baixo percentual de neurônios sobreviventes<sup>2</sup>. Os dados sugerem que 80% dos novos neurônios gerados pela resposta compensatória neural morrem durante as seis primeiras semanas após o *ictus* isquêmico, e somente 0,2% das células lesadas são repostas pela neurogênese. A neurogênese induzida pelo AVC era considerada uma resposta aguda e transitória até 2006, quando Thored e cols.<sup>64</sup>, também do grupo de Lindvall, demonstraram que os neuroblastos estriatais são gerados sem declínio por quatro meses após o AVC

em ratos adultos. Os novos neuroblastos assim formados, precocemente ou tardiamente, formaram neurônios maduros que sobreviveram por vários meses. Essa resposta celular foi coincidente com a melhora funcional. Houve uma melhora funcional inicial nos testes da escada e do cilindro, que se estabilizou após um mês, mas houve uma melhora acentuada na marcha entre o primeiro e o quarto mês após o AVC utilizando-se o teste da grade. Assim, o grupo de Lindvall<sup>2,64</sup> forneceu as primeiras evidências de que o cérebro adulto pode responder ao infarto cerebral, gerando novos neurônios por períodos prolongados.

## Terapia celular e o G-CSF

A terapia celular objetiva repor, reparar ou potencializar a função biológica das células lesionadas para restaurar a função neural. Podemos categorizar essas estratégias em dois tipos de abordagem: exógena e endógena. Na estratégia exógena, as células progenitoras neurais (NSC's) derivadas, cultivadas ou imortalizadas são injetadas ou implantadas localmente, após purificação *in vitro*; a análise dessa técnica ultrapassa o escopo deste artigo. A abordagem endógena faz uso da população de NSC's naturalmente presente no sistema neural do paciente, mobilizando células precursoras e progenitoras e potencializando uma resposta compensatória existente. Com essa assertiva, torna-se compreensível e atraente a estratégia de administrar agentes mobilizadores de células precursoras que amplificarão as células precursoras endógenas fornecendo uma via alternativa de reinervação do cérebro danificado e potencializando a resposta compensatória. A mobilização de células precursoras é menos problemática em todos os aspectos, ao comparar-se com o transplante, e possui uma sólida base científica<sup>12,20,21,24,31,32,34,42,50,52,53</sup>.

### *O G-CSF como agente mobilizador e protetor*

Entre os vários agentes mobilizadores de células precursoras conhecidos atualmente, o G-CSF tem recebido considerável atenção. O G-CSF é uma glicoproteína com 19,6 quilodaltons e membro da família de citocinas de fatores de crescimento, descrita há mais de 20 anos, inicialmente como indutora da diferenciação da célula leucêmica monocitária WEHI-3B<sup>4,6</sup>, e clonada por Nagata e cols.<sup>41</sup>. Nicola e cols.<sup>44</sup> caracterizaram os receptores do G-CSF em humanos e, posteriormente, outros autores detalharam as suas características bioquímicas e moleculares<sup>10,30</sup>. O receptor do G-CSF

é típico das citocinas (CD114) com um domínio de transmembrana e de transdução de sinal intracelular. Incluem-se como fontes do G-CSF os monócitos, as células mesoteliais, os fibroblastos, e as células endoteliais. O G-CSF estimula o crescimento de precursores de neutrófilos e regula crucialmente a maturação e a sobrevivência da linhagem de granulócitos neutrófilos maduros, pós-mitóticos, pela inibição da apoptose<sup>4,21,66</sup>. Atualmente, é utilizado para tratar neutropenia induzida por agentes quimioterápicos ou no transplante de medula óssea<sup>4,6,40,41,43,56,65</sup>. O G-CSF é uma droga liberada pela Food and Drug Administration (FDA) e pelo Ministério da Saúde no Brasil, tendo já sido administrada em milhões de pacientes em todo o mundo, e é bem tolerada pelo organismo humano. Mais recentemente, tem sido demonstrada uma surpreendente atividade do G-CSF no SNC<sup>12,13,25,26,31,50,53,57,59</sup>, fato que adiciona um potencial regenerativo em várias doenças neurológicas. A administração do G-CSF mobiliza células-tronco e progenitoras da medula óssea para o sangue periférico que, por sua vez, ultrapassam a barreira hematoencefálica e se dirigem à área acometida do cérebro. Além desse papel periférico, o G-CSF e seus receptores se expressam em grande parte do tecido neural, o que justificaria o seu efeito neuroprotetor aparentemente multimodal (Figura 1), incluindo-se uma atividade antiapoptótica nos neurônios<sup>24,50,53</sup>, regeneração e reparação da vascularização e estímulo da angiogênese<sup>31</sup>, além de um efeito antiinflamatório<sup>18</sup> e de estímulo à neurogênese endógena<sup>52</sup>.

### *Atividade protetora do G-CSF após a isquemia cerebral*

Konishi e cols.<sup>29</sup> descreveram os efeitos tróficos do G-CSF em células neuronais, mas Schabitz e cols.<sup>50</sup> e Six e cols.<sup>59</sup> foram os primeiros a descrever a atividade protetora na isquemia cerebral. Num modelo de infarto cerebral de artéria cerebral média (ACM) em ratos, eles demonstraram que o G-CSF reduz o tamanho do infarto cerebral, induzido pelo glutamato, em 47%. Além disso, o G-CSF também reduziu significativamente a mortalidade (25% no grupo controle *versus* 6,25% no grupo do G-CSF). Em estudo subsequente, o grupo de Schabitz<sup>53</sup> demonstrou o potencial terapêutico multimodal do G-CSF; eles demonstraram a forte atividade antiapoptótica em neurônios maduros por meio da ativação de múltiplas vias de sobrevivência celular. Ambos, G-CSF e o seu receptor (G-CSFr), expressaram-se em inúmeros sítios anatômicos e funcionais do SNC, e essa expressão foi induzida pela isquemia cerebral, o que sugeriu um mecanismo sináptico de proteção autócrino. Surpreendentemente, o G-CSFr também se expressou nas células-tronco neurais

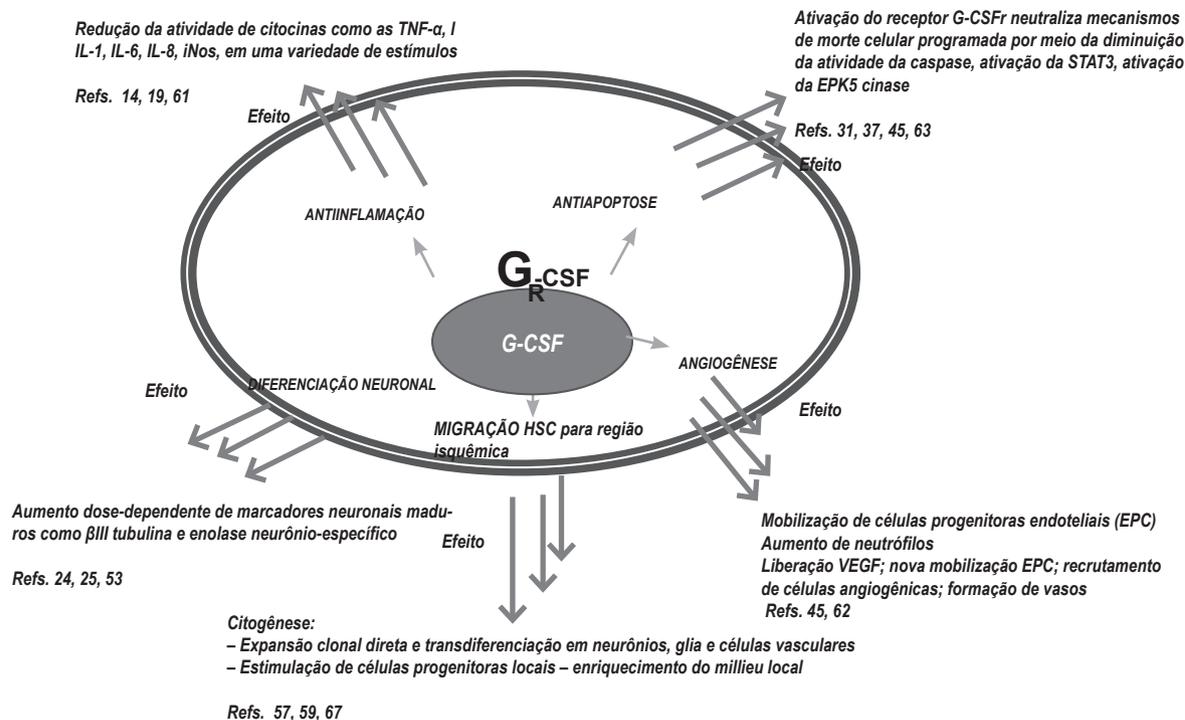


Figura 1 – Efeito multimodal do G-CSF no SNC.

adultas, e o G-CSF induziu a diferenciação neuronal *in vitro*. O G-CSF melhorou significativamente o resultado comportamental de longo prazo e, portanto, melhorou o prognóstico de longo prazo após a isquemia cortical, estimulando a resposta progenitora neural, propiciando, assim, uma nova oportunidade de recuperação funcional. Os autores concluíram que o G-CSF é um ligante endógeno no SNC que possui atividade benéfica dupla, seja agindo contra a degeneração neuronal aguda, seja contribuindo para a plasticidade de longo prazo após a isquemia cerebral.

Schneider e cols.<sup>54</sup>, recentemente, utilizaram dois modelos de isquemia cerebral em ratos; no primeiro, mensuraram o volume do infarto cerebral num modelo de isquemia de oclusão da ACM e estenderam o início do tratamento com G-CSF após a isquemia para 24 horas e 72 horas após o *ictus* isquêmico, num modelo de isquemia fototrombótica cortical, analisando separadamente os efeitos da isquemia e do G-CSF no córtex cerebral e em regiões subcorticais; demonstraram que a eficácia do G-CSF estende-se para as áreas cortical e subcortical. Até aquele momento, todas as drogas conhecidas tinham eficácia apenas no córtex cerebral. Assim como eles, outros autores demonstraram que a janela terapêutica após o infarto pode ser bastante flexível, pois o G-CSF teria uma eficácia verdadeiramente bimodal (antiapoptótica na fase aguda e potencializadora da recuperação na fase subaguda e crônica). Outros autores, como Six e cols.<sup>59</sup>, demonstraram redução

de 55% na área do infarto com janela terapêutica de 24 horas. Kamine-Kobayashi e cols.<sup>26</sup> demonstraram uma redução equivalente em dois grupos de animais, um de 24 horas e outro de 72 horas após o infarto. Essa ação bimodal torna o G-CSF um candidato extremamente atraente para aplicação clínica na fase subaguda do AVC. Schabitz e cols.<sup>50</sup>, Zhao e cols.<sup>67</sup> e Lu e cols.<sup>34</sup> também demonstraram que modelos experimentais tratados com G-CSF tiveram melhor recuperação funcional, menor taxa de mortalidade e menor volume de infarto.

Kawada e cols.<sup>25</sup> exploraram o potencial do G-CSF na fase aguda (1-10 dias) e subaguda (11-20 dias) do AVC e mostraram que o G-CSF atuou de uma maneira distinta, pois na fase subaguda o G-CSF também melhorou as funções cerebrais cognitivas.

### *O G-CSF mobiliza as células progenitoras hematopoiéticas (HSCs) para o SNC*

HSCs mobilizadas da medula óssea (CD34<sup>+</sup>) pelo G-CSF migram através da circulação e atravessam a barreira hematoencefálica; elas podem ser observadas nos espaços perivasculares do hemisfério isquêmico<sup>17</sup>. Embora haja melhora no processo de reparo celular, o mecanismo exato de como esse fato acontece ainda não é compreendido. Existem alguns processos que são conhecidos. Sabemos que a isquemia causa aumento na

expressão de receptor de citocinas CXCR4 SDF-1 em regiões adjacentes à isquemia, indicando que o SDF-1 pode exercer quimioatração nas células CD34<sup>+</sup> CXCR4 periféricas. Assim, o SDF-1 seria um sinalizador molecular que direcionaria as células CD34<sup>+</sup> CXCR4 para a área isquêmica<sup>49,64</sup>. Os mecanismos que gerariam o reparo celular – refletidos como um aumento em sobrevida e melhoria nas escalas de avaliação clínica – são mais especulativos. Uma possibilidade seria a integração ao tecido das células CD34 mobilizadas e que atingiram a área isquêmica e de penumbra, repondo as células lesionadas e reconstruindo o circuito neuronal. Outra possibilidade seria a produção de fatores tróficos a partir da interação das células CD34 com as células isquêmicas, e esses fatores tróficos contribuiriam para a reparação das células lesadas e ainda viáveis. Zhao e cols.<sup>67</sup> mostraram que os níveis de fibronectina no cérebro de ratos tratados com G-CSF estão elevados e que a fibronectina promove a sobrevivência e a migração de células precursoras neurais endógenas transplantadas em cérebros de ratos com traumatismo craniocéfálico. Modelos experimentais com camundongos deficientes em fibronectina possuem atividade apoptótica e área de infarto muito superior após a oclusão da ACM quando comparados com camundongos normais.

### *O G-CSF ativa os mecanismos de antiapoptose*

O G-CSF mostrou-se um forte ativador de vias de sobrevivência celular (antiapoptose); essa propriedade parece ser mediada pelo receptor neuronal G-CSF (G-CSFr). Uma via antiapoptótica conhecida é a regulação da STAT-3 e Bcl2<sup>26</sup>, família de proto-oncogenes que promove a sobrevivência celular. Outra possibilidade seria através da via da proteína Janus tirosina cinase/transdutor e ativador de sinal de transcrição (JAK/STAT) e subsequente ativação da Bcl-2<sup>9,17</sup>, onde a hiperexpressão de Bcl-2 protegeu os neurônios contra a morte no período pós-isquemia. O grupo de Schabitz<sup>53</sup> demonstrou a existência de G-CSFr em neurônios e na glia e que o efeito neuroprotetor do G-CSF é dependente da ativação da via JAK/STAT. Schabitz e cols.<sup>50</sup>, Zhao e cols.<sup>67</sup> e Lu e cols.<sup>34</sup> demonstraram que modelos experimentais tratados com G-CSF tiveram melhor recuperação funcional, menor taxa de mortalidade e menor volume de infarto.

### *O G-CSF induz a diferenciação neuronal*

Sabe-se que o cérebro dos mamíferos adultos possui células-tronco e progenitoras em vários sítios, incluindo-se a zona subventricular e giro denteado. O G-CSF e seu receptor se expressam também nessas regiões<sup>53</sup>.

O G-CSF induz a atividade do marcador neuronal maduro  $\beta$ -III tubulina, indução esta que é mais intensa do que a maioria dos indutores conhecidos. O G-CSF leva a um aumento da população de células neurais que expressam marcadores neuronais maduros, sendo este dado uma indicação de que o G-CSF modula a diferenciação de células precursoras neurais adultas<sup>53</sup>. O G-CSF também estimula a neurogênese por meio da integração com o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ativação de estatinas<sup>24</sup>. A administração de citocinas hematopoiéticas na fase subaguda após o infarto cerebral foi eficaz na recuperação funcional, facilitando a proliferação de células progenitoras neurais<sup>25</sup>.

### *O G-CSF interfere na angiogênese*

Concomitante ao aumento dos granulócitos e dos neutrófilos na circulação sanguínea, o G-CSF promove a secreção de fatores angiogênicos<sup>45</sup>, como o VEGF, utilizando-se das alternativas de aumentar o número absoluto de neutrófilos e do aumento da produção de VEGF em cada neutrófilo. O bloqueio das vias de VEGF impede a angiogênese induzida pelo G-CSF, sugerindo que a angiogênese induzida pelo G-CSF é dependente de VEGF<sup>45</sup>. A administração local de G-CSF no tecido isquêmico elevou a densidade capilar e forneceu uma vascularização funcional, contribuindo para a neovascularização do tecido isquêmico<sup>31</sup>. Nessa situação, observou-se área vascular com aumento de ramificações, do comprimento dos vasos e do número de células endoteliais BrdU positivas no grupo tratado com G-CSF quando comparadas com o grupo isquêmico. Mas essa não é a única forma de ação, pois existem evidências de que células circulantes angiogênicas são capazes de se dirigir para locais de dano vascular, estimulando a angiogênese, muito embora o número dessas células angiogênicas circulantes seja considerado muito pequeno. Takagi e cols.<sup>63</sup> demonstraram aumento do índice de perfusão sanguínea, além de aumento do número de vasos colaterais mensuráveis e da densidade capilar por meio de Doppler. A combinação de transplante de células mononucleares de medula óssea e do G-CSF apresentou o melhor percentual de neovascularização. Um fator que pode interferir na eficácia do G-CSF como indutor de angiogênese é o fator tempo. O G-CSF injetado um dia após a isquemia cerebral induziu uma maior taxa de proliferação endotelial quando comparado às injeções ocorridas sete dias após a isquemia<sup>31</sup>. Aparentemente, o G-CSF também atua na diferenciação de células HSCs, diferenciando-as em células endoteliais de vasos sanguíneos. Minamino e cols.<sup>37</sup> observaram que essa diferenciação estava aumentada em animais tratados com G-CSF, resultando numa recuperação mais precoce do fluxo sanguíneo em membros isquêmicos.

## O G-CSF inibe os mediadores inflamatórios

Os antígenos que penetram o corpo humano são combatidos pelo sistema imunológico inespecífico do qual fazem parte os granulócitos (PMN) e os macrófagos, entre outros. No bojo dessa batalha contra a infecção, aparecem os elementos que definem a inflamação, como a hiperemia, o edema e a hipertermia local. Nosso sistema de defesa desse componente do sistema imunológico é coordenado e regulado pelos padrões de sinalização celular (molecular), por mediadores lipídicos e pelas citocinas interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a linfocina interferon gama (IFN- $\gamma$ ). A atividade dessas citocinas pode ser reduzida não somente pela *down-regulation* de sua produção ou secreção, mas também pela estimulação da liberação de seus antagonistas IL-1ra e sTNF- $\alpha$ , pois é nesse contexto que o G-CSF age: o G-CSF ativa os PMN, estimulando sua proliferação, maturação e direcionamento para defesa. Assim, o G-CSF pode ser um potente imunomodulador antiinflamatório por si só. Então, à luz desses dados, o próximo passo seria conhecer com mais detalhes os efeitos do G-CSF nesses mediadores, pois drogas que interferem na produção ou na ação desses mediadores potencialmente fornecem proteção contra a inflamação. Um importante denominador comum de muitas condições inflamatórias é a liberação de TNF. Drogas que interferem na produção ou na ação do TNF potencialmente fornecem proteção contra a inflamação. O G-CSF reduz a atividade do TNF $\alpha$ <sup>14</sup>, inibe a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOs)<sup>61</sup>, bem como diminui os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 em várias condições<sup>19</sup>. Ekdahl e cols.<sup>8</sup>, do grupo de Lindvall, demonstraram que a inflamação artificialmente induzida por lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* piora tanto a neurogênese basal quanto a induzida pela injúria. Os autores propuseram que a inflamação aumenta a ativação microglial e que esse seria o fator primordial da inibição da neurogênese. Esse efeito deletério da microglia ativada dos neurônios justa-formados é mais provavelmente mediado pela ação de citocinas, tais como a IL-1  $\beta$  ou IL-6, TNF- $\alpha$ , ou óxido nítrico (NO). Essas moléculas podem ser liberadas na microglia e são neurotóxicas *in vitro*<sup>11,16,46,65</sup>. Monge e cols.<sup>39</sup> demonstraram que a inflamação produzida isoladamente no SNC inibe a neurogênese e que o bloqueio do processo inflamatório com indometacina restaura a neurogênese após a inflamação induzida por endotoxina ou após irradiação cerebral. Os autores também discutem a importância e os possíveis mecanismos na fisiopatologia da memória e em certas demências.

## Implicações clínicas dos estudos em humanos

Os estudos promissores realizados em animais deram o embasamento científico para o uso clínico do G-CSF em humanos. As estratégias de reposição celular em humanos se iniciaram com o transplante intracerebral de células fetais ou células precursoras pré-diferenciadas *in vitro*<sup>5,27,28</sup>. Essas estratégias concebiam uma abordagem em uma única via na cadeia de eventos que levam à morte celular. O G-CSF propicia uma nova terapia, pois as várias publicações existentes, como já citamos anteriormente, demonstram um efeito multimodal do G-CSF, atuando tanto na fase aguda quanto na fase subaguda da isquemia cerebral. O G-CSF melhorou o resultado comportamental de longo prazo após a isquemia cortical. Assim, aparentemente o G-CSF exerce uma atividade benéfica dupla, ou seja, agindo contra a degeneração neuronal aguda ou contribuindo para uma plasticidade<sup>12,34,61</sup> de longo prazo após a isquemia cerebral. O G-CSF preenche os critérios do STAIR (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable)<sup>62</sup>, quais sejam: penetração na barreira hematoencefálica, atividade neuroprotetora em diferentes modelos de infarto cerebral demonstrada por grupos independentes, atividade demonstrada em diferentes espécies, farmacocinética bem conhecida e dados prognósticos promissores.

Ickenstein e cols.<sup>22</sup>, em 2004, reportaram a ausência de efeitos adversos do G-CSF; em 2006, Shyu e cols.<sup>58</sup> exploraram o potencial terapêutico do G-CSF no AVCI agudo da artéria cerebral média avaliando dez pacientes. Os critérios de inclusão foram: diagnóstico por meio de ressonância magnética à admissão hospitalar, déficit neurológico avaliado pela Escala de Stroke do NIH (NIHSS), pacientes selecionados quando entre os escores 9 e 20 dessa escala e período máximo de sete dias após o início do AVC. Num período de 12 meses após tratamento, sete pacientes que receberam G-CSF apresentaram melhora muito mais expressiva na função neurológica do que os três pacientes-controle em todas as escalas clínicas utilizadas, incluindo a Escala de Stroke do NIH, Escala de Stroke Européia e o índice de Barthel. Esses resultados positivos encorajadores estimularam a realização de novos estudos clínicos com maior número de pacientes e dentro de padrões estatísticos inquestionáveis. Sprigg e cols.<sup>60</sup> publicaram, em 2006, um estudo duplo-cego, aleatório e controlado com placebo em 36 pacientes com AVCI, realizado em dois centros, onde foi aplicado G-CSF subcutâneo com aumento escalonado de dose, na fase subaguda (de 7 a 30 dias). Foi realizada a contagem de células CD34+ e hematimétrica global para se atestar a mobilização de células precursoras, sendo o objetivo do experimento clínico avaliar a segurança e o resultado funcional dos pacientes. Os autores concluíram que o

G-CSF é eficaz na mobilização de células precursoras em pacientes com AVCI recente e que a administração é segura e bem tolerada. Apesar do início promissor, novos estudos deverão agora avaliar a eficácia da droga como agente terapêutico no AVC.

Existem ainda vários quesitos a serem respondidos, como, por exemplo, o que aborda a questão da dosagem mais eficaz. Quais são os limites temporais da eficácia do G-CSF após o AVC? É possível potencializar ainda mais a ação do G-CSF aplicando-o simultaneamente com outras citocinas, tais como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator derivado vascular endotelial (VEDF) ou eritropoietina (EPO)? Essas são questões a serem respondidas por pesquisas clínicas futuras.

Talvez o G-CSF possa ser um complemento ou ser associado ao implante de células mesenquimais<sup>36</sup>. Num trabalho recente, Baker e cols.<sup>3</sup>, por exemplo, utilizaram HSCs, inibidores da metaloproteinase e tratamento metabólico isoladamente ou em associação em animais. Num modelo de oclusão da ACM, vetores de liberação genéticos foram utilizados para potencializar a expressão de inibidores teciduais da matriz metaloproteinase 1 e 2 (TIMP1 e TIMP2) três dias antes da isquemia induzida. Após a oclusão, células HSCs foram injetadas por via intra-arterial isoladamente ou em combinação com agentes que melhoraram a biodisponibilidade de NO. A avaliação da extensão do infarto, a incorporação de BrdU e a recuperação motora demonstraram que os maiores benefícios foram obtidos nos ratos que receberam a terapia tripla combinada, que ultrapassaram os efeitos benéficos obtidos na monoterapia ou na dupla terapia.

Em outro estudo recente, Minger e cols.<sup>38</sup> examinaram o cérebro de um paciente de 84 anos de idade que faleceu sete dias após um AVC, utilizando-se de anticorpos com marcadores específicos para células progenitoras neurais, e estas foram comparadas com um cérebro da mesma idade e sexo. Os autores observaram a presença de células imunopositivas na região periinfartada e também em áreas distantes. Todos os achados descritos em animais foram corroborados por esse estudo anátomo-patológico do cérebro humano.

### *Estudos no Brasil*

No Brasil, foram realizados estudos não aleatórios para se avaliar a segurança do transplante autólogo de células de medula óssea no AVCI agudo, dentro de certos pressupostos. Na fase I desse estudo<sup>7</sup>, pacientes com AVCI na fase aguda foram submetidos ao transplante autólogo intra-arterial de HMC's. Com base nos resultados desse trabalho, os autores concluíram que o procedimento é seguro, viável e promissor. Posteriormente, os autores publicaram outra série com um número maior de pacientes, e o grupo de pesquisadores se prepara agora

para avaliar os efeitos terapêuticos das células mesenquimais, onde nosso grupo pretende se inserir. Nosso grupo possui experiência prévia com células-tronco em cardiologia<sup>1,15,48</sup> e experiência inicial com o G-CSF<sup>35</sup>. Nesse último relato apresentamos nossa experiência inicial com um paciente que talvez tenha sido o primeiro paciente brasileiro a fazer uso de G-CSF especificamente para uma patologia intracerebral, a qual se deu logo após a publicação de Shyu e cols.<sup>58</sup>.

## Conclusão

A compreensão dos mecanismos envolvidos na plasticidade neural e na sua modulação e a possibilidade de restauração de deficiências funcionais pela potencialização da neurogênese endógena ou da terapia celular abrem novos horizontes no tratamento do AVC. Estamos vivenciando uma nova era, e a próxima década possivelmente marcará o surgimento de novas tecnologias e abordagens para o tratamento do AVC e de outras doenças neurológicas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à professora Rosalia Mendez-Otero, professora titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela revisão deste artigo.

## Referências

1. ARAÚJO JD, ARAÚJO FILHO JD, CIORLIN E, GRECO OT, ARDITO RV et al.: Utilização de células-tronco de MO para tratamento de isquemia crítica de membro inferior. *J Vasc Bras* 5:209-14, 2006.
2. ARVIDSSON A, COLLIN T, KIRIK D, KOKAIA Z, LINDVALL O: Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-70, 2002.
3. BAKER AH, SICA V, WORK L, WILLIAMS-IGNARRO S, DE NIGRIS F, LERMAN LO et al.: Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia. *PNAS* 104:3597-602, 2007.
4. BEGLEY CG, LOPEZ AF, NICOLA NA, WARREN DJ, VADAS MA, SANDERSON CJ, METCALF D: Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood* 68:162-6, 1986.
5. BONN D: First cell transplant aimed to reverse stroke damage. *Lancet* 352(9122):119;1998.

6. BURGESS AW, METCALF D: Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer* 26:647-54, 1980.
7. DE FREITAS GR, MENDONÇA MLF, BEZERRA DC, SILVA AS, FALCÃO CHE, GONZALES C et al.: Safety and feasibility of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in acute ischemic stroke. *Stroke* 37: 624-5, 2006.
8. EKDAHL CT, CLAASEN JH, BONDE S, KOKAIA Z, LINDVAL L: Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *PNAS* 100:13632-7, 2003.
9. FERRER I, PLANAS AM: Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *Neuropathol Exp Neurol* 62:329-39, 2003.
10. FUKUNAGAR, SEGO Y, MIZUSHIMA S, NAGATA S: Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8702-6, 1990.
11. GEBICKE-HAERTER PJ: Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microsc Res Tech* 54:47-58, 2001.
12. GIBSON CL, BATH PM, MURPHY SP: G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:431-9, 2005.
13. GIBSON CL, JONES NC, PRIOR MJ, BATH PM, MURPHY SP: G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1beta expression after cerebral ischemia in mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:763-9, 2005.
14. GORGEN I, HARTUNG T, LEIST M, NIEHORSTER M, TIEGS G, UHLIG S, WEITZEL F, WENDEL A: Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *Immunol* 149:918-24, 1992.
15. GRECO OT, ARDITO RV, TAKEDART, LAGO MR, POLONI AFC, JACOB JLB et al.: Ressincronização cardíaca e terapia celular, alternativas para tratamento de pacientes com cardiomiopatia dilatada. Resultados preliminares. *Reblampa* 19:259-99, 2006.
16. HANISCH UK: Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-55, 2002.
17. HARADA M, QIN Y, TAKANO H, MINAMINO T, ZOU Y, TOKO H et al.: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11:305-11, 2005.
18. HARTUNG T: Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol* 5:221-5, 1998.
19. HEARD SO, FINK MP: Counterregulatory control of the acute inflammatory response: granulocyte colony-stimulating factor has anti-inflammatory properties. *Crit Care Med* 27:1019-21, 1999.
20. HIRAYAMA F, YAMAGUCHI M, YANO M, YASUI K, HORIE Y, MATSUMOTO K et al.: Spontaneous and rapid re-expression of functional CXCR4 by human steady-state peripheral blood CD34+ cells. *Int J Hematol* 78:48-55, 2003.
21. HU B, YASUI K: Effects of colony stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammations site. *Int J Hematol* 66:179-88, 1997.
22. ICKENSTEIN G, HAAS S, SAUERBRUCH S et al.: Regeneration in acute ischemic stroke (RAIS) with hematopoietic stem cell mobilization. 56th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Abstracts, Program n. S39.001, 2004.
23. JIN K, Minami M, Lan JQ et al.: Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 98:4710-15, 2001.
24. JUNG KH, CHU K, LEE ST, KANG L, KIM SU, KIM M, ROH JK: G-CSF protects human cerebral hybrid neurons against in vitro ischemia. *Neurosci Lett* 394:168-73, 2006.
25. KAWADA H, TAKIZAWA S, TAKANASHI T, MORITA Y, FUJITA J, FUKUDAK et al.: Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 113: 701-10, 2006.
26. KOMINE-KOBAYASHI M, ZHANG N, LIU M, TANAKA R, HARA H, OSAKA A et al.: Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:402-13, 2006.
27. KONDZIOLKA D, WECHSLER L, GOLDSTEIN S: Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55:565-9, 2000.
28. KONDZIOLKA D, STEINBERG GK, WECHSLER L et al.: Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 103:38-45, 2005.
29. KONISHI Y, CHUI DH, HIROSE H, KUNISHITA T, TABIRA T: Trophic effects of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 609:29-35, 1993.
30. LAYTON JE, HALL NE, CONNELL F, VENHORST J, TREUTLEIN HR: Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* 276:3679-87, 2001.
31. LEE ST, CHU K, JUNG KH, KO SY, KIM EH, SINN DI, LEE YS, LO EH, KIM M, ROH JK: Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1058:120-8, 2005.
32. LOIS C, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A: Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271: 978-81, 1996.
33. LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A: Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-8, 1994.
34. LU CZ, XIAO BG: G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia. *Biochem Soc Transact* 34:1327-33, 2006.
35. MASET AL, DUARTE KP, GRECO OT: O fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) para isquemia cerebral. Uma nova aplicação terapêutica? *Rev Bras Hematol* (in press).
36. MENDEZ-OTERO R, DE FREITAS GR, FURTADO DE MENDONÇA ML, OLIVEIRA-FILHO MFJ: Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Reg Med* 2:1-7, 2007.
37. MINAMINO K, ADACHI Y, OKIGAKI M, ITO H, TOGAWA Y, FUJITA K et al.: Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. *Stem Cells* 23:347-54, 2005.
38. MINGER S, EKONOMOVA, CARTAE, CHINOYA, PERRY R, BALLARD C: Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med* 2:69-74, 2007.
39. MONGE ML, TODA H, PALMER TD: Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302: 1760-64, 2003.
40. MOROSTYN G, CAMPBELL L, LIESCHKE G, LAYTON JE, MAHER D, O'CONNOR M et al.: Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. *J Clin Oncol* 7:1554-62, 1989.
41. NAGATA S, TSUCHIYA M, ASANO S, KAZIRO Y, YAMAZAKI T, YAMAMOTO O et al.: Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 319:415-8, 1986.

42. NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S, HATANNO O, KAWAHARA N et al.: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-41, 2002.
43. NEIDHART J, MANGALIKA, KOHLER W, STIDLEY, SAIKI J, DUNCAN P et al.: Granulocyte colony-stimulating factor stimulates recovery of granulocytes in patients receiving dose-intensive chemotherapy without bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 7:1685-92, 1989.
44. NICOLANA, BEGLEY CG, METCALF D: Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature* 314:625-8, 1985.
45. OHKI Y, HEISSIG B, SATO Y, AKIYAMA H, ZHU Z, HICKLIN DJ et al.: Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J* 19:2005-7, 2005.
46. POCOCK JM; LIDDLE AC: Microglial signalling cascades in neurodegenerative diseases. *Progr Brain Res* 132: 555-65, 2001.
47. REYNOLDS BA, WEISS S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-10, 1992.
48. RUIZ MA, ARDITO RV, PIRON-RUIZ L, LAGO MR, BUENO V: Células-tronco hematopoiéticas: uma nova era na terapia das cardiopatias. *Reblampa* 18:50-5, 2005.
49. SAKAI T, JOHNSON KJ, MUROZONO M, SAKAI K, MAGNUSON MA, CRONBERG T et al.: Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* 7:324-30, 2001.
50. SCHABITZ WR, KOLLMAR R, SCHWANINGER M, JUETTLER E, BARDUTZKY J, SCHOLZKE MN et al.: Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 34:745-51, 2003.
51. SCHABITZ WR, FISHER M: Perspectives on neuroprotective stroke therapy. *Bioch Soc Trans* 34:1271-6, 2006.
52. SCHNEIDER A, KUHN HG, SCHABITZ WR: A role of G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle* 4:1753-57, 2005.
53. SCHNEIDER A, KRUGER C, STEIGLEDER T et al.: The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Inv* 115:2083-98, 2005.
54. SCHNEIDER A, WYSOCKI R, PITZER C, KRUGER C, LAAGE R, SCHWAB S et al.: An extended window of opportunity for G-CSF treatment in cerebral ischemia. *BMC Biol* 4:36, 2006.
55. SCHWINDT TT, BARNABÉ GF, MELL LEAM: Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *J Bras Neurocirurg* 16:13-9, 2005.
56. SHERIDAN WP, MORSTYN G, WOLF M, DODDS A, LUSK J, MAHER D et al.: Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 2:891-5, 1989.
57. SHYU WC, LIN SZ, YABG HI, TZENG YS, PANG CY, YEN PS, LI H: Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 110:1847-54, 2004.
58. SHYU WC, LIN SZ, LEE CC, LIU DD, LI H: Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ* 174:927-33, 2006.
59. SIX I, GASAN G, MURA E, BORDET R: Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 458:327-8, 2003.
60. SPRIGG N, BATH P, ZHAO L, WILLMOT MR, GRAY LJ, WALKER MF et al.: Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke. *Stroke* 37:2979-83, 2006.
61. SQUADRITO F, ALTAVILLA D, SQUADRITO G, CAMPO GM, LOCULANO M, AMMEDOLIA L et al.: The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 120:333-9, 1997.
62. STROKE THERAPY ACADEMIC INDUSTRY ROUNDTABLE: Recommendations for standards regarding pre-clinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30:2752-8, 1999.
63. TAKAGI Y, OMURA T, YOSHIYAMA M, MATSUMOTO R, ENOMOTO S, KSUYAMA T et al.: Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia. *J Pharmacol Sci* 99:45-51, 2005.
64. THORED P, ARVIDSSON A, CACCI E, AHLENIUS H, KALLUR T et al.: Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-47, 2006.
65. VALLIERES L, CAMPBELL IL, GAGE FH, SAWCHENKO PE: Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci* 22:486-92, 2002.
66. WELTE K, PLATZER E, LU L, GABRILOVE JL, LEVI E, MERTELSMANN R, MOORE MA: Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 82: 1526-30, 1985.
67. ZHAO Y, LUO Y-M, QIAO J, XIAO B-G, LU CZ: Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Research* 1098:161-9, 2006.

*Original recebido em outubro de 2007*

*Aceito para publicação em maio de 2008*

### **Endereço para correspondência**

*Angelo L. Maset*

*Av. Anísio Haddad, 7700, Bl- G- Lt 5*

*15093-000 – São José do Rio Preto, SP, Brasil*

*E-mail: maset@terra.com.br*