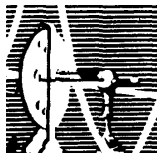


# **Maíra Rezende Lima**

Efeito do tratamento com a fração mononuclear da medula óssea na recuperação funcional e na expressão de marcadores de neuroplasticidade em modelo de isquemia cerebral focal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

**Efeito do tratamento com a fração mononuclear  
da medula óssea na recuperação funcional e na  
expressão de marcadores de neuroplasticidade  
em modelo de isquemia cerebral focal**

Maíra Rezende Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas (Biofísica), IBCCF, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica)

Orientadora: Dra. Rosalia Mendez Otero

Co-orientador: Dr. Arthur Giraldi Guimarães

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2008

**LIMA, MAÍRA REZENDE**

Efeito do tratamento com a fração mononuclear da medula óssea na recuperação funcional e na expressão de marcadores de neuroplasticidade em modelo de isquemia cerebral focal

Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2008

Orientadora: Rosalia Mendez Otero

Co-orientador: Arthur Giraldi Guimarães

Dissertação de Mestrado - UFRJ/ IBCCF/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2008.

Referências Bibliográficas: f. 75-87

1) Acidente vascular encefálico

3) GAP-43

5) Testes sensorimotores

2) Células de medula óssea

4) sinaptofisina

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, do programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Dra. Rosalia Mendez Otero e sob a co-orientação do Dr. Arthur Giraldi Guimarães, com o apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Programa de Terapia Celular (PROTECEL)

Dedico esta tese ao meu avô  
Sylvio Rezende Guimarães e às  
minhas tias-avós Eurídice Caroli e  
Edith Guimarães. Eu sempre vou  
amar vocês. Estou com  
saudades.

## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram e me incentivaram nos momentos em que mais precisei. Agradeço também ao meu irmão pela paciência e pelo apoio moral em todas as horas. À minha avó também sou grata pelo carinho, pela preocupação e pelas conversas sempre agradáveis de fim de tarde. À Rose eu agradeço a paciência e o carinho, fundamentais ao longo de toda essa jornada. E finalmente, agradeço ao meu avô querido por ter sido tão amoroso e por ter me alegrado sempre com seu bom humor. Onde quer que você esteja, saiba que eu o amo muito e que penso em você todos os dias com carinho.

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Rosalia Mendez Otero pela paciência, compreensão e carinho. Estarei sempre grata por me permitir trabalhar em um projeto tão interessante. Também agradeço ao meu co-orientador Arthur Giraldo Guimarães pela extrema paciência e bom humor durante todo o processo e por ter me ensinado toda a parte prática deste trabalho.

À Dra. Léa Mirian, agradeço pela ajuda no experimento com o tecnécio. Agradeço ainda ao Fernando, por ter me auxiliado com as isquemias, à Denise pela ajuda durante o aprendizado da parte prática e à Catarina pelo auxílio na sala de cultura. Por fim, agradeço ao Brian e ao Ricardo por terem me ajudado, e muito, a realizar todos os *Blottings* e ao prof. Marcelo Felipe Santiago pela paciência e pela ajuda nas questões práticas do laboratório.

Gostaria de enfatizar a importância de todos os colegas do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, como Louise, Virgínia, Victor, Mariana, Fernanda, Jasmin, Florian, Mônica, Pedro, Isis, Marcella, Camila, Jason, Andréia Michelle e Ana Carolina, pois além de terem contribuído de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, também ajudaram pelo convívio agradável e pela amizade.

Agradeço também ao Felipe pelos cuidados com o laboratório e também pelo carinho e amizade.

Enfim, meus agradecimentos se estendem a todos os que me apoiaram de alguma forma para que eu pudesse concluir esta tese.

Estudos em modelos experimentais de Acidente Vascular Encefálico (AVE) demonstram que as regiões que cercam a lesão sofrem mudanças funcionais e estruturais. Essa plasticidade induzida pela isquemia é considerada um possível alvo de intervenção terapêutica. Recentes estudos têm demonstrado o potencial terapêutico das células-tronco para tratar doenças neurovasculares. Acredita-se que o principal mecanismo de ação destas células esteja relacionado à liberação de fatores tróficos e de crescimento, amplificando ou facilitando os mecanismos de regeneração. No presente estudo, foi utilizado o modelo de isquemia focal por termocoagulação dos vasos do córtex sensorimotor em ratos adultos *Wistar* para se estudar os efeitos da infusão intravenosa de células mononucleares da medula óssea na recuperação funcional e na plasticidade induzida pela isquemia. A injeção de células (grupo experimental) ou salina (grupo controle) pela veia femoral foi realizada 1 dia após a isquemia e os animais foram sacrificados 7 ou 30 dias após a isquemia. A região periférica (que inclui principalmente o córtex cingular) e o córtex contralateral homólogo à lesão foram dissecados e usados para análise da expressão das proteínas GAP-43 (7 dias pós-isquemia) e sinaptofisina (30 dias pós-isquemia). A GAP-43 está presente principalmente em cones de crescimento axonais e a sinaptofisina é encontrada nas vesículas pré-sinápticas. Os testes sensorimotores foram executados nos animais que sobreviveram 30 dias após a isquemia. Não houve diferença significativa na expressão dos marcadores GAP-43 e sinaptofisina, entre o grupo experimental e o controle. No entanto, foi observada diminuição da expressão da proteína GAP-43 na periferia da lesão, induzida pela isquemia. O aumento significativo da recuperação funcional após o tratamento com as células mononucleares da medula óssea, de acordo com o teste do cilindro, indica que este tratamento apresenta efeito terapêutico. Essa recuperação pode ser atribuída a modificações estruturais e funcionais no sistema nervoso que não estejam diretamente relacionadas à expressão das proteínas GAP-43 e sinaptofisina, podendo envolver outras regiões além da periferia da lesão.



Studies in experimental models of stroke demonstrate that regions surrounding the injury suffer functional and structural changes. This stroke-induced plasticity is considered a possible target of therapeutical intervention. Recent studies have demonstrated the therapeutical potential of stem cells to treat neurovascular diseases. One of the main mechanism of action of these cells is related to the release of trophic and growth factors, amplifying or facilitating the regeneration mechanisms. In the present study, we used a rat model of focal ischemia of the sensorimotor cortex to study the effects of the intravenous infusion of bone marrow mononuclear cells in the functional recovery and in the plasticity induced by ischemia. Adult Wistar rats were submitted to unilateral ischemia of the sensorimotor cortex by the thermocoagulation method. The injection of cells (experimental group) or saline (control group) by femoral vein was carried through 1 day after ischemia and the animals were sacrificed 7 or 30 days after the ischemia. The peripheral region (that includes mainly the cingular cortex) and the homologous contralateral cortex to the injury were dissected and used to perform analysis of the expression of the proteins GAP-43 (7 days after ischemia) and synaptophysin (30 days after ischemia). GAP-43 is mainly present in axonal growth cones and synaptophysin is found in the pre-synaptic vesicles. Behavioral tests were executed in the animals that survived 30 days the after ischemia. There wasn't significant difference in the expression of the markers GAP-43 and synaptophysin between the experimental and control groups. However, it was observed an ischemia-induced reduction of the expression of GAP-43 in the periphery of the injury. The significant increase of the functional recovery after the treatment with the mononuclear cells from bone marrow, in accordance with the test of the cylinder, indicates that this treatment presents therapeutical effect. This recovery can be attributed to structural and functional modifications in the nervous system that is not directly related to the expression of the proteins GAP-43 and synaptophysin, being able to involve other regions beyond the periphery of the injury.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- **AVE** → Acidente vascular encefálico
- **ATP** → Adenosina 5'-trifosfato
- **BHE** → Barreira hemato-encefálica
- **VCAM-1** → Moléculas de adesão das células vasculares 1 (do inglês: *vascular cell adhesion molecule-1*). O mesmo que CD106.
- **ICAM-1** → Moléculas de adesão intracelular 1 (do inglês: *intercellular adhesion molecule-1*)
- **TGF- $\beta$**  → Fator de crescimento de transformação  $\beta$  (do inglês: *transforming growth factor  $\beta$* )
- **IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11** → Interleucinas 1, 7, 8, 10 e 11
- **TNF- $\alpha$**  → Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (do inglês: *tumor necrosis factor  $\alpha$* )
- **VEGF** → Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: *vascular endothelial growth factor*)
- **LTP** → Potenciação de longa duração (do inglês: *long-term potentiation*)
- **GABA** → Ácido gama-aminobutírico (do inglês: *gamma-amino butyric acid*)
- **NMDA** → N-metil-D-aspartato (do inglês: *N-methyl-D-aspartic acid*)
- **GAP-43** → Proteína associada a crescimento de 43kDa (do inglês: *growth associated protein 43*). O mesmo que neuromodulina, B-50 e pp-46.
- **BDA** → Amina de dextrana biotinizada (do inglês *biotinylated dextran amine*)
- **RNA<sub>m</sub>** → Ácido ribonucléico mensageiro
- **ES** → Células-tronco embrionárias (do inglês: *embryonic stem cells*)
- **HSC** → Células-tronco hematopoiéticas (do inglês: *hematopoietic stem cells*)
- **MSC** → Células-tronco mesenquimais (do inglês: *mesenchymal stem cells*)
- **EPC** → Células progeitoras endoteliais (do inglês: *endothelial progenitor cell*)
- **ACM** → Artéria cerebral média

- **rTPA** → Ativador do plasminogênio recombinante (do inglês: *recombinant tissue-plasminogen activator*)
- **G-CSF** → Fator estimulante de colônia de granulócitos (do inglês: *granulocyte colony-stimulating factor*)
- **GDNF** → Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês: *glial cell derived neurotrophic factor*)
- **BDNF** → Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*)
- **NGF** → Fator de crescimento neural (do inglês: *neural growth factor*)
- **EGF** → Fator de crescimento epidermal (do inglês: *epidermal growth factor*)
- **FGF-2** → Fator de crescimento de fibroblasto 2 (do inglês: *fibroblast growth factor 2*)
- **SCF** → Fator derivado de células-tronco (do inglês: *stem cell factor*)
- **TTC** → Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (do inglês: *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*)
- **DMEM** → Meio de cultura celular Dulbecco (do inglês: *Dulbecco's modified eagle medium*)
- **PBS** → Salina tamponada com fosfato (do inglês: *phosphate buffered saline*)
- **Tris** → Do inglês: *trishydroxymethylaminomethane*
- **EDTA** → Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês: *ethylenediamine tetra-acetic acid*)
- **BSA** → Albumina do soro bovino (do inglês: *bovine serum albumine*)
- **SDS** → Dodecil sulfato de sódio (do inglês: *sodium dodecyl sulfate*)
- **ECL** → Quimiluminescência gerada eletroquimicamente (do inglês: *electrogenerated chemiluminescence*)
- **CMMO** → Células mononucleares da medula óssea
- **ANOVA** → Análise de variância paramétrica
- **TTX** → Tetrodotoxina (do inglês: *tetrodotoxin*)

- **MAP2** → Proteína associada ao microtúbulo 2 (do inglês: *microtubule-associated protein 2*)
- **fMRI** → Imagem por ressonância magnética funcional (do inglês: *functional magnetic resonance imaging*)

1.0. INTRODUÇÃO.....	1
1.01. Acidente vascular encefálico (AVE).....	1
1.02. Alterações fisiológicas e anatômicas provocadas pelo AVE.....	1
1.03. A proteína GAP-43 como marcador de crescimento axonal.....	5
1.04. A proteína sinaptofisina como marcador de novas sinapses.....	7
1.05. Modelos animais de AVE isquêmico.....	9
1.06. Terapias para o AVE.....	10
1.07. Células-tronco.....	14
1.08. Células-tronco de medula óssea.....	16
1.09. Córtex cerebral e controle central do movimento.....	20
1.10. Córtex sensorimotor de ratos.....	23
2.0. OBJETIVOS.....	25
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.01. Animais.....	26
3.02. Isquemia focal - Termocoagulação unilateral dos vasos do córtex sensorimotor.....	26
3.03. Reação histoquímica com cloreto de trifetil tetrazólio (TTC).....	28
3.04. Isolamento das CMMO.....	29
3.05. Injeção das CMMO.....	30
3.06. Testes sensorimotORES.....	32
3.07. Extração e dosagem de proteínas.....	36
3.08. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	37
3.09. Análise da expressão proteica.....	37

3.10. Quantificação da expressão de GAP-43 e sinaptofisina.....	38
4.0. RESULTADOS.....	40
4.01. Extensão da lesão: reação histoquímica com TTC.....	40
4.02. Determinação da via intravenosa ideal para administração das CMMO.....	41
4.03. Teste do cilindro.....	43
4.04. <i>Beam test</i> .....	45
4.05. Teste do adesivo.....	49
4.06. Análise da expressão da proteína sinaptofisina.....	51
4.07. Análise da expressão da proteína GAP-43.....	54
5.0. DISCUSSÃO.....	59
6.0. CONCLUSÕES.....	74
7.0. BIBLIOGRAFIA.....	75

## **1.0. INTRODUÇÃO**

### **1.01. Acidente vascular encefálico (AVE)**

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das maiores causas de morte e incapacitação de adultos no mundo. Nos EUA, aproximadamente 700.000 pessoas sofrem essa injúria a cada ano (Dickerson e cols., 2007). No Brasil, só em 2002, houve 87.344 mortes em consequência do AVE, estando esta doença entre as primeiras causas de mortalidade (Lotufo, 2005). Cerca de 70% dos pacientes que sofrem um AVE sobrevivem e as seqüelas resultantes dependem da duração do insulto, da magnitude da lesão e das regiões encefálicas acometidas, podendo abranger alterações motoras, sensitivas, de comportamento e/ou cognitivas (Dobkin, 2005).

O AVE se caracteriza por um distúrbio da circulação sangüínea para o tecido encefálico. Estima-se que cerca de 80% dos casos de AVE sejam causados pelo bloqueio ou pela diminuição do fluxo sangüíneo arterial (AVE isquêmico) e 20% ocorram pelo rompimento de um vaso (AVE hemorrágico).

### **1.02. Alterações fisiológicas e anatômicas provocadas pelo AVE**

Logo após o AVE, a diminuição do fluxo sangüíneo leva a alterações metabólicas devido à falta de suporte de oxigênio e glicose para as células na região afetada. Assim, há uma subseqüente diminuição dos níveis de ATP, alterações iônicas, excitotoxicidade, estresse oxidativo, resposta inflamatória e morte celular por necrose e apoptose (Yusuf, 2002; Fisher e Ratan, 2003; Lo, 2003; Mergenthaler

e cols., 2004). Essas alterações levam à morte não só de neurônios como de astrócitos e oligodendrócitos. Dessa forma, terapias para o AVE devem visar não só a recuperação dos circuitos neuronais perdidos como a recuperação das células gliais que ajudam a manter esses circuitos em funcionamento.

A oclusão de uma artéria cerebral, como a artéria cerebral média, leva a uma isquemia focal, onde a lesão fica delimitada à região do encéfalo irrigada por aquela artéria. Assim, há um centro na lesão onde o fluxo sanguíneo é praticamente nulo, e uma região na periferia da lesão, onde existe uma irrigação colateral, restando algum fluxo. Essa região é denominada penumbra isquêmica (Hakim, 1987).

Os AVEs isquêmicos focais induzem a morte de células nervosas e promovem tanto um distúrbio local da barreira hemato-encefálica (BHE) como uma resposta inflamatória no sítio da lesão (Mark e Davis, 2001). A BHE é composta por uma monocamada de células endoteliais, astrócitos, pericitos, macrófagos perivasculares e pela lâmina basal, que limitam o movimento de pequenas moléculas polares e de macromoléculas entre o sangue e o fluido intersticial do cérebro. A natureza restritiva da BHE é atribuída à falta de fenestrações, à reduzida atividade pinocítica e à presença de junções oclusivas (em inglês, "tight junctions") entre as células endoteliais (De Vries e cols., 1997; Kniesel e Wolburg, 2000).

Esta BHE é primordial para garantir a homeostase no sistema nervoso central; porém, ela é vulnerável à injúria. As células que compõem a BHE são bastante sensíveis à hipóxia e, durante uma isquemia cerebral, elas podem sofrer alterações estruturais e distúrbios funcionais. Por exemplo, as junções oclusivas entre as células endoteliais apresentam uma disfunção no sítio onde ocorreu a isquemia, o que geralmente causa aumento da permeabilidade microvascular e edema (De Vries e cols., 1997). Além disso, há um aumento da expressão de



moléculas de adesão como a VCAM-1 e a ICAM-1 na superfície luminal do endotélio vascular, principalmente ao nível das vênulas. Isto facilita a adesão de diversos tipos celulares à parede luminal deste endotélio, especialmente células inflamatórias e progenitoras circulantes. Pode ocorrer, posteriormente, a migração destas células para o parênquima cerebral na fase aguda da lesão (Iadecola e Alexander, 2001; Emerich e cols., 2002; Schilling e cols., 2003).

Diversos tipos celulares, como os macrófagos periféricos e os residentes no parênquima cerebral (microglia), ficam ativados e são atraídos por diversas substâncias liberadas no sítio de lesão (Schilling e cols., 2003). Eles fagocitam células mortas e seus fragmentos e também podem liberar diferentes moléculas anti-inflamatórias, por exemplo, TGF- $\beta$  e IL-10 (Aloisi, 2001). Alguns fatores tróficos e mediadores vasoativos liberados por estas células são importantes para neuroproteção e para promover maior proliferação celular no local da lesão. Apesar da liberação de agentes anti-inflamatórios, estas células também secretam fatores pró-inflamatórios, como IL-1 e TNF- $\alpha$ .

Após a isquemia, ocorre a formação de cicatriz glial na periferia da lesão. Os neurônios danificados inicialmente interagem com os astrócitos adjacentes, que se proliferam e rapidamente cercam a região de infarto, separando o tecido necrosado do sadio e, conseqüentemente, evitando o crescimento da lesão (Li e cols., 2005). Os astrócitos ativados também podem liberar TGF- $\beta$  e um importante fator angiogênico, o VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), o qual será importante na formação de novos vasos no sítio da isquemia (Salhia e cols., 2000). O VEGF também tem sido descrito como estimulador de neurogênese, uma vez que existem receptores de VEGF em células-tronco neurais *in vivo* e *in vitro* (Jin e cols., 2002; Sun e cols., 2003; Maurer e cols., 2003). Além disto, estudos recentes

mostram que o VEGF tem um efeito neuroprotetor, atuando sobre seus receptores específicos, nos neurônios (Le Bras e cols., 2006; Pasinelli e Brown, 2006; Storkebaum e cols., 2005; Kilic e cols., 2006; Lambrechts e Carmeliet, 2006). No entanto, a gliose também consiste em uma barreira física e bioquímica para a regeneração de axônios. Os oligodendrócitos, por outro lado, também agem na área afetada, produzindo moléculas de adesão (ex: proteína Nogo) que inibem o crescimento axonal e a recuperação da área danificada (Li e cols., 2005).

Observações em pacientes de AVE e em modelos animais demonstram que a isquemia produz mudanças na distribuição e lateralidade das representações sensoriais e motoras, que estão relacionadas à recuperação funcional (Cramer e Chopp, 2000; Schaechter e cols., 2006). Assim, após a isquemia são observadas importantes alterações fisiológicas de longa duração em regiões próximas à lesão e em regiões distantes, mas que mantêm contatos sinápticos com a região infartada. Dentre essas alterações, podemos citar o aumento do nível basal de excitabilidade neuronal (facilitação da LTP - do inglês *long-term potentiation*) em regiões adjacentes ao infarto, a diminuição dos potenciais pós-sinápticos inibitórios e o aumento dos potenciais pós-sinápticos excitatórios gerados por conexões que inervam a área infartada, e finalmente a diminuição das conexões inibitórias vindas de regiões adjacentes e de áreas localizadas no hemisfério oposto ao infarto (Neumann-Haefelin e cols., 1995; Buchkremer-Ratzmann e Witte, 1997; Hagemann e cols., 1998; Carmichael, 2003). Estas modificações fisiológicas estão relacionadas à diminuição da expressão do receptor inibitório GABA<sub>a</sub> e ao aumento da expressão do receptor de NMDA nas regiões adjacentes e nas regiões conectadas localizadas no hemisfério oposto (Carmichael, 2003).

Acredita-se que as alterações funcionais induzidas pela isquemia estejam diretamente relacionadas com o crescimento axonal e o surgimento de novos contatos sinápticos. Estudos com marcadores de cones de crescimento, como a GAP-43 (do inglês *growth-associated protein 43*), e com marcadores de vesículas pré-sinápticas, como a sinaptofisina, vêm confirmando esta hipótese (Carmichael, 2003). Estudos com traçadores moleculares anterógrados, como o BDA (do inglês *biotinylated dextran amine*), que permite a visualização dos terminais axonais, também mostram que a isquemia induz o aparecimento de um grande número de novos terminais axonais tanto na região adjacente à lesão quanto no estriado ipsilateral. Estas projeções seriam provenientes do hemisfério contralateral à lesão, no qual foi injetado o traçador (Carmichael e cols., 2001; Carmichael e Chesselet, 2002).

### **1.03. A proteína GAP- 43 como um marcador de crescimento axonal**

A GAP-43 (do inglês *growth associated protein*, com peso molecular de 43KDa), também conhecida como neuromodulina, é uma fosfoproteína de membrana importante nos eventos de sinalização celular para a modificação do citoesqueleto de actina (Carmichael, 2003). A ligação da GAP-43 na face citoplasmática da membrana ocorre por interação com regiões hidrofóbicas do N-terminal. Esta proteína é um dos principais substratos da proteína quinase C em neurônios e a sua fosforilação parece ser importante para o crescimento axonal (Benowitz e Routtenberg, 1997).

No sistema nervoso central, a proteína GAP-43 é primeiramente detectada quando os neurônios completam sua divisão celular final. No neocórtex e na

formação hipocampal de ratos, altos níveis de expressão de GAP-43 são observados nas duas primeiras semanas pós-natais, coincidindo com o período de brotamento dos terminais axonais e formação de sinapses (Holtmaat e cols., 1995). As células neuronais de indivíduos adultos apresentam, em condições normais, baixos níveis de GAP-43, se comparados aos indivíduos em desenvolvimento (Stroemer e cols., 1995). Os níveis de GAP-43 são geralmente mais altos nos cones de crescimento.

Apesar dos níveis do RNAm e da proteína decaírem após o nascimento na maior parte do encéfalo, algumas populações de neurônios continuam a expressar altos níveis de GAP-43 constitutivamente (Dani e cols., 1991). A presença da proteína em regiões do sistema límbico, por exemplo, sugere o seu envolvimento na capacidade dos neurônios de continuarem a sofrer mudanças estruturais e funcionais relacionadas ao armazenamento de informações (Benowitz e Routtenberg, 1997).

Estudos mostram que a superexpressão de GAP-43 induz o crescimento de projeções neuronais aberrantes. Assim, a proteína parece permitir o brotamento de novos terminais mesmo na ausência de fatores tróficos. Mesmo em células não-neuronais, a expressão do transgene para GAP-43 induz o crescimento de prolongamentos com conseqüente reorganização do citoesqueleto (Verhaagen e cols., 1994). Camundongos que não possuem um *exon* do gene que codifica a proteína GAP-43 apresentam defeitos nas vias axonais e a maioria morre logo após o nascimento (Strittmatter e cols., 1995).

O aumento da expressão de GAP-43 também aumenta o brotamento axonal após lesões no sistema nervoso, como a isquemia (Carmichael, 2003). Stroemer e colaboradores (1993) mostraram que uma lesão isquêmica provocada pela oclusão

da artéria cerebral média induziu o aumento significativo da expressão da proteína GAP-43 na periferia da lesão e um aumento menor no córtex contralateral homólogo. A expressão da proteína também é observada em situações em que os neurônios são inseridos no ambiente permissivo do sistema nervoso periférico, podendo, assim, regenerar os axônios danificados.

Logo, a proteína GAP-43 é considerada um marcador de crescimento axonal, ou seja, o aumento da expressão desta proteína após uma lesão é um indício de que o axônio está em processo regenerativo. No entanto, para se obter conclusões definitivas de que ocorre crescimento axonal após a isquemia, são necessárias análises ultraestruturais e o traçamento das conexões no córtex adjacente ao infarto e em áreas que mantinham conexões com a área infartada. Isso porque a GAP-43 poderia também atuar de outras formas na célula nervosa, como através da indução de LTP (Benowitz e Routtenberg, 1997; Carmichael, 2003)

#### **1.04. A proteína sinaptofisina como um marcador de novas sinapses**

Inicialmente denominada p38, a sinaptofisina (38 kDa) é uma glicoproteína integral de membrana encontrada em vesículas neurosecretórias pequenas, como as vesículas pré-sinápticas (Jahn e cols, 1985; Leube e cols, 1987). Foi demonstrado que a sinaptofisina compõe aproximadamente 8% do total de proteínas na vesícula sináptica (Evans e Cousin, 2005). Esta também pode ser encontrada em vesículas de diversas células neuroendócrinas de fenótipo tanto neuronal quanto epitelial, sendo útil para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos (Leube e cols, 1987). A sinaptofisina é uma proteína estável ao longo da evolução, estando presente em diversas espécies de vertebrados (Wiedenmann e Franke, 1985). O

aumento da expressão de sinaptofisina está diretamente relacionado ao aumento do número de sinapses em uma determinada região como, por exemplo, na periferia de uma lesão cortical (Stroemer e cols., 1992).

Através da análise da seqüência de aminoácidos, determinou-se que a molécula de sinaptofisina atravessa a membrana 4 vezes, possuindo os terminais N e C voltados para a superfície citoplasmática. Verificou-se também que a região carboxi-terminal contém um sítio de ligação ao  $Ca^{2+}$  e uma seqüência antigênica reconhecida pelo anticorpo monoclonal SY38 (Wiedenmann e Franke, 1985; Leube e cols., 1987; Knaus e Betz, 1990). A sinaptofisina é altamente fosforilada por tirosina-quinases, sugerindo que sua fosforilação é fundamental para a sua função (Evans e Cousin, 2005).

A exata função da sinaptofisina é ainda desconhecida, mas acredita-se que ela atue na formação da vesícula sináptica e/ou no processo de exocitose (Hanaya e cols., 2007). No entanto, quando o gene da sinaptofisina foi experimentalmente inativado em animais, estes não apresentaram defeitos óbvios na liberação de neurotransmissores. Essa observação foi atribuída a uma possível redundância com outras isoformas da sinaptofisina, como a sinaptofisina II e/ou sinaptogirina. De fato, camundongos *Knockout* para sinaptofisina e sinaptogirina apresentaram deficiências, apesar da liberação de neurotransmissores permanecer normal. Curiosamente, nos terminais nervosos, a sinaptofisina se liga principalmente à proteína integral de membrana vesicular denominada sinaptobrevina. Esta proteína tem sido recentemente relacionada à endocitose, que rapidamente reutiliza as vesículas sinápticas que acabaram de participar do processo de exocitose (Evans e Cousin, 2005).

### **1.05. Modelos animais de AVE isquêmico**

Existe uma variedade de modelos de isquemia cerebral em roedores, nos quais o principal objetivo é bloquear o suprimento sangüíneo arterial para determinada região do encéfalo, a fim de reduzir a oferta de oxigênio e glicose para o parênquima cerebral (Traystman, 2003). Os modelos são classificados de acordo com o local afetado (isquemia global ou focal) e com a duração da obstrução vascular (isquemia transitória ou permanente), sendo que na maioria dos trabalhos da literatura utiliza-se o modelo de isquemia focal, pois este tipo de isquemia ocorre mais freqüentemente em humanos.

A maioria dos modelos experimentais de isquemia cerebral focal em roedores visa obstruir a artéria cerebral média (ACM), produzindo uma área de infarto que abrange o córtex frontal e o parietal (Türeyen e cols., 2005; Ardehali e Rondouin, 2003). Existem 2 modelos principais de obstrução da ACM: o modelo de eletrocauterização (isquemia permanente descrita por Majid e cols., 2000) e o modelo do fio intraluminal (isquemia transitória), sendo este último mais complexo, porém bastante utilizado.

Outro modelo bem descrito provoca uma lesão nas seis camadas corticais, mas não do corpo caloso, através da termocoagulação com uma sonda quente (40w, 450°C-550°C) dos vasos da pia-máter, sem danificar a dura-máter, utilizando-se um aparelho estereotáxico para localizar e delimitar a área a ser lesada (Szele e cols., 1995; Napieralski e cols., 1996; Napieralski e cols., 1998; Uryu e cols., 2001; Carmichael e Chesselet, 2002; Mir e cols., 2004). As lesões por termocoagulação têm sido bastante utilizadas para estudar os efeitos neuroquímicos da degeneração das aferências córtico-estriatais. Este tipo de lesão provoca a morte dos neurônios

corticais de forma progressiva, sendo que o processo de degeneração só se completa de 5 a 7 dias após a cirurgia (Szele e cols., 1995).

Apesar de se tentar mimetizar o AVE isquêmico em diversos animais de laboratório, é importante ressaltar que, nos modelos experimentais, os animais são bem selecionados e preferencialmente jovens e saudáveis. Em contrapartida, a maioria dos pacientes que sofre AVE pertence à população idosa, com múltiplas doenças e fatores de risco associados, tais como *diabetes mellitus*, obesidade, sedentarismo, hipertensão arterial, problemas cardiovasculares, etc. Por esses motivos, os modelos de isquemia cerebral em animais, apesar de serem úteis em muitos aspectos, não reproduzem totalmente as condições fisiopatológicas encontradas em humanos (Graham e cols., 2004).

#### **1.06. Terapias para o AVE**

Hoje em dia ainda não existem terapias eficazes para a recuperação de pacientes que sofreram um AVE. Os métodos disponíveis, como os trombolíticos (rTPA: ativador do plasminogênio recombinante), só são eficazes se o paciente receber o tratamento 3 horas após o início do insulto e não podem ser administrados em pacientes com AVE hemorrágico (Fisher e Ratan, 2003; Haas e cols., 2005). Em pacientes que já tenham tido um AVE, utiliza-se a aspirina (anti-agregante plaquetário) como método de prevenção de um novo infarto (American Heart Association, 1992-2003). Considerando que no Brasil o acesso a centros de emergência ainda é lento e que ainda há muita dificuldade em reconhecer o AVE como uma emergência médica, um grande número de pacientes com AVE isquêmico chega aos hospitais com quadro agudo, porém fora da janela terapêutica



ideal para o uso do rTPA. Assim, uma nova perspectiva no tratamento do AVE isquêmico são as terapias celulares com células-tronco. O objetivo principal da utilização destas células é potencializar a neuroplasticidade e a recuperação funcional já observados após a isquemia (Cramer e Chopp, 2000; Dobkin, 2005), reduzindo, dessa forma, as seqüelas causadas pelo AVE.

Existem ainda controvérsias quanto à utilização de células-tronco embrionárias ou fetais, devido não só às questões éticas e religiosas como pelo seu potencial carcinogênico (Kan e cols., 2005). Por outro lado, as células-tronco adultas surgem como possível terapia em pacientes com AVE. As células-tronco de medula óssea tornaram-se uma excelente escolha para tratamentos terapêuticos devido à facilidade de obtenção e pela possibilidade de serem feitos transplantes autólogos nos pacientes, eliminando problemas de rejeição dessas células.

Atualmente, as pesquisas relacionadas ao AVE buscam principalmente testar a segurança e a exeqüibilidade do transplante de células (experimentos fase 1). Somente quando todos os critérios da fase 1 estão satisfeitos, iniciam-se os estudos de fase 2, onde são avaliados os efeitos terapêuticos do tratamento.

Diversos estudos fase 1 e/ou 2 recentemente realizados utilizaram o transplante intracraniano de neurônios gerados a partir de teratocarcinomas, em pacientes com lesão nos gânglios da base e deficiências motoras estabelecidas. Os pacientes não apresentaram reações adversas e alguns obtiveram recuperação motora associada ao aumento do metabolismo de glicose no tecido adjacente à lesão (Kondziolka e cols., 2000; Kondziolka e cols., 2005; Meltzer e cols., 2001).

Estudos experimentais em AVE têm sugerido que o G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) exerce efeitos neuroprotetores através de diferentes mecanismos, como a inibição da apoptose, aumento da neurogênese, da angiogênese, dos

processos anti-inflamatórios e mobilização das células-tronco hematopoiéticas (Gibson e cols., 2005; Solaroglu e cols., 2006; Schneider e cols., 2005). Foi observada recuperação funcional após a administração de G-CSF em pacientes com isquemia aguda que afetava a região da artéria cerebral média, em comparação com o grupo controle (Shyu e cols., 2006). Sprigg e colaboradores (2006) comprovaram que o G-CSF é eficaz na mobilização de células-tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> em pacientes com AVE isquêmico recente. No entanto, acredita-se que os efeitos benéficos do G-CSF estejam mais relacionados à neuroproteção do que à mobilização das células CD34<sup>+</sup>. Assim, a administração de G-CSF em pacientes que sofreram isquemia é exequível e parece ser segura e bem tolerada (Schabitz e Schneider, 2007).

Atualmente, diversos trabalhos têm mostrado que o transplante de MSCs promove o aumento da recuperação funcional em modelos animais de AVE isquêmico (Chen e cols., 2001; Chopp e Li, 2002; Li e cols., 2005; Li e cols., 2006; Shen e cols., 2006). Da mesma forma, Bang e colaboradores (2005) obtiveram resultados positivos ao analisar a exequibilidade, segurança e eficácia da infusão intravenosa de MSCs autólogas expandidas em cultura, em pacientes isquêmicos com deficiências motoras.

A terapia com MSCs apresenta, no entanto, suas desvantagens. A necessidade de proliferar essas células em cultura durante semanas para se obter o número ideal para transplante tende a tornar a terapia cara e demorada, inviável para a tratamento na fase aguda do AVE. Além disso, não se pode descartar o risco de contaminação da cultura durante o processo, o que comprometeria a segurança da terapia e conseqüentemente a saúde do paciente.

A terapia com a fração mononuclear da medula óssea, por outro lado, representa uma alternativa mais rápida e barata para o tratamento do AVE. Isso porque as células mononucleares são de fácil obtenção e não há necessidade de proliferá-las em cultura, tornando a terapia mais segura e viável em pacientes na fase aguda do AVE. O fato de a fração mononuclear conter vários tipos celulares, incluindo as MSCse hematopoiéticas e as células progenitoras endoteliais (EPCs), também favorece a sua utilização em terapias, pois esses diferentes tipos celulares poderiam interagir uns com os outros, potencializando os efeitos terapêuticos no paciente (Mendez-Otero e cols., 2007; Iihoshi e cols., 2004). Estudos recentes realizados em pacientes na fase aguda do AVE mostram que o transplante autólogo intra-arterial da fração mononuclear da medula óssea é seguro e exequível (Mendonça e cols., 2006; Correa e cols., 2005).

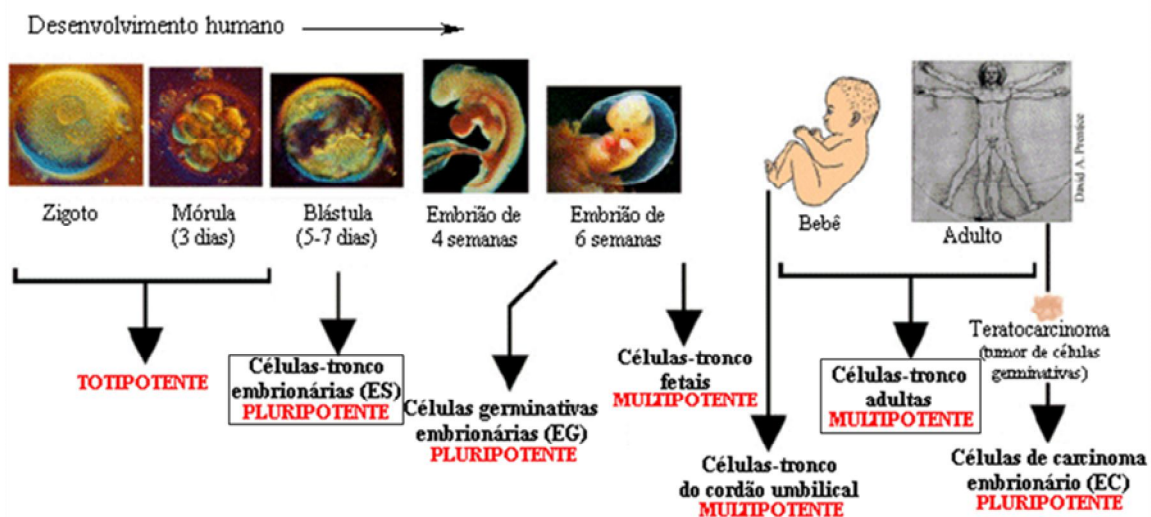
Em modelos animais de AVE isquêmico, ainda existem poucos estudos utilizando o transplante da fração mononuclear da medula óssea (Iihoshi e cols., 2004), sendo que a maioria dos trabalhos utiliza as células mesenquimais purificadas. Chopp e colaboradores, por exemplo, têm uma série de estudos publicados que relatam os benefícios do transplante das células mesenquimais em animais isquêmicos, tais como o aumento da plasticidade anatômica e o aumento da recuperação funcional, observada em testes sensorimotores (Chen e cols., 2001; Chopp e Li, 2002; Li e cols., 2005; Li e cols., 2006; Shen e cols., 2006).

Dessa forma, a capacidade das células-tronco de medula óssea em ajudar na regeneração ou na sobrevivência de células em tecidos lesados já está sendo bem demonstrada, principalmente em modelos animais. No entanto, ainda não se sabe ao certo como esse processo ocorreria a nível celular. Algumas hipóteses têm sido propostas, a primeira delas seria a diferenciação dessas células nas células do

tecido lesado. Porém, os indícios de fusão celular e a falta de análises funcionais dessas células dificultam uma resposta correta (Ying e cols., 2002). A hipótese mais aceita atualmente é a de que as células-tronco injetadas liberariam fatores tróficos e de crescimento (Rice, 2004), que atuariam no tecido, diminuindo a apoptose e/ou aumentando a neurogênese, a angiogênese (Chen e cols., 2003) e a sinaptogênese na periferia da lesão. Estudos têm demonstrado uma melhora funcional (Chen e cols., 2001; Li e cols., 2001; Iihoshi e cols., 2004) e uma diminuição da cicatriz glial (Li e cols., 2005) nos animais tratados com estas células, comparados ao grupo controle. A melhora funcional poderia ser atribuída ao papel neuroprotetor que estas células exerceriam no sítio de isquemia (Chen e cols., 2003). Dentre os fatores tróficos e de crescimento liberados pelas células-tronco de medula óssea estariam o GDNF, BDNF, NGF, EGF, FGF-2 e VEGF (Iihoshi e cols., 2004), sendo os dois últimos considerados fatores angiogênicos (Hamano e cols., 2000; Chopp e Li, 2002). O EGF, quando injetado no ventrículo lateral, demonstrou estimular a proliferação, a diferenciação e a migração das células-tronco neurais (Doetsch e cols., 2002). A capacidade das MSCs de liberarem citocinas como IL-7, IL-8, IL-11 e SCF também já foi demonstrada (Prockop, 1997).

### **1.07. Células-tronco**

As células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de se auto-renovar e se diferenciar em múltiplas linhagens. As células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (Figura 1).



**Figura 1: Diferentes tipos de células-tronco encontrados ao longo da vida do indivíduo.** O zigoto e as células da mórula são totipotentes; as células ES, as células germinativas embrionárias e de carcinoma embrionário são pluripotentes; as células-tronco adultas, fetais e de cordão umbilical são multipotentes. As células-tronco adultas e as células ES estão entre as mais pesquisadas atualmente.

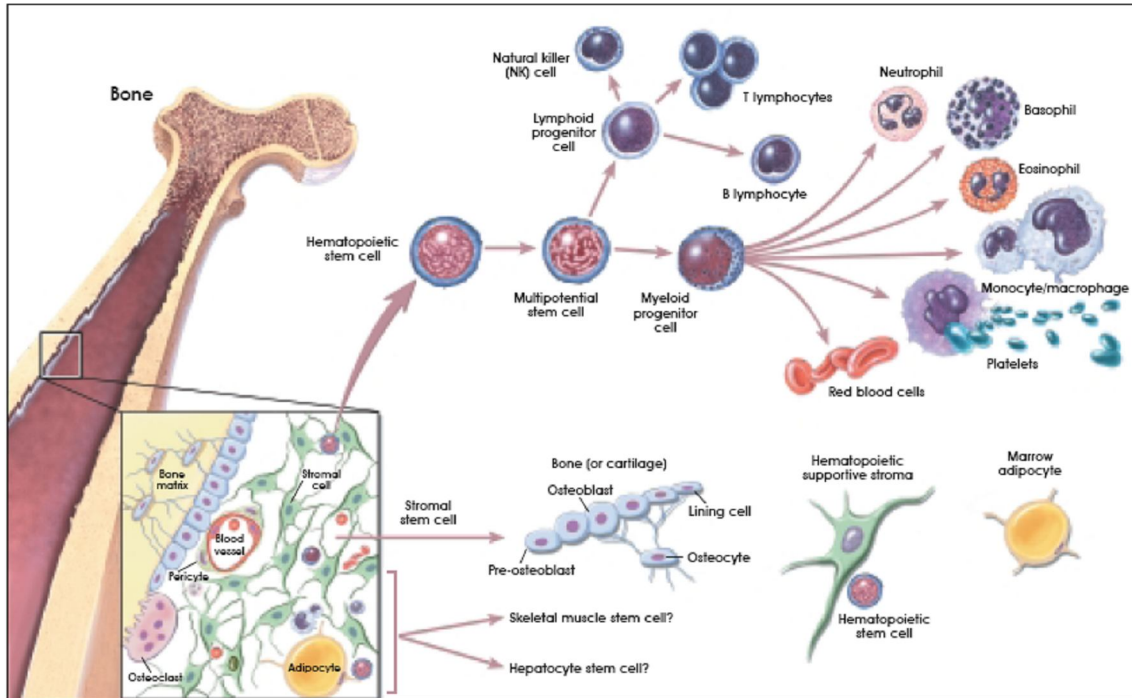
O zigoto é a célula-tronco totipotente, sendo capaz de gerar todas as células do organismo, além das células que sustentam o desenvolvimento do embrião no útero. Em humanos, quatro ou cinco dias após a fecundação forma-se o blastocisto, composto pelo trofoblasto e pela massa celular interna. A partir da massa celular interna são obtidas as chamadas células-tronco embrionárias (ES, do inglês *embryonic stem*), de caráter pluripotente, capazes de gerar células dos três folhetos embrionários – endoderma, mesoderma e ectoderma. Células-tronco pluripotentes podem ser obtidas, também, a partir de teratocarcinomas e de células germinativas embrionárias. Estas últimas se diferenciam das células ES por se manterem por menos tempo em cultura, mas são interessantes em possíveis terapias celulares porque apresentam menor potencial teratocarcinogênico (Shamblott e cols., 2001).

As células-tronco adultas são classificadas como multipotentes, pois só são capazes de gerar os tipos celulares do tecido com o qual estão comprometidas. Essas células, em geral, dão origem por divisão assimétrica a uma outra célula-tronco adulta e a uma célula progenitora que, por sua vez, dá origem a uma célula madura diferenciada. As células-tronco adultas existem durante a vida embrionária e permanecem no organismo adulto, onde participam da regeneração e do reparo tecidual. Assim, a sua função primordial parece ser a de manter a homeostase do tecido, substituindo células mortas em lesões ou doenças (Kan e cols., 2005).

As células-tronco adultas são bastante raras, difíceis de se identificar, isolar e purificar. Apesar disso, o fato destas células não formarem teratocarcinomas espontaneamente facilita a sua utilização em terapias celulares visando à regeneração de órgãos e tecidos lesados (Kan e cols., 2005).

#### **1.08. Células-tronco de medula óssea**

A medula óssea possui duas populações de células-tronco que co-existem de maneira funcionalmente interdependente: as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco de estroma da medula óssea. Estas duas populações estão representadas na Figura 2.



**Figura 2: Células-tronco presentes na medula óssea.** As células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são responsáveis pela formação de toda a linhagem hematopoiética, dando origem aos progenitores mielóides e linfóides e, conseqüentemente, a linfócitos, neutrófilos, basófilos, hemácias, plaquetas e demais células sanguíneas. As células-tronco do estroma, por sua vez, são capazes de formar condroblastos, osteoblastos, células endoteliais e adipócitos. Retirado de *The National Institutes of Health*, 2001.

As células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são obtidas normalmente da medula óssea, mas podem ser encontradas também no sangue periférico, no cordão umbilical, na placenta, no fígado fetal e no baço, porém, em uma proporção muito menor. Experimentos de rastreamento das HSCs mostraram que elas são móveis, voltando periodicamente para a medula óssea (Fuchs e Segre, 2000).

Recentemente tem sido estudada a utilização de HSCs do sangue de cordão umbilical, uma vez que transplantes de células de cordão umbilical podem reverter o quadro de algumas doenças sanguíneas ou até genéticas em recém-nascidos (Laughlin, 2001; Escolar e cols., 2005), comprovando o grande potencial terapêutico

dessas células. Entretanto, a quantidade de células obtidas a partir de um cordão é insuficiente para se utilizar em pacientes adultos.

As HSCs são as mais bem caracterizadas dentre as células-tronco de medula óssea e são capazes de dar origem a toda a linhagem linfóide e mielóide, incluindo hemácias, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plaquetas. O crescimento e a diferenciação das HSCs são governados por uma série de fatores ambientais, incluindo citocinas, quimiocinas e componentes da matriz extracelular. Condições particulares fazem com que uma linhagem seja aumentada e outra reduzida, de forma a manter a homeostase.

Na medula óssea, existem duas populações de HSCs: uma população quiescente e uma população ativa, em proliferação. A população quiescente representa quase 75% das HSCs na medula normal (Cheshier e cols., 1999). Quando estimuladas a proliferarem através de drogas que alteram o ciclo celular, as HSCs quiescentes são mobilizadas para o sangue, sugerindo que alterações no ambiente hematopoiético levam a uma alteração do estado de célula-tronco quiescente para célula-tronco proliferante (Wright e cols., 2001).

As células-tronco de estroma da medula óssea, por sua vez, são descritas como células clonais, com morfologia de fibroblasto, aderentes ao plástico e capazes de se diferenciar em diversas células não-hematopoiéticas, tais como adipócitos, condrócitos, células endoteliais de músculo liso e células ósseas (Savitz e cols., 2002; Short e cols., 2003).

Termo derivado do grego, “estroma” significa tecido conjuntivo de suporte associado a um tecido funcional dominante. Desta forma, o estroma de medula óssea é um tecido cuja principal função é criar um microambiente dentro da medula óssea capaz de dar suporte à proliferação, diferenciação e maturação das HSCs



(Short e cols., 2003). Este microambiente contém moléculas regulatórias e permite interações entre as células e a matriz extracelular.

Como as células-tronco do estroma da medula óssea são pouco estudadas *in vivo*, a maior parte das informações que se tem atualmente deriva de estudos *in vitro*, onde estas células recebem o nome de “mesenquimais”. De maneira geral, as células da medula óssea são separadas por centrifugação em gradiente de densidade descontínuo e plaqueadas em placas aderentes. Com o tempo em cultura, as células hematopoiéticas, não aderentes, são lavadas e as células mesenquimais formam uma monocamada com morfologia de fibroblastos (Gregory e cols., 2005). Como as células-tronco mesenquimais (MSCs) são facilmente expandidas em cultura e são capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens, há grande interesse na utilização destas células em terapias celulares.

As MSCs podem ser encontradas não só na medula óssea, mas também em áreas como o tecido adiposo, o pulmão fetal e o músculo esquelético (Abedin e cols., 2004; Barry e Murphy, 2004). Na verdade, estudos recentes mostram que é possível isolar células mesenquimais de quase todos os tecidos do corpo. A hipótese de que as MSCs seriam o mesmo tipo celular encontrado em endotélios, o pericito vascular, daria uma explicação da presença de MSCs em vários tecidos. Essa hipótese se baseia no fato de que as MSCs e os pericitos expressam o antígeno Stro-1 e possuem respostas similares ao estímulo com fatores de crescimento (Meirelles e cols., 2006; Bianco e cols., 2001). Os pericitos são células presentes na parede vascular, embebidas na membrana basal, onde entram em contato focal com o endotélio vascular (peri = em volta, ao redor; cyto = célula ou vaso) (Armulik e cols., 2005).

Na medula óssea, também podem ser encontradas as células progenitoras endoteliais (EPCs). As EPCs e as HSCs parecem ter se originado de um antecessor comum, o hemangioblasto (Wood e cols., 1997). Acredita-se que as lesões isquêmicas ou lesões vasculares estejam associadas à mobilização das EPCs da medula óssea, fazendo com que se dirijam ao local afetado, acelerando o reparo do tecido e o processo de revascularização (vasculogênese). A recuperação funcional observada após o transplante da fração mononuclear da medula óssea em pacientes que sofreram AVE poderia ser atribuída, em parte, à ação das EPCs no sítio da lesão. No entanto, existe atualmente uma enorme discussão a respeito dos marcadores específicos para estas células, não sendo ainda possível determinar com precisão a real localização das EPCs após o transplante (Golledge e cols., 2007; Urbich e Dimmeler, 2004; Iwami e cols., 2004; Kong e cols., 2004; Rafii e Lyden, 2003; Zhang, 2002). Estudos recentes sugerem que as EPCs promovam o reparo do tecido também através de mecanismos parácrinos que ainda não estão bem estabelecidos (Young e cols., 2007).

### **1.09. Córtex cerebral e controle central do movimento**

O córtex cerebral, presente em todos os animais vertebrados, se divide em três regiões distintas: hipocampo, córtex olfativo e neocórtex (ou simplesmente córtex), sendo este último somente encontrado em mamíferos. Dentre as características comuns aos três tipos de córtex podemos citar a disposição em camadas dos corpos celulares neuronais paralelas à superfície do encéfalo, a escassez de neurônios na camada I (mais próxima à pia-máter) e a presença de células piramidais, em pelo menos uma camada, que emitem dendritos apicais. O neocórtex, diferentemente do

hipocampo e do córtex olfativo, possui seis camadas celulares e é o mais complexo dentre os tipos de córtex, sendo importante no processamento das informações visuais, auditivas e daquelas relacionadas às sensações somáticas e aos movimentos voluntários, dentre outras. Através da análise histológica de diferentes regiões do neocórtex foi possível criar um mapa citoarquitetônico do mesmo, onde cada área com uma citoarquitetura em comum executa a mesma função (Bear e cols., 2001a; Amaral, 2000a).

A área de superfície do neocórtex varia enormemente entre as espécies, sendo o córtex humano 1000 vezes maior do que o córtex de rato. Por outro lado, existe pouca diferença na sua espessura entre os mamíferos, provando que a estrutura cortical básica permaneceu praticamente a mesma ao longo da evolução (Bear e cols., 2001a).

O neocórtex pode ser dividido em quatro grandes áreas principais, de acordo com a sua função: áreas sensoriais primárias (recebem os sinais das vias sensoriais ascendentes), áreas sensoriais acessórias (se conectam com as áreas sensoriais primárias), áreas motoras (recebem aferências dos núcleos talâmicos que trazem informação do telencéfalo basal e do cerebelo, e enviam eferências a neurônios motores no tronco encefálico e na medula espinhal) e áreas corticais de associação, encontradas somente em primatas e relacionadas à expansão do córtex frontal e ao surgimento da “mente” (Bear e cols., 2001a; Saper e cols., 2000).

Os gânglios da base são formados pelo núcleo caudado, putâmen, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra. O núcleo caudado e o putâmen, em conjunto, são chamados de estriado. Esses núcleos recebem aferências do córtex cerebral e enviam suas eferências para o tronco encefálico e para o tálamo, sendo que através deste as projeções voltam para o córtex (Bear e cols., 2001b).

A iniciação de um movimento voluntário depende tanto da ativação das áreas pré-motora e motora suplementar (área 6) como do córtex motor primário (área 4). A ativação da área 6 ocorre através de uma alça motora, com o refinamento das informações para a realização do movimento. Esta alça se inicia nos córtices parietal posterior e pré-frontal, passa pelos gânglios de base, pelo núcleo ventrolateral do tálamo e finalmente retorna à área 6 do córtex, particularmente à área motora suplementar. O córtex motor primário (área 4), intensamente conectado com a área 6, é a área motora que contribui de forma mais intensa para o tracto córtico-espinhal e para o movimento. Isso porque os neurônios da área 4 possuem um limiar mais baixo para desencadear movimentos em relação às outras áreas. Esta região também ganha destaque por conter um mapa completo da musculatura somática ao longo da sua extensão (Bear e cols., 2001b; Amaral, 2000b).

Os axônios do tronco encefálico descem ao longo da medula espinhal por dois grupos principais de vias. As vias mediais estão envolvidas no controle da postura e do equilíbrio e as vias laterais estão envolvidas no movimento voluntário da musculatura distal. As vias mediais possuem três principais tractos descendentes (tractos vestibulo-espinhal, tecto-espinhal e retículo-espinhal) que terminam entre os interneurônios espinhais, controlando os músculos proximais e axiais. A principal via descendente lateral do tronco encefálico é o tracto rubro-espinhal, importante para a manipulação de objetos em gatos e símios. Nos macacos antropóides e nos humanos, esta função é basicamente assumida pelo sistema córtico-espinhal. O tracto córtico-espinhal ventral origina-se principalmente nos neurônios das áreas 4 e 6, enquanto o tracto córtico-espinhal lateral se origina nas áreas 4 e 6, além das áreas sensoriais 1, 2 e 3. As divisões lateral e ventral do tracto córtico-espinhal terminam aproximadamente nas mesmas regiões da substância cinzenta medular,

como o fazem os sistemas descendentes lateral e medial do tronco encefálico (Ghez e Krakauer, 2000; Bear e cols., 2001b).

### **1.10. Córtex sensorimotor de ratos**

Através da estimulação intracortical ou da superfície corporal descobriu-se que as representações motoras estão principalmente localizadas no córtex frontal. Em ratos, o córtex frontal é medial e rostral em relação ao córtex parietal. O córtex frontal, ao contrário do parietal, se caracteriza pela ausência de células granulares densamente agrupadas na camada IV. O córtex frontal (agranular) pode ser dividido em duas regiões, medial e lateral (Wise e Donoghue, 1986).

Experimentos eletrofisiológicos demonstraram que a maior parte do córtex motor primário corresponde principalmente à região agranular lateral, no córtex frontal, como já foi observado em outros mamíferos. Observou-se também que o córtex motor primário se sobrepõe ao córtex somatosensorial primário nas regiões correspondentes à pata traseira e em parte da região correspondente à pata dianteira. O córtex sensorimotor primário de ratos pode então ser dividido em três partes: uma parte exclusivamente com o córtex motor primário, outra exclusivamente com o córtex somatosensorial primário e uma parte contendo a sobreposição dos dois córtices. As regiões onde há sobreposição recebem aferências cutâneas e emitem projeções motoras. Acredita-se que as aferências cutâneas sejam importantes para um controle tátil dos movimentos, especialmente para a pata traseira (Wise e Donoghue, 1986).

A região agranular medial, no córtex frontal, se conecta diretamente com a medula espinhal é uma das três maiores áreas corticais que emite projeções para o

córtex motor primário, só ficando atrás dos córtices somatosensoriais primário e secundário. Visto que lesões nessa região produzem déficits motores, sugeriu-se que a região agranular medial seja equivalente aos córtices pré-motor e motor suplementar dos primatas (Wise e Donoghue, 1986).

O núcleo ventrolateral do tálamo recebe aferências dos núcleos cerebelares profundos e dos gânglios da base e emite projeções para toda a extensão do córtex sensorimotor primário. O núcleo ventromedial do tálamo, por outro lado, recebe aferências da substância nigra e emite projeções não só para o córtex sensorimotor primário, mas também virtualmente para todo o neocórtex (Wise e Donoghue, 1986).

O córtex motor primário envia densas projeções para o estriado, para o núcleo subtalâmico e para o núcleo pontino basilar (cerebelo), estruturas subcorticais importantes para o controle do movimento. Além das projeções para estruturas relacionadas ao controle motor, o córtex motor primário controla as informações que chegam até ele através de aferências para áreas talâmicas e corticais, como o córtex motor primário contralateral e o córtex somatosensorial ipsilateral. O córtex motor primário também emite projeções para a medula espinhal através dos tractos córtico-espinhais lateral e medial, onde ocorre o contato com interneurônios espinhais envolvidos no controle da atividade muscular. Danos no córtex motor primário levam a deficiências na manipulação de objetos, na velocidade da contração muscular e na produção de força (Wise e Donoghue, 1986).

## 1.0. OBJETIVOS

- Estabelecer o modelo de lesão isquêmica por termocoagulação dos vasos do córtex sensorimotor, em ratos adultos, verificando-se a extensão da lesão através da reação histoquímica com cloreto de trifetil tetrazólio (TTC)
- Determinar a via intravenosa ideal para administração das células-tronco mononucleares de medula óssea em ratos, utilizando o marcador radioativo tecnécio-99
- Estudar o efeito do transplante de células-tronco mononucleares de medula óssea no modelo de lesão por termocoagulação através dos seguintes parâmetros:
  - ✓ Avaliação da recuperação funcional em 3 testes sensorimotores, analisando-se as patas dianteiras e traseiras
  - ✓ Quantificação da expressão das proteínas GAP-43 e sinaptofisina na periferia e no córtex contralateral e homólogo à lesão

### **3.0. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.01. Animais**

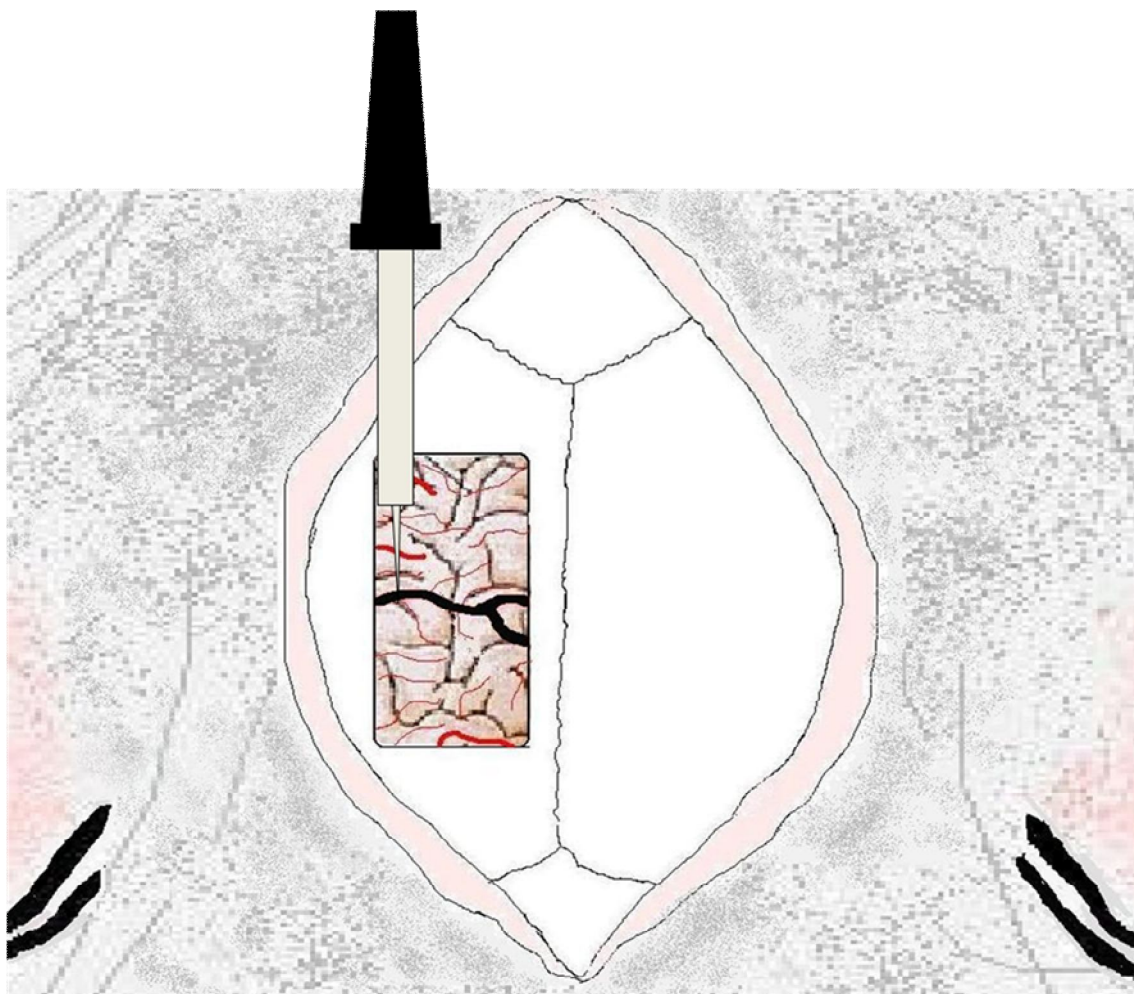
Foram utilizados ratos adultos machos de 3 a 5 meses, da linhagem *Wistar*. Todos os animais foram utilizados seguindo o protocolo aprovado pelo comitê de uso de animais experimentais, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e seguindo as recomendações de eutanásia descritas pela associação médica e veterinária americana (2007).

#### **3.02. Isquemia focal - Termocoagulação unilateral dos vasos do córtex sensorimotor**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, i.p.) e cloridrato de quetamina (50 mg/kg, i.p.) e posteriormente tiveram a cabeça fixada em um aparelho estereotáxico. Uma incisão na pele foi feita acima da fissura craniana medial e o crânio foi então exposto. Usando medidas estereotáxicas obtidas de um atlas de encéfalo de rato (eixo antero-posterior, +2,0 mm a -6,0 mm do bregma; Paxinos e Watson, 1986), delimitou-se a região a ser exposta utilizando-se uma lapiseira. Uma craniotomia foi realizada nessa região, que abrange o córtex sensorimotor esquerdo, utilizando-se uma “broca” cirúrgica de ponta fina. Com o auxílio de uma lupa, realizou-se a termocoagulação dos vasos sangüíneos da pia-máter através da aproximação de um ferro de solda de ponta fina (40w, 450-550°C), sem danificar a dura-máter (Figura 3). O ferro de solda havia sido previamente preso ao aparelho estereotáxico, permitindo a manipulação cuidadosa do mesmo durante



o processo de termocoagulação. Após a cauterização, a abertura craniana foi fechada, a pele foi suturada, foi aplicado antibiótico na região suturada e os animais foram levados ao biotério.



**Figura 3: Isquemia focal - Termocoagulação unilateral (hemisfério esquerdo) dos vasos do córtex sensorimotor.** Após a abertura craniana utilizando-se uma “broca” cirúrgica, os vasos da pia-máter da região exposta foram termocoagulados com um ferro de solda de ponta fina, previamente preso ao aparelho estereotáxico. Quando a coagulação de todos esses vasos estava completa (ficaram pretos), a abertura craniana foi fechada e os animais foram devolvidos ao biotério. Ilustração não representativa da região que sofreu a termocoagulação (eixo antero-posterior, +2,0 mm a -6,0 mm, em relação ao bregma).

### **3.03. Reação histoquímica com cloreto de trifenil tetrazólio (TTC)**

O cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) é um sal que atravessa a membrana plasmática celular e, nas mitocôndrias das células vivas, recebe um íon H<sup>+</sup> de enzimas desidrogenases, que participam do ciclo de Krebs. Esta redução química do TTC forma o produto Trifenil Formazan, que dá uma coloração avermelhada ao tecido vivo. Esta reação tem sido muito utilizada em modelos experimentais de isquemia cardíaca e encefálica, pois no tecido infartado não ocorre a redução química do TTC e o tecido permanece esbranquiçado.

Para comprovação da extensão da lesão em nosso estudo, os 4 primeiros animais operados foram sacrificados 1 dia após a isquemia e fatias frescas de seus encéfalos foram obtidas para reação histoquímica com solução de TTC 0,5 % em tampão fosfato 0,1 M.

Os animais foram anestesiados com éter etílico (VETEC) e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. Seus encéfalos foram então removidos do crânio e colocados em um molde de acrílico milimetrado e fatiados, utilizando lâminas Gillete®. As fatias foram feitas com 2 mm de espessura, sendo imediatamente transferidas para uma placa de 24 poços contendo tampão fosfato 0,1M. Esta solução foi logo em seguida substituída pela solução de TTC 0,5% previamente aquecida em banho-maria, a 37°C. As fatias permaneceram por 20 minutos nesta solução, protegidas da luz, em uma estufa a 37°C, sendo que após os primeiros 10 minutos as fatias foram viradas para garantir que as duas faces estivessem igualmente banhadas pela solução. Após os 20 minutos em solução de TTC, as fatias foram lavadas 2 vezes em tampão fosfato 0,1M e fixadas com

paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M (PF 4 %) por 24 horas (em cada poço em colocado um volume de 1 ml de PF 4 %).

Para a demonstração da eficácia da isquemia foram realizadas imagens em seqüência das fatias do encéfalo, utilizando-se uma câmera digital acoplada a uma lupa.

### **3.04. Isolamento das CMMO**

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. O fêmur e tíbia foram então extraídos e separados dos tecidos adjacentes. O restante do procedimento foi realizado em condições estéreis.

As epífises dos ossos foram cortadas e com auxílio de uma seringa de 5ml, foi aplicado o meio de cultura DMEM-F12 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO BRL) sem soro no interior dos ossos, coletando-se, em seguida, a medula óssea em um tubo de 15ml. As células foram dissociadas com auxílio de uma pipeta Pasteur e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300xg.

Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 2ml de meio DMEM F-12 e aplicado sobre 2ml de Ficoll (Histopaque, Sigma) em um tubo de 15ml. Este procedimento foi feito de forma lenta para que as células não se misturassem com o Ficoll.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 600xg. Este procedimento permite a separação das células de acordo com a densidade. Formase, então, um anel correspondente às células mononucleadas. Estas células foram recolhidas e transferidas para um novo tubo, onde foram lavadas 3 vezes com salina tamponada com tampão fosfato 10mM pH 7,4 (PBS, do inglês *phosphate buffer*

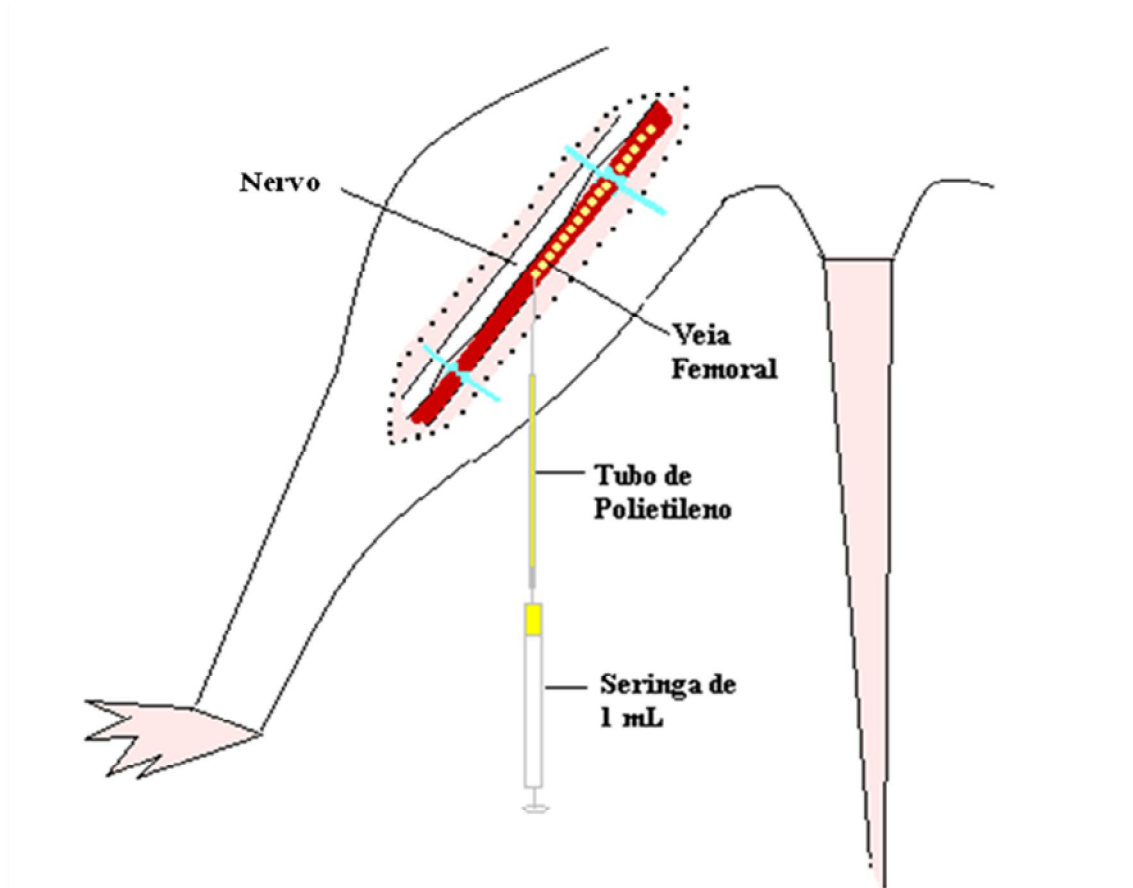
*saline* - 10g de NaCl, 0,25g de KCl, 1,4g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 1litro de água destilada). Em cada lavagem, foram utilizados 10ml de PBS 10mM para retirar os resíduos de Ficoll, que são tóxicos para as células.

Ao final das lavagens, o número de células foi contado com auxílio de uma câmara de *Newbauer*. Para a exclusão de células mortas, foi feita coloração com Azul de Tripán (4%). Neste tipo de coloração, apenas as células mortas ficam coradas e, desta forma, é possível identificar as células vivas, não coradas. Apenas as células vivas foram contadas. Após a contagem, as células foram centrifugadas a 300xg e ressuspendidas em solução salina 0,9% de NaCl.

### **3.05. Injeção das CMMO**

Um dia após a isquemia, as células mononucleares foram injetadas nos animais experimentais (30 milhões de células em 500µl de solução salina) e os animais controle foram injetados com solução salina 0,9% (500µl).

Um tubo de polietileno (PE 10) foi conectado a uma seringa de 1mL, sendo que na outra extremidade deste tubo conectou-se uma ponta de seringa ultrafina (0,30x13 30G<sup>1/2</sup>, BD Precision Glide®), que foi introduzida na luz vascular. Após a injeção, a veia femoral foi ocluída permanentemente em dois pontos, um proximal e outro distal ao sítio da injeção. Para essa oclusão, foram utilizadas linhas de costura previamente posicionadas de modo a isolar a veia, como mostra a Figura 4. A injeção foi realizada na veia femoral da pata esquerda, para não interferir nos resultados dos testes sensorimotores.

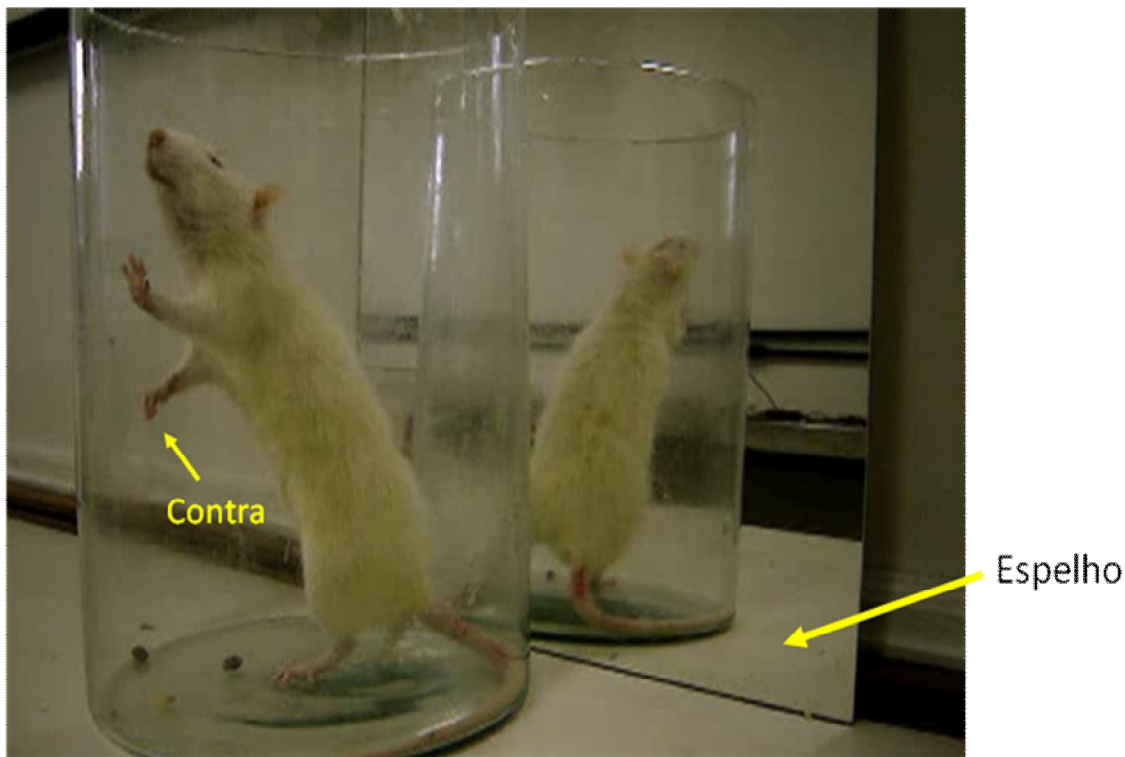


**Figura 4: Injeção de CMMO ou salina pela veia femoral.** Em uma das extremidades de um tubo de polietileno foi conectada uma seringa de 1ml. Na outra extremidade foi conectada uma ponta de seringa ultrafina, que foi inserida no lúmen da veia. Após a injeção, a veia foi ocluída permanentemente em dois pontos, utilizando-se linha de costura. Cada animal recebeu a injeção de 30 milhões de células diluídas em 500 $\mu$ l de solução salina (grupo experimental) ou apenas 500 $\mu$ l de salina (grupo controle). Ilustração não representativa da pata que recebeu a injeção (pata esquerda).

### 3.06. Testes sensorimotores

Todos os testes foram realizados em um ambiente calmo, refrigerado e livre de qualquer influência externa que pudesse interferir no comportamento dos animais. Foram feitos três diferentes testes funcionais para analisar o efeito da injeção de células de medula óssea nos animais isquêmicos. O teste do cilindro e o teste do adesivo avaliam as patas dianteiras do animal, enquanto o *beam test* avalia as patas traseiras (Schallert e cols., 2002).

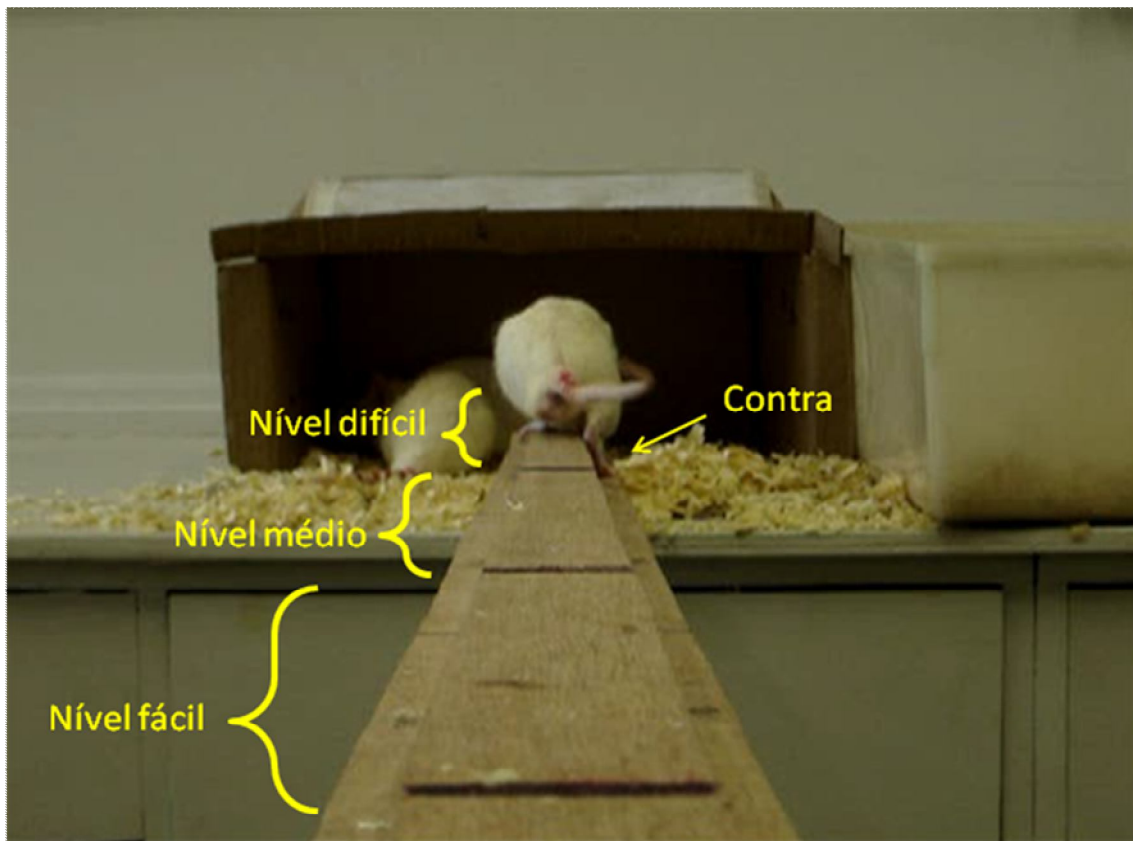
O teste do cilindro de Schallert (Schallert e cols., 2000) analisa a assimetria no uso das patas dianteiras quando o animal realiza movimentos exploratórios. Assim, foram contadas quantas vezes o animal apoiou a pata esquerda, direita ou ambas as patas na parede de um cilindro de vidro, durante 5 minutos de filmagem. Um espelho foi posicionado na frente do cilindro, permitindo a visualização da posição da pata do animal quando ele está de costas para a câmera de filmagem (Figura 5). Os resultados correspondentes à taxa de assimetria foram representados graficamente em um gráfico, em função dos dias pós-isquemia. Taxa de assimetria: % de apoio da pata ipsilateral à lesão - % de apoio da pata contralateral. As porcentagens em questão foram calculadas em relação ao número total de subidas (número de apoios com a pata ipsilateral à lesão + com a pata contralateral + com ambas). Assim, quanto mais alto o valor da taxa de assimetria, maior a deficiência motora da pata contralateral em relação à pata ipsilateral e vice-versa. Foram utilizados para este teste 12 animais isquêmicos injetados com células e 10 animais isquêmicos injetados com salina.



**Figura 5: Teste do cilindro.** Foram contadas quantas vezes o animal apoiou a pata dianteira direita, esquerda ou ambas na parede do cilindro, em função do número total de apoios, durante 5 minutos de filmagem. Os resultados correspondentes à taxa de assimetria foram representados graficamente em função dos dias pós-isquemia. Um espelho foi colocado em frente ao cilindro para facilitar a visualização das patas quando o animal estava de costas. A foto mostra o momento em que o animal apoiou a pata dianteira esquerda na parede do cilindro. A seta mostra a pata direita, contralateral à lesão, que não está apoiada na parede do cilindro. CMMO: n=12; salina: n=10.

No *beam test*, o animal caminha sobre uma ponte com três níveis de dificuldade. Essa ponte é composta de duas vigas de madeira, colocadas uma sobre a outra (Schallert e cols., 2000). A ponte de cima é mais estreita do que a de baixo, sendo que ambas se estreitam ao longo de seu comprimento (Figura 6). Os animais com maior equilíbrio e coordenação motora caminham preferencialmente sobre a ponte de cima. Nesse teste, são contadas quantas vezes o animal erra e apóia a pata traseira (esquerda, direita ou ambas) na região mais externa da ponte, ou seja, na viga de madeira de baixo. Os resultados correspondentes à taxa de assimetria

foram representados graficamente em um gráfico, em função dos dias pós-isquemia. Taxa de assimetria: % de falhas no lado contralateral em relação ao número total de passos deste lado (direito) - % de falhas no lado ipsilateral à lesão em relação ao número total de passos deste outro lado (esquerdo). Assim, quanto mais alto o valor da taxa de assimetria, maior a deficiência motora da pata contralateral em relação à pata ipsilateral e vice-versa. Foram utilizados para este teste 5 animais injetados com células e 5 animais injetados com salina.



**Figura 6: Beam test.** Foram contadas quantas vezes o animal apoiou a pata traseira direita, esquerda ou ambas na região mais lateralizada e rebaixada da ponte, considerando a sua posição em relação aos três níveis de dificuldade. Os resultados correspondentes à taxa de assimetria foram representados graficamente em função dos dias pós-isquemia. A foto mostra o momento em que o animal apoiou a pata traseira direita (contralateral), na viga de madeira de baixo, no nível difícil. CMMO: n=5; salina: n=5.



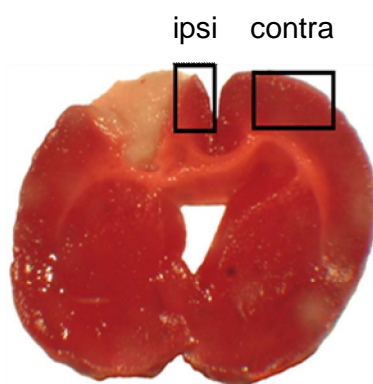
O teste do adesivo analisa a sensibilidade tátil e a conseqüente capacidade desta em gerar uma resposta motora. Portanto, permite medir perdas funcionais sensoriais e motoras em conjunto, não sendo possível analisar cada um destes dois componentes separadamente. Neste teste, dois pequenos pedaços de papel adesivo (de tamanho igual, 113.1 mm<sup>2</sup>) foram utilizados como estímulo tátil bilateral, sendo colados nos pulsos das patas dianteiras esquerda e direita (Chen e cols., 2001; Li e cols., 2005; Li e cols., 2006; Shen e cols., 2006). Em 4 tentativas por dia, verificou-se qual adesivo ele retirava primeiro com a boca, se da pata esquerda ou direita. Neste estudo, não foi considerado o tempo que o animal levou para remover qualquer um dos adesivos das patas dianteiras. A porcentagem de retirada do adesivo da pata contralateral em primeiro lugar foi plotada em um gráfico em função dos dias pós-isquemia. Dessa forma, quanto mais baixa é essa porcentagem, maior a deficiência sensorimotora da pata contralateral em relação à pata ipsilateral à lesão e vice-versa. Foram utilizados para este teste 7 animais injetados com células e 6 animais injetados com salina.

Os testes foram realizados antes da isquemia, antes da injeção de células ou salina e 7, 14, 21 e 28 dias após a isquemia. No caso do *beam test*, também foram realizados testes 35 dias após a isquemia.

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o programa de computador *GraphPad Prism* versão 4.02 (GraphPad Software, Inc.). Foi aplicado o *two-way ANOVA*, com medidas repetidas. Para a comparação entre os dois grupos em cada tempo de sobrevida foi aplicado o pós-teste de Bonferroni.

### 3.07. Extração e dosagem de proteínas

O material utilizado para análise da expressão protéica corresponde ao córtex adjacente à lesão, próximo à linha média (córtex cingular), e ao córtex contralateral e homólogo à lesão isquêmica (Figura 7). Os tecidos foram recolhidos 7 dias (GAP-43) e 30 dias (sinaptofisina) após a isquemia e utilizados imediatamente para a extração das proteínas. Animais normais foram utilizados como um grupo controle extra.



**Figura 7: Regiões corticais utilizadas para análise da expressão das proteínas GAP-43 e sinaptofisina.** As regiões extraídas correspondem ao córtex contralateral e homólogo à lesão e ao córtex ipsilateral, localizado entre a lesão e a linha média. Corte coronal (2mm) do encéfalo de um animal isquêmico submetido à reação histoquímica com TTC, 1 dia após a isquemia por termocoagulação. O tecido vivo possui uma coloração vermelha, enquanto a região da lesão apresenta-se esbranquiçada. A foto foi obtida através de uma câmera digital acoplada a uma lupa.

Para extração protéica, as amostras foram homogeneizadas em 100µl de tampão de lise (TrisHCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 2 mM e Triton X-100 0,2%), utilizando-se uma pipeta. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000xg e a dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Utilizou-se 1µl de cada amostra para 1000µl de reagente de Bradford e, para a curva padrão, foram utilizadas concentrações conhecidas de BSA (do inglês *bovine serum albumine* - Sigma).

### **3.08. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

A separação das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado um minigel com 12,5% de acrilamida e o procedimento foi feito em condições de redução como descrito por Laemmli (1970). As amostras foram diluídas em tampão de amostra e fervidas por 4 minutos em “banho-maria”. Foram aplicados 10µl em cada poço, sendo 8µl de amostra (30µg de proteína) e 2µl de tampão de amostra. Foram utilizados 2µl de padrão de peso molecular, onde as bandas observadas são coloridas. A corrida foi feita aplicando-se uma voltagem constante de 120V por aproximadamente 1 hora e meia.

### **3.09. Análise da expressão protéica**

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando-se um sistema de transferência como descrito por Towbin e colaboradores (1979). A transferência foi realizada a uma corrente de 200mA por 2 horas.

Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de 0,2% de vermelho de Ponceau em 3% de ácido acético para verificar o padrão de proteínas e garantir que a transferência havia sido bem sucedida. Em seguida, foi feita lavagem da membrana e iniciou-se a fase de bloqueio. Para o bloqueio dos sítios não-específicos, a membrana foi incubada em PBS 10mM com 0,05% de tween-20 e 5% de BSA por 4 horas a 4°C.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo anti-GAP-43 (*SantaCruz*, 1:500) ou anti-sinaptofisina (1:20000) e o anticorpo anti-  $\alpha$ -tubulina (1:30000), para o controle de carregamento. Os anticorpos foram diluídos em PBS 10mM com 0,05% de tween-20 e 5% de BSA.

No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com PBS 10mM com 0,05% de tween-20 e incubada com os anticorpos secundários por 2 horas à temperatura ambiente no agitador. Para a detecção da GAP-43, utilizou-se o anticorpo contra coelho conjugado à peroxidase (1:2500) e para a detecção da sinaptofisina e da  $\alpha$ -tubulina utilizou-se o anticorpo contra camundongo conjugado à peroxidase (1:3000). Os anticorpos foram diluídos em PBS com 0,05% de tween-20 e 1% de BSA. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS 10mM com 0,05% de tween-20.

Após todo o procedimento, o complexo formado foi revelado por quimioluminescência, usando um kit comercial (ECL - *Chemiluminescence Luminol Reagent*). Neste momento, pôde-se observar que as bandas ficaram fluorescentes. Em seguida, a membrana foi colocada no cassete com o filme fotográfico (Amersham Biosciences) e exposta por cerca de 10 minutos.

### **3.10. Quantificação da expressão de GAP-43 e sinaptofisina**

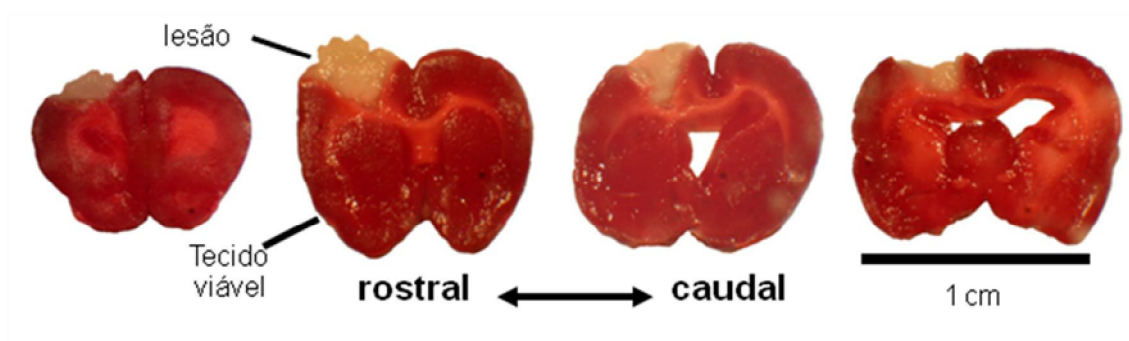
A densitometria ótica das bandas obtidas a partir da revelação com o ECL foi quantificada utilizando-se o programa de computador Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Inc.). Os valores finais obtidos foram representados graficamente em gráficos e correspondem à razão: (densitometria das bandas de GAP-43 ou sinaptofisina - *background*) / (densitometria das bandas de  $\alpha$ -tubulina - *background*).

A análise estatística dos resultados foi feita utilizando-se o programa de computador *GraphPad Prism* versão 4.02 (GraphPad Software, Inc.). Foi aplicado o *two-way ANOVA* com medidas repetidas. Para a comparação entre os grupos em cada hemisfério cortical foi aplicado o pós-teste de Bonferroni.

## 4.0. RESULTADOS

### 4.01. Extensão da lesão: reação histoquímica com TTC

A reação histoquímica entre as fatias do encéfalo recém extraído de ratos e o cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) demonstrou-se eficiente. Assim, o tecido ainda vivo, viável, adquiriu uma coloração fortemente avermelhada, o que caracteriza a formação do composto Trifenil Formazan a partir do TTC, nas mitocôndrias. A região lesionada pelo procedimento de termocoagulação, por outro lado, apresentou uma coloração esbranquiçada, ou seja, as células dessa região não foram capazes de converter o TTC em Trifenil Formazan, de cor vermelha. Esse padrão foi observado nas fatias do encéfalo ao longo de toda a extensão da lesão. Observando essas fatias, podemos concluir que a lesão conseguiu atingir as seis camadas do córtex sensorimotor e não afetou o corpo caloso (Figura 8).



**Figura 8: Extensão da lesão.** Cortes coronais (2mm) do encéfalo de um animal isquêmico submetido à reação histoquímica com TTC, 1 dia após a isquemia por termocoagulação. O tecido vivo possui uma coloração vermelha, enquanto a região da lesão apresenta-se esbranquiçada. A lesão abrange as seis camadas do córtex sensorimotor e não afeta o corpo caloso. A fotomontagem foi feita com imagens obtidas de uma câmera digital acoplada a uma lupa.

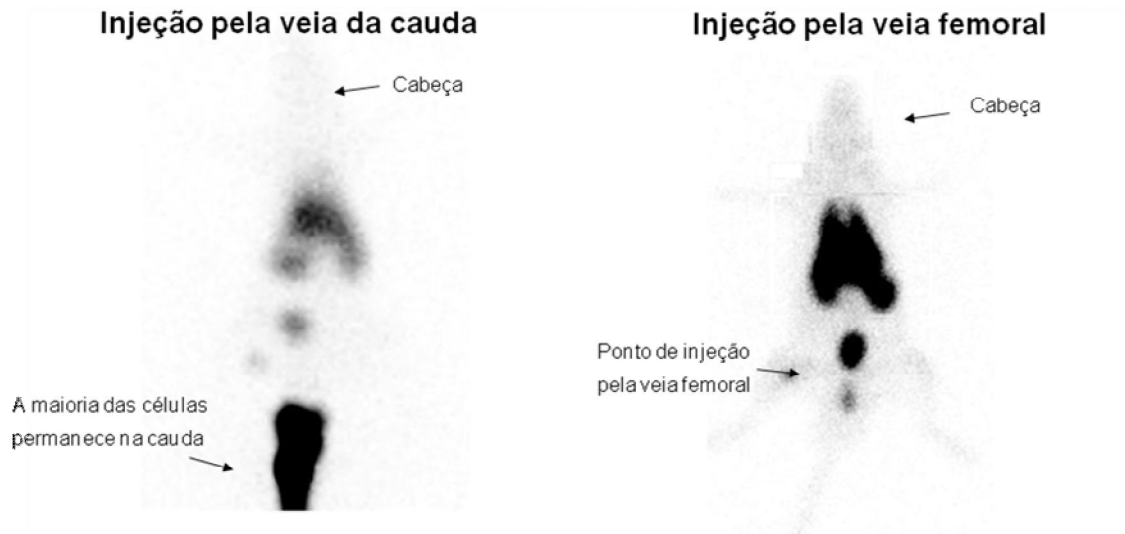
#### **4.02. Determinação da via intravenosa ideal para administração das CMMO**

Para verificar a via intravenosa ideal para administração das células-tronco de medula óssea em ratos, foi realizado um experimento teste, que consistiu na injeção de CMMO marcadas com a molécula radioativa tecnécio-99 pela veia da cauda ou pela veia femoral. Logo após a injeção, os 4 animais teste (2 para cada grupo) foram levados para um aparelho de cintilografia utilizado em humanos, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

A partir das imagens obtidas, pode-se concluir que as células injetadas pela veia femoral conseguiram migrar e alcançaram eficientemente a região da cabeça, apesar do forte tropismo dessas células para o fígado, pulmão, coração e bexiga (Figura 9). Por outro lado, a maior parte das células injetadas pela cauda permaneceu na cauda, não conseguindo atingir a circulação com eficácia. Uma explicação para a permanência de grandes quantidades de CMMO na cauda estaria relacionada ao fato de que a injeção pela veia da cauda é mais complexa do que a injeção pela veia femoral. Isso porque, no primeiro caso, é difícil ter certeza de que a veia foi realmente puncionada e de que não houve o extravasamento da solução para o tecido adjacente, o que provavelmente ocorreu no experimento em questão. Na injeção pela veia femoral, por outro lado, é possível acompanhar todo o procedimento de injeção com o auxílio de uma lupa, corrigindo-se a posição da ponta da seringa ultrafina para que ela seja diretamente inserida no lúmen da veia e para que a quantidade de material perdido durante a injeção seja mínima.

Esse experimento teste demonstrou, portanto, que a veia femoral é uma ótima via de administração de células em ratos. Para se analisar de forma mais apurada a

concentração das células na região da cabeça, seria necessário um aparelho de cintilografia específico para animais de pequeno porte.



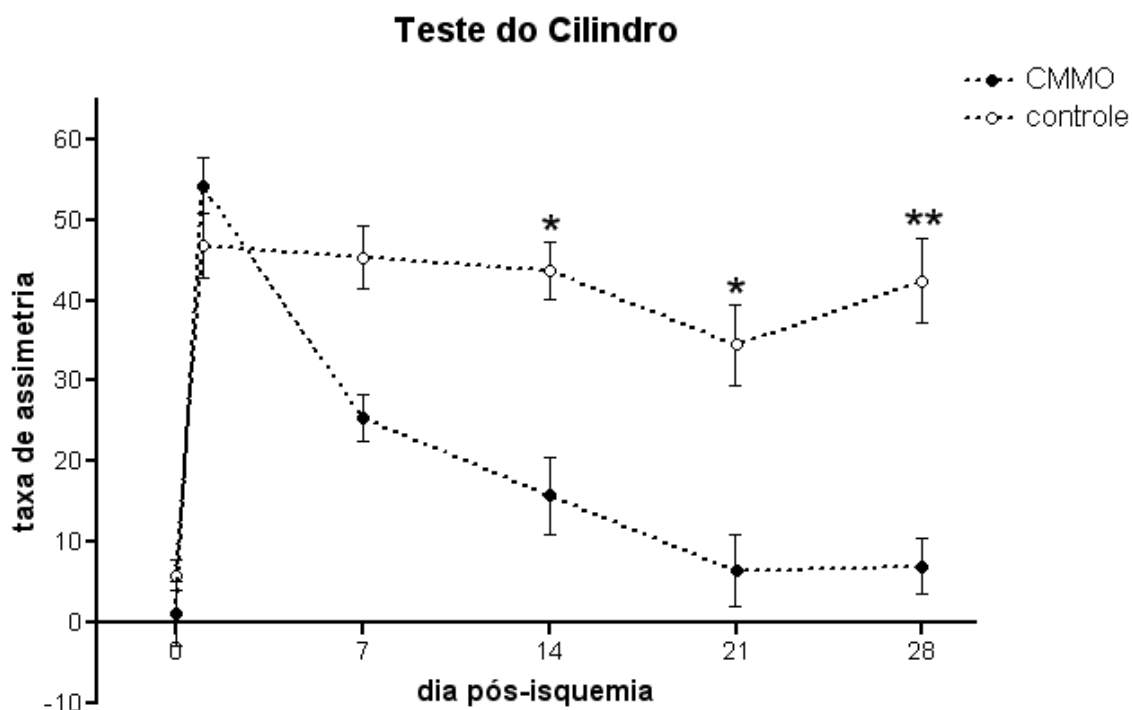
**Figura 9: Imagens de cintilografia obtidas após a injeção das CMMO marcadas com tecnécio-99.** A injeção pela veia femoral foi eficiente e as células conseguiram alcançar a região da cabeça, apesar do forte tropismo para o fígado, pulmão, coração e bexiga. Logo, a veia femoral é uma ótima via de administração em ratos. A injeção pela veia da cauda, mais complexa do que a injeção pela veia femoral, não foi eficiente e grande parte das células permaneceu na cauda. Veia da cauda: n= 2; Veia femoral: n=2.



### 4.03. Teste do cilindro

A análise em câmera lenta dos vídeos mostrou que antes da isquemia havia um equilíbrio entre o uso da pata esquerda e direita, com a taxa de assimetria sempre próxima de zero. Após a isquemia, no entanto, todos os animais tenderam a apoiar mais a pata não afetada, ipsilateral à lesão, na parede do cilindro, aumentando a taxa de assimetria.

A análise de variância revelou efeito significativo tanto em relação aos dias pós-isquemia ( $F = 39,15$ ;  $p < 0,0001$ ) quanto em relação ao tratamento ( $F = 29,02$ ;  $p < 0,0001$ ). Além disso, interação entre o tempo e o tratamento também foi significativo ( $F = 10,65$ ;  $p < 0,0001$ ). A injeção de células produziu mudanças significativas na preferência pelo uso das patas, especialmente a partir do 14º dia após a isquemia, onde a taxa de assimetria estava significativamente menor nesses animais em relação àqueles que receberam a injeção de solução salina (Figura 10). Essa diferença não foi considerada significativa no 7º dia após a isquemia. Portanto, os animais que receberam a injeção de células da medula óssea voltaram a usar a pata contralateral para apoio na parede do cilindro e os animais que receberam a injeção de salina continuaram a utilizar a pata ipsilateral à lesão com maior frequência. De acordo com o pós-teste de Bonferroni, a diferença na taxa de assimetria entre os grupos foi significativa a partir de 14 dias pós-isquemia, mantendo-se dessa forma até o último tempo analisado (28 dias pós-isquemia; Figura 10).

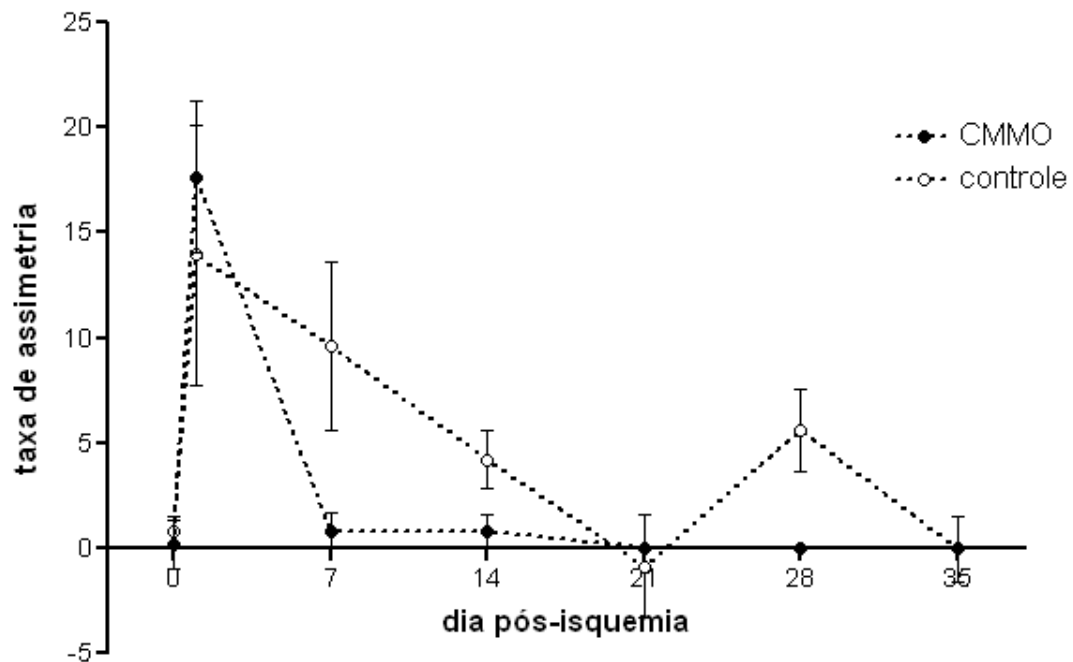


**Figura 10: Teste do cilindro.** No teste realizado antes da isquemia, grande parte dos animais não tinha preferência por apoiar a pata esquerda ou direita na parede do cilindro (dia 0). Logo após a isquemia, no entanto, todos os animais passaram a preferencialmente apoiar a pata esquerda, ipsilateral à lesão, na parede do cilindro (dia 1). Os animais que receberam e injeção de CMMO recuperaram significativamente a função da pata afetada (direita) em relação ao grupo que recebeu salina (controle), a partir do 14<sup>o</sup> dia pós-isquemia. CMMO: n= 12; Salina: n=10; \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01. Taxa de assimetria: (% de uso da pata dianteira ipsilateral à lesão) - (% de uso da pata dianteira contralateral à lesão).

#### 4.04. *Beam test*

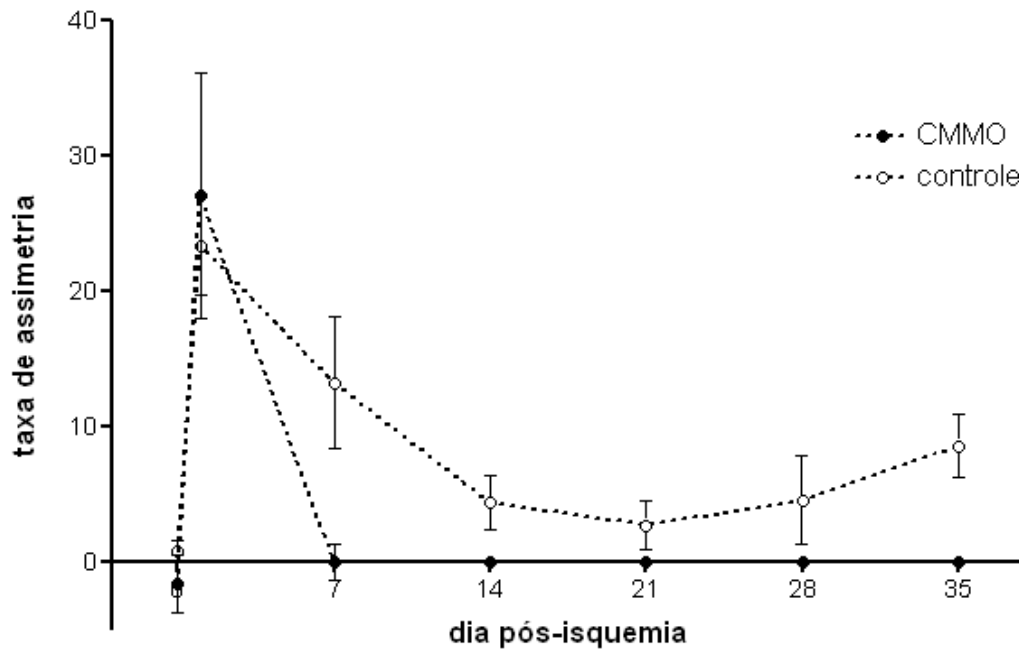
A análise de variância revelou uma diferença significativa entre os testes realizados logo após a isquemia e aqueles por volta de um mês após a isquemia, nos níveis fácil ( $F = 11,02$ ;  $p < 0,0001$ ), médio ( $F = 15,88$ ;  $p < 0,0001$ ) e difícil ( $F = 13,82$ ;  $p < 0,0001$ ). Além disso, em todos os níveis foi observada uma tendência à recuperação mais rápida no grupo tratado com CMMO, com médias de taxa de assimetria menores no sétimo dia após a isquemia, ainda que de acordo com o pós-teste de Bonferroni estas diferenças não sejam significativas (Figuras 11, 12 e 13). Essas tendências sugerem que o tratamento com as CMMO induz recuperação funcional no *beam test*, ainda que discreta. A interação entre o tempo e o tratamento não foi significativa em todos os níveis (dados não mostrados).

**Beam test**  
(nível fácil)

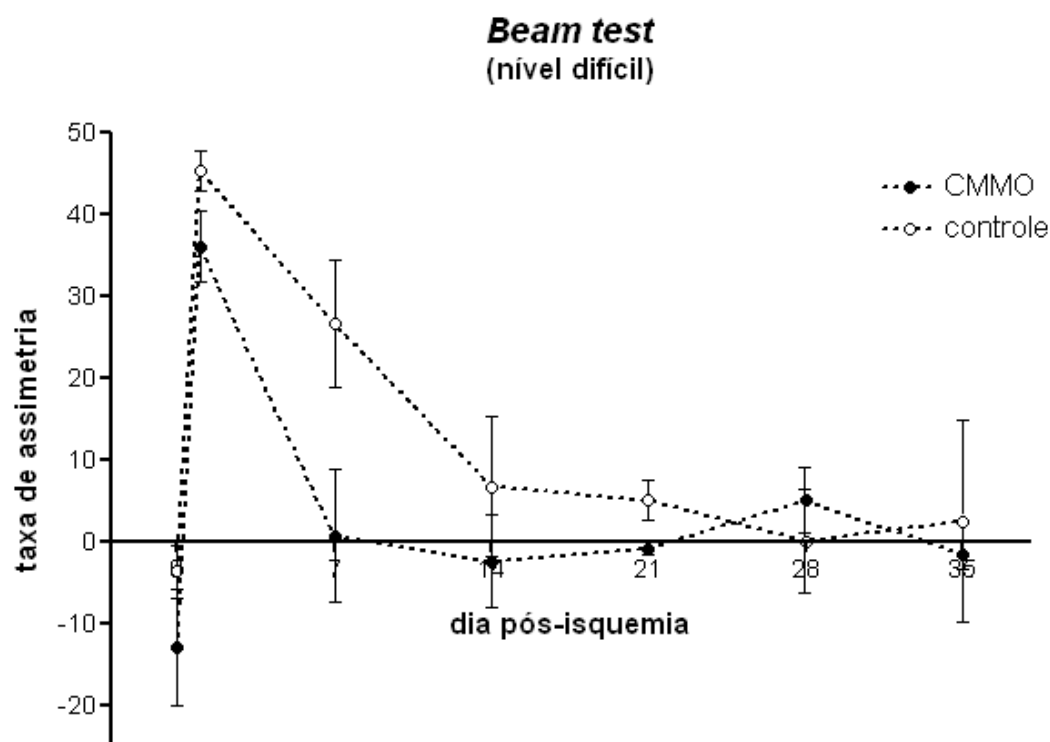


**Figura 11: Nível fácil do *Beam test*.** No teste realizado antes da isquemia, os animais caminhavam principalmente sobre a ponte mais centralizada (dia 0). Logo após a isquemia, no entanto, todos os animais passaram a errar o passo durante a caminhada, posicionando com mais frequência a pata traseira contralateral (afetada) na região mais externa da ponte (dia 1). Os animais que receberam e injeção de CMMO e os que receberam a injeção de salina (controle) recuperaram a função da pata afetada (direita), porém a recuperação dos que receberam células tendeu a ser mais rápida (7 dias pós-isquemia). CMMO: n=5; Salina: n=5. Taxa de assimetria: (% de falhas no lado contralateral à lesão em relação ao número total de passos deste lado) - (% de falhas no lado ipsilateral à lesão em relação ao número total de passos deste outro lado).

**Beam test**  
(nível médio)



**Figura 12: Nível médio do *Beam test*.** No teste realizado antes da isquemia, os animais caminhavam principalmente sobre a ponte mais centralizada (dia 0). Logo após a isquemia, no entanto, todos os animais passaram a errar o passo durante a caminhada, posicionando com mais frequência a pata traseira contralateral (afetada) na região mais externa da ponte (dia 1). Os animais que receberam a injeção de CMMO e os que receberam a injeção de salina (controle) recuperaram a função da pata afetada (direita), porém a recuperação dos que receberam células tendeu a ser mais rápida (7 dias pós-isquemia). CMMO: n=5; Salina: n=5. Taxa de assimetria: (% de falhas no lado contralateral à lesão em relação ao número total de passos deste lado) - (% de falhas no lado ipsilateral à lesão em relação ao número total de passos deste outro lado).

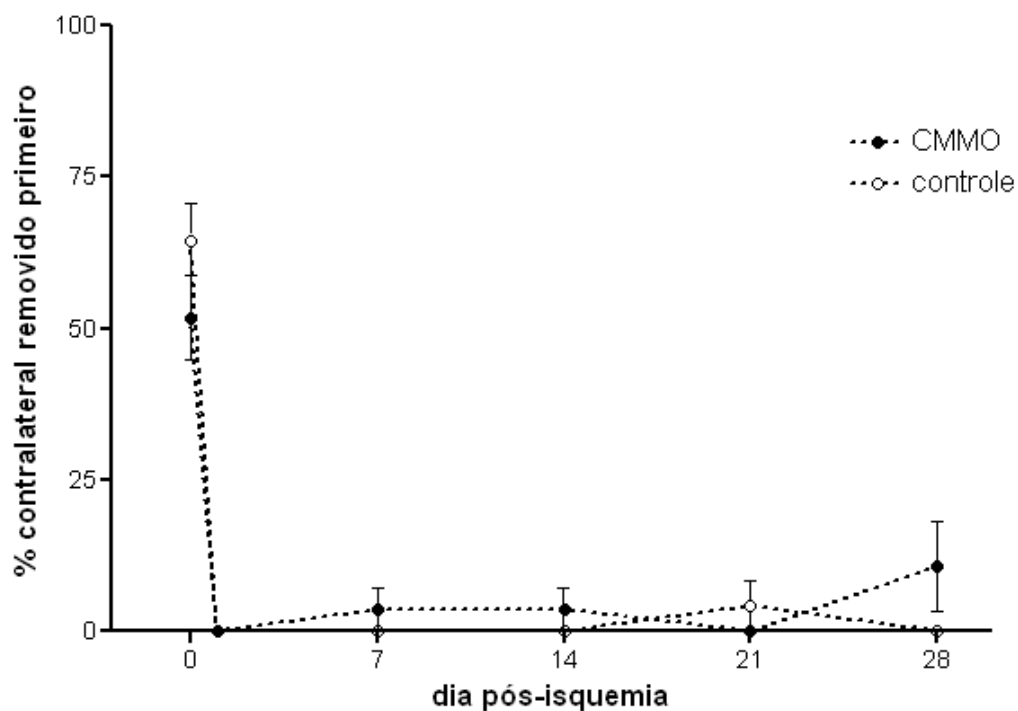


**Figura 13: Nível difícil do *Beam test*.** No teste realizado antes da isquemia, os animais caminhavam principalmente sobre a ponte mais centralizada (dia 0). Logo após a isquemia, no entanto, todos os animais passaram a errar o passo durante a caminhada, posicionando com mais frequência a pata traseira contralateral (afetada) na região mais externa da ponte (dia 1). Os animais que receberam a injeção de CMMO e os que receberam a injeção de salina (controle) recuperaram a função da pata afetada (direita), porém a recuperação dos que receberam células tendeu a ser mais rápida (7 dias pós-isquemia). CMMO: n=5; Salina: n=5. Taxa de assimetria: (% de falhas no lado contralateral à lesão em relação ao número total de passos deste lado) - (% de falhas no lado ipsilateral à lesão em relação ao número total de passos deste outro lado).

#### 4.05. Teste do adesivo

Não foi observada uma diferença significativa na preferência pela remoção do adesivo primeiramente na pata contralateral à lesão entre os animais injetados com células-tronco da medula óssea e os animais injetados com salina, em todos os tempos analisados (Figura 14). Antes da isquemia, a taxa de assimetria encontrava-se baixa, com cerca de 50% a 70% de preferência pela retirada do adesivo da pata direita, em primeiro lugar (dia zero pós-isquemia, ver na Figura 14). Após a isquemia, no entanto, todos os animais preferiram retirar primeiro o adesivo da pata esquerda, não afetada pela lesão. A análise de variância revelou efeito significativo do tempo de sobrevivência ( $F = 73,45$ ;  $p < 0,0001$ ), mas não do tratamento ( $F = 0,00$ ;  $p = 0,9612$ ). A interação entre o tempo e o tratamento não foi significativa ( $F = 2,25$ ;  $p < 0,0625$ ). De acordo com este teste, a injeção de células não produziu uma melhora funcional significativa, como pode ser observado no gráfico, nos dias 7, 14 e 21 após a isquemia. No entanto, observou-se uma tendência de recuperação nos animais injetados com células, no 28º dia após a isquemia. Neste estudo, não foi considerado o tempo que o animal leva para remover qualquer um dos adesivos das patas dianteiras.

## Teste do adesivo

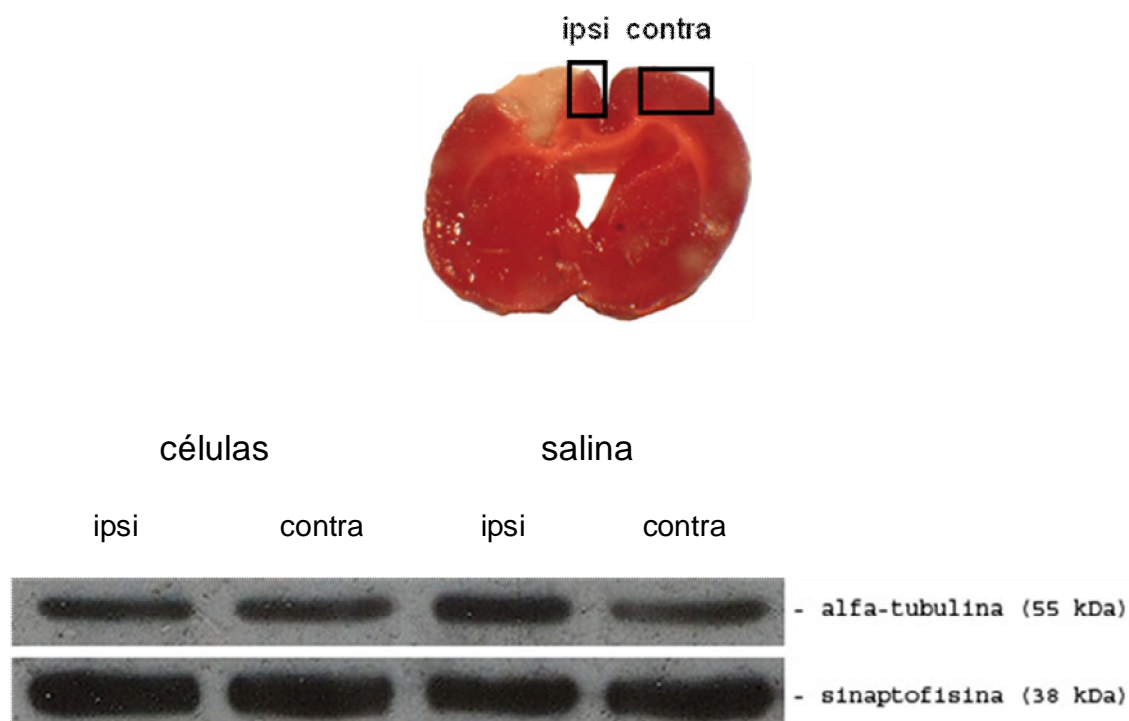


**Figura 14: Teste do adesivo.** No teste realizado antes da isquemia, os animais não tinham preferência por retirar o adesivo da pata dianteira esquerda ou direita (dia 0). Logo após a isquemia, no entanto, todos os animais passaram retirar principalmente o adesivo da pata ipsilateral à lesão, não afetada pela isquemia (dia 1). Os animais que receberam e injeção de CMMO e os que receberam a injeção de salina (controle) não recuperaram a função da pata afetada (direita), porém os que receberam células apresentaram uma tendência de recuperação desta pata no 28º dia após a isquemia. CMMO: n=7; Salina: n=6.

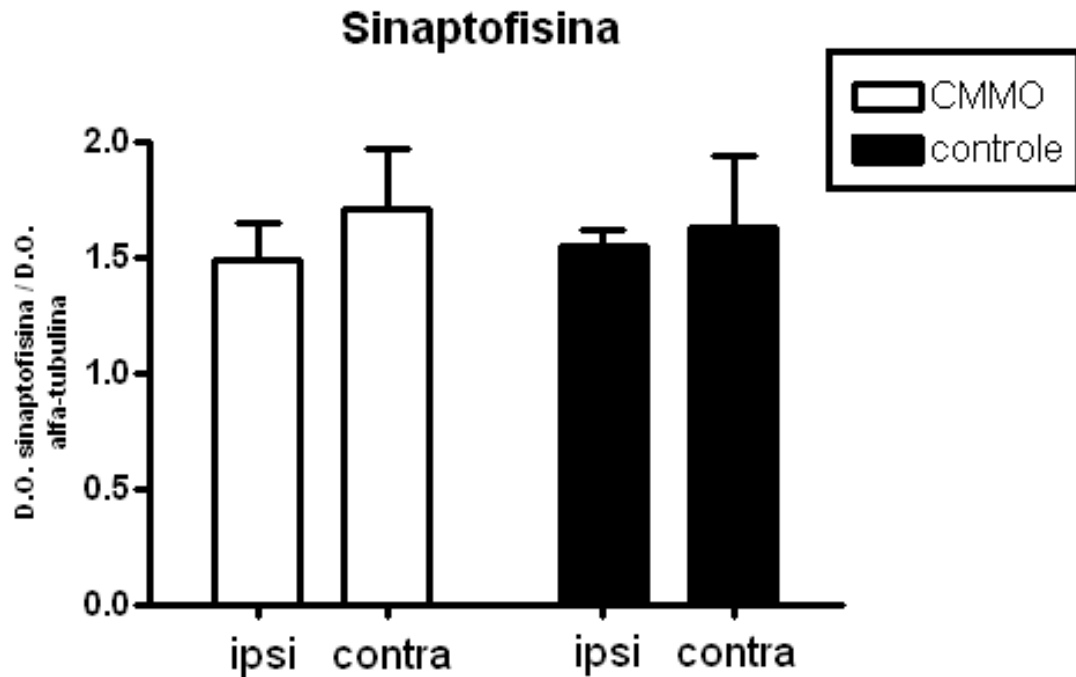


#### 4.06. Análise da expressão da proteína sinaptofisina

A análise de variância revelou não haver efeito significativo do hemisfério cortical ( $F = 0,84$ ;  $p = 3852$ ) e do tratamento ( $F = 0,00$ ;  $p = 0,976$ ) quando comparados os grupos tratado com as CMMO e o controle (Figuras 15 e 16). Isto sugere que não houve aumento ou diminuição na expressão da sinaptofisina induzido pelo tratamento com as CMMO em ambos os hemisférios.

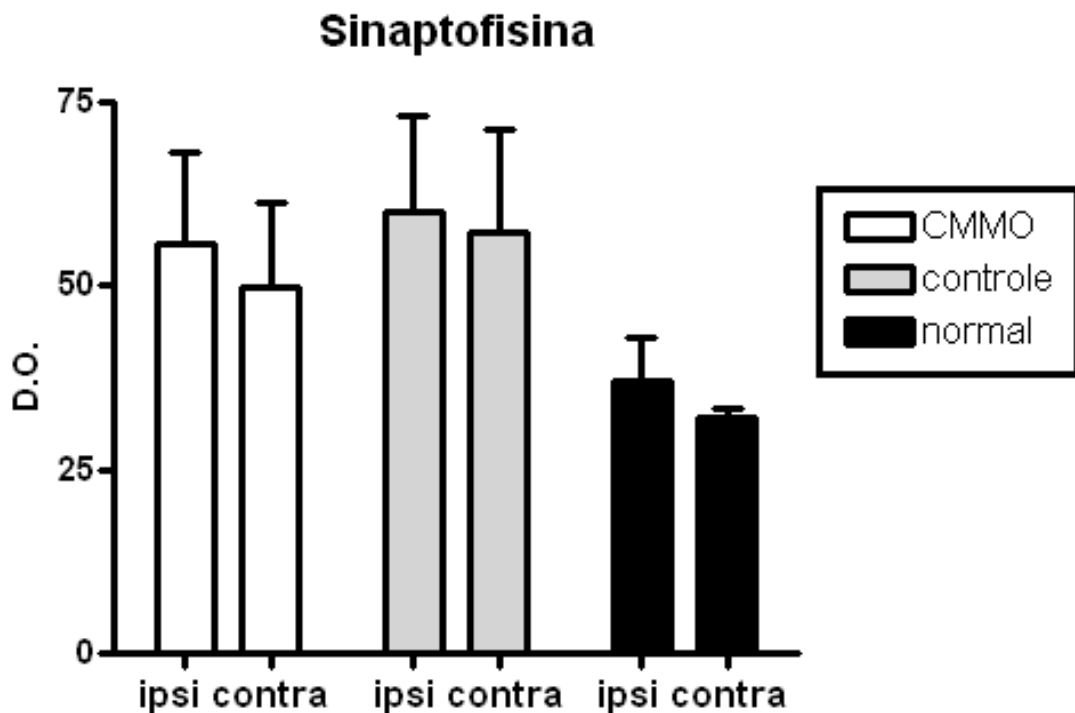


**Figura 15: Regiões utilizadas para análise da expressão da sinaptofisina e bandas obtidas por *Western Blotting*.** A região "ipsi" corresponde à periferia da lesão, localizada entre a lesão e a linha média. A região "contra" corresponde ao córtex contralateral e homólogo à lesão. A proteína alfa-tubulina foi utilizada como controle de carregamento. Fotomontagem. As imagens do *Blotting* não são representativas. CMMO: n=6; Salina: n=4.



**Figura 16: Quantificação, por densitometria ótica, da expressão da proteína sinaptofisina.** Não foi observada diferença significativa na expressão da sinaptofisina entre os dois grupos de animais, injetados com células ou salina. Essa diferença também não foi significativa quando eram comparados os lados ipsi e contralateral à lesão de um mesmo grupo. CMMO: n= 6; Salina: n= 4.

Quando incluído o grupo dos animais normais, a análise de variância revelou não haver diferença entre os grupos (Figura 17), o que sugere que não houve aumento ou diminuição na expressão da sinaptofisina induzido pela isquemia em ambos os hemisférios.

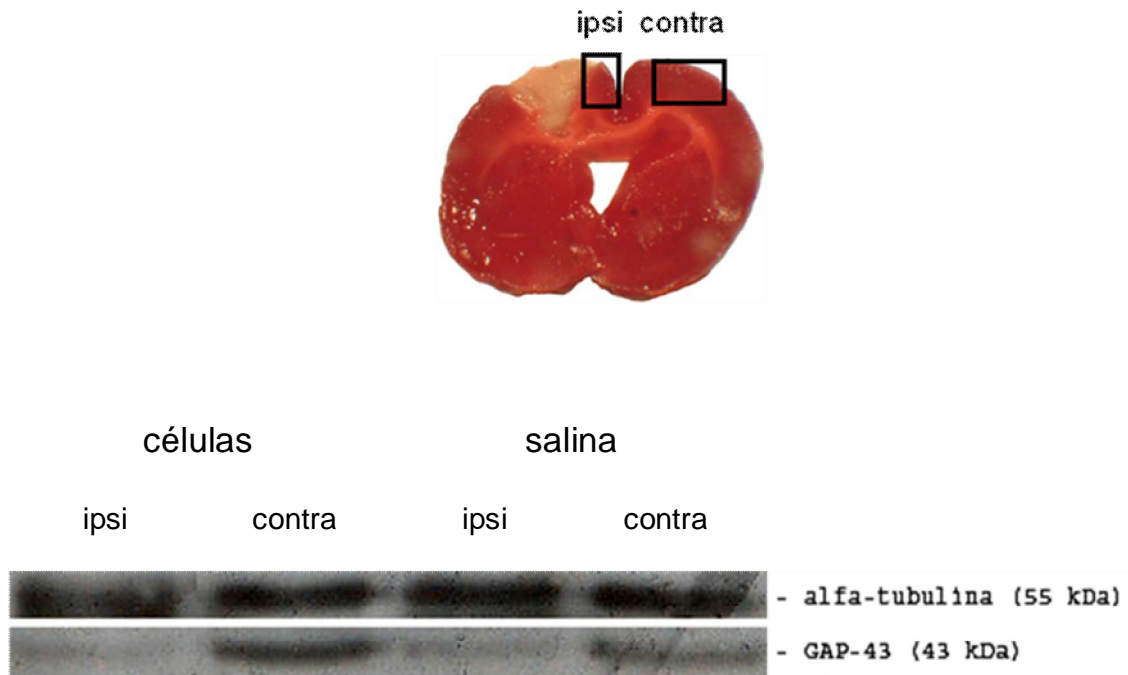


**Figura 17: Quantificação, por densitometria ótica, da expressão da proteína sinaptofisina.** Não foi observada diferença significativa na expressão da sinaptofisina entre os três grupos de animais: normais, isquêmicos injetados com células e isquêmicos injetados com salina. Essa diferença também não foi significativa quando eram comparados os lados ipsi e contralateral à lesão de um mesmo grupo. CMMO: n= 6; Salina: n= 4; Normais: n=4.

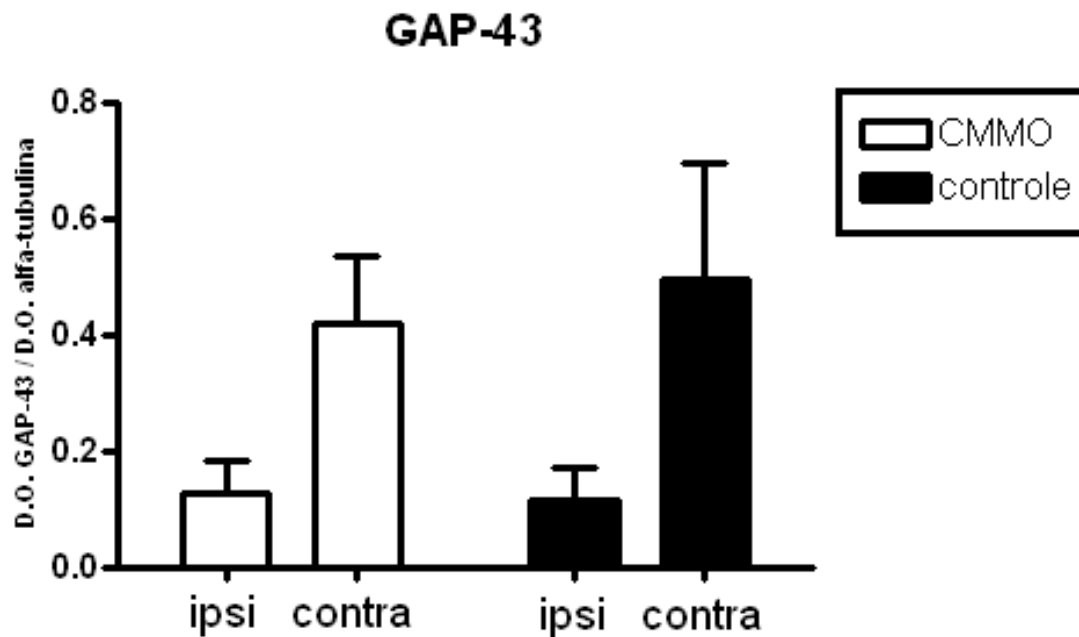
#### **4.07. Análise da expressão da proteína GAP-43**

Não foi observada diferença significativa na expressão da GAP-43 entre o grupo de animais injetados com células de medula óssea e o grupo de animais injetados com salina. No entanto, o córtex contralateral e homólogo à lesão apresentou um nível de expressão de GAP-43 mais elevado, se comparado com o córtex adjacente à lesão, em ambos os grupos (Figura 18). A proteína alfa-tubulina foi utilizada como controle de carregamento.

A análise de variância revelou não haver efeito significativo do tratamento ( $F = 0,05$ ;  $p = 0,8316$ ), mas sim do hemisfério cortical ( $F = 12,04$ ;  $p < 0,05$ ), quando comparados os grupos tratado com as CMMO e o controle (Figuras 19). Entretanto, de acordo com o pós-teste de Bonferroni, a diferença entre os lados não foi significativa em ambos os grupos, provavelmente pelo número pequeno de animais utilizados para esta análise.



**Figura 18: Regiões utilizadas para análise da expressão da GAP-43 e bandas obtidas por *Western Blotting*.** A região “ipsi” corresponde à periferia da lesão, localizada entre a lesão e a linha média. A região “contra” corresponde ao córtex contralateral e homólogo à lesão. A proteína alfa-tubulina foi utilizada como controle de carregamento. Fotomontagem. As imagens do *Blotting* não são representativas. CMMO: n=4; Salina: n=3.

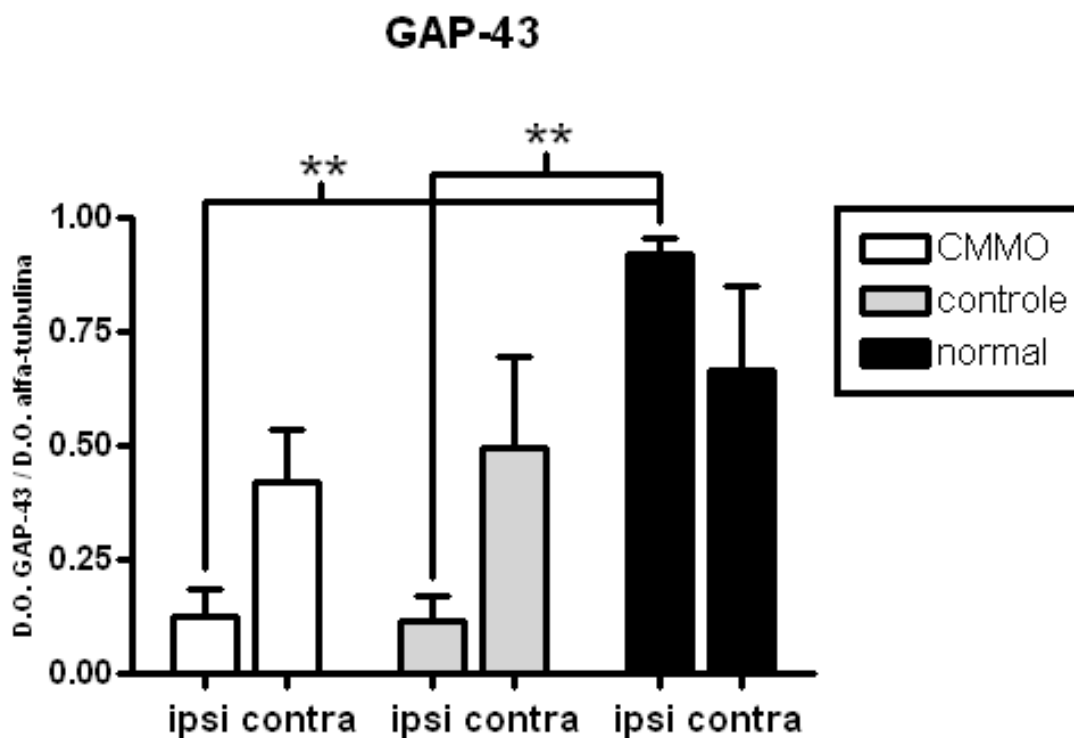


**Figura 19: Quantificação, por densitometria ótica, da expressão da proteína GAP-43.** Não foi observada diferença significativa na expressão da GAP-43 entre os dois grupos de animais, injetados com células ou salina. No entanto, a expressão de GAP-43 na periferia da lesão (ipsi) estava significativamente reduzida em relação ao lado contralateral, em ambos os grupos, em relação ao lado contralateral à lesão. CMMO: n= 4; Salina: n= 3.

Para verificar se essa diferença na expressão de GAP-43 era provocada pela isquemia ou se era uma característica constitutiva do tecido, foram incluídos na comparação homogenatos de animais não operados (normais).

A análise de variância revelou efeito significativo do tratamento (neste caso, falta de operação também deve ser entendido como um “tratamento”) ( $F = 10,39$ ;  $p < 0,01$ ), mas não do hemisfério cortical ( $F = 2,20$ ;  $p = 0,176$ ). Além disso, a interação entre o hemisfério cortical e o tratamento também foi significativo ( $F = 4,66$ ;  $p < 0,05$ ). De acordo com o pós-teste de Bonferroni, foram observadas diferenças significativas apenas entre os lados ipsilaterais do grupo normal e do grupo tratado com as CMMO, e entre os lados ipsilaterais do grupo normal e do grupo controle (Figura 20).

A expressão significativamente elevada de GAP-43 no lado ipsilateral à lesão de animais normais, em relação aos animais isquêmicos, revela que a isquemia é responsável pela diminuição da expressão dessa proteína na periferia da lesão. No lado contralateral, não foi observada diferença significativa entre os animais normais e os animais isquêmicos, injetados com células ou salina (Figura 20).



**Figura 20: Quantificação, por densitometria ótica, da expressão da proteína GAP-43.** Não foi observada diferença significativa na expressão da GAP-43 entre os dois grupos de animais, injetados com células ou salina. No entanto, a expressão de GAP-43 na região ipsilateral à lesão dos animais normais estava significativamente maior em relação aos grupos de animais isquêmicos. A expressão no lado contralateral, por outro lado, não diferiu significativamente entre os três grupos de animais analisados. CMMO: n = 4; Salina: n = 3; Normais: n = 4; \*\* =  $p < 0,01$



#### 4.0. DISCUSSÃO

Atualmente, tem se dado muito destaque a pesquisas realizadas com células-tronco, devido à possibilidade de uso futuro destas células em terapias celulares. As células-tronco adultas de medula óssea estão entre as mais estudadas, sendo utilizadas tanto em modelos animais quanto em testes clínicos, que buscam verificar a segurança e a aplicabilidade da terapia celular em diversas doenças. Dentre as doenças que acometem o sistema nervoso central, o AVE é uma das mais estudadas atualmente, devido principalmente à alta incidência na população e aos enormes custos decorrentes dos cuidados com os pacientes seqüelados. Os modelos animais de AVE isquêmico são bastante utilizados e muito úteis para se estudar mais a fundo a fisiopatologia da doença, assim como os possíveis tratamentos terapêuticos. Os progressos observados nas terapias celulares em modelos animais de AVE têm estimulado as pesquisas clínicas, que se encontram atualmente em sua fase inicial (fase 1), onde se testa a segurança e a exeqüibilidade do tratamento.

Os modelos animais de AVE estão bem estabelecidos e têm se mostrado reprodutíveis. O método mais utilizado atualmente para induzir uma isquemia focal é o de oclusão da artéria cerebral média (ACM). Resultados utilizando o modelo de isquemia por oclusão da ACM de ratos mostraram que o transplante das células causou melhoria no desempenho em testes funcionais. Na maioria dos casos, o melhor resultado foi observado com o transplante feito 24 h após a oclusão da ACM, tanto no transplante intracerebral como no sistêmico (Chen e cols., 2001; Li e cols., 2001 e 2002; Iihoshi e cols., 2004).

No presente estudo foi utilizado o modelo de isquemia unilateral por termocoagulação previamente descrito por Szele e colaboradores (1995), onde os vasos piais do córtex sensorimotor esquerdo de ratos foram coagulados através da aproximação de uma sonda quente (40w, 450°C-550°C), sem danificar a dura-máter. Experimentos com TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) mostraram que a lesão atingiu as 6 camadas corticais, deixando o corpo caloso intacto. Dentre as vantagens desse modelo, podemos destacar a fácil acessibilidade ao local a ser lesionado, a rápida execução e a baixa taxa de mortalidade dos animais.

A recuperação funcional não necessariamente se correlaciona com evidências de regeneração histológica e eletrofisiológica, pois as fibras nervosas podem se regenerar sem fazer as conexões sensoriais e motoras adequadas e o crescimento axonal descontrolado pode também superestimar o número de conexões funcionais. Esse fato estimula o interesse na utilização de testes funcionais como forma de avaliar os efeitos de lesões no sistema nervoso. A análise funcional pode oferecer o melhor e mais seguro método de demonstrar que axônios centrais não apenas se regeneram, mas também fazem as conexões corretas e funcionais. Ao caminhar em velocidade constante, os ratos mantêm um padrão postural e um modo de andar que são bastante consistentes e podem ser quantificados. Seus passos são regulares e simétricos, permitindo uma alta reprodutibilidade dos padrões das pegadas. O progresso dos ratos ao caminhar também é bastante regular, havendo informações consistentes para o local onde uma pata vai se posicionar em relação às outras, comprimento do passo e tempo gasto nas fases de repouso e de movimento do passo. O funcionamento normal da pata traseira do rato é fundamental para a postura e para uma caminhada regular e lesões no sistema nervoso afetam as funções da perna, da pata e dos dedos. Uma deficiência funcional na pata traseira

causa mudanças nos padrões estabelecidos de posição da pata ao caminhar, mudanças nas fases do passo e mudanças diretas na força/resistência da pata (Nichols e cols., 2005).

Dentre a ampla variedade de testes disponíveis para avaliar o comportamento sensorimotor de ratos, foram escolhidos para este trabalho o teste do cilindro, o *beam test* e o teste do adesivo. No teste do cilindro, assim como no *beam test*, foi analisada a taxa de assimetria no uso das patas, em função dos dias após a isquemia. No entanto, os cálculos para a determinação da taxa de assimetria foram diferentes para os dois tipos de teste. Enquanto no teste do cilindro essa taxa corresponde à porcentagem de uso (apoio) da pata ipsilateral à lesão menos a porcentagem de uso da pata contralateral, levando em consideração todos os apoios (inclusive com ambas as patas), no *beam test*, a taxa de assimetria corresponde à porcentagem de falhas no lado contralateral (em relação ao número total de passos deste lado) menos a porcentagem de falhas no lado ipsilateral à lesão (em relação ao número total de passos deste outro lado). Foram consideradas “falhas” todas as vezes em que o animal pisou do lado de fora da ponte principal, localizada mais centralmente. Considerando-se esses cálculos, podemos concluir que quanto mais alta a taxa de assimetria, maior a tendência de o animal apoiar a pata dianteira esquerda (não afetada) na parede do cilindro e de apoiar a pata traseira direita (afetada) na região mais externa da ponte, no *beam test*. No teste do adesivo, por outro lado, não foi analisada a taxa de assimetria, mas sim a porcentagem de retirada do adesivo da pata contralateral em primeiro lugar, em função dos dias pós-isquemia. Assim, quanto mais alta essa porcentagem, menor a deficiência motora da pata contralateral (afetada) em relação à pata ipsilateral e vice-versa. Neste teste,

não foi levado em consideração o tempo que o animal leva para remover o adesivo da pata esquerda ou direita.

No teste do cilindro, os animais foram filmados durante 5 minutos, após serem colocados dentro de um cilindro transparente. Foram contadas quantas vezes cada animal apoiou as patas dianteiras esquerda, direita ou ambas na parede do cilindro. Os testes foram realizados antes da isquemia, antes da injeção de células ou salina e 7, 14, 21 e 28 dias após a isquemia. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 10.

Experimentos realizados por Napieralski e colaboradores (1998) mostraram que a lesão isquêmica unilateral por termocoagulação resultou em um maior uso da pata dianteira não afetada (ipsilateral à lesão), 4 dias após a isquemia. Da mesma forma, Shanina e colaboradores (2006) mostraram que uma lesão isquêmica unilateral no córtex sensorimotor de ratos provocada por uma reação fotoquímica (PIT: do inglês *photochemically initiated thrombosis*) fez com que os animais passassem a usar preferencialmente a pata dianteira ipsilateral à lesão (não afetada) para se apoiar na parede do cilindro transparente. A preferência por apoiar a pata ipsilateral na parede do cilindro também foi observada após a aplicação tópica de endotelina, um potente vasoconstritor, no córtex sensorimotor, provocando uma lesão isquêmica unilateral (Adkins e cols., 2004; Hsu e Jones, 2006). Os resultados encontrados por estes pesquisadores estão de acordo com aqueles encontrados no presente estudo. Dessa forma, o modelo de lesão por termocoagulação mostrou-se eficaz, comprometendo de forma significativa o funcionamento da pata dianteira contralateral. O desempenho dos animais após a administração de células ou salina também está conforme o esperado, onde o grupo que recebeu células recuperou significativamente a função da pata afetada a partir

do 14º dia pós-isquemia. A grande quantidade de animais utilizada neste teste (12 receberam células e 10 receberam salina) não deixa dúvidas a respeito da eficácia do tratamento com células-tronco mononucleares da medula óssea. O fato de o teste do cilindro não exigir um treinamento prévio dos animais faz com que os resultados sejam ainda mais confiáveis, na medida em que se descarta a influência do aprendizado na análise do teste.

No *beam test*, os animais foram filmados durante o tempo necessário para atravessarem uma ponte que se estreitava ao longo do caminho e que apresentava duas regiões para apoio da pata durante a caminhada, uma mais central e elevada e outra mais lateral e rebaixada. O comprimento da ponte foi dividido nos níveis fácil, médio e difícil, conforme ela ia se estreitando. Na análise em câmera lenta dos vídeos, foram contados todos os passos de cada animal (patas traseiras esquerda e direita), observando-se a posição da pata em relação ao nível de dificuldade e se ele pisava na região central da ponte ou se errava e pisava na região mais externa. Os testes foram realizados antes da isquemia, antes da injeção de células ou salina e 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a isquemia. Os resultados obtidos estão ilustrados nas figuras 11, 12 e 13. A partir da análise dos gráficos, podemos concluir que os animais que receberam células apresentaram uma tendência de recuperação mais acelerada da pata afetada (7 dias pós-isquemia) em relação aos animais que receberam salina. O aumento do número de animais experimentais será importante, futuramente, para determinar se essa tendência se confirma.

Estudos realizados por Soblosky e colaboradores (1997) mostraram que uma lesão traumática (por impacto) unilateral no córtex sensorimotor de ratos provocou uma deficiência motora significativa na pata traseira contralateral. Essa deficiência foi se reduzindo ao longo do tempo e 35 dias após a cirurgia o desempenho dos

animais no teste estava próximo ao dos animais controle. O teste utilizado neste estudo, semelhante ao *beam test*, consistia de uma “escada”, que colocada na posição horizontal, funcionava como uma ponte para o animal caminhar. Eram considerados erros quando o animal não apoiava a pata traseira afetada na grade (degrau da “escada”) durante a caminhada. Shanina e colaboradores (2006) também mostraram que a isquemia unilateral provocada por uma reação fotoquímica produziu deficiências motoras na pata dianteira contralateral, observadas no teste em que o animal caminha sobre a grade. Lesões provocadas pela aplicação tópica unilateral de endotelina no córtex sensorimotor produziram as mesmas deficiências motoras na pata contralateral à lesão, neste teste (Adkins e cols., 2004). Os resultados observados no presente trabalho, no *beam test*, caminham em direção àqueles observados nos trabalhos descritos acima. Uma possível explicação para a pequena diferença entre os grupos, no *beam test*, estaria relacionada ao próprio fato dos animais serem obrigados a caminhar na ponte, o que influenciaria de forma positiva na sua recuperação motora. Apesar disso, o fato de os animais que receberam células apresentarem uma tendência de recuperação mais rápida da pata afetada, em relação ao grupo controle, demonstra que essas células apresentaram um efeito terapêutico.

No teste do adesivo, os animais foram observados para se verificar qual adesivo eles retiravam primeiro com a boca, o que foi colado na pata dianteira esquerda ou o que foi colado na pata dianteira direita. Cada animal realizou 4 vezes esse procedimento por dia de teste. Os testes foram realizados antes da isquemia, antes da injeção de células ou salina e 7, 14, 21 e 28 dias após a isquemia. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 14.

Estudos realizados por Ghabawie e colaboradores (2006) mostraram que a oclusão transiente da artéria cerebral média afeta a flexão e o fechamento dos dedos da pata dianteira contralateral à lesão. Hsu e Jones (2006) observaram deficiências motoras semelhantes na flexão dos dedos no lado contralateral após a aplicação tópica de endotelina no córtex sensorimotor de ratos. Biernaskie e colaboradores (2005), por sua vez, descobriram que a injeção de lidocaína no córtex sensorimotor oposto ao que sofreu isquemia por oclusão da artéria cerebral média provocava o aumento das deficiências motoras (flexão dos dedos) na pata dianteira afetada pela lesão isquêmica. Esse resultado sugere que o córtex sensorimotor contralateral, não afetado pela isquemia, contribui para a recuperação do membro afetado. Com relação ao teste do adesivo, experimentos recentes mostraram uma diminuição significativa do tempo médio de retirada dos adesivos das patas dianteiras em animais que receberam a injeção de células-tronco mesenquimais, 1 ou 7 dias após a oclusão da artéria cerebral média, comparando-se ao grupo controle, que recebeu a injeção de PBS (Chen e cols., 2001; Li e cols., 2005; Li e cols., 2006; Shen e cols., 2006). Esses últimos resultados não estão de acordo com os encontrados no presente estudo. Porém, é importante lembrar que no presente trabalho não foi levado em consideração o tempo de retirada dos adesivos, mas sim a determinação de qual adesivo foi retirado primeiro. Sendo assim, não é possível estabelecer uma comparação direta entre os dois tipos de experimento. A respeito dos experimentos que avaliam a flexão dos dedos das patas dianteiras após a isquemia, a comparação com o teste do adesivo é possível, pois a deficiência motora neste caso está diretamente relacionada à manipulação do adesivo com a pata e com a boca, permitindo a sua remoção. Logo, os resultados do teste do adesivo após a lesão isquêmica, no presente trabalho, estão de acordo com aqueles

que avaliam a flexão dos dedos descritos acima. O fato de o teste do adesivo envolver também o reconhecimento tátil (não afetado pela isquemia e, portanto, inalterado nos dois grupos), além do desempenho motor, explicaria em parte a não observação de uma recuperação motora significativa nos dois grupos de animais, injetados com células ou salina. Apesar disso, observou-se nos animais injetados com células uma tendência de recuperação funcional da pata afetada (contralateral) 28 dias após a isquemia, o que não foi observado no grupo controle. Como os testes só foram realizados até 28 dias após a isquemia, para verificar se essa tendência de recuperação funcional se confirma nos animais que receberam células, serão necessários outros experimentos e testes funcionais que abranjam um período maior de sobrevivência, superior a 28 dias.

Dentre as diversas moléculas possíveis de serem estudadas em modelos de AVE, foram escolhidas para este trabalho as proteínas sinaptofisina e a GAP-43, principalmente por estarem já estabelecidas como marcadores de plasticidade e por haver diversos trabalhos abordando a sua expressão em diferentes modelos animais.

A análise da expressão das proteínas GAP-43 e sinaptofisina foi feita através da técnica de *Western Blotting*. Os animais utilizados para esse experimento foram primeiramente submetidos à isquemia unilateral por termocoagulação e, no dia seguinte, injetados com CMMO ou com salina. O primeiro grupo de animais foi sacrificado 7 dias após a isquemia e foi então utilizado para a análise da GAP-43, enquanto o outro grupo só foi sacrificado 30 dias após a isquemia e então usado para a análise da sinaptofisina. Os tecidos retirados para a análise da expressão protéica correspondem ao córtex cingular adjacente à lesão (ipsilateral) e ao córtex contralateral homólogo à região da isquemia. A análise da expressão protéica de



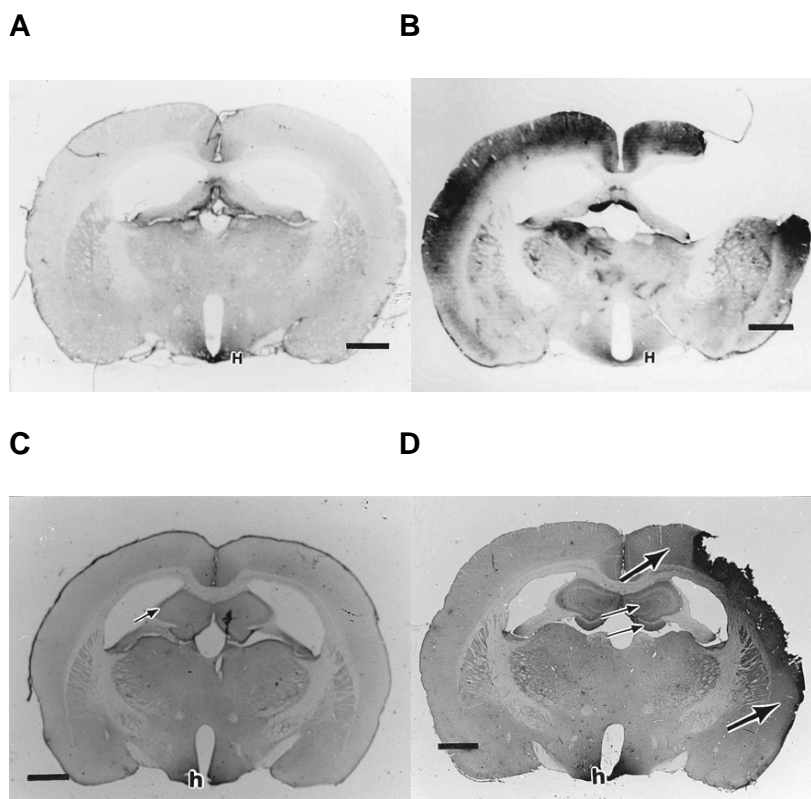
animais normais também foi realizada, sendo que as regiões extraídas eram homólogas às retiradas dos grupos isquêmicos. Assim, os animais normais foram utilizados como um grupo controle extra. Os resultados obtidos estão ilustrados nas figuras 15-20.

O modelo de isquemia por termocoagulação foi extensamente utilizado principalmente por Chesselet e colaboradores, sendo que a maioria dos estudos fez uma comparação entre as lesões por termocoagulação e as lesões por aspiração do tecido, utilizando uma pipeta de vidro. A região aspirada correspondia exatamente à região afetada pela termocoagulação (6 camadas do córtex sensorimotor), mas os efeitos observados foram bastante distintos. Por exemplo, injeções de Fluoro-Ruby ou BDA (traçadores anterógrados) no córtex contralateral de animais isquêmicos por termocoagulação resultaram na marcação de numerosas fibras no estriado ipsilateral à lesão, o que não foi observado após lesão por aspiração. Além disso, descobriu-se que as lesões por termocoagulação, mas não aquelas causadas por aspiração, produziam uma atividade neuronal sincronizada na periferia do infarto, nos 3 primeiros dias após a lesão, sendo esta sincronia posteriormente observada no córtex contralateral e homólogo. Experimentos também mostraram que a expressão da proteína GAP-43 no estriado ipsilateral aumentou após a lesão por termocoagulação, mas diminuiu drasticamente após a lesão por aspiração. Além disso, para verificar o efeito da sincronia neuronal sobre o brotamento axonal, realizou-se a infusão de TTX (tetrodotoxina; bloqueia os potenciais de ação, ligando-se aos canais de sódio dependentes de voltagem) na periferia da lesão por termocoagulação e a posterior injeção de BDA no córtex contralateral desses animais. Os resultados mostraram que o bloqueio da sincronia neuronal induzido pela administração de TTX provocou uma diminuição do número de terminais

axonais no estriado ipsilateral à lesão, em relação ao grupo controle, que não recebeu a infusão de TTX. Dessa forma, a atividade neuronal sincronizada observada após uma lesão por termocoagulação seria importante para estimular o brotamento axonal que se inicia no córtex contralateral e se estende até o estriado ipsilateral à lesão. Esse processo de indução do crescimento axonal estaria relacionado à alteração do ambiente extracelular naturalmente inibitório em indivíduos adultos (ex: proteína Nogo) ou mesmo à modificação do padrão de expressão gênica no córtex contralateral à lesão. As diferenças observadas entre as lesões por termocoagulação e por aspiração podem ser explicadas baseando-se no fato de que a perda dos neurônios corticais após uma lesão por termocoagulação é progressiva e só se completa em 5 a 7 dias pós-isquemia. Lesões por aspiração, por outro lado, destroem imediatamente tanto os corpos celulares quanto os axônios corticais. Diferenças na liberação de citocinas após os dois tipos de lesão poderiam também contribuir para os efeitos moleculares observados (Szele e cols., 1995; Napieralski e cols., 1996; Uryu e cols., 2001; Carmichael e Chesselet, 2002).

As modificações fisiológicas e anatômicas induzidas pela isquemia descritas acima se somam às descobertas de outros pesquisadores. Por exemplo, Stroemer e colaboradores (1995) observaram uma alta expressão da sinaptofisina (imunohistoquímica) tanto no córtex periférico à lesão quanto no córtex contralateral e homólogo, 60 dias após a isquemia por oclusão da artéria cerebral média e da artéria carótida comum ipsilateral (Figura 21: A e B). Curiosamente, no artigo publicado anteriormente, Stroemer e colaboradores (1992) descreveram que a expressão da sinaptofisina estava maior na periferia da lesão do que no lado contralateral homólogo, sob as mesmas condições experimentais. A expressão de GAP-43 (Stroemer e cols., 1992; Stroemer e cols., 1995) também estava aumentada

na periferia da lesão, mas não no córtex contralateral homólogo, considerando-se a janela temporal de 3 a 14 dias após a isquemia (Figura 21: C e D). Ng e colaboradores (1998) também observaram aumento na expressão de GAP-43 na periferia da lesão isquêmica, após 10 e 14 dias, enquanto Li e colaboradores (1998) verificaram o aumento da expressão de MAP2 (proteína associada ao microtúbulo - marcador dendrítico) e GAP-43 na periferia da lesão (oclusão da artéria cerebral média), em relação ao grupo controle, até 28 dias pós-isquemia. Artigos publicados pela pesquisadora Theresa Jones mostraram recentemente o aumento da expressão de MAP2 no córtex contralateral homólogo em 14 ou 20 dias após a lesão cortical induzida pela aplicação tópica de endotelina (Allred e Jones, 2004; Hsu e Jones, 2006).



**Figura 21: Reação imunohistoquímica para sinaptofisina (A e B) e GAP-43 (C e D).** As figuras A e C correspondem a animais normais; B: animal isquêmico, sacrificado 60 dias após a lesão; D: animal isquêmico, sacrificado 7 dias após a lesão. Cortes coronais de encéfalo de rato. Adaptado de *Stroemer e cols. (1995), Stroke*.

Além disso, diversos trabalhos publicados por Chopp e colaboradores mostraram que a injeção de MSCs após uma isquemia por oclusão da artéria cerebral média induziu a recuperação funcional e o aumento da expressão de moléculas relacionadas à regeneração. Por exemplo, observou-se que a injeção de células mesenquimais 24 horas após a isquemia, na artéria carótida, induziu melhoras funcionais e o aumento da expressão de sinaptofisina (imunohistoquímica) na periferia da lesão, 28 dias após a isquemia (Zang e cols., 2006; Shen e cols., 2006). Li e colaboradores (2005) mostraram que a injeção de células 7 dias após a isquemia, na veia da cauda, reduziu a cicatriz glial e provocou o aumento da

expressão de GAP-43 na borda dessa cicatriz e na zona subventricular, além de promover uma recuperação funcional significativa em 1, 2, 3 e 4 meses após a lesão (teste de remoção do adesivo e teste de medição da severidade neurológica).

Os resultados referentes à expressão da MAP2 (após lesão por endotelina) e da sinaptofisina (60 dias após a isquemia) no córtex contralateral estão de acordo com aqueles encontrados no presente estudo, onde foi observada uma alta expressão da sinaptofisina no lado contralateral em todos os animais analisados, 30 dias após a isquemia. Os resultados da expressão da GAP-43 descritos por outros trabalhos diferem, no entanto, dos que foram observados no presente estudo, onde a expressão da proteína estava alta no córtex contralateral e baixa na periferia da lesão, 7 dias após a isquemia. Diferentemente do que foi descrito pelo grupo do Chopp, não foi observado aumento da expressão de sinaptofisina na periferia da lesão nos animais que receberam células, em relação ao grupo controle.

Apesar de a maioria dos trabalhos descreverem o aumento da expressão de GAP-43 na periferia da lesão, existem alguns aspectos que precisam ser considerados. Por exemplo, sabe-se que a área adjacente à lesão é tipicamente caracterizada pelo grande *background* nos experimentos de imunohistoquímica. Esse fato poderia de alguma forma mascarar a real marcação para diversas proteínas nesta região, como para a GAP-43 ou para a sinaptofisina. Outro fato relevante é que a GAP-43 poderia desempenhar outra função dentro da célula que não estivesse relacionada diretamente ao crescimento axonal, como, por exemplo, participando da indução da LTP (Benowitz e Routtenberg, 1997; Namgung e cols., 1997). É importante lembrar que a marcação para GAP-43 ou mesmo para a sinaptofisina não é um indício absoluto de que ocorre crescimento axonal e sinaptogênese em uma determinada região. Sendo assim, são necessários também

os experimentos com traçadores neuronais e uma posterior análise ultraestrutural dos cones de crescimento para se poder afirmar com mais segurança a respeito dos brotamentos axonais induzidos pela isquemia ou pela administração de células-tronco.

Os estudos realizados por Chesselet e colaboradores acima mencionados, além dos experimentos utilizando fMRI (ressonância magnética funcional) pós-isquemia (Takata e cols., 2006) confirmam a importância do córtex contralateral para a recuperação funcional dos animais isquêmicos. Dessa forma, esses resultados justificam em parte a alta expressão de GAP-43 no córtex contralateral à lesão encontrada no presente trabalho. Em experimentos futuros, será fundamental avaliar a importância do estriado ipsilateral à lesão na recuperação funcional após a isquemia e após a administração de células-tronco mononucleares da medula óssea. Também será importante verificar futuramente os níveis de expressão de GAP-43 e sinaptofisina em outras regiões do córtex, além das que foram utilizadas neste trabalho, comparando-se os animais isquêmicos que receberam células aos animais isquêmicos que receberam salina.

As diferenças entre os resultados encontrados no presente estudo e os resultados já publicados sobre o assunto são justificáveis, uma vez que existem muitas variáveis a serem consideradas. Podemos citar como exemplo os diferentes modelos de isquemia, janela temporal, regiões analisadas, técnicas de análise (Ex: imunohistoquímica/*Western Blotting*), além de todas as variações referentes aos testes funcionais.

No entanto, é válido destacar a importância do efeito terapêutico das células mononucleares observado nos testes funcionais. Esse resultado contribui de forma significativa para o avanço das pesquisas com células-tronco, especialmente com

células-tronco mononucleares da medula óssea, que em um futuro próximo poderão ser uma das principais formas de tratamento para o AVE.

## 6.0. CONCLUSÕES

- O aumento significativo da recuperação funcional após o tratamento com as CMMO, de acordo com o teste do cilindro, indica que este tratamento apresenta efeito terapêutico;
- Não foi observada diferença significativa na expressão da sinaptofisina e da GAP-43 entre os grupos experimental e controle. No entanto, os resultados da GAP-43 indicam diminuição da sua expressão na periferia da lesão, induzida pela isquemia e não afetada pela injeção de células.
- A recuperação observada no teste do cilindro pode ser atribuída a modificações estruturais e funcionais no sistema nervoso que não estejam diretamente relacionadas à expressão das proteínas GAP-43 e sinaptofisina, e pode envolver outras regiões além da periferia da lesão.



## 7.0. BIBLIOGRAFIA

Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. (2004) Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circulation Research*, 95 (7): 671-676

Adkins D.L., Voorhies A.C., Jones T.A. (2004) Behavioral and neuroplastic effects of focal endothelin-1 induced sensorimotor cortex lesions. *Neuroscience*, 128: 473-486

Allred R.P., Jones T.A. (2004) Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex. *Experimental Neurology*, 190: 433-445

Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, 36 (2): 165-179

Amaral D.G. (2000a) A organização anatômica do sistema nervoso central. In Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (editores) *Princípios da Neurociência* (4ª edição - 2003). Editora Manole Ltda., Barueri (SP), cap. 17, p. 317-336

Amaral D.G. (2000b) A organização funcional da percepção e do movimento. In Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (editores) *Princípios da Neurociência* (4ª edição - 2003). Editora Manole Ltda., Barueri (SP), cap. 18, p. 337-348

Ardehali, M.R., Rondouin G. (2003) Microsurgical intraluminal middle cerebral artery occlusion model in rodents. *Acta Neurologica Scandinavica*, 107 (4): 267-275.

Armulik A., Abramsson A., Betsholtz C. (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res*, 97 (6): 512-523

Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. (2005) Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57 (6): 874-882

Barry F.P., Murphy J.M. (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (4): 568-584

Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. (2001a) A estrutura do sistema nervoso. Livro: *Neurociências - Desvendando o sistema nervoso* (2ª edição - 2002). Editora ArtMed S.A., Porto Alegre (RS), cap. 7, p. 164-200

Bear M.F., Connors B.W., Paradiso M.A. (2001b) Controle encefálico do movimento. Livro: Neurociências - Desvendando o sistema nervoso (2ª edição - 2002). Editora ArtMed S.A., Porto Alegre (RS), cap. 14, p. 466-492

Benowitz L.I., Routtenberg A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci.*, 20 (2): 84-91

Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., Robey P.G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells*, 19 (3): 180-192

Biernaskie J., Szymanska A., Windle V., Corbett D. (2005) Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *European Journal of Neuroscience*, 21: 989-999

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254

Buchkremer-Ratzmann I., Witte O.W. (1997) Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport*, 8 (2): 519-522

Carmichael S.T., Wei L., Rovinen C.M., Woolsey T.A. (2001) New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiology of Disease*, 8: 910-922

Carmichael S.T., Chesselet M.F. (2002) Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *The Journal of Neuroscience*, 22 (14): 6062-6070

Carmichael S.T. (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *The Neuroscientist*, 9 (1): 64-75

Chen J., Li Y., Wang L., Zhang Z., Lu D., Lu M., Chopp M. (2001) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 32: 1005-1011

Chen J., Li Y., Katakowski M., Chen X., Wang L., Lu D., Lu M., Gautam S.C., Chopp M. (2003) Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and

promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J. Neurosci. Res.*, 73 (6): 778-786

Cheshier S.H., Morrison S.J., Liao X., Weissman I.L. (1999) *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS) U S A*, 96 (6): 3120-3125

Chopp M., Li Y. (2002) Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*, 1: 92-100

Correa P., Felix R., Mendonça M.L. (2005) Dual-head coincidence gamma camera FDG-PET before and after autologous bone marrow mononuclear cell implantation in ischaemic stroke. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 32: 99

Cramer S.C., Chopp M. (2000) Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci.*, 23: 265-271

Dani J.W., Armstrong D.M., Benowitz L.I. (1991) Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. *Neuroscience*, 40: 277-287

De Vries, H.E., Kuiper J., De Boer A.G., Van Berkel T.J.C., Breimer D.D. (1997) The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacological Reviews*, 49 (2): 143-152

Dickerson L.M., Carek P.J. e Quattlebaum R.G. (2007) Prevention of recurrent ischemic stroke. *Stroke Prevention*, 382-388

Dijkhuizen R.M., Asahi M., Wu O., Rosen B.R., Lo E.H. (2001) Delayed rt-PA treatment induces rapid blood-brain barrier breakdown and subsequent hemorrhagic transformation in a rat embolic stroke model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21: 964-971

Dobkin B.H. (2005) Rehabilitation after stroke. *The New England journal of medicine*, 1677-1684

Doetsch F., Preteanu L., Caille J., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36 (6): 1021-1034

Emerich D.F., Dean R.L., Bartus R.T. (2002) The role of leucocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Experimental Neurology*, 173: 168-181

Escolar M.L., Poe M.D., Provenzale J.M., Richards K.C., Allison J., Wood S., Wenger D.A., Pietryga D., Wall D., Champagne M., Morse R., Krivit W., Kurtzberg J. (2005) Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *The New England Journal of Medicine*, 352 (20): 2069-2081

Fisher M., Ratan R. (2003) New perspectives on developing acute stroke therapy. *Ann. Neurol.*, 53: 10-20

Fuchs E., Segre J.A. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100: 143-155

Gharbawie O.A., Auerb R.N., Whishawa I.Q. (2006) Subcortical middle cerebral artery ischemia abolishes the digit flexion and closing used for grasping in rat skilled reaching. *Neuroscience*, 137: 1107-1118

Ghez C., Krakauer J. (2000) A organização do movimento. In Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (editores) *Princípios da Neurociência* (4ª edição - 2003). Editora Manole Ltda., Barueri (SP), cap. 33, p. 653-673

Gibson C.L., Jones N.C., Prior M.J. (2005) G-CSF suppresses edema formation and reduces interleukin-1 $\beta$  expression after cerebral ischemia in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 64 (9): 763-769

Golledge J., MChir, FRACS, Campenhout A.V., Pal S., Rush C. (2007) Bone marrow-derived cells and arterial disease. *Journal of Vascular Surgery*, 46 (3): 590-600

Graham S.M., McCullough L.D., Murphy S.J. (2004) Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comparative Medicine*, 54 (5): 486-496

Gregory C.A., Prockop D.J., Spees J.L. (2005) Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Experimental Cell Research*, 306 (2): 330-335

Haas S., Weidner N., Winkler J. (2005) Adult stem cell therapy in stroke. *Curr. Opin. Neurol*, 18 (1): 59-64

Hagemann G., Redecker C., Neumann-Haefelin T., Freund H.J., Witte O.W. (1998) Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann. Neurol.*, 44 (2): 255-258

Hakim A.M. (1987) The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol. Sci.*, 14: 557-559

Hamano K., Li T.S., Kobayashi T., Kobayashi S., Matsuzaki M., Esato K. (2000) Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Transplant*, 9 (3): 439-443

Hanaya R., Boehm N., Nehlig A. (2007) Dissociation of the immunoreactivity of synaptophysin and GAP-43 during the acute and latent phases of the lithium-pilocarpine model in the immature and adult rat. *Experimental Neurology*, 204: 720-732

Hsu J.E., Jones T.A. (2006) Contralesional neural plasticity and functional changes in the less-affected forelimb after large and small cortical infarcts in rats. *Experimental Neurology*, 201: 479-494

Iadecola C., Alexander M. (2001) Cerebral ischemia and inflammation. *Current Opinion in Neurology*, 14 (1): 89-94

Iihoshi S., Honmou O., Houkin K., Hashi K., Kocsis J.D. (2004) A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research*, 1007: 1-9

Iwami Yo, Masuda H., Asahara T. (2004) Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future *J. Cell. Mol. Med.*, 8 (4): 488-497

Jahn R., Schiebler W., Ouimet C., Greengard P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Cell Biology*, 82: 4137-4141

Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X.O., Xie L., Greenberg D.A. (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 99 (18): 11946-11950

Kan I., Melamed E., Offen D. (2005) Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Current Drug Targets*, 6: 31-41

Knaus P., Betz H. (1990) Mapping of a dominant immunogenic region of synaptophysin, a major membrane protein of synaptic vesicles. *Febs Letters*, 261 (2): 358-360

Kilic U., Kilic E., Jarve A. (2006) Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J. Neurosci.*, 26: 12439-12446

Kniesel U., Wolburg H. (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 20 (1): 57-76

Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. (2000) Transplantation of cultured neuronal cells for patients with stroke. *Neurology*, 55: 565-569

Kondziolka D., Steinberg G.K., Wechsler L. (2005) Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a Phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.*, 103 (1): 38-45

Kong D., Melo L.G., Gnecci M., Zhang L., Mostoslavsky G., Liew C.C., Pratt R.E., Dzau V.J. (2004) Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*, 110: 2039-2046

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685

Lambrechts D., Carmeliet P. (2006) VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762: 1109-1121

Laughlin M.J. (2001) Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant*, 27(1): 1-6

Le Bras B., Barallobre M.J., Homman-Ludiye J. (2006) VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat. Neurosci.*, 9 (3): 340-348

Leube R.E., Kaiser P., Seiter A., Zimbelmann R., Franke W.W., Rehm H., Knaus P., Prior P., Betz H., Reinke H., Beyreutherl H., Wiedenmann B. (1987) Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *The EMBO Journal*, 6 (11): 3261-3268

Li Y., Jiang N., Powers C., Chopp M. (1998) Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 29: 1972-1980

Li Y., Chen J., Wang L., Lu M., Chopp M. (2001) Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*, 56: 1666-1672

Li Y., Chen J., Chen X.G., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Katakowski M., Zhang L.J., Lu M., Janakiraman N., Chopp M. (2002) Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*, 59 (4): 514-523

Li Y., Chen J., Zhang C.L., Wang L., Lu D., Katakowski M., Gao Q., Shen L.H., Zhang J., Lu M., Chopp M. (2005) Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 49: 407-417

Li Yi, McIntosh K., Chen J., Zhang C., Gao Qi, Borneman J., Raginski K., Mitchell J., Shen L., Zhang J., Lu D., Chopp M. (2006) Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats *Experimental Neurology*, 198: 313-325

Lo E.H., Dalkara T., Moskowitz M.A. (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 399-414.

Lotufo PA. (2005) Stroke in Brazil: a neglected disease. *São Paulo Med J.*, 123 (1): 3-4

Majid A., He Y.Y., Gidday J.M., Kaplan S.S., Gonzales E.R., Park T.S., Fenstermacher J.D., Wei L., Choi D.W., Hsu C.Y. (2000) Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. *Stroke*, 31: 2707-2714

Mark K.S., Davis T.P. (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 282: 1485-1494

Maurer M.H., Tripps W.K., Feldmann R.E., Kuschinsky W. (2003) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neuroscience Letters*, 344 (3): 165-168

- Meirelles L.S., Chagastelles P.C., Nardi N.B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119: 2204-2213
- Meltzer C.C., Kondziolka D., Villemagne V.L. (2001) Serial [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurgery*, 49 (3): 586-591
- Mendez-Otero R., de Freitas G.R., André C., de Mendonça M.L., Friedrich M., Oliveira-Filho J. (2007) Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Regen. Med.*, 2 (4): 417-423
- Mendonça M.L., Freitas G.R., Silva S.A. (2006) Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke. *Arq. Bras. Cardiol.*, 86 (1): 52-55
- Mergenthaler P., Dirnagl U., Meisel A. (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metabolic Brain Disease*, 19 (314): 151-167
- Mir H.M., Tatsukawa K.J., Carmichael S.T., Chesselet M.F., Kornblum H.I. (2004) Metabolic correlates of lesion-specific plasticity: an in vivo imaging study. *Brain Research*, 1002: 28-34
- Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N. Tamura A., Kirino T., Nakafuku M. (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 110 (4): 429-441
- Namgung U., Matsuyama S., Routtenberg A. (1997) Long-term potentiation activates the GAP-43 promoter: selective participation of hippocampal mossy cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11675-11680
- Napieralski J.A., Butler A.K., Chesselet M.F. (1996) Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 373: 484-497
- Napieralski J.A., Banks R.J.A., Chesselet M.F. (1998) Motor and somatosensory deficits following uni- and bilateral lesions of the cortex induced by aspiration or thermocoagulation in the adult rat. *Experimental Neurology*, 154: 80-88



Neumann-Haefelin T., Hagemann G., Witte O.W. (1995) Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neuroscience Letters*, 193 (2): 101-104

Ng S.C., De la Monte S.M., Conboy G.L., Karns L.R., Fishman M.C. (1998) Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron*, 1: 133-9

Nichols C.M., Myckatyn T.M., Rickmana S.R., Fox I.K., Hadlock T., Mackinnon S.E. (2005) Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behavioural Brain Research*, 163: 143-158

Pasinelli P., Brown R.H. (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7 (9): 710-723

Paxinos G., Watson C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, Sydney

Prockop D.J. (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276 (5309): 71-74

Rafii S., Lyden D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine*, 9 (6): 702-712

Rice C.M., Scolding N.J. (2004) Adult stem cells – reprogramming neurological repair? *Lancet*, 364: 193-199

Salhia B., Angelov L., Roncari L., Wu X., Shannon P., Guha A. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain Research*, 883 (1): 87-97

Saper C.B., Iversen S., Frackowiak R. (2000) Integração da função motora e sensória: as áreas de associação do córtex cerebral e as capacidades cognitivas do encéfalo. In Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. (editores) *Princípios da Neurociência* (4ª edição - 2003). Editora Manole Ltda., Barueri (SP), cap. 19, p. 349-380

Savitz S.I., Rosenbaum D.M., Dinsmore J.H., Wechsler L.R., Caplan L.R. (2002) Cell transplantation for stroke. *Ann. Neurol.*, 52: 266-275

Schabitz W.R., Schneider A. (2007) New targets for established proteins: exploring GCS-F for treatment of stroke. *Trends Pharmacol. Sci.*, 28: 157-161

Schaechter J.D., Moore C.I., Connell B.D., Rosen B.R., Dijkhuizen R.M. (2006) Structural and functional plasticity in the somatosensory cortex of chronic stroke patients. *Brain*, 129: 2722-2733

Schallert T., Fleming S.M., Leasure J.L., Tillerson J.L., Bland S.T. (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39: 777-787

Schallert T., Woodlee M.T., Fleming S.M. (2002) Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In J. Krieglstein, S. Klumpp (editores), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*, Stuttgart, Medpharm Scientific Publishers, p. 201-216

Schneider A., Kruger C., Steigleder T. (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.*, 115: 2083-2098

Schilling M., Besselmann M., Leonhard C., Mueller M., Ringelstein E.B., Kiefer R. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, 183: 25-33

Shamblott M.J., Axelman J., Littlefield J.W., Blumenthal P.D., Huggins G.R., Cui Y., Cheng L., Gearhart J.D. (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 113-118

Shanina E.V., Schallert T., Witte O.W., Redecker C. (2006) Behavioral recovery from unilateral photothrombotic infarcts of the forelimb sensorimotor cortex in rats: role of the contralateral cortex. *Neuroscience*, 139: 1495-1506

Shen L.H., Li Y., Chen J., Zhang J., Vanguri P., Borneman J., Chopp M. (2006) Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*, 137: 393-399

Short B., Brouard N., Occhiodoro-Scott T., Ramakrishnan A., Simmons P.J. (2003) Mesenchymal stem cells. *Archives of Medical Research*, 34 (6): 565-571

Shyu W.C., Lin S.Z., Lee C.C. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ*, 174: 927-933

Soblosky J.S., Colgin L.L., Chorney-Lane D., Davidson J.F., Carey M.E. (1997) Ladder beam and camera video recording system for evaluating forelimb and hindlimb deficits after sensorimotor cortex injury in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 78: 75-83

Soares M.B., Lima R.S., Rocha L.L., Takyia C.M., Pontes-de-Carvalho L., Carvalho A.C., Ribeiro-dos-Santos R. (2004) Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *American Journal of Pathology*, 164 (2): 441-447

Solaroglu I., Cahill J., Jadhav V. (2006) A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*, 37: 1123-1128

Sprigg N., Bath P.M., Zhao L. (2006) Granulocyte colony-stimulating-factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the stem cell trial of recovery enhancement after stroke (STEMS) pilot randomized controlled trial. *Stroke*, 37 (12): 2979-2983

Storkebaum E., Lambrechts D., Dewerchin M. (2005) Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.*, 8 (1): 85-92

Streit W., Walter S.A., Pennell N.A. (1999) Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology*, 57: 563-581

Stroemer R.P., Kent T.A., Hulsebosch C.E. (1992) Increase in synaptophysin immunoreactivity following cortical infarction. *Neuroscience Letters*, 147: 21-24

Stroemer R.P., Kent T.A., Hulsebosch C.E. (1993) Acute increase in expression of growth associated protein GAP-43 following cortical ischemia in rat. *Neuroscience Letters*, 162: 51-54

Stroemer R.P., Kent T.A., Hulsebosch C.E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*, 26: 2135-2144

Sun Y., Jin K., Xie L., Childs J., Mao X.O., Logvinova A., Greenberg D.A. (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111 (12): 1843-1851

Szele F.G., Alexander C., Chesselet M.F. (1995) Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *The Journal of Neuroscience*, 15 (6): 4429-4448

Takata K., Yamauchi H., Tatsuno H., Hashimoto K., Abo M. (2006) Is the ipsilateral surrounding the lesion or the non-injured contralateral cortex important for motor recovery in rats with photochemically induced cortical lesions? *Eur. Neurol.*, 56: 106-112

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci (PNAS) U S A*, 76: 4350-4354

Traystman R.J. (2003) Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR Journal*, 44 (2): 85-95

Türeyen K., Vemuganti R., Sailor K.A., Dempsey R.J. (2005) Ideal suture diameter is critical for consistent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosurgery*, 56: 196-200

Urbich C., Dimmeler S. (2004) Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circulation Research*, 95: 343-353

Uryu K., Mackenzie L., Chesselet M.F. (2001) Ultrastructural evidence for differential axonal sprouting in the striatum after thermocoagulatory and aspiration lesions of the cerebral cortex in adult rats. *Neuroscience*, 105 (2): 307-316

Wiedenmann B., Franke W.W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, 41(3):1017-28

Wise S.P., Donoghue J.P. (1986) Motor cortex of rodents. In Jones E.G., Peters A. (editores) *Cerebral Cortex - Sensorimotor areas and aspects of cortical connectivity*. Editora Plenum Press, vol. 5, cap. 7, p. 243-270

Wood H.B., May G., Healy L., Enver T., Morriss-Kay G.M. (1997) CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*, 90 (6): 2300-2311

Wright D.E., Wagers A.J., Gulati A.P., Johnson F.L., Weissman I.L. (2001) Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*, 294: 1933-1936

Ying Q.L., Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416 (6880): 545-8

Young P.P., Vaughan D.E., Hatzopoulos A.K. (2007) Biological properties of endothelial progenitor cells (EPCs) and their potential for cell therapy. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 49 (6): 421-429

Yusuf S. (2002) Two decades of progress in preventing vascular disease. *Lancet*, 360: 2-3

Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q., Chopp M. (2002) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation Research*, 90: 284-288

Zhang C., Li Y., Chen J., Gao Q., Zacharek A., Kapke A., Chopp M. (2006) Upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, GAP junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*, 141: 687-695

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)