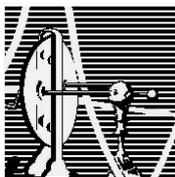


ANDRÉIA DE VASCONCELOS DOS SANTOS

Janela terapêutica para administração de  
células de medula óssea em um modelo pré-  
clínico de acidente vascular encefálico  
isquêmico

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  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ANDRÉIA DE VASCONCELOS DOS SANTOS**

**Janela terapêutica para administração de células  
de medula óssea em um modelo pré-clínico de  
acidente vascular encefálico isquêmico**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências biológicas (Biofísica).

**Orientadora: Dra. Rosalia Mendez Otero**  
**2º orientador: Dr. Arthur Giraldi Guimarães**

**Rio de janeiro**  
**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**De Vasconcelos, Andréia Santos**

**Janela terapêutica para administração de células mononucleares de medula óssea em um modelo pré-clínico de acidente vascular encefálico isquêmico. Rio de Janeiro, 2009.**

114 fls.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde, 2009.

Orientadora: Dra. Rosalia Mendez Otero

1. Acidente vascular encefálico; 2. Células de medula óssea; 3. Fluoro-Jade C; 4. Testes funcionais; 5. Gliose reativa – Teses I. Mendez-Otero, Rosalia (orient.) e Giral-di-Guimarães, Arthur (co-orient.). II Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde. III. Janela terapêutica para administração de células mononucleares de medula óssea em um modelo pré-clínico de Acidente vascular encefálico isquêmico.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Andréia de Vasconcelos dos Santos

**Janela terapêutica para administração de células mononucleares de medula óssea em um modelo pré-clínico de acidente vascular encefálico isquêmico.**

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2009

---

**Prof. Dra. Rosalia Mendez Otero – Orientador** Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS-UFRJ

---

**Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães – 2º Orientador** Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

---

**Prof. Dr. Alfred Sholl Franco – Membro da banca examinadora** Laboratório de Neurogênese do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS-UFRJ

---

**Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro – Membro da banca examinadora** Laboratório de Farmacologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas, CCS-UFRJ

---

**Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg – Membro da banca examinadora** Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS-UFRJ

---

**Prof. Dr. João Ricardo Lacerda de Menezes – Revisor / Suplente externo** Laboratório de Neuroanatomia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas, CCS-UFRJ

---

**Prof. Dra. Patricia Franca Gardino – Suplente interna** Laboratório de Neurobiologia da Retina do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS-UFRJ

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, do Programa de Terapia Celular e Bioengenharia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientado pela Dra. Rosalia Mendez Otero e co-orientado pelo Dr. Arthur Giraldo 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 dissertação a  
Antonio Marcos Mello Moraes

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Rosalia Mendez Otero pela oportunidade, confiança e orientação;

Ao Arthur Giraldi Guimarães por ter me ensinado os testes funcionais e a cirurgia de termocoagulação utilizados neste projeto;

A todos os colegas do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular: Aline, André, Camila, Fernanda, Felipe, Louise Louro, Marcella, Marcelo, Michelle, Pedro, Ricardo, Suelen, Victor e Virgínia;

Em especial à Mariana Godoy pelo carinho e por estar sempre disposta a me ajudar. A Juliana Reis, Jasmin e Louise Moraes pela participação nos experimentos, e também pelo apoio e amizade;

À equipe da Dra Lea Mirian pela marcação das células com tecnécio;

Aos colegas do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular pelo respeito, atenção e auxílio. Em especial ao Bruno Paredes pela amizade e ajuda com a análise celular no citômetro de fluxo;

Aos colegas do Laboratório de Neurogênese pelo auxílio, em especial à minha querida amiga Isadora Oliveira, Brian Njaine e Bruno Gonçalves pela amizade e ajuda com o *Western Blot*;

Aos colegas do Laboratório de Neuroanatomia Celular, em especial aos meus queridos Anna Lenice Xavier e João Ricardo Lacerda de Menezes;

As agências fomentadoras CAPES, CNPq e FAPERJ por terem contribuído diretamente financiando este projeto.

## RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é a terceira maior causa de morte no mundo, sendo a principal causa de morte no Brasil. A única terapia farmacológica disponível no momento é o uso do agente trombolítico ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rTPA), que deve ser administrado até 3 h após os primeiros sintomas, o que inviabiliza sua utilização por grande parte dos pacientes. Em função destes fatores, a busca por novas alternativas terapêuticas é altamente relevante. Neste trabalho investigamos o possível efeito benéfico do uso de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) em um modelo de isquemia cortical por termocoagulação em ratos. Administramos CMMOs ( $3 \times 10^7$ ) ou salina, através da veia jugular, 1, 7, 14 ou 30 dias após a isquemia (DPI) e os animais foram avaliados por testes funcionais durante 77 dias. Observamos melhora funcional significativa, avaliada pelo teste do cilindro nos animais que receberam as células 1 e 7 DPI ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e esta melhora foi mantida por pelo menos 70 dias após o tratamento. Os animais que receberam as células 14 ou 30 dias após a isquemia não mostraram melhora significativa quando comparados com o grupo que recebeu salina. Avaliamos também o efeito de células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMs -  $3 \times 10^6$ ), administradas 1DPI. Os animais tratados com CTMs apresentaram melhora significativa ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo que recebeu salina. Esta melhora foi semelhante à observada nos animais que receberam CMMOs. Para investigar os possíveis mecanismos de ação destas células, analisamos a morte neuronal e a gliose reativa nos diferentes grupos. Não observamos diferença significativa no número de células marcadas com Fluoro-Jade C (marcador de neurônios em degeneração) entre os animais tratados com CMMOs 1 ou 7 dias após a isquemia e os animais injetados com salina. A gliose reativa foi investigada através da expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) em animais injetados com CMMOs ou salina 1 e 7 DPI e utilizados nos testes funcionais durante 77 dias. Análises por imunohistoquímica e por *Western blot* demonstraram aumento na expressão de GFAP nos córtices ipsilaterais à lesão, tanto de animais que receberam CMMOs como daqueles injetados com salina. Estes resultados nos permitiram concluir que as CMMOs exercem efeito benéfico quando administradas até 7 dias após a isquemia e que as CTMs apresentam efeito terapêutico semelhante a das CMMOs no período avaliado (1 dia após a isquemia). Entretanto não observamos diferença entre o número de células em degeneração na periferia da lesão após o tratamento com CMMOs, além do perfil de gliose reativa não ter apresentado variação entre os grupos tratado e controle analisados 77 dias após a isquemia.

## ABSTRACT

Stroke is the third main cause of death worldwide, it is the leading cause of death in Brazil and the largest cause of disability in adults. At present, the only therapy available to treat ischemic stroke is the thrombolytic agent recombinant tissue plasminogen activator (rTPA) that should be administered in the first three hours after symptoms onset which compromises their use in most of the patients. Thus, the search for new therapeutic approaches is highly relevant. In this work we investigated the possible beneficial effects of bone marrow mononuclear cells (BMMCs) in a rat model of cortical ischemia by thermocoagulation. BMMCs ( $3 \times 10^7$ ) or saline were administered through the jugular vein 1, 7, 14 or 30 days after ischemia (DPI) and the animals were evaluated by functional tests during 77 days. We observed significant functional improvement assessed by the cylinder test in animals that received cells 1 and 7 DPI ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and this improvement was maintained for at least 70 days after treatment. The animals that received cells 14 or 30 days after ischemia showed no significant improvement when compared with the group that received saline. We also evaluated the effect of mesenchymal stem cells from bone marrow (MSCs -  $3 \times 10^6$ ), administered 1 DPI. The MSCs-treated animals showed significant improvement ( $p < 0.0001$ ) when compared with the saline injected animals. This improvement was similar to that seen in animals that received BMMCs. To investigate the possible mechanisms of action of these cells we analyzed neuronal death and reactive gliosis in the different groups. Two days after injected there was no significant difference in the number of cells labeled with Fluoro-Jade C ( a marker of neuronal degeneration) among animals treated with BMMCs 1 day or 7 days after ischemia and animals injected with saline. The reactive gliosis was investigated through the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in animals injected with BMMCs or saline 1 and 7 DPI and used in functional tests for 77 days. Immunohistochemical and Western blot analysis showed an increase in the expression GFAP in the cortex ipsilateral to the lesion both in animals that received BMMCs and those injected with saline. We can conclude that BMMCs exert beneficial effect when administered to up 7 days after ischemia and that MSCs present therapeutic effect similar to BMMCs in the evaluated period (1 day after ischemia). However we did not see any difference in the number of degenerating cells in the peripheral area of the injury after BMMCs treatment. Furthermore, the pattern of the reactive gliosis showed no difference between control and treated groups analyzed 77 days after ischemia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACM – Artéria cerebral média

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVE – Acidente vascular encefálico

CEMOs – Células estromais de medula óssea

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CMMOs – Células mononucleares da medula óssea

CSPGs – Proteoglicanos do tipo sulfato de condroitina (do inglês: *chondroitin sulfate proteoglycans*)

CTMs – Células-tronco mesenquimais

CTMhs – Células-tronco mesenquimais humanas

CTHs – Células-tronco hematopoiéticas

CTNs – Células-tronco neurais

DPI – Dias pós-isquemia

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês: endothelial nitric oxide synthase)

CTEs – Células-tronco embrionárias

G-CSF – Fator estimulador de colônia de granulócitos (do inglês: *granulocyte colony stimulating factor*)

GFAP – Proteína ácida fibrilar glial (do inglês: *Glial fibrillary acidic protein*)

GFP – Proteína verde fluorescente (do inglês: *Green fluorescent protein*)

FDA – *Food and Drug Administration*

hUCB – Sangue de cordão umbilical humano (do inglês: *human umbilical cord blood*)

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida do inglês: *induced nitric oxide synthase*)

JT – Janela terapêutica

MMPs – Metaloproteinases de matriz (do inglês: *matrix metalloproteinases*)

M1 – Córtex motor primário

NINDS – *National Institute of Neurological Disorder and Stroke*

nNOS – Óxido nítrico sintase neural (do inglês: *neural nitric oxide synthase*)

NO – Óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*)

NOS – Óxido nítrico sintase (do inglês: *nitric oxide synthase*)

NT2 – Linhagem celular derivada de teratocarcinoma humano (do inglês: *human teratocarcinoma-derived cell line*)

OACM – Oclusão da artéria cerebral média

PMSCc – Células-tronco multipotentes derivadas do sangue periférico (do inglês: *peripheral blood multipotent stem cells*)

RMS – Via migratória rostral (do inglês: *rostral migratory stream*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês: *reactive oxygen species*)

rTPA – Ativador do plasminogênio tecidual recombinante (do inglês: *Recombinant tissue plasminogen activator*)

SCF – Fator de célula-tronco (do inglês: *stem cell factor*)

SDF-1 – Fator derivado de estroma 1 (do inglês: *stromal-derived factor 1*)

SNC – Sistema Nervoso Central

S1 – Área somatosensória primária

S2 – Área somatosensória secundária

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular (do inglês: *vascular endothelial growth factor*)

VEGFR2 – Receptor 2 do fator de crescimento de endotélio vascular (do inglês: *vascular endothelial growth factor receptor 2*)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da origem e distribuição das principais artérias encefálicas de rato em corte sagital.....	23
Figura 2: Modelo de lesão por termocoagulação.....	25
Figura 3: Localização das regiões onde os movimentos foram evocados com estimulação intracortical no córtex de rato como descrito por Hall e Lindholm (1974).....	27
Figura 4: Representações da sobreposição motora e somatosensória do cérebro de rato.....	28
Figura 5: Desenho esquemático da cirurgia de termocoagulação.....	49
Figura 6: Grupos experimentais.....	52
Figura 7: Cintilografia da biodistribuição das CMMOs.....	53
Figura 8: Testes funcionais.....	57
Figura 9: Desenho experimental para análise da morte celular após tratamento com CMMOs.....	59
Figura 10: Esquema mostrando a área da lesão.....	60
Figura 11: Esquema da área dissecada para análise da expressão de proteína...62	
Figura 12: Caracterização parcial de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) antes do transplante.....	65
Figura 13: Avaliação funcional.....	68
Figura 14: Teste sensoriomotor de preferência na remoção do adesivo.....	69
Figura 15: Teste sensoriomotor de tempo de remoção do adesivo.....	71
Figura 16: Células derivadas de medula óssea em cultivo.....	72
Figura 17: Viabilidade celular.....	73
Figura 18: Efeito das CTMs e comparação com o grupo tratado com CMMOs.....	74
Figura 19: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – 1DPI e 7DPI.....	76
Figura 20: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – JT 1DPI/3DPI.....	77
Figura 21: Quantificação de neurônios em degeneração - JT 1DPI/3.....	78
Figura 22: Avaliação funcional – Teste do cilindro JT 1DPI/3.....	79
Figura 23: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – JT 7DPI/9DPI.....	80

Figura 24: Avaliação funcional – Teste do cilindro JT 7DPI/9.....	81
Figura 25: Gliose reativa – 1 e 7 DPI.....	82
Figura 26: Imagens mostrando a cicatriz glial 77 dias após a isquemia.....	83
Figura 27: Gliose reativa – JT 1DPI/77.....	84
Figura 28: Gliose reativa – JT 7 DPI/77.....	85
Figura 29: Expressão da proteína GFAP.....	86
Figura 30: Quantificação por densitometria óptica da expressão de GFAP.....	87

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	Acidente vascular encefálico (AVE).....	18
1.2	Fisiopatologia do AVE isquêmico.....	19
1.3	Modelos pré-clínicos de AVE isquêmico.....	22
1.4	Córtex sensoriomotor de roedores.....	26
1.5	Terapias em AVE.....	30
1.6	Terapia celular.....	32
1.7	Células de medula óssea.....	37
1.8	Células de medula óssea e modelos pré-clínicos de AVE isquêmico.....	39
1.9	Inflamação no AVE isquêmico: astrocitose e microgliose reativas.....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	Animal experimental.....	48
3.2	Cirurgia de termocoagulação dos vasos piais do córtex sensoriomotor.....	48
3.3	Isolamento das células mononucleares de medula óssea.....	50
3.4	Cultura de células mesenquimais.....	54
3.5	Análise das células mononucleares de medula óssea por citometria de fluxo.....	54
3.6	Avaliação funcional.....	55
3.7	Preparações histológicas – perfusão e criotomia.....	58

	16
3.8 Histoquímica com Fluoro-Jade C.....	58
3.9 Expressão da proteína GFAP.....	61
3.9.1 Imuno-histoquímica.....	61
3.9.2 Western blot.....	62
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
4.1 Análise das CMMOs por citometria de fluxo.....	65
4.2 Avaliação funcional da terapia com CMMOs.....	66
4.3 Avaliação funcional da terapia com células mesenquimais de medula óssea.....	71
4.4 Avaliação morfológica da terapia celular.....	75
4.4.1 Morte neuronal – Fluoro-Jade C.....	75
4.4.2 Gliose reativa – Expressão de GFAP.....	81
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>88</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>100</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidente vascular encefálico (AVE)

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma doença cerebrovascular responsável por incapacidade neurológica temporária ou permanente em adultos após os 50 anos. Esta representa um impacto clínico e socioeconômico significativo, sendo a terceira causa de mortalidade no mundo inteiro, perdendo apenas para infarto do miocárdio e câncer. Dados do Ministério da Saúde do Brasil indicam que as doenças cerebrovasculares são a primeira causa de morte no nosso país ([www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)).

O AVE é uma manifestação neurológica da redução crítica do fluxo sanguíneo em uma determinada região do encéfalo. Trata-se de um estado clínico altamente variável. A localização, a causa, severidade e reversibilidade desta condição estão frequentemente associadas com doenças pré-existentes como, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão e idade (Hunter *et al.*, 1995; Nudo, 2007).

Esta doença pode ser classificada em AVE do tipo hemorrágico ou isquêmico. O AVE hemorrágico é causado por hemorragias dentro do encéfalo, devido a ruptura de um vaso sanguíneo, correspondendo a 20% do total de AVEs, sendo que 15% são decorrentes de hemorragias intracerebrais e 5 % a hemorragias subaracnóideas (Warlow *et al.*, 2001 *apud* Warlow *et al.*, 2003). Na maioria dos casos, o AVE é causado por um bloqueio sanguíneo em uma artéria, uma condição chamada “isquemia”. Isto impede o aporte de oxigênio e glicose

para as células nervosas e inicia um processo de morte celular massiva, o infarto (Choi, 2000). O AVE isquêmico corresponde a aproximadamente 80% de todos os AVEs e resulta de uma oclusão trombótica ou embólica de uma grande artéria encefálica, frequentemente, a artéria cerebral média (ACM), ou seus ramos (Durukan e Tatlisumak, 2007).

Os sintomas das isquemias são variáveis, dependendo basicamente da circulação encefálica atingida pelo trombo ou êmbolo visto que diferentes partes do encéfalo controlam diferentes áreas e funções e que tanto a circulação anterior como a posterior podem ser afetadas. A circulação anterior corresponde às áreas irrigadas pelas artérias carótidas internas e seus ramos (artérias cerebrais média e anterior). Os AVEs da circulação anterior representam cerca de 70% dos AVEs isquêmicos. Os infartos da ACM são os mais comuns, afetando o córtex frontal e parietal e regiões subcorticais, causando déficits motores e sensoriais do lado contralateral do corpo.

## **1.2 Fisiopatologia do AVE isquêmico**

O AVE isquêmico leva a morte celular por pelo menos duas vias diferentes, necrose e apoptose, sendo esta última também chamada de morte celular programada. A necrose é caracterizada por intumescência celular aguda e está associada com ruptura da membrana externa das células. A apoptose é caracterizada por condensação celular e reflete a ativação de genes suicidas específicos dentro da célula. A principal causa de necrose de células nervosas

após isquemia é a toxicidade por glutamato. Após a privação de oxigênio e glicose, as células nervosas rapidamente perdem seus estoques de energia e, conseqüentemente, o seu potencial de membrana. A despolarização resultante afeta os terminais nervosos e causa a liberação de neurotransmissores, onde se destaca o neurotransmissor excitatório glutamato (Choi, 2000).

A ativação de receptores de glutamato ionotrópicos resulta no influxo de cálcio para o compartimento intracelular, gerando a sobrecarga de cálcio mitocondrial e a ativação de enzimas catabólicas dependentes de cálcio, o que leva a distúrbios mitocondriais e a diminuição de cálcio no retículo endoplasmático, induzindo uma resposta ao estresse (Paschen, 1996). Sendo assim, espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas, produzindo lesão peroxidativa das membranas plasmática e de organelas intracelulares (Chan, 1996). O óxido nítrico (NO) é a principal ROS envolvida no estresse oxidativo, sendo produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem 3 isoformas de NOS: eNOS, expressa constitutivamente pelas células endoteliais; nNOS, em neurônios e iNOS encontrada principalmente em macrófagos (Samdani *et al.*, 1997).

A isquemia cerebral dispara a resposta inflamatória devido a presença de células necróticas, geração de ROS e produção de citocinas inflamatórias pelos neurônios. Esses iniciadores levam a ativação microglial, a qual produz mais citocinas, causando superexpressão de moléculas de adesão na vasculatura cerebral. As quimiocinas liberadas levam a quimiotaxia de células inflamatórias para o cérebro isquêmico. As moléculas de adesão medeiam a adesão de leucócitos circulantes ao endotélio vascular e infiltração para o parênquima cerebral. Uma vez no cérebro, os leucócitos e microglia ativados produzem uma

variedade de mediadores inflamatórios tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), iNOS, as quais geram NO, citocinas e aumento na expressão de NOS, os quais levam a edema cerebral, hemorragia e morte celular (Wang *et al.*, 2007).

A microglia, o macrófago residente do sistema nervoso central, desempenha um papel crítico como célula fagocítica e imunocompetente (Kreutzberg, 1996). Uma vez ativada, a microglia pode passar por transformações morfológicas em fagócitos, tornando-se virtualmente indistinguível dos macrófagos circulantes. A ativação da microglia após isquemia não está totalmente esclarecida, mas receptores CD14 têm sido observados em monócitos e microglia ativada no cérebro de pacientes com AVE (Beschoner *et al.*, 2002).

Após a isquemia, os astrócitos são ativados, resultando em aumento da expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP). E este fenômeno caracterizado por mudanças estruturais e funcionais específicas é denominado gliose reativa (Pekny e Nilsson, 2005). Além das células inflamatórias tradicionais, os astrócitos também são conhecidos por expressar diferentes tipos de mediadores inflamatórios (Benveniste, 1998; Che *et al.*, 2001), tais como citocinas, quimiocinas e iNOS (Dong e Benveniste, 2001).

As moléculas de adesão desempenham um papel essencial na infiltração de leucócitos dentro do parênquima encefálico após o AVE, e podem representar importante alvo terapêutico (Sughrue *et al.*, 2004). A interação entre leucócitos e o endotélio vascular é mediada por três principais grupos de moléculas de adesão: selectinas (selectinas P, E e L), imunoglobulinas (por exemplo, molécula 1 de adesão intercelular ICAM-1 e molécula 1 de adesão vascular VCAM-1) e integrinas (CD11a-c) (De Graba, 1998; Emsley e Tyrrell, 2002).

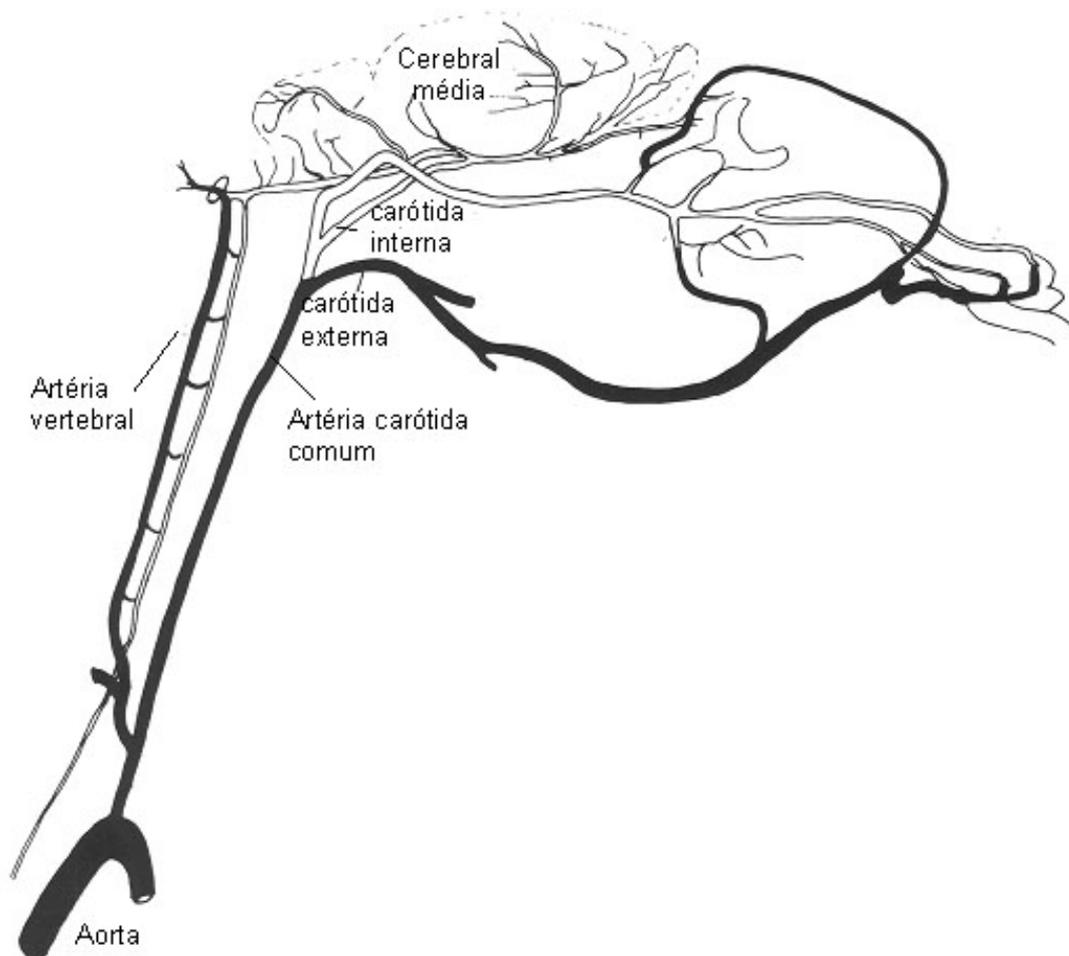
### 1.3 Modelos pré-clínicos de AVE isquêmico

Os modelos animais mais utilizados atualmente não reproduzem o quadro clínico de AVE *per se*. O AVE clínico é frequentemente uma consequência de doenças pré-existentes, afetando principalmente indivíduos acima dos 50 anos de idade. Os modelos animais, em contraste, têm sido produzidos para causar lesão isquêmica experimental a estruturas corticais e/ou subcorticais, tipicamente em animais saudáveis, jovens e de meia idade.

Para entender os mecanismos neurais de morte celular e sobrevivência, bem como a plasticidade neuronal após lesão isquêmica, é necessário controlar as variáveis encontradas no AVE clínico, que poderiam confundir os resultados experimentais. Certamente, está é a principal vantagem da utilização dos modelos animais nos quais, a idade, experiência, dieta, características fenotípicas, e genóticas podem ser controladas. Assim, os resultados de tais estudos podem explicar as condições do AVE, mas não refletem as condições complexas que resultam no AVE clínico (Nudo, 2007).

Existem diferentes modelos pré-clínicos de isquemia cerebral em roedores, objetivando causar lesões através do bloqueio do suprimento sanguíneo para determinadas regiões do encéfalo. Estes modelos são classificados de acordo com a área afetada, podendo ser isquemia global ou focal; e a duração da oclusão vascular, resultando em isquemia transitória ou permanente. Os modelos de isquemia global em ratos incluem os modelos de oclusão tanto de dois (oclusão bilateral das carótidas) como dos quatro vasos (duas artérias vertebrais e duas carótidas comuns) responsáveis pela irrigação encefálica (Figura 1). Todos estes

métodos globais resultam em isquemia em grande proporção do encéfalo e envolve um período variável de isquemia transiente (Hunter *et al.*, 1995).



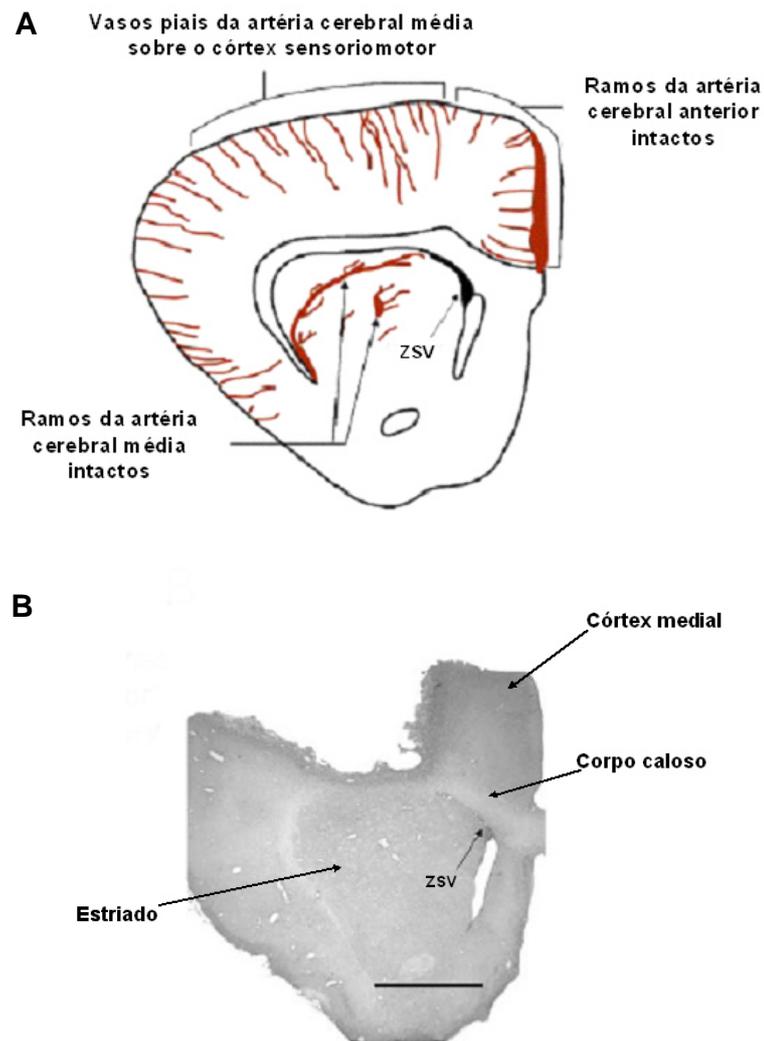
**Figura 1. Representação da origem e distribuição das principais artérias encefálicas de rato em corte sagital. Modificado de Paxinus 3 Ed.**

A isquemia focal pode ser classificada em dois tipos, permanente e reversível. A isquemia focal permanente resulta em uma região densa de dano isquêmico (centro da isquemia) e mudanças degenerativas são observadas nesta região. É questionável se a parada total e permanente do fluxo sanguíneo em regiões do encéfalo ocorre clinicamente na maioria dos AVEs devido a desintegração do trombo e trombólise endógena (Mohr *et al.*, 1986 *apud* Hunter *et al.*, 1995). Modelos de oclusões reversíveis têm sido desenvolvidos e, nesta situação, a lesão resulta tanto da isquemia como das conseqüências da reperfusão. Ambos os modelos, permanente e transiente são, por esta razão, valiosos para examinar diferentes aspectos do processo neurodegenerativo (Hunter *et al.*, 1995).

Os modelos de oclusão da artéria cerebral média (OACM) são de particular relevância, porque este é o vaso mais comumente afetado nos pacientes de AVE (Mohr *et al.*, 1986 *apud* Hunter *et al.*, 1995). A oclusão e subsequente reperfusão do vaso podem ser realizadas com clips removíveis ou suturas, por passagem de um filamento intraluminal nos vasos (Longa e Weinstein, 1989) ou por aplicação de endotelina-1 (Robinson *et al.*, 1990).

Neste trabalho, nós utilizamos um modelo de isquemia cortical por termocoagulação, que consiste na coagulação dos vasos sanguíneos da pia-máter sobre o córtex sensoriomotor, induzindo isquemia do tecido cortical subjacente. Este modelo leva a perda total das camadas corticais cerca de 5 a 7 dias após a lesão (Carmichael e Chesselet, 2002; Szele *et al.*, 1995), mantendo a integridade do córtex medial, corpo caloso, estriado e zona subventricular devido ao

suprimento sanguíneo dos ramos das artérias cerebral anterior e cerebral média (Gotts e Chesselet, 2005).

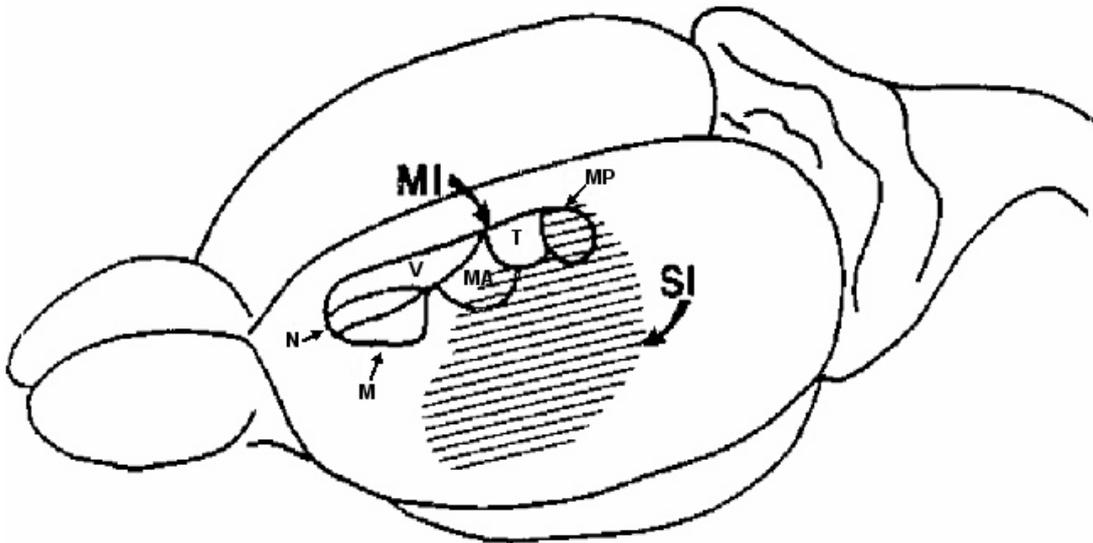


**Figura 2: Modelo de lesão por termocoagulação.** (A) diagrama esquemático do suprimento arterial do cérebro de rato ao nível do estriado. (B) Secção coronal marcada com hematoxilina e eosina, 7 dias após a termocoagulação dos vasos piais. A termocoagulação induz degeneração do córtex subjacente, mas mantém a integridade do corpo caloso, estriado, córtex medial e zona subventricular (ZSV). Escala= 2.5 mm. Modificado de Gotts e Chesselet, 2005.

#### 1.4 Córtex sensoriomotor de roedores

O AVE pode afetar tanto a substância branca como a substância cinzenta, e interromper várias vias anatômicas difíceis de serem restauradas. Muitos estudos experimentais têm sido conduzidos, usando o modelo de oclusão da artéria cerebral média que afeta grande parte do estriado e em menor parte o córtex. Poucos trabalhos têm avaliado a terapia celular para infartos no córtex (Gates *et al.*, 2000; Dunnett *et al.*, 1987) e ainda não existe nenhum resultado conclusivo sobre a possibilidade de restauração de lesão cortical.

O córtex de ratos foi mapeado inicialmente por Hall e Lindholm utilizando microeletrodos intracorticais simples para medir a resposta evocada por estimulação periférica (Hall e Lindholm, 1974). Estes autores demonstraram que grande parte da representação do córtex motor primário (M1) está ocupada por áreas cuja estimulação evoca movimentos dos membros posteriores e anteriores, região maxilar, boca e língua enquanto que movimentos da musculatura axial podem ser evocados de uma pequena porção de M1. Além disto, foi demonstrada a existência de uma sobreposição da representação motora do membro posterior e parte do membro anterior com a área sensorial primária (S1) (Figura 3).

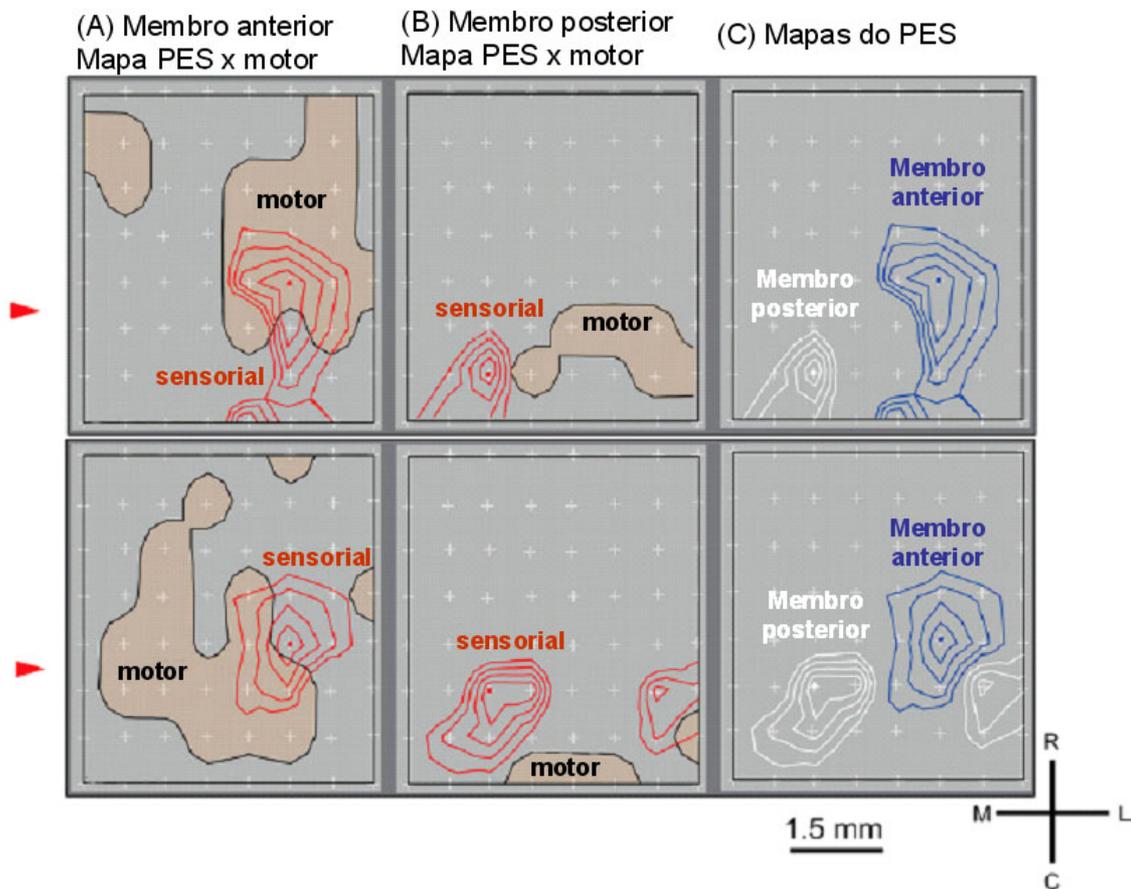


**Figura 3: Localização das regiões onde os movimentos foram evocados com estimulação intracortical no córtex de rato como descrito por Hall e Lindholm (1974).** As regiões em M1 das quais os movimentos da vibrissa (V), nariz (N), maxila (M), membro anterior (MA), tronco (T) e membro posterior (MP) foram evocados são delineados por linha contínua. A localização de S1 está indicada pela área sombreada. Note que existe uma sobreposição entre o MP e parte do MA em S1. Modificado de Hall e Lindholm (1974).

No entanto, estudos recentes de mapeamento, utilizando um método não invasivo de matriz de microeletrodos (Molina-luna *et al.*, 2007) indicam que as representações somatosensórias e motoras do membro anterior de rato apresentam uma sobreposição de 30%, enquanto que para o membro posterior esta sobreposição é insignificante (Figura 4). Além disso, as representações somatosensórias dos membros anterior e posterior são claramente separadas (Hosp *et al.*, 2008).

As representações motoras do córtex de rato estão localizadas no córtex frontal, situado rostralmente em relação ao córtex parietal. O córtex motor tem uma densa projeção para o estriado, núcleos subtalâmicos, cerebelo, e estruturas

subcortiais que são conhecidas por desempenhar um papel importante no controle do movimento. (Wise e Donoghue, 1986).



**Figura 4. Representações da sobreposição motora e somatosensória do cérebro de rato.** (A e B) As áreas motoras e somatosensoriais do membro anterior se sobrepõem por aproximadamente 30%, quase nenhuma sobreposição é encontrada para o membro posterior. (C) Representações somatosensórias dos membros anterior e posterior são separadas. PES, potencial evocado somatosensorial. Modificado de Hosp *et al.* 2008.

Devido à grande similaridade na organização cortical entre humanos e primatas não-humanos torna-se interessante comparar a organização anatômica destes últimos com a de roedores, visto que ambos são alvos de estudos para o entendimento dos mecanismos patofisiológicos causados pelo AVE clínico.

A importância do córtex motor para roedores é menor, quando comparada a importância do córtex motor para os primatas. Por exemplo, enquanto a remoção do córtex motor em primatas causa um déficit nos movimentos dos dígitos, a ablação em ratos resulta em um efeito brando e transitório. No entanto, determinados danos ao córtex motor ou vias motoras cerebrais causam déficits similares entre estas espécies. Bem como, resultados de lesões nos tratos corticais e piramidais, que parecem não diferir em roedores, primatas e outros mamíferos (Wise e Donoghue, 1986).

O trato corticoespinal é a principal via descendente do córtex cerebral para os motoneurônios da medula espinhal, portanto suas fibras são frequentemente lesadas no AVE cortical. Este trato está presente em todos os mamíferos e se origina das células piramidais da camada V no córtex cerebral. A maioria dos neurônios corticoespinais está localizada em uma região contígua do córtex frontoparietal, correspondendo ao córtex motor primário (M1) e córtex somatosensório primário (S1). Estes neurônios corticoespinais também se originam da área somatossensória secundária (S2) (Nudo, 2007).

Em todos os mamíferos as fibras corticoespinais descendem através da cápsula interna e pirâmides medulares. Cerca de 90% destas fibras cruzam a linha média na junção entre bulbo espinhal e a medula espinhal. Assim, muitas peculiaridades fundamentais do trato são comuns a todas as espécies de mamíferos, sugerindo que esta via surgiu cedo na evolução (Nudo e Masterton, 1990). Contudo, existem também diferenças na anatomia do trato entre espécies de mamíferos no que se refere ao número total de neurônios corticoespinais, que é substancialmente maior em primatas do que em roedores no que diz respeito ao

número de neurônios por unidade de peso corporal ou peso encefálico (Nudo *et al.*, 1995).

Na medula espinhal, a principal trajetória do trato corticoespinhal é a via funículo dorsolateral em primatas, e via funículo dorsal em roedores (Steward, *et al.*, 2004). Em mamíferos, as sinapses entre neurônios corticoespinhais e motoneurônios são disínticas e polissínticas. Algumas espécies de primatas possuem um subgrupo de neurônios corticoespinhais que fazem monossínticas com motoneurônios (Lemon e Griffiths, 2005). Entretanto, estas conexões não existem em roedores.

O córtex sensoriomotor de primatas é caracterizado por uma ampla diferenciação de regiões primordiais em subáreas separadas. Após lesão focal, a especialização funcional nessas subáreas pode resultar em déficits funcionais específicos, diferentes daqueles observados em roedores ou outras espécies.

## **1.5 Terapias em AVE**

O tratamento do AVE isquêmico mudou bastante após o início do uso de agentes antitrombóticos e trombolíticos. A terapia antitrombótica pode atuar no AVE agudo ou na prevenção do AVE recorrente. Os agentes incluem medicamentos: antiplaquetários - aspirina, ticlopidina (Ticlid), clopidogrel (Plavix) e dipiridamole (Persantine) e anticoagulante - warfarina (Coumadina) (Dickerson *et al.*, 2007).

A terapia trombolítica utiliza agentes trombolíticos, que ajudam a dissolver coágulos que podem estar obstruindo as artérias. O único trombolítico aprovado para o tratamento intravenoso do AVE isquêmico é o rTPA (ativador do plasminogênio tecidual recombinante). Este medicamento foi aprovado primeiramente nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration*, baseada inicialmente nos resultados de estudos coordenados pelo *National Institute of Neurological Disorder and Stroke* (NINDS).

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) também aprovou a utilização do rTPA. Entretanto, ele só é seguro e eficaz, quando administrado dentro das primeiras 3 horas após o início dos sintomas do AVE (Marler, 1995; Fisher e Ratan, 2003; Hass *et al.*, 2005), o que inviabiliza a utilização deste medicamento por grande parte dos pacientes, visto que é necessário que se faça um diagnóstico precoce, o que requer unidades de emergência especializadas em AVE.

Devido à curta janela terapêutica para a administração do rTPA, uma nova perspectiva no tratamento do AVE é a terapia celular, com a utilização de células-tronco ou células progenitoras. Atualmente, existem inúmeros estudos investigando os efeitos de diferentes tipos celulares em modelos experimentais de AVE (Hayashi *et al.*, 2006; Borlongan *et al.*, 1998; Corti *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007).

## 1.6 Terapia celular

O campo da biologia celular e da medicina regenerativa vem desenvolvendo estratégias terapêuticas para uma variedade de doenças e lesões humanas. Uma dessas estratégias é a terapia celular, baseada em estudos em modelos animais, que mostram que as células transplantadas, não somente sobrevivem, mas também levam à melhora funcional em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas (Lindvall e Kokaia, 2006).

Em modelos de AVE, por exemplo, existem algumas vias terapêuticas possíveis para tratamento com a terapia celular, com a hipótese de que as células transplantadas são efetivas não somente para a reposição celular dentro do tecido lesado do hospedeiro, mas também por promoverem suporte trófico, e neuroprotetor, bem como suprir o tecido de mediadores imunomodulatórios (Locatelli *et al.*, 2008; Caplan, 2007; Chopp e Li, 2002).

A terapia celular iniciada precocemente após o início do AVE pode exercer um efeito na preservação e sobrevivência celular, enquanto que em períodos mais tardios os efeitos tróficos ou de substituição podem ajudar a restaurar a perda de função. A terapia celular pode ser mais efetiva quando administrada dentro das primeiras semanas após o AVE, contudo, existem evidências pré-clínicas de que a janela terapêutica para administração intravenosa de células derivadas da medula óssea pode se estender até um mês após a isquemia (Shen *et al.*, 2007). A via de administração celular, a maneira como as células são administradas, a dose adequada e o tipo de AVE são elementos importantes para avaliar a efetividade da

informação obtida em modelos animais (Lawrence e Wechsler, 2008). A via intravenosa, por exemplo, depende de sinais quimioatrativos tais como o SDF-1, (do inglês: *stromal-derived factor 1*) expresso no encéfalo lesado, que atraem as células para a área de lesão (Shen *et al.*, 2007; Robin *et al.*, 2006).

Diversos tipos celulares podem ser empregados em protocolos de terapia celular: células-tronco embrionárias (CTEs) do blastocisto, linhagens de teratocarcinoma, células-tronco neurais do embrião ou cérebro adulto, ou células-tronco de outros tecidos, como por exemplo, da medula óssea (Hayashi *et al.*, 2006; Borlongan *et al.*, 1998; Capone *et al.*, 2007; Corti *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007).

As células-tronco são células indiferenciadas que apresentam habilidade de auto-renovação e geração de progênie que se diferencia em tipos celulares especializados. Nos últimos anos, o uso de CTEs tem gerado otimismo para a terapia de doenças humanas, mas seu uso clínico permanece controverso devido a razões éticas e técnicas, dentre elas a dificuldade de obtenção e o risco de formação de tumor (Vaquero e Zurita, 2009).

Em contraste, as células-tronco adultas ganharam importância após o conhecimento das propriedades biológicas das células estromais de medula óssea (CEMOs), também denominadas de células-tronco mesenquimais (CTMs). Estas células são células-tronco adultas multipotentes, localizadas na medula óssea, que teriam a capacidade de se diferenciar não somente em osteoblastos, condrócitos e miócitos, mas também em células endoteliais e do neuroectoderma (Dezawa *et al.*, 2004; Kotobuki *et al.*, 2004; Benayahu *et al.*, 2007; Parr *et al.*, 2007). No entanto, a capacidade de diferenciação destas células é controversa.

Por exemplo, evidências de que CTMs podem ser rapidamente induzidas a diferenciar em neurônios, usando agentes químicos foram relatadas por Woodbury e colaboradores (2000), mas este resultado foi questionado por outros autores, que sugerem que a indução neuronal química resulta em estresse celular. Este estresse, provocaria uma contração das células, que por sua vez levaria apenas a uma morfologia semelhante a de neurônio, mas não uma diferenciação verdadeira (Liu e Rao, 2003; Lu *et al.*, 2004).

Estudos investigando a capacidade regenerativa de células progenitoras/tronco neurais (CPNs) derivadas do feto ou embrião de roedores ou humanos reportam que as CPNs implantadas diferenciaram-se adequadamente em neurônios e astroglia, bem como, melhoram o desempenho funcional em modelos de AVE após administração intracerebral, intracerebroventricular e intravascular (Mattisson *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 2004; Kondziolka *et al.*, 2005; Darsalia *et al.*, 2007). Somente um grupo investigou os efeitos do transplante das CPNs derivadas de ratos adultos em modelo de AVE. As células transplantadas sobreviveram e migraram para a área de isquemia conforme análises histológicas e radiológicas (Zhang *et al.*, 2003).

Diferente de outras fontes de células-tronco, as linhagens de CTEs, além da capacidade de autorenovação, podem gerar todos os tipos celulares. Buhnemann e colaboradores (2006) implantaram precursores derivados de CTEs murina em encéfalo de ratos após OACM e observaram que estas células passaram por diferenciação neural e apresentaram propriedades neurofisiológicas funcionais.

Alguns laboratórios têm criado linhagens de células-tronco de tecidos humanos e do SNC de roedores como fontes alternativas para transplante. Um exemplo é a linhagem celular imortalizada NT2, a qual é derivada de um tumor de célula germinativa testicular humana (Andrews *et al.*, 1984). Vários estudos têm demonstrado a eficácia da linhagem NT2 em modelo de isquemia cerebral focal (Borlongan *et al.*, 1998; Park, 2000). Outra linhagem, MHP36 demonstrou reduzir o volume de infarto e melhorar o comportamento sensoriomotor de ratos após OACM (Veizovic *et al.*, 2001).

Está bem descrito que a administração intravenosa de CTMs diminui a área de lesão e melhora a função neurológica de ratos após isquemia (Chen *et al.*, 2001; 2003a). Outro tipo de células precursoras multipotentes semelhantes as CTMs vem sendo obtidas do sangue periférico - PMSCs (Ukai *et al.*, 2007). Ukai e colaboradores (2007) verificaram a hipótese do possível efeito terapêutico das PMSCs. Eles compararam o efeito entre o tratamento com CTMs e PMSCs no modelo de OACM e observaram diminuição no volume de lesão, melhora no fluxo sanguíneo cerebral regional e recuperação funcional, sendo que estes benefícios terapêuticos foram semelhantes em ambos os tratamentos, sugerindo que as PMSCs derivadas do sangue periférico podem ser uma fonte celular importante para a terapia.

Numerosos estudos vêm investigando a capacidade regenerativa das células-tronco hematopoiéticas (CTHs). Taguchi e colaboradores (2004) demonstraram que a administração sistêmica de células CD34+, derivadas do sangue de cordão umbilical humano, em camundongos imunocomprometidos submetidos a isquemia cerebral induziu neovascularização na zona isquêmica e

forneceu um ambiente favorável a regeneração neuronal. O transplante sistêmico de CTHs reduziu a resposta imune periférica, diminuiu a infiltração de células imunes no hemisfério cerebral isquêmico, e mediou a neuroproteção na fase subaguda da isquemia (Schwartz *et al.*, 2008).

Recentemente, foram observados efeitos neuroprotetores das células mononucleares de sangue de cordão umbilical (hUCB) em um modelo *in vitro* de hipóxia neuronal, no qual mecanismos antiapoptóticos relacionados a contatos célula-célula diretos com neurônios lesados foram elucidados (Hau *et al.*, 2008).

Numerosos estudos investigam a capacidade regenerativa das células de medula óssea em uma variedade de doenças, por exemplo, doenças cardiovasculares (Schachinger *et al.*, 2004; Strauer *et al.*, 2005; Mazhari e Hare, 2007) e modelos de lesão do SNC, tais como AVE isquêmico, lesão cerebral traumática e lesão de medula espinhal traumática (Mahmood *et al.*, 2001; Ohta *et al.*, 2004). Em modelo pré-clínico de AVE isquêmico as principais células de medula estudadas para terapia são CTMs (Chen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001 e 2005; Iihoshi *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006, 2007 e 2008).

## 1.7 Células de medula óssea

Na medula óssea existe uma população heterogênea de células progenitoras e células-tronco, incluindo as CTHs e as CTMs. As CTHs são responsáveis por sustentar a produção de células sanguíneas durante toda a vida do indivíduo, elas são raras, com uma frequência estimada de 1 em 10.000 na medula óssea e 1 em 100.000 no sangue (Ng *et al.*, 2009).

Duas propriedades definem estas células. Primeira, elas podem gerar mais CTHs, num processo de auto-renovação. Segunda, elas têm o potencial de gerar várias células progenitoras mais restritas, que eventualmente poderão se comprometer à maturação ao longo de vias específicas. O resultado final destes eventos é a contínua produção de um número suficiente de células de toda a linhagem hematopoiética (Orkin, 2000).

Na medula óssea, as células estromais são uma população rara e heterogênea, que contem uma mistura de progenitores em diferentes estágios de comprometimento com as linhagens do mesoderma e somente um pequeno número de células com características multipotentes e de auto-renovação. Atualmente, vem sendo aceito que células estromais progenitoras derivadas de medula óssea podem ser consideradas CTMs após proliferação *in vitro* (Horwitz *et al.*, 2005).

As CTMs podem ser definidas como células estromais mesenquimais multipotentes, raras e heterogêneas que proliferam *in vitro* como células aderentes ao plástico, tem morfologia semelhante a fibroblasto, formam colônias *in vitro* e podem diferenciar em osso, cartilagem e adipócitos (Horwitz *et al.*, 2005).

Contudo, células estromais que aparentemente cumprem estes critérios têm sido isoladas de quase todos os tipos de tecidos (Meirelles *et al.*, 2006).

Já as CTHs se mantêm em um estado quiescente na medula óssea. Após estímulo apropriado, elas diferenciam e são liberadas no sistema vascular sinovial. Na medula óssea, o nicho de células estromais circunda as CTHs e sua progênie (Kiel e Morrison, 2008). Dois tipos de nicho têm sido descritos em roedores, o nicho endosteal e o nicho vascular (Kiel e Morrison, 2008). As células de estroma fornecem um microambiente de proteção em ambos os tipos de nicho, que suportam a manutenção e a auto-renovação das CTHs por protegê-las da diferenciação e dos estímulos apoptóticos que podem incidir sobre as reservas de células-tronco (Wilson e Trumpp, 2006; Kiel e Morrison, 2008).

Esses nichos também controlam a proliferação e a diferenciação das CTHs e a liberação de sua progênie madura para o sistema vascular. A regulação da CTH quiescente, através da manutenção destas células na fase G0 do ciclo celular no nicho endosteal, e o controle da proliferação, diferenciação e recrutamento da CTH para o nicho vascular é atribuído às células de estroma de medula óssea (Wilson e Trumpp, 2006; Kiel e Morrison, 2008).

As CTMs derivadas de células do estroma de medula óssea, bem como outras CTMs, carecem de marcadores específicos. Existe um consenso geral de que as CTMs de medula óssea humanas não expressam os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34 e CD14 ou as moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40, enquanto que elas expressam níveis variados dos marcadores CD105, CD73, CD44, CD90, CD71, o gangliosídeo GD2 e CD271. Estas células

também são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal STRO-1 (Uccelli *et al.*, 2008).

### **1.8. Células de medula óssea e modelos pré-clínicos de AVE isquêmico**

A oclusão da ACM é um modelo experimental de isquemia cerebral amplamente utilizado no estudo dos efeitos do transplante de células de medula óssea em roedores. Resultados provenientes de estudos com este modelo mostraram que o transplante de CTMs melhora o desempenho funcional dos animais (Shen *et al.*, 2006). 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 *et al.*, 2001 e 2003a; Li *et al.*, 2001 e 2002; Shen *et al.*, 2006).

Comparado com a injeção intracerebral, a injeção intravenosa das CTMs é menos invasiva, e pode levar a uma neuroproteção mais difusa, tendo um potencial maior de aplicação clínica. As CTMs possuem habilidade de migrar para a área de lesão, e a interação entre a quimiocina SDF-1 e o seu receptor (CXCR4), vem demonstrando um importante papel neste processo (Wang *et al.*, 2008). A via de migração das CTMs no encéfalo lesado após OACM foi demonstrada pela primeira vez por Wang e colaboradores (2008). Eles observaram através de injeção intravenosa das CTMs marcadas com GFP, que em 1 dia após o transplante, a grande maioria das células GFAP positivas foram confinadas a área olfatória. Em 3 dias após o transplante, as células marcadas foram encontradas na área de

penumbra, a qual, inclui principalmente, tálamo e hipotálamo. Passados 7 dias do transplante, foi possível detectar células GFAP positivas no ventrículo lateral e no estriado. Esta marcação se estendeu para o córtex motor em 14 e 28 dias após o transplante.

O transplante de CTMs após OACM pode reduzir o tamanho do infarto e melhorar o desempenho funcional (Chen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2005; Honma *et al.*, 2006; Horita *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006) os mecanismos detalhados pelos quais as CTMs promovem esta melhora não estão muito bem esclarecidos. A angiogênese parece estar envolvida nesta recuperação neurológica após isquemia (Krupinski *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2003).

As CTMs normais ou modificadas para o gene da angiogenina administradas intravenosamente em ratos após OACM forneceram efeitos benéficos em termos de neovascularização e fluxo sanguíneo cerebral regional (Onda *et al.*, 2008). O transplante de CTMs, expressando neurogenina-1, sugere que além das funções parácrinas intrínsecas das CTMs, as disfunções motoras podem ser notavelmente melhoradas pelas CTMs transdiferenciadas em células neuronais (Kim *et al.*, 2008).

Alguns estudos vêm utilizando as PBSCs como fonte de CTHs para transplante. Contudo, a concentração de CTHs no sangue sob condições normais é muito baixa (Elfenbein e Sackstein, 2004). Uma maneira alternativa de aumentar a concentração destas células no sangue periférico pode ser feita por indução, com o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), que é capaz de mobilizar as CTHs da medula óssea para o sangue (Demetri e Griffin, 1991), amplificando a concentração de PBSCs. Estas células vêm sendo estudadas em

transplantes para regeneração de tecidos não hematopoiéticos, tais como músculo esquelético, coração (Orlic *et al.*, 2001) e isquemia cerebral (Shyu *et al.* 2006).

Shyu e colaboradores (2006) realizaram transplante intracerebral de PBSCs como estratégia terapêutica aplicada a fase crônica de um modelo de isquemia global por oclusão de três vasos (artéria cerebral média e a carótida comum bilateral) em ratos, e obtiveram resultados significativos de recuperação neurológica. Além disso, demonstraram que as células transplantadas assumiram fenótipo de células neurais, melhoraram o fluxo sanguíneo cortical por formação de novos vasos, sugerindo que o transplante de PBSCs pode ser uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento de doenças cerebrovasculares.

Outro tipo de terapia celular utiliza a fração de células mononucleares de medula óssea (CMMOs). Estas células são utilizadas como tratamento em alguns modelos de doenças, incluindo infarto do miocárdio agudo e cardiomiopatia isquêmica crônica, nos quais foram demonstradas evidências da capacidade regenerativa destas células (Schachinger *et al.*, 2004; Strauer *et al.*, 2005).

Existem poucos trabalhos estudando as CMMOs em modelos pré-clínicos de AVE. As informações sobre o tratamento com CMMOs em modelo animal de isquemia cerebral provem inicialmente do trabalho de Iihoshi e colaboradores (2004). Estes, utilizando a OACM como modelo, administraram  $1 \times 10^7$  células mononucleares por via intravenosa em ratos nas janelas terapêuticas de 3 e 72 horas pós-isquemia e obtiveram recuperação funcional significativa.

Outro trabalho que utilizou as CMMOs como tratamento em modelo de isquemia cerebral, demonstrou efeito neuroprotetor e melhora funcional, transplantando-se  $1 \times 10^7$  células por via intra-arterial imediatamente após reperfusão

no modelo de OACM transiente. Não obtendo os mesmos resultados quando a administração celular foi feita por via intravenosa, sugerindo que a via intra-arterial seria mais eficiente (Kamiya *et al.*, 2008).

Recentemente, Giraldi-Guimarães e colaboradores (2009) demonstraram efeito benéfico das CMMOs sobre o desempenho funcional de animais submetidos a isquemia focal por termocoagulação dos vasos sanguíneos do córtex sensoriomotor, as células foram administradas por via intravenosa 24 h após a isquemia e os animais tiveram sobrevivência de 28 dias.

As CMMOs constituem uma fração heterogênea de células mononucleares da medula óssea. Estas células são isoladas facilmente por gradiente de densidade, podendo ser transplantadas diretamente no próprio indivíduo (transplante autólogo), tornando sua aplicação clínica mais rápida e viável economicamente. Diferente das CTMs que apesar de apresentar uma população relativamente homogênea de células mesenquimais demoram cerca de um mês para serem obtidas, devido à necessidade de uma etapa de proliferação *in vitro*.

### **1.9 Inflamação no AVE isquêmico: astrocitose e microgliose reativas**

A inflamação no encéfalo isquêmico é caracterizada pelo acúmulo de mediadores e células inflamatórias no tecido afetado. Após o início da isquemia, células inflamatórias tais como leucócitos derivados do sangue e microglia são ativados e se acumulam dentro do parênquima encefálico, levando a lesão

inflamatória. Algumas evidências mostram que os astrócitos também podem agir como células inflamatórias em resposta ao AVE isquêmico (Wang *et al.*, 2007).

A resposta astrocitária à lesão no sistema nervoso central (SNC) resulta na formação de uma “cicatriz glial”, a qual é caracterizada por astrócitos reativos, morfológica e hipertróficos, que proliferam rapidamente ocupando densamente a área de lesão e expressando quantidades elevadas de moléculas inibitórias ao crescimento (Davies *et al.*, 1999; Katsman *et al.*, 2003).

Os astrócitos reativos circundam o sítio de lesão, atuando como uma barreira física e bioquímica que inibe a regeneração axonal. Dentre as moléculas inibitórias, estão os proteoglicanos do tipo sulfato de condroitina (chondroitin sulfate proteoglycans - CSPGs) que reduzem a regeneração dos axônios *in vivo* em áreas de gliose reativa (Davies *et al.*, 1997, 1999; Hoke e Silver, 1996). A administração da enzima condroitinase ABC, que atua sobre o proteoglicano sulfato de condroitina promove um aumento na regeneração de axônios do SNC (Bradbury *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2001).

A molécula neurocan é um dos principais CSPGs do tecido nervoso, cuja expressão e clivagem proteolítica são bem reguladas no encéfalo normal. Existem evidências de um acúmulo desta proteína em lesões no SNC, incluindo lesão traumática (Asher *et al.*, 2000) e ataque isquêmico focal (Deguchi *et al.*, 2005).

O nível de neurocan encontra-se significativamente aumentado na área de peri-infarto após OACM. Astrócitos reativos positivos para GFAP são a maior fonte de neurocan em torno do sítio de lesão. A administração de CTMs 24 horas após a isquemia diminui o nível de neurocan e aumenta a expressão do marcador de crescimento axonal GAP43 (Shen *et al.*, 2008).

As CTMs transplantadas por via intravenosa e intra-arterial em ratos submetidos a OACM, como modelo pré-clínico de AVE, aceleraram a regeneração axônica (Liu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006, 2007) e diminuíram a espessura da parede de cicatriz glial (Li *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2007).

A microglia reside no SNC saudável, como uma população celular quiescente, que responde a mudanças no microambiente e reage a eventos patológicos. Através da síntese de moléculas tróficas e tóxicas, e suas propriedades imunoregulatórias, a microglia está envolvida em lesões agudas do SNC e na isquemia cerebral (Rothwell e Luheshi, 1994; Yrjanheikki *et al.*, 1998), bem como em doenças inflamatórias e neurodegenerativas (Benveniste *et al.*, 2001; McGeer *et al.*, 1993). A ativação microglial, ou microgliose reativa, é caracterizada por alguns eventos específicos que incluem transformação morfológica, expressão de um amplo padrão de marcadores mieloides, citocinas, radicais livres, óxido nítrico, e aquisição de um fenótipo fagocítico (Bechmann e Nitsch, 1997; Raivich *et al.*, 1999; Streit e Kreutzberg, 1988; Streit *et al.*, 1999).

Outro aspecto interessante da ativação microglial, é sua capacidade de se expandir em resposta à lesão e as doenças crônicas e agudas no SNC (Streit *et al.*, 1999; Hailer *et al.*, 1999; Wirenfeldt *et al.*, 2007). Nos modelos de lesão que não resultam em dano da barreira hematoencefálica, esta expansão ocorre predominantemente pela proliferação da microglia residente ativada (Graeber *et al.*, 1988; Fagan e Gage, 1994) e em menor proporção à migração de microglia de áreas adjacentes não lesadas. Contudo, alguns estudos recentes baseados em modelos de camundongos irradiados e apresentando medula óssea quimérica, sugerem que a população microglial residente é suplementada por células

derivadas da medula óssea, as quais migram para o parênquima neural, onde diferenciam em microglia ou células semelhantes a microglia (Ladeby *et al.*, 2005; Priller *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003; Wirenfeldt *et al.*, 2007).

As células microgлияis, bem como astrócitos, neurônios e células do sistema imunológico liberam citocinas, que são aumentadas no cérebro após uma variedade de lesões, tais como isquemia (Liu *et al.*, 1994; Sairanen *et al.*, 2001). As principais citocinas relacionadas à inflamação em isquemia são interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Han e Yenari, 2003). Dessas citocinas, IL-1 e TNF- $\alpha$  parecem estar aumentadas em lesão cerebral e aumentam a inflamação, contudo, IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  podem ser neuroprotetoras (Allan e Rothwell, 2001).

Vários estudos (Schabitz *et al.*, 2006; Shyu *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2005; Komine-Kobayashi *et al.*, 2006) tem demonstrado que citocinas hematopoiéticas apresentam um efeito neuroprotetor, ou suportam a neurogênese endógena. A administração de G-CSF recombinante humano e o fator de célula-tronco recombinante murino (SCF) na fase subaguda (11-20 dias) da isquemia cerebral focal levam a uma melhora no desempenho motor. Além disto, este procedimento, induz a transição de células neuronais derivadas da medula óssea para dentro da área peri-infarto e estimulam a proliferação de células-tronco/progenitoras na zona neuroproliferativa (Kawada *et al.*, 2006).

Schwartzing e colaboradores (2008) forneceram evidências de que a injeção por via intravenosa de HSCs atenua a resposta imunológica periférica pós-isquemia, reduz a infiltração de células imunológicas para dentro do hemisfério isquêmico, e causa neuroproteção na fase subaguda pós-isquemia. Além disso,

hMSCs diminui a morte neuronal através da modulação das respostas inflamatórias quando injetadas no hipocampo de camundongo 1 dia pós-isquemia global transiente (Ohtaki *et al.*, 2008).

### 3 OBJETIVOS

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram um efeito terapêutico das células mononucleares de medula óssea (CMMOs) no modelo de isquemia por termocoagulação quando transplantadas intravenosamente 24 h após a isquemia e analisando os animais até 28 dias após a isquemia (Giraldi-Guimarães *et al.*, 2009). Com base nesses resultados, nosso objetivo principal foi analisar até que momento pós-isquemia as CMMOs podem desempenhar um efeito benéfico na recuperação neurológica.

Os objetivos específicos foram:

- Analisar por citometria de fluxo a fração de CMMOs injetadas;
- Avaliar o desempenho funcional de animais tratados em diferentes tempos pós-isquemia;
- Transplantar células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de medula óssea e comparar seu possível efeito com o das CMMOs;
- Avaliar a morte neuronal nos grupos que receberam injeção de CMMOs em períodos pós-isquemia iniciais;
- Investigar de forma qualitativa e quantitativa a astrogliose reativa após o tratamento com CMMOs;

### **3 Materiais e métodos**

#### **3.1 Animal experimental**

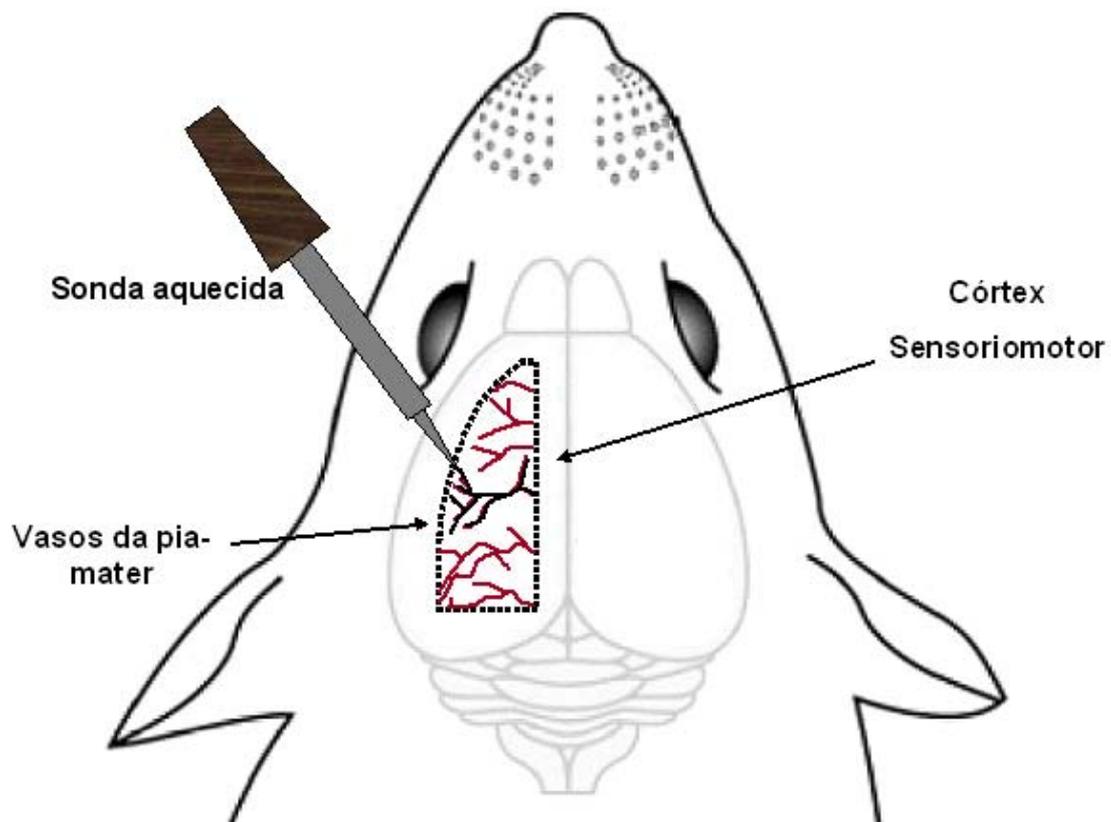
Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos com 3 meses de idade, pesando entre 250 e 300g. Os procedimentos experimentais adotados foram aprovados pela Comitê de ética na Utilização de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS/UFRJ).

#### **3.2 Cirurgia de termocoagulação dos vasos piais do córtex sensorimotor**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (5 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (50 mg/Kg). A cabeça do animal foi mantida imobilizada num aparelho estereotáxico (Insight, São Paulo), submetida à tricotomia e incisão da pele na área próxima as suturas cranianas para exposição do crânio. Posteriormente, as medidas estereotáxicas (eixo ântero-posterior, +2,0 mm a -6,0 mm do bregma; Paxinos e Watson, 1986) foram utilizadas para guiar a craniotomia de forma a expor o córtex sensorimotor do hemisfério cerebral esquerdo.

Os vasos sangüíneos da pia-mater do córtex sensorimotor foram cauterizados por aproximação de um ferro de solda (40 W, 450-550 °C) (Figura 5), tomando cuidado para não encostar na dura-mater. Após a cauterização, a abertura craniana foi fechada e a pele suturada. Os animais foram mantidos sob

aquecimento constante e devolvidos ao biotério após a recuperação da anestesia e mantidos com alimentação e água *ad libitum*.



**Figura 5: Desenho esquemático da cirurgia de termocoagulação.** Os vasos piais do córtex sensoriomotor de rato foram coagulados aproximando-se um ferro de solda aquecido. A craniotomia foi feita utilizando-se uma broca cirúrgica, seguindo as coordenadas (eixo ântero, +2mm a -6mm, em relação ao Bregma).

### 3.3 Isolamentos das células mononucleares de medula óssea

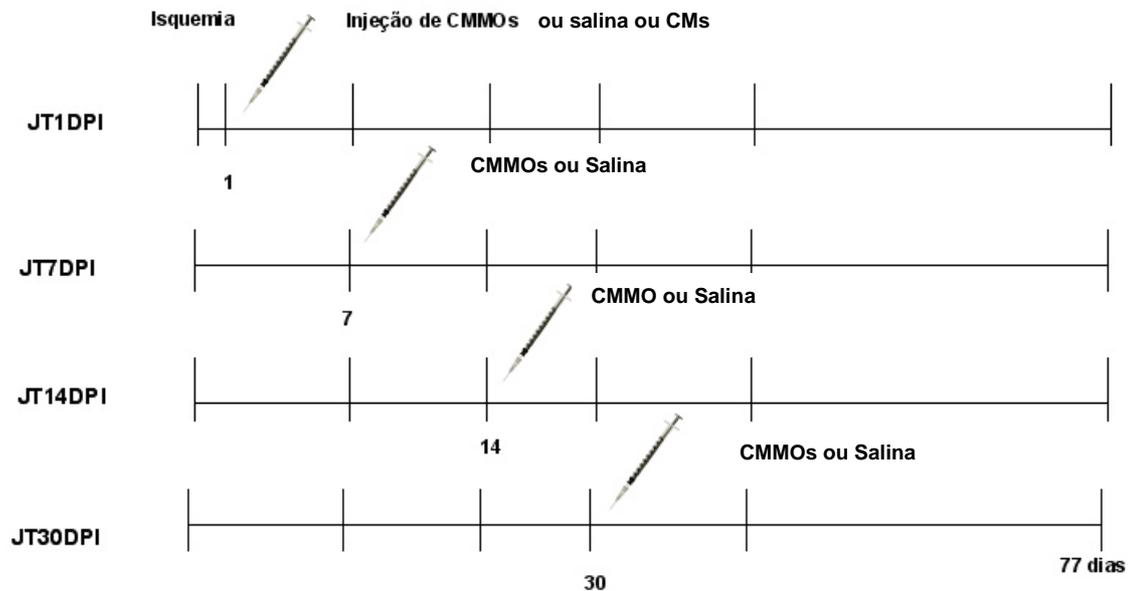
Para isolamento das células da fração mononuclear de medula óssea, os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, seus fêmures e tíbias foram dissecados e levados para uma capela de fluxo laminar. O restante do procedimento foi realizado em condições estéreis. Uma das epífises de cada osso foi cortada, os ossos foram colocados em ponteiros de micropipetas automáticas (Axigen) de 1 mL, com a parte cortada orientada para baixo. Estas foram transferidas para tubos de 15 mL, que foram centrifugados a 300 x g por 1 minuto para remover a medula do interior do osso. A medula foi dissociada em meio de cultura DMEM/F12 (do inglês *Dulbecco's modified Eagle medium*; Invitrogen, São Paulo) sem soro com uma pipeta *Pasteur* e em seguida os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300 x g. O precipitado foi ressuscitado em 3 mL de meio DMEM/F12 e aplicado sobre 3 mL de Histopaque (10831-6x100 mL, Sigma) em um tubo de 15 mL.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 300 x g. Este procedimento permite que sejam separadas as células de acordo com a densidade. A fração correspondente às células mononucleares foi recolhida, transferida para um novo tubo e lavada 3 vezes, em 8 mL de salina tamponada com tampão fosfato 10 mM 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). Esta lavagem consiste de 3 centrifugações de 5 minutos a 300 x g para retirar os resíduos de Histopaque, que são tóxicos para as células.

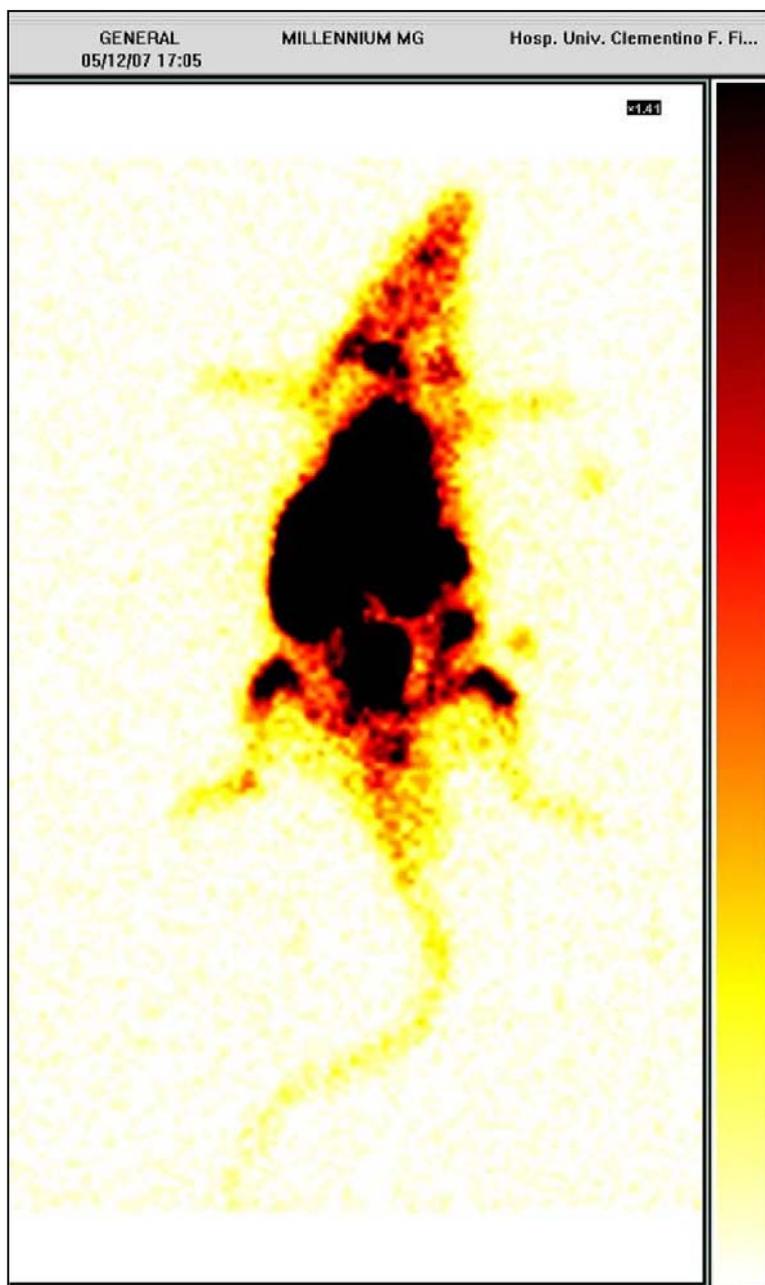
Ao final das lavagens, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de salina 0,9% e o número de células foi contado com auxílio de uma câmara de *Neubauer*. A viabilidade celular foi avaliada por coloração com Azul de Tripán (4%) e um total de  $3 \times 10^7$  células foi injetado em 500  $\mu$ L de solução salina 0,9% na veia jugular.

As células foram injetadas em diferentes períodos após a isquemia. O grupo controle está representado por animais isquêmicos, que receberam apenas injeção de solução salina (Grupo Controle). Os grupos experimentais foram denominados: JT 1DPI, JT 7DPI, JT 14DPI e JT 30DPI (JT: janela terapêutica; DPI: dias pós-isquemia), representando os diferentes períodos de injeção (1, 7, 14 e 30 dias após a isquemia), nos quais o transplante de CMMOs, ou a injeção de salina foram realizados. O tratamento com CTMs foi avaliado apenas na janela terapêutica mais precoce, JT 1DPI (Figura 6). Todos os animais foram avaliados através de teste funcional a cada 7 dias por um período de 77 dias e sacrificados no final deste período.

Para avaliar o perfil de biodistribuição das células injetadas no corpo do animal, realizamos uma marcação celular com o isótopo radiativo tecnécio-99. Cerca de 10% das CMMOs foram incubadas com uma dose de 100  $\mu$ Ci de tecnécio-99 por 10 minutos à temperatura ambiente em contato com o agente redutor. Em seguida, as células foram lavadas em salina 0,9% e centrifugadas a 500 rpm por 5 minutos. Os animais foram anestesiados e as células injetadas via jugular. Duas horas depois os animais foram reanestesiados e levados para o cintilógrafo para análise (Figura 7).



**Figura 6: Grupos experimentais.** A injeção de CMMO ou de solução salina foi realizada por via intravenosa em diferentes períodos após a isquemia 1,7,14 e 30 dias, correspondendo aos grupos JT 1DPI, JT 7DPI, JT 14DPI e JT 30DPI, respectivamente. Sendo que, para JT 1DPI foi criado um grupo que recebeu tratamento com CTMs. Estes grupos foram avaliados a cada 7 dias durante um período de 77 dias. JT: janela terapêutica; DPI: dias pós-isquemia



**Figura 7: Cintilografia da biodistribuição das CMMOs.** A imagem de cintilografia mostra a biodistribuição das CMMO marcadas com tecnécio-99 após a injeção na veia jugular.

### **3.4 Cultura de células mesenquimais**

Para obtenção das células mesenquimais em cultura, a fração de células mononucleares extraídas da medula óssea foi ressuspensa em meio DMEM/F12 e plaqueada. Após dois dias em cultura, o sobrenadante do meio foi retirado e um novo meio adicionado. Quando as células atingiram confluência, estas foram tratadas com tripsina e resuspendidas por turbilhamento mecânico e transferidas com pipeta de vidro polida para uma nova placa.

Devido ao fato das células mesenquimais serem aderentes ao plástico, e as mononucleares não, 3 passagens enzimáticas são necessárias para obtenção de uma cultura enriquecida em células mesenquimais. No final de três passagens, as células foram removidas da placa enzimaticamente, a enzima foi inibida em meio contendo  $\frac{1}{4}$  de Pulmozyme (Pulmozyme - alfadornase (rhDNase) - ROCHE - 2,5 mg/ 2,5 mL). A pulmozyme foi utilizada para impedir a formação de agregados celulares, que poderiam vir a entupir os vasos durante a injeção.

Após inibição da reação enzimática, as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos. Em seguida, foram ressuspendidas em solução salina 0,9% com  $\frac{1}{4}$  de pulmozyme, e injetadas na concentração de  $3 \times 10^6$  num volume de 500  $\mu$ L na veia jugular.

### **3.5 Análise das células mononucleares de medula óssea por citometria de fluxo**

Após a última lavagem da fração mononuclear de células da medula óssea, uma alíquota de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células (em 500  $\mu$ L de PBS) foi separada

para análise por citometria de fluxo. Foram adicionados 50  $\mu$ L de amostra e 1,5  $\mu$ L de cada anticorpo em tubos de poliestireno cristal para citometria. As amostras foram marcadas da seguinte maneira:

Tubo 1 – Controle (sem anticorpo);

Tubo 2 – Iodeto de propídeo (5  $\mu$ g/mL);

Tubo 3 – Granulocyte-FITC (Santa Cruz Biotechnology / sc19613);

Tubo 4 – CD11b e c-FITC (CALTAG/ MR6201) / CD90-PerCP (BD Pharmingen/ n° 551401);

Tubo 5 – CD29-FITC (BD Pharmingen n° 555005) / CD90-PerCP.

Os tubos foram incubados no escuro e em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, adicionamos 500  $\mu$ L de solução de lise de hemácias com fixador (paraformaldeído 2%) e incubamos por 10 minutos. Adicionamos 2 mL de PBS para lavagem do excesso de anticorpo. As amostras foram centrifugadas a 1500g por 3 minutos e ressuspensas em 400  $\mu$ L de PBS para fazer a análise no citômetro e o perfil fenotípico das amostras foi analisado no programa BD FACSDiva.

### **3.6 Avaliação funcional**

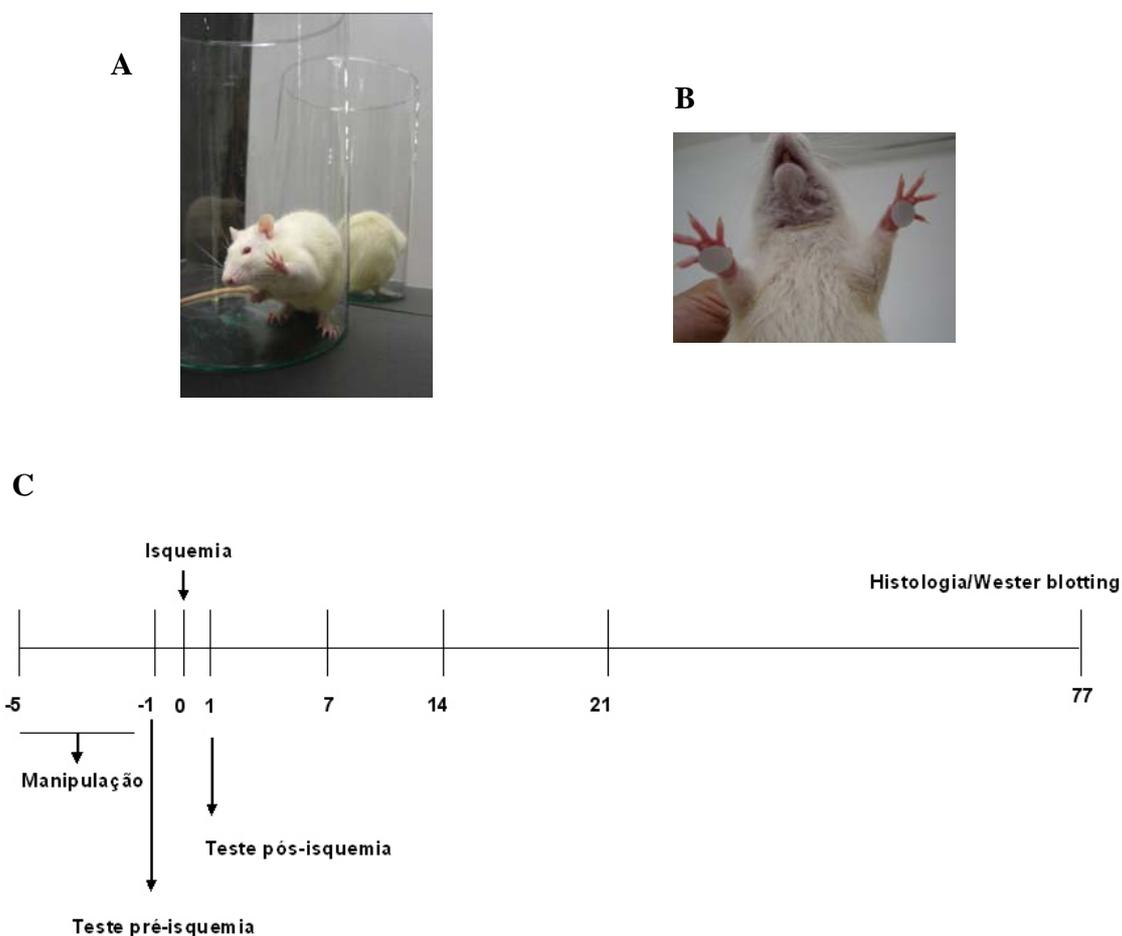
O desempenho motor funcional foi baseado no teste de exploração vertical-lateral de Schallert e colaboradores (2000), este teste é sensível para déficits motores de longa duração no uso do membro anterior, e os resultados não mudam com a repetição. Os testes foram realizados em um cilindro de vidro com tamanho

apropriado para ratos de 300 g (20 cm de diâmetro x 30 cm de altura). As dimensões do cilindro, bem como o período do dia ou a intensidade de luz encoraja a exploração vertical (Schallert, 2006). Estes testes foram realizados em baixa luminosidade, frequentemente no período da tarde.

Para prevenir a habituação ao cilindro, 20 eventos foram registrados para cada animal. Os eventos correspondem ao número de vezes que o animal se apóia com a pata direita (contralateral à lesão), com a esquerda (ipsilateral) ou com ambas (Figura 8A). É calculada então a taxa de assimetria (% de uso com a esquerda - % de uso com a direita). Estas percentagens são obtidas em relação ao total de toques na parede do cilindro: número de toques com a direita + com a esquerda + com ambas). Sendo a taxa de assimetria representada por X: ( $X = 0$ ) → uso simétrico; ( $0 < X \leq 100$ ) → uso maior da esquerda; ( $-100 \leq X < 0$ ) → uso maior da direita. Para o tratamento com CMMOS foram selecionados apenas os animais que apresentavam déficit igual ou superior a 80% de assimetria. A taxa de assimetria foi convertida para taxa de simetria para melhor visualização dos dados no gráfico.

Um teste sensoriomotor também foi realizado. Este consiste de 4 sessões, separadas por intervalo de 5 minutos, de colocação de uma etiqueta adesiva em cada pulso (Figura 8B) e posterior verificação de qual pata o rato primeiro remove o adesivo ou verificação de quanto tempo ele leva para remover o adesivo da pata direita. A percentagem de preferência pela direita é calculada ( $n^\circ$  de retiradas primeiramente da direita /  $n^\circ$  de retiradas primeiramente da esquerda +  $n^\circ$  de retiradas primeiramente da esquerda), sendo: 50% → sem preferência; > 50% → preferência pela direita; < 50% → preferência pela esquerda.

Em ambos os testes os animais foram avaliados antes da isquemia, para remover do grupo os animais com assimetria prévia e para termos o parâmetro comportamental antes da lesão. Todos os animais passaram por um período de manipulação antes do início dos testes, sendo que para o teste do adesivo os três últimos dias de manipulação foram utilizados para treinamento da retirada do adesivo, o que não foi necessário para o teste do cilindro por tratar-se de um teste de exploração (Figura 8C).



**Figura 8: Testes funcionais.** A, teste do cilindro de Schallert. B, teste sensoriomotor de remoção do adesivo. C, escala dos testes funcionais.

### **3.7 Preparações histológicas – perfusão e criotomia**

Os animais foram anestesiados com éter etílico e posicionados em decúbito dorsal, passando por uma incisão cirúrgica para expor o coração. Uma agulha conectada a cânula da bomba de perfusão foi inserida no ventrículo esquerdo iniciando-se a perfusão com 200 mL de salina 0,9% por 15 minutos, seguida de 500 mL de paraformaldeído 4% por 30 minutos e por fim, 200 mL da solução paraformaldeído 4% + sacarose 10% por 10 minutos.

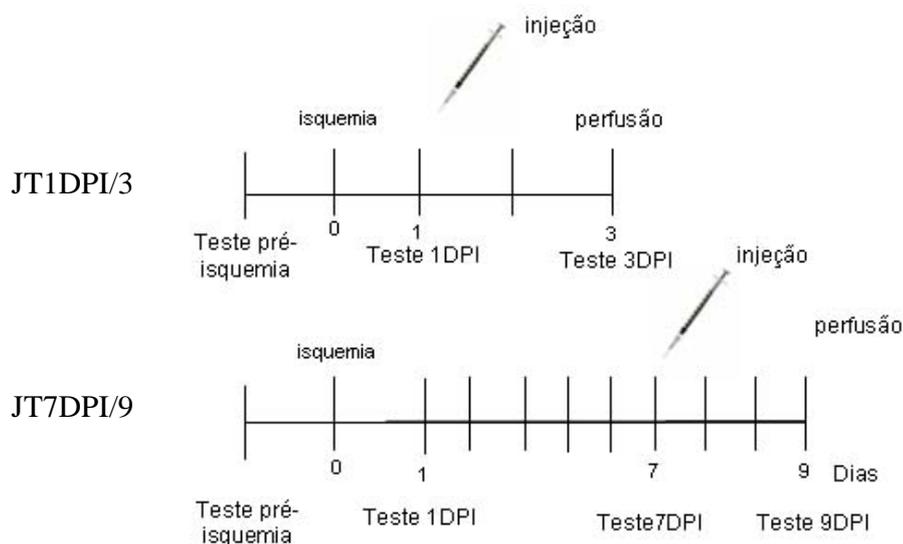
No término deste procedimento foi feita a craniotomia, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e mantidos em tampão fosfato com 20% de sacarose com o objetivo de iniciar a crioproteção. Em seguida, a solução foi trocada para tampão fosfato com 30% de sacarose. Os encéfalos foram, então, emblocados em resina OCT (Tissue-Tek-4583), cortados coronalmente em criostato (Leica CM-1850) a 30  $\mu$ m em lâminas gelatinizadas e mantidos a -20°C até serem utilizados para as reações histoquímicas e imuno-histoquímicas.

### **3.8 Histoquímica com Fluoro-Jade C**

A morte celular no córtex cerebral foi avaliada por reação histoquímica para Fluoro-Jade C (Histo-Chem Inc.), que marca especificamente neurônios em degeneração (Schmued *et al.* 1997). Para esta reação os cortes foram desidratados com etanol 100% por 3 min. e etanol 70% por 1 min., lavados em

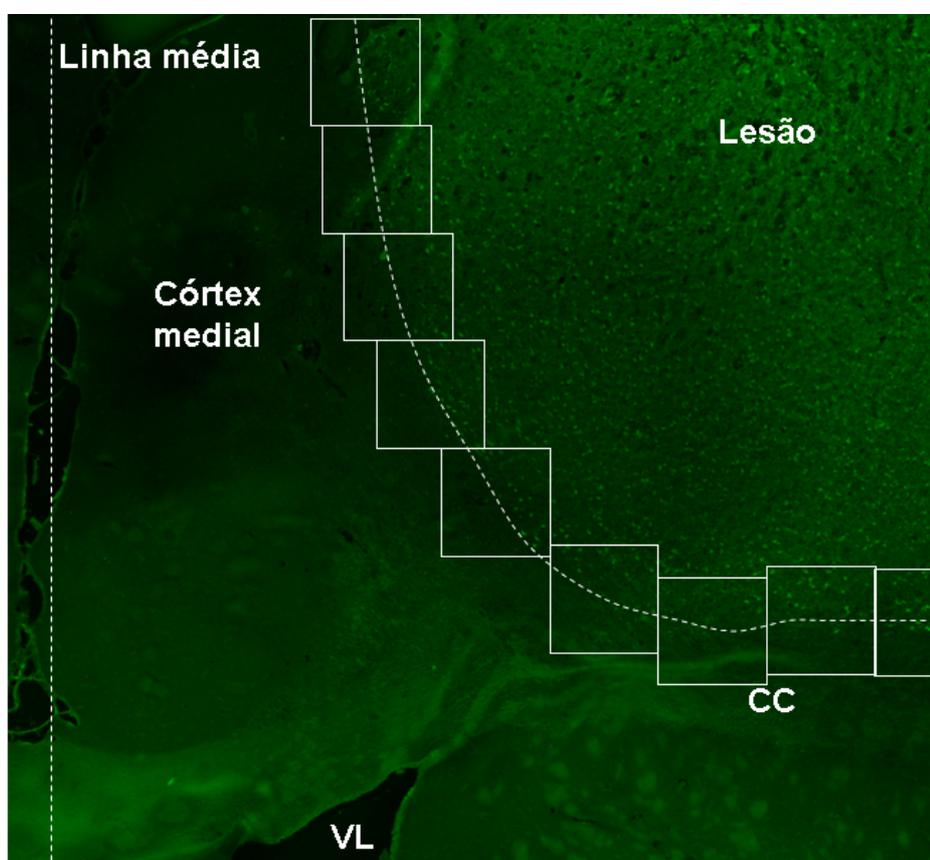
água destilada por 1 min. e incubados em solução de permanganato ( $\text{KMnO}_4$ ) a 0.06%, com suave agitação por 15 min. em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados novamente e incubados em uma solução contendo 0.001% de Fluoro-Jade C em ácido acético por 30 min. Por fim, os cortes foram lavados três vezes em água destilada, desidratados na estufa a  $37^\circ\text{C}$  e as lâminas montadas em meio de montagem Entellan (Merck).

Os grupos experimentais foram separados em: JT 1DPI/3 e JT 7DPI/9 (sobrevida de 3 dias e 9 dias pós-isquemia, respectivamente), sendo que para cada um destes grupos, existe um grupo controle (injeção de salina) correspondente. Os animais de todos os grupos foram submetidos a avaliação funcional de acordo com o esquema abaixo (Figura 9).



**Figura 9: Desenho experimental para análise da morte celular após tratamento com CMMOS.** Os grupos foram testados para o teste do cilindro antes, pós-isquemia e pós-CMMOs.

A quantificação das células Fluoro-Jade C positivas, foi realizada contando-se o número de células marcadas na periferia da lesão (Figura 10), no corte localizado a 1 mm (eixo ântero-posterior) do bregma. Foram utilizados 3 animais para cada grupo experimental, contando-se todas as células marcadas na periferia da lesão de três cortes por animal.



**Figura 10: Esquema mostrando a área de lesão.** A fotomontagem mostra um corte coronal reagido para Fluoro-Jade C a área de lesão 1 dia após a isquemia. Os quadrados localizados na periferia da lesão correspondem a área quantificada. CC, corpo caloso; VL, ventrículo lateral.

### 3.9 Expressão da proteína GFAP

#### 3.9.1 Imunohistoquímica

Para análise imuno-histoquímica, as lâminas com os cortes foram lavadas três vezes com PBS 10 mM, pH 7,4 + Triton X-100 a 0,01% (Sigma) por 5 minutos. A lavagem foi seguida de incubação com soro normal de cabra 10% em PBS (NGS, do inglês *normal goat serum*; Sigma) por 30 minutos à temperatura ambiente para bloquear os sítios não-específicos.

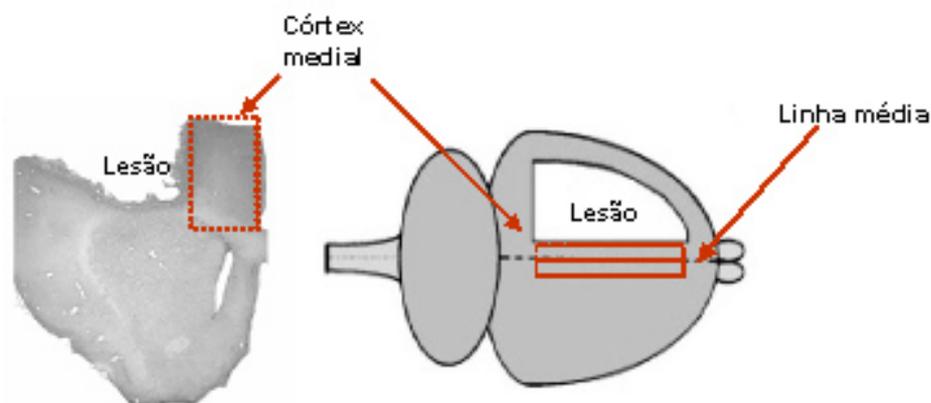
Posteriormente, o anticorpo primário anti-GFAP (fração IgG feito no coelho, 1:500, DAKO) foi adicionado sobre os cortes e mantido *overnight* em câmara úmida a 4°C. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 10 mM e os tecidos incubados com o anticorpo secundário conjugado a Cy3 (contra IgG de coelho, feito em cabra, 1:200, Sigma) durante 2 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.

Após incubação com o anticorpo secundário as lâminas foram lavadas novamente com PBS 10 mM, os cortes incubados por 3 minutos com solução aquosa a 0,1% de bisbenzimidazina (Sigma) e lavados mais uma vez com PBS 10mM. As lâminas foram montadas com a solução de montagem PPD 5 mM (p-fenil-diamina; Sigma) e analisadas ao microscópio de fluorescência Axiovert 200M da Zeiss equipado com o sistema Apotome. Os cortes foram analisados através de uma lente objetiva de 20x com 0,5 de número de abertura.

### 3.9.2 Western Blot

- **Extração e Dosagem de proteínas**

As amostras utilizadas para análise da expressão protéica foram obtidas dos córtices mediais ipsilateral (periférico à lesão) e contralateral (Figura 11). Os tecidos correspondem aos animais dos grupos: **Normal**, animal sem isquemia; **Controle**, animal isquêmico que recebeu injeção de solução salina 0,9%; **JT 1DPI** e **JT7DPI**, animais que receberam injeção de CMMOS 1 e 7 dias pós-isquemia, respectivamente. Os tecidos de todos os grupos experimentais foram dissecados 77 dias pós-isquemia. Os animais do grupo Normal apresentavam a mesma idade dos demais grupos.



**Figura 11: Esquema da área dissecada para análise da expressão de proteína.** Os tecidos utilizados para análise da expressão de GFAP foram dissecados dos córtices mediais, ipsilateral (entre a linha média e a periferia da lesão) e contralateral a lesão (região homóloga ao tecido dissecado no hemisfério ipsilateral a lesão).

Para a extração protéica, os córtices foram lisados em 100  $\mu$ L de tampão de RIPA (Tris HCl 10 mM, pH 7,6; NP-40 1%; Desoxicolato de Sódio 1%; EDTA 5 mM e Triton X-100 1%; SDS 0,1% NaCl 150mM). A este tampão foram acrescentados os inibidores de proteases (PMSF 1 mM; 10  $\mu$ g/mL de Aprotinina e 10  $\mu$ g/mL de Pepstatina). O tecido foi homogeneizado por agitação (4 séries de 10 min.) e centrifugados a 15000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -70°C até o uso.

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951), utilizando-se uma curva-padrão com diferentes concentrações (5-35  $\mu$ g) de BSA (do inglês *bovine serum albumine*, Sigma). Os tubos contendo as concentrações da curva- padrão e as amostras (2  $\mu$ L) foram incubados em duplicatas, com 2 mL de RCA (Sulfato de cobre 0,01%; tartarato de NaK 0,02%; carbonato de sódio 0,02% em hidróxido de sódio 0,1 N) por 10 min. seguido da adição de 100  $\mu$ L de Folin por 30 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm e a densidade óptica obtida para cada amostra comparada com a curva padrão para aferir a concentração de proteína correspondente.

- **Análise da expressão protéica**

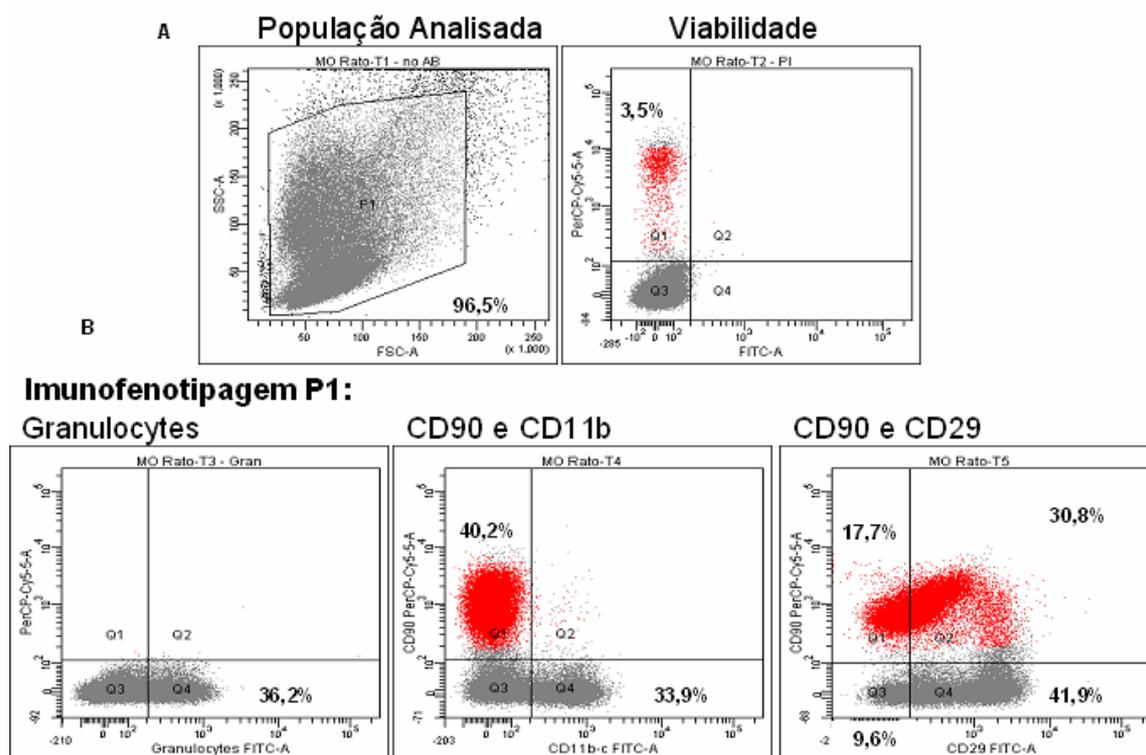
Extratos protéicos obtidos dos córtices de ratos em diferentes situações experimentais, contendo 30  $\mu$ g de proteína, foram adicionados ao tampão de amostra 4x (Tris 250 mM pH 6,8; glicerol 40%;  $\beta$ -mercaptoetanol 4%; SDS 12% e azul de bromofenol 0,1%). A separação das proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12,5% a

120 v. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham), a 40 mA por 2 horas. Ao final da transferência, foi realizado o bloqueio da membrana com BSA 5% em TBS/Tween 0,1% por 1 h. Em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-GFAP (fração IgG feito no coelho, 1:5000, DAKO) ou anti-actina (fração IgG feito no camundongo, 1:2000, controle de carregamento) em BSA 5% TBS/Tween 0,1% por 16-18 h. Após incubação a membrana foi lavada por 3 vezes de 15 minutos com TBS/Tween 0,1%, seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (contra IgG de coelho, feito em cabra HRP-linked IgG 1:2000 Cell Signaling e contra IgG de camundongo HRP-linked IgG 1:2000, Cell Signaling ) diluído em leite Mólico 5% TBS/Tween 0,1% por 1 hora. A seguir a membrana foi lavada novamente por 3 vezes de 15 min. com TBS/Tween 0,1% e revelada em câmara escura com ECL-plus (Amersham), segundo instruções do fabricante. O tempo de exposição do filme de raio-X variou de 10-30 segundos. Para a densitometria, os filmes foram escaneados, e as imagens analisadas no programa Image J. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa de computador *GraphPad Prism* versão 4.02 (GraphPad Software, Inc). foi aplicados o teste *two-way ANOVA* com medidas repetidas e representados como média  $\pm$  desvio padrão.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise das CMMOs por citometria de fluxo.

Analisamos as células da fração mononuclear de medula óssea por citometria de fluxo em uma população de cerca de 96,5% (Figura 12A). Nesta população, avaliamos a viabilidade celular, através de marcação com iodeto de propídio (PI), obtendo um percentual de células viáveis superior a 96% (Figura 12A).



**Figura 12: Caracterização parcial de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) antes do transplante.** A: análise de citometria de fluxo das CMMOs, mostrando as porcentagens da população analisada e viabilidade. Em B, podemos observar a imunofenotipagem das CMMOs. n=3.

Realizamos uma caracterização fenotípica parcial das células injetadas. Os ensaios de imunofenotipagem demonstraram que na população analisada encontramos 36,2% de granulócitos; 40,2% de progenitores hematopoiéticos (identificados pelo antígeno CD90); 33,9 % de monócitos (CD11b positiva) e 41,9% de leucócitos (CD29 positivas). A porcentagem de células duplamente positivas para CD90 e CD29 foi de 30,8% (Figura 12B). Os valores das porcentagens foram obtidos a partir da média de três ensaios individuais, sendo analisada uma amostra de CMMOs de cada animal por ensaio.

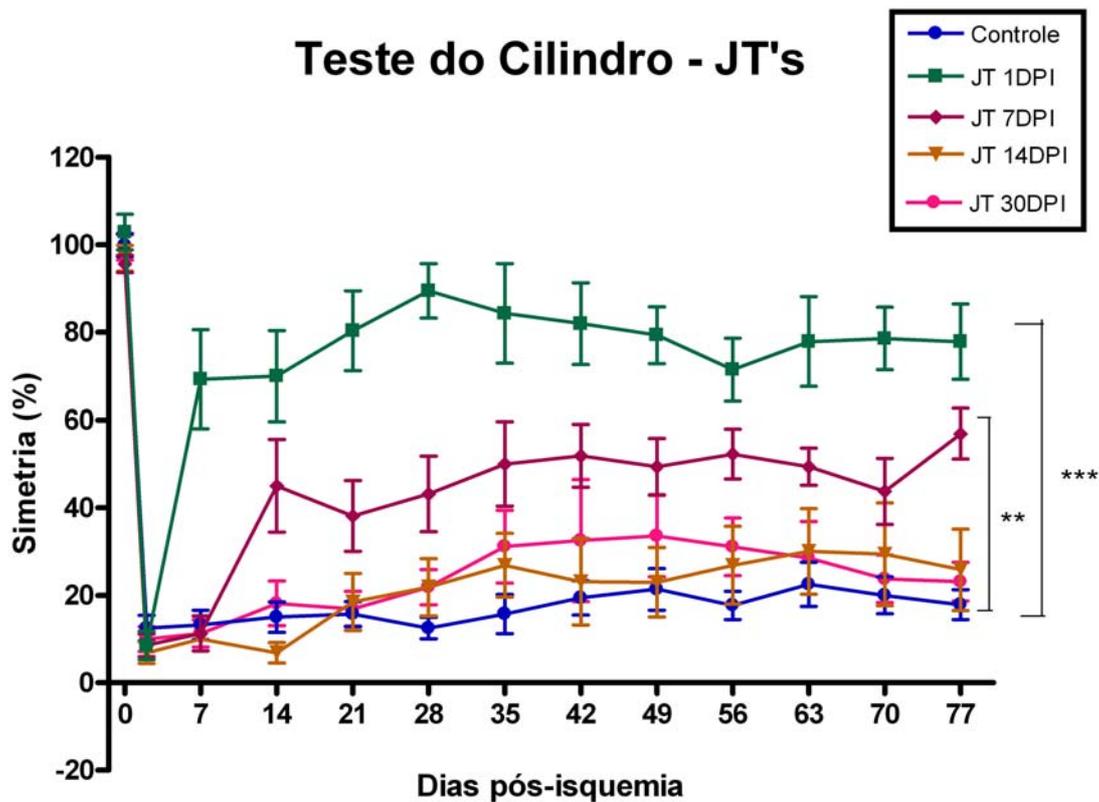
#### **4.2 Avaliação funcional da terapia com CMMOs.**

Para investigar o possível benefício funcional da terapia com CMMOs em ratos submetidos à lesão cortical, utilizamos o teste de Schallert *et al.* (2000), no qual se avalia o grau de assimetria dos membros superiores durante exploração vertical-lateral na parede de um cilindro de vidro.

Os grupos experimentais avaliados abrangem quatro janelas terapêuticas (JT's) 1, 7, 14 e 30 dias pós-isquemia (DPI), nas qual foram realizados o transplante celular. Nosso grupo controle consiste em animais isquêmicos injetados com salina, também administrada nos diferentes tempos pós-isquemia (1, 7, 14 e 30 DPI). Na representação gráfica todos os animais injetados com salina foram agrupados em um único grupo de animais controle, devido a grande similaridade entre os resultados obtidos nos diferentes tempos pós-isquemia.

Na Figura 13 estão representados os resultados obtidos na avaliação funcional nos diferentes grupos experimentais e no grupo controle. Os animais foram testados 1 dia antes da isquemia, 1 dia após a cirurgia e os testes foram repetidos a cada 7 dias até atingir 77 dias de sobrevivência. Podemos observar uma maior recuperação funcional no grupo de animais injetado 1 dia após a lesão, quando comparado com o grupo controle. A recuperação funcional no grupo injetado 7 dias após a lesão, também foi significativamente maior do que o grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa na recuperação funcional dos grupos injetados com 14 ou 30 dias quando comparados com o grupo injetado com salina.

Nossos resultados apontam para um efeito terapêutico pelas CMMOs em duas das quatro janelas terapêuticas avaliadas, JT 1DPI e JT 7DPI, sendo que este efeito permanece por pelo menos 77 dias pós-isquemia.

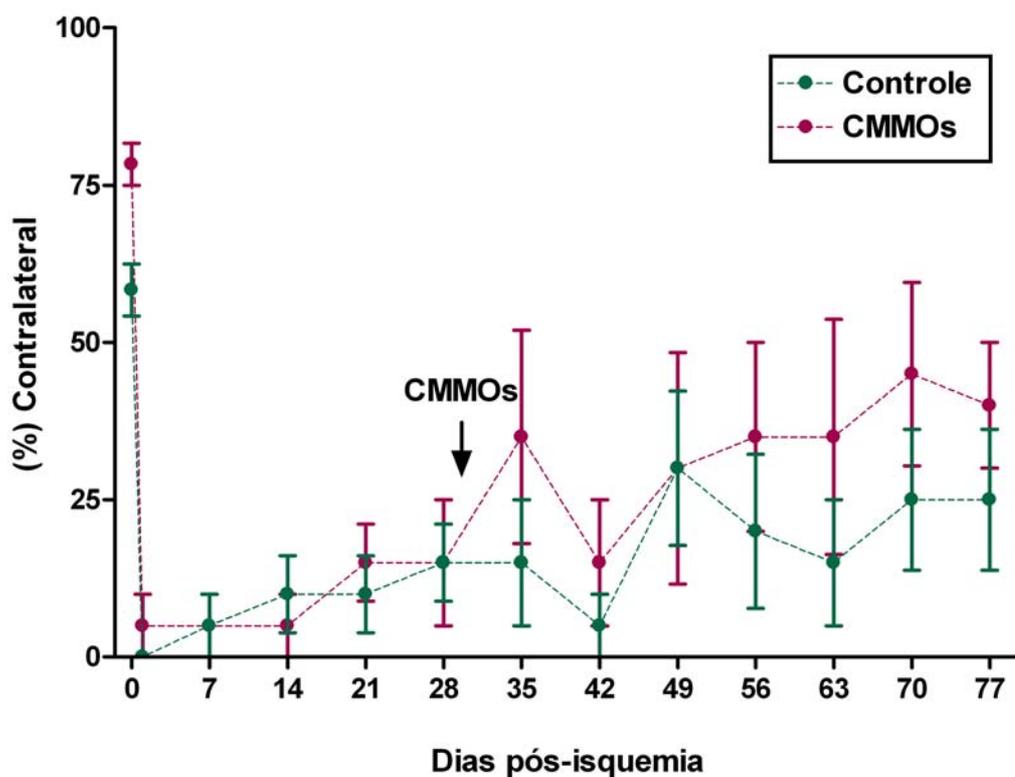


**Figura 13: Avaliação funcional.** Os resultados representados no gráfico mostram a percentagem de simetria obtida a partir do uso dos membros anteriores no interior de um cilindro de vidro, durante a exploração vertical-lateral (Teste do Cilindro de Schallert). Foram avaliados 5 grupos experimentais - Grupo Controle (n=14): animais isquêmicos que receberam injeção de solução salina; Grupos JT 1DPI, JT 7DPI, JT 14DPI e JT 30DPI (n=8 para cada grupo): animais isquêmicos que receberam injeção de CMMOs em diferentes períodos 1, 7, 14 e 30 dias após a lesão, respectivamente. Estes grupos foram avaliados 24 h após a isquemia e a cada 7 dias durante 77 dias pós-isquemia. JT: janela terapêutica, DPI: dias pós isquemia, CMMOs: células mononucleares de medula ósea. ANOVA two-way.  $p < 0,001$  (\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*)).

Além do teste do cilindro, utilizamos um outro teste funcional – o teste do adesivo. Este teste permite avaliar dois parâmetros distintos, preferência e tempo de remoção do estímulo. A avaliação funcional no teste do adesivo foi realizada apenas para o grupo JT 30DPI. Este grupo representa o tratamento em um

período mais tardio, 30 dias pós-isquemia. Nesta janela temporal não foi observada melhora funcional em resposta ao tratamento para nenhum dos parâmetros analisados (Figuras 14 e 15).

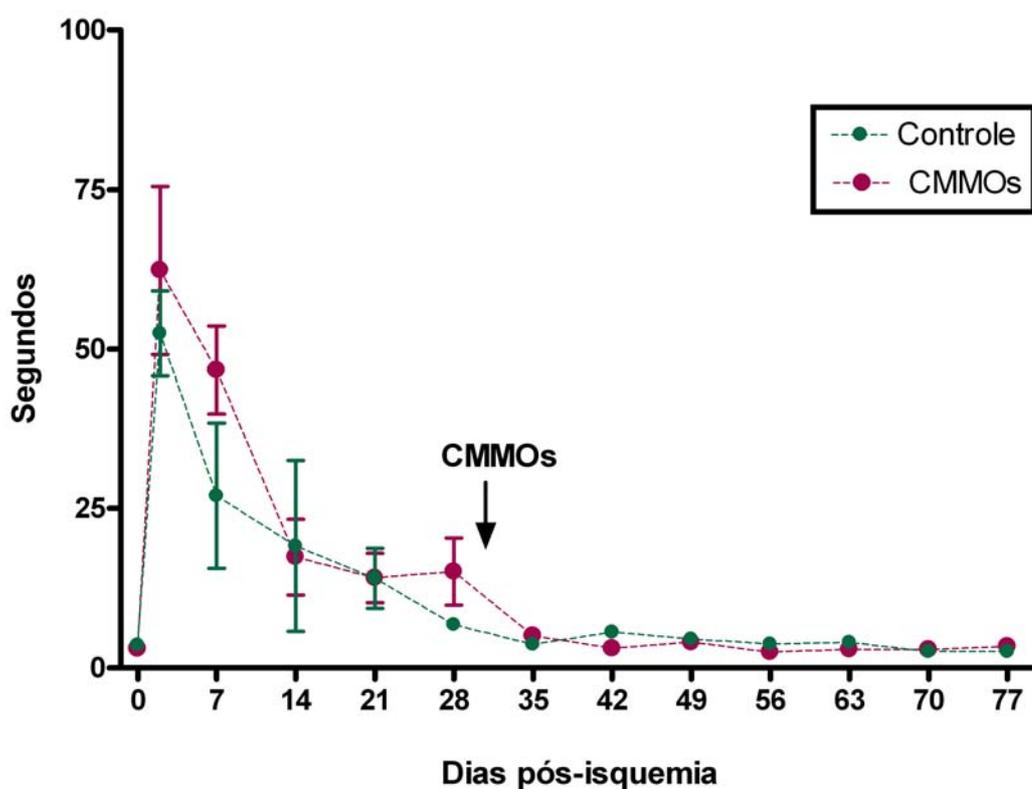
## Teste de Preferência na Remoção do Adesivo - JT 30DPI



**Figura 14: Teste sensoriomotor de preferência na remoção do adesivo.** Os animais receberam injeção de CMMOs 30 dias pós-isquemia (vermelho) n=5. Não houve diferença na preferência entre o grupo CMMOs e controle (verde) n=5. CMMOs, células mononucleares de medula óssea. ANOVA two-way.

Este resultado está de acordo com o teste do cilindro, no qual, também não observamos melhora significativa para este grupo (Figura 13). Entretanto, no parâmetro que avalia o tempo que os animais levam para remover o adesivo da pata contralateral a lesão, houve uma melhora espontânea, antes da administração das células (Figura 15).

### Tempo de Remoção do Adesivo - JT 30DPI



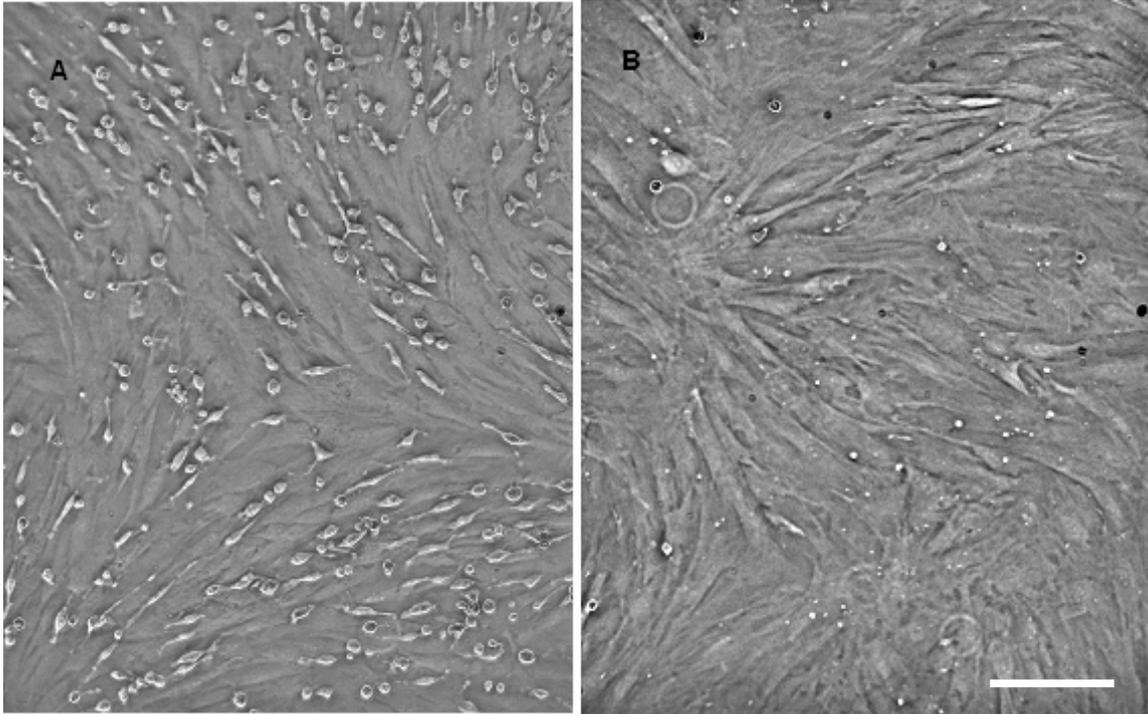
**Figura 15: Teste sensoriomotor de tempo de remoção do adesivo.** O tratamento com CMMOs foi realizado 30 dias pós-isquemia. Em vermelho o grupo que recebeu injeção de CMMOs e em verde o grupo injetado com salina. CMMOs, células mononucleares de medula óssea. n=5; Salina, n=5. ANOVA two-way.

### **4.3 Avaliação funcional da terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea**

Um grupo de animais foi tratado com células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas a partir da medula óssea de ratos, com o objetivo de avaliar se este tipo celular poderia desempenhar algum efeito benéfico neste modelo de isquemia. Não realizamos a caracterização destas células para confirmar seu caráter multipotente, apenas avaliamos seu fenótipo pelas condições em cultura, como a morfologia e seu caráter aderente ao plástico (Figura 16A e B).

Para avaliar o efeito do tratamento com CTMs escolhemos a janela terapêutica de 1 dia pós-isquemia para a realização do transplante. Esta foi a janela terapêutica, na qual a melhora funcional resultante do tratamento com CMMOs foi mais evidente (Figura 13). Realizamos a análise funcional do grupo transplantado com CTMs, baseada no teste do cilindro, seguindo os mesmos critérios adotados para os grupos tratados com CMMOs.

As células mesenquimais utilizadas no transplante foram retiradas das condições de cultivo após a terceira passagem (Figura 16B). Neste momento é possível obtermos uma cultura enriquecida de CTMs. Estas células foram injetadas na veia jugular, e o desempenho funcional dos animais foi avaliado semanalmente, durante 77 dias.

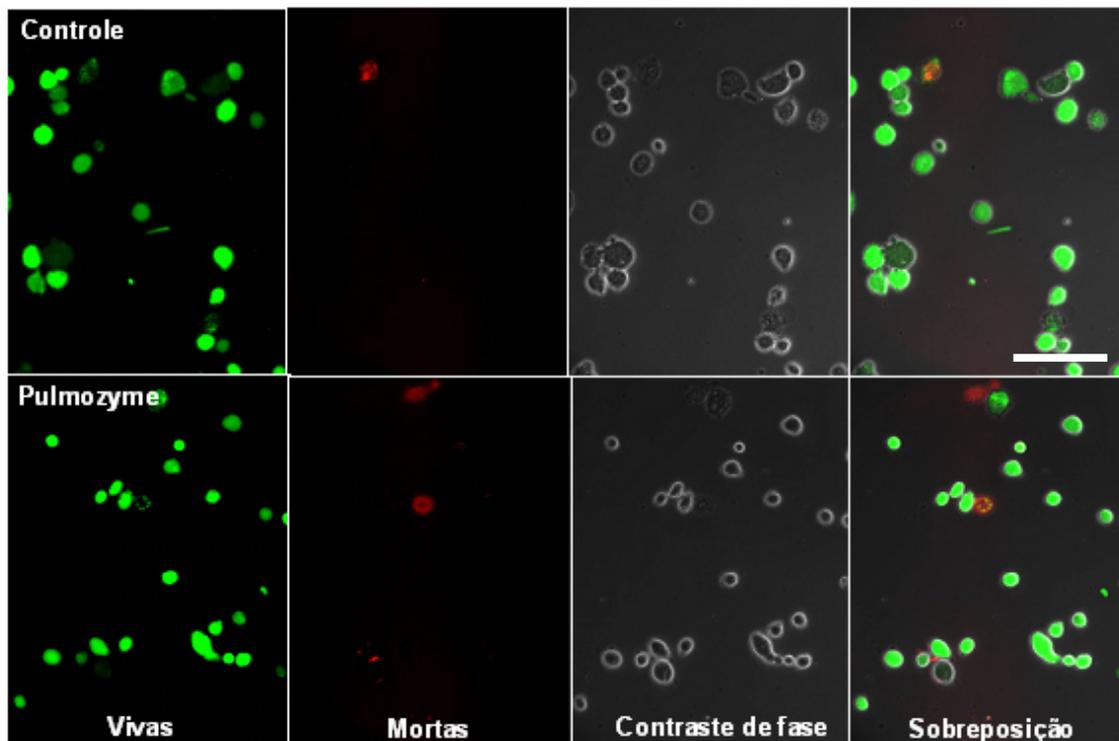


**Figura 16: Células derivadas de medula óssea em cultivo.** A, células da fração mononuclear com 9 dias em cultura; B, CTMs em terceira passagem. Campo claro; barra de calibração 100 $\mu$ m.

No início dos transplantes os animais injetados com CTMs morriam por embolia. As CTMs estavam se agregando e formando microembolos, que provavelmente estavam se alojando nos vasos do pulmão, levando os animais a uma parada respiratória. Para resolver este problema as CTMs foram dissociadas em meio DMEM, contendo Alfadornase (rhDNase) - *Pulmozyme* para impedir a formação de agregados.

Para avaliar se o medicamento não estaria comprometendo a viabilidade celular, utilizamos um kit de viabilidade que identifica células vivas e células

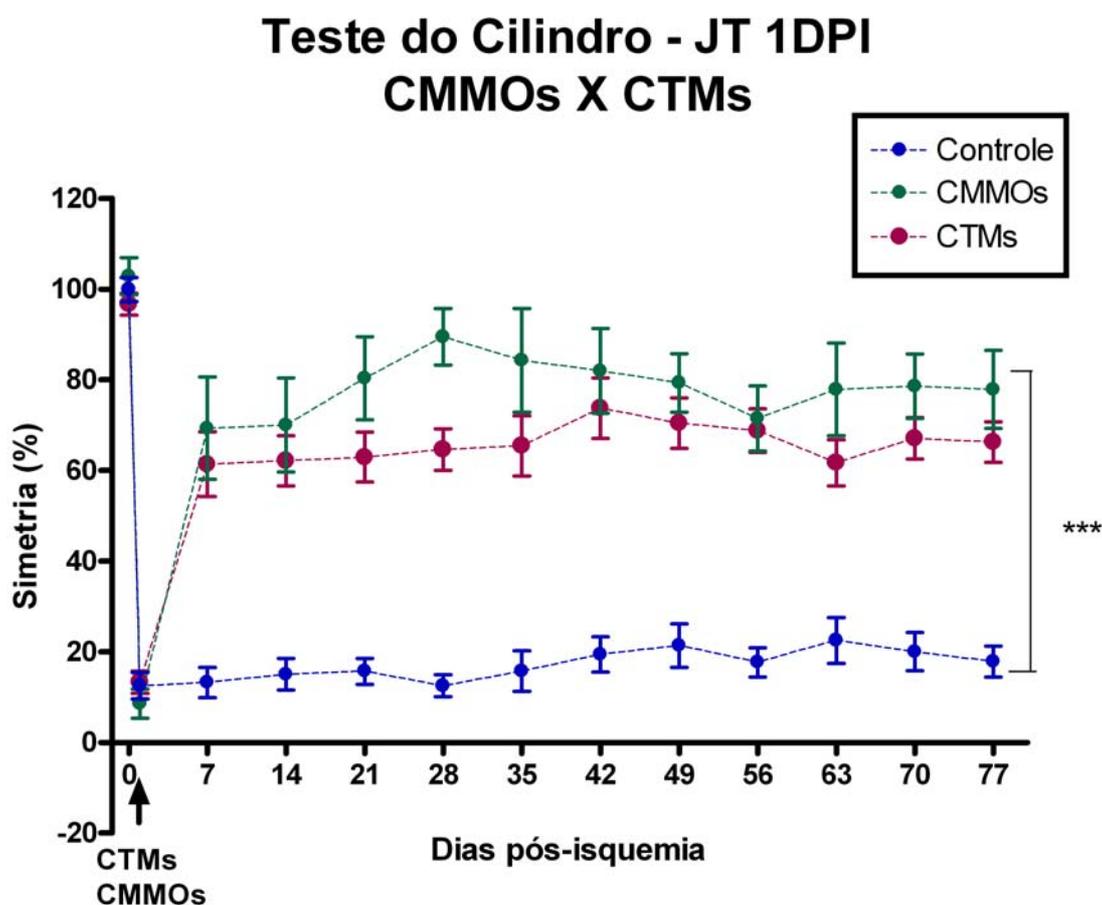
mortas. Não observamos diferenças visíveis na viabilidade celular entre as células mantidas em solução salina em relação às células mantidas em salina contendo *Pulmozime* após 1 hora de incubação (Figura 17).



**Figura 17: Viabilidade celular.** Utilizando o kit Live-Dead, podemos observar as células viáveis em verde e as células mortas em vermelho. As CTMs foram incubadas com Pulmozime por 1 hora. As imagens foram obtidas 2 horas após a remoção das células das condições de cultivo. Controle: CTMs+salina; CTMs+ Pulmozime/salina; barra de calibração 100 $\mu$ m.

Com este procedimento conseguimos realizar os transplantes e avaliar o desempenho funcional dos animais. A figura 18 mostra o efeito do tratamento com CTMs e CMMOs na janela terapêutica de 1 dia pós-isquemia (JT 1DPI), sendo possível comparar o efeito dos dois tratamentos. O desempenho funcional avaliado pelo teste do cilindro demonstrou melhora significativa após o tratamento

com CTMs comparado ao grupo controle. No entanto, não observamos diferença significativa entre os tratamentos, CTMs e CMMOs.



**Figura 18: Efeito das CTMs e comparação com o grupo tratado com CMMOs.** Os resultados representados no gráfico mostram o desempenho funcional avaliado pelo Teste do Cilindro de Schallert. Os tratamentos foram realizados na janela terapêutica de 1 dia pós-isquemia (JT1DPI). O grupo em verde recebeu injeção de CMMOs (n=8). Enquanto que o grupo em vermelho recebeu injeção de CTMs (n=12). Em azul o grupo Salina (n=14): animais isquêmicos que receberam injeção de solução salina. Estes grupos foram avaliados durante 77 dias pós-isquemia. CMMOs: células mononucleares de medula óssea, CTMs células mesenquimais de medula óssea ANOVA two-way,  $p < 0,0001$  (\*\*\*) Bonferroni; 7, 14, 21, 35, 49, 56, 63, 70, 77 (\*); 28 e 42 (\*\*).

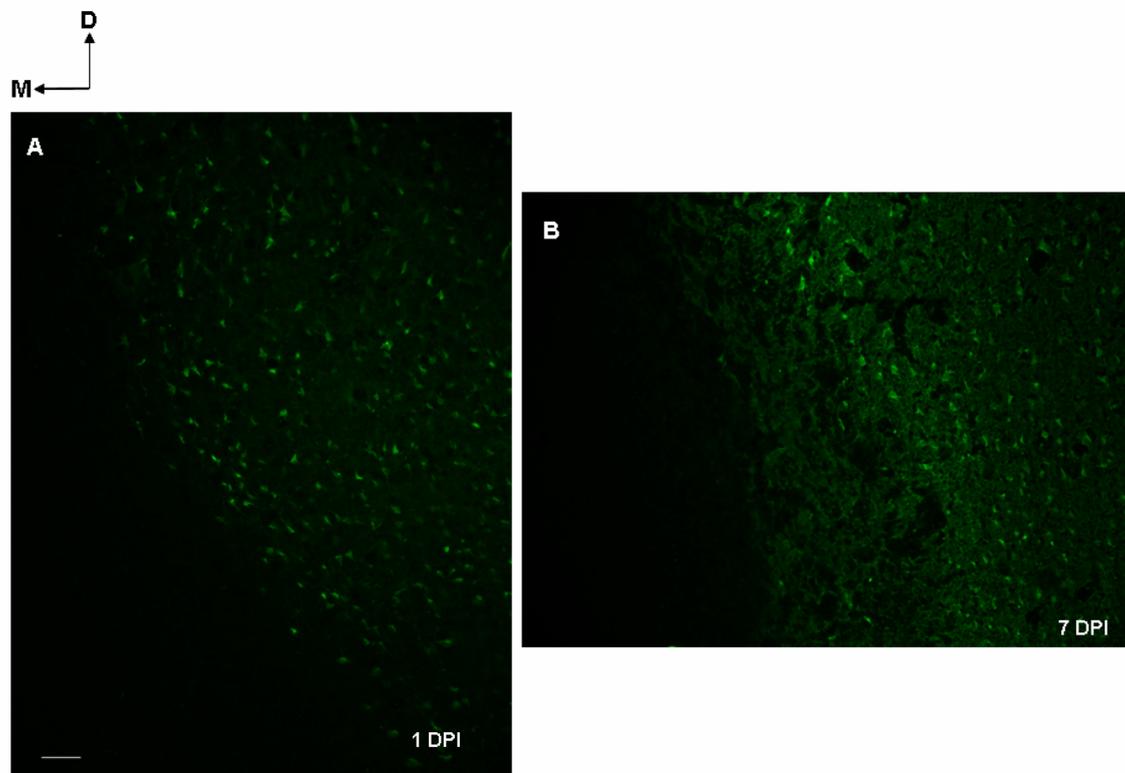
## **4.4 Avaliação morfológica da terapia celular**

### **4.4.1 Morte neuronal – Fluoro-Jade C**

Para avaliar se a neuroproteção seria um dos mecanismos responsáveis pela melhora no desempenho funcional observado nas janelas terapêuticas JT 1DPI e JT 7DPI (com sobrevida de 77 dias) (Figura 13), resolvemos avaliar a morte neuronal, utilizando reação para Fluoro-Jade C nestes períodos. Para isto, utilizamos dois grupos de animais que foram injetados com CMMOs ou salina em 1 ou 7 dias após a isquemia, com sobrevida de 3 e 9 (JT 1DPI/3 e JT 7DPI/9) dias, respectivamente.

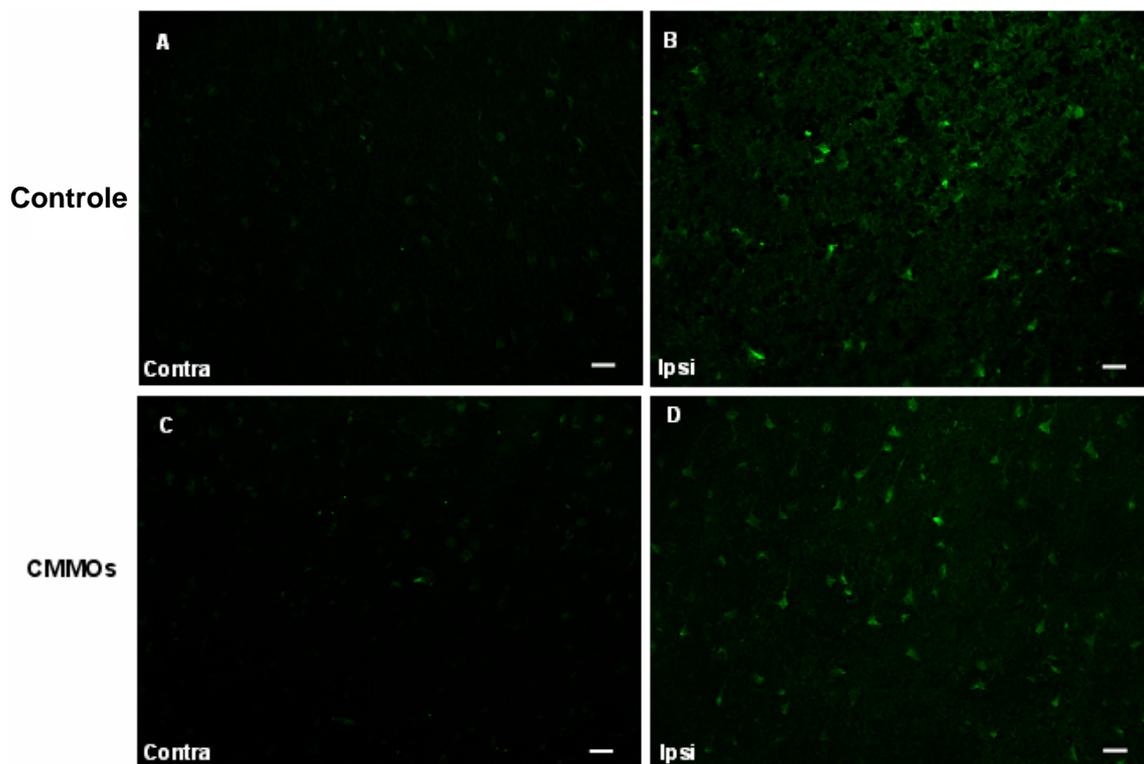
Inicialmente, avaliamos o padrão de morte neuronal em animais isquêmicos, sem tratamento, com sobrevidas de 1, 7, 14 e 30 dias pós-lesão. Observamos marcação com Fluoro-Jade C nos córtices ipsilaterais a lesão, apenas em 1 e 7 dias após a isquêmica (Figura 19 A e B). Não observamos marcação em 14 e 30 dias, pois o tecido apresenta-se completamente degenerado (dados não mostrados).

No primeiro dia pós-isquemia podemos observar muitas células marcadas com Fluoro-Jade C distribuídas por toda a área de lesão. Quando a análise é realizada 7 dias pós-isquemia, o tecido subjacente à superfície, onde os vasos piais foram coagulados, apresenta uma integridade inferior ao tecido analisado em 1DPI, mas ainda é possível observar neurônios em degeneração (Figura 19 B).



**Figura 19: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – 1DPI e 7DPI.** As figuras A e B mostram células Fluoro-Jade C na periferia da lesão em 1 e 7 dias pós-isquemia, respectivamente. Barra de calibração, 50  $\mu\text{m}$ .

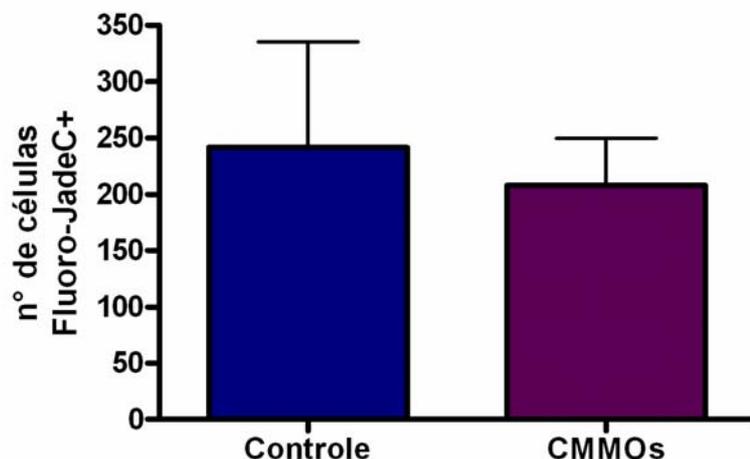
No grupo JT 1DPI/3, observamos neurônios marcados com Fluoro-Jade C nos córtices ipsilaterais a lesão, tanto nos animais tratados com CMMOs quanto naqueles que receberam injeção de salina. No entanto, os animais tratados com CMMOs apresentaram um parênquima mais íntegro quando comparado ao grupo que recebeu salina (Figura 20).



**Figura 20: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – JT 1DPI/3DPI.** As figuras A e B representam marcação com Fluoro-Jade C nos córtices contra e ipsilateral de animais injetados com salina. Em C e D podemos observar o padrão de marcação para os animais submetidos ao tratamento com CMMOs. Contra: contralateral; Ipsi: ipsilateral; Barra de calibração, 20 $\mu$ m.

A figura 21 mostra a quantificação das células Fluoro-Jade C positivas, na periferia da lesão dos animais correspondentes ao grupo JT 1DPI/3. Não encontramos diferença significativa no número de neurônios em degeneração nos córtices dos animais tratados com CMMOs, quando comparados com o controle.

### Células Fluoro-Jade C positivas na periferia da lesão 2 dias após tratamento com CMMOs

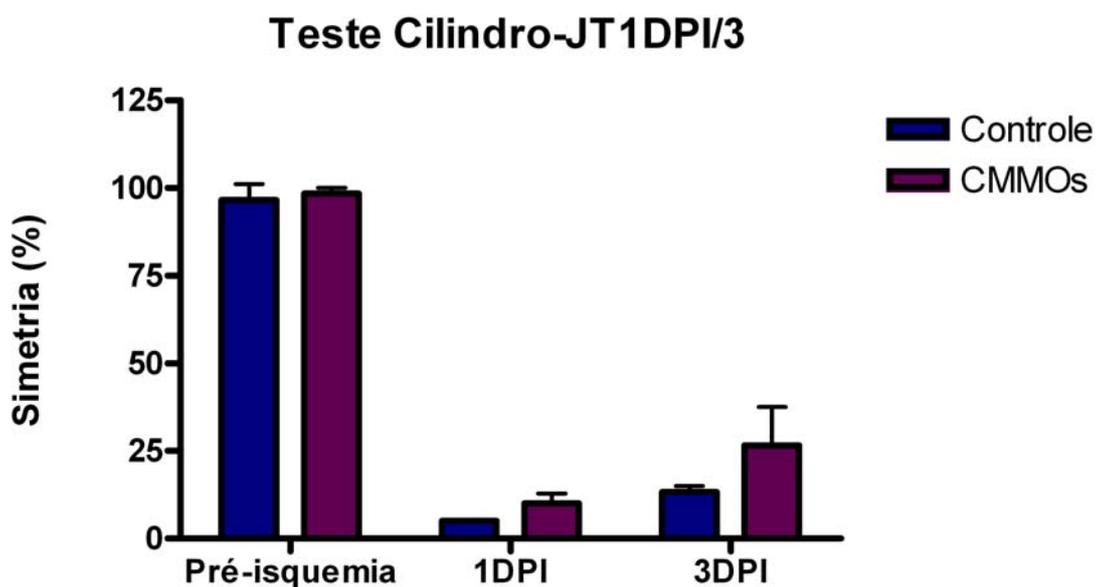


**Figura 21: Quantificação de neurônios em degeneração - JT 1DPI/3.** O grupo que recebeu transplante 1 dia pós-isquemia, foi avaliado histologicamente no terceiro dia pós-isquemia, correspondendo ao segundo dia pós-injeção de células. Controle, n=3; CMMOs, n=3. Teste t.

O grupo JT 1DPI/3, bem como o grupo JT 7DPI/9 foram acompanhados por testes funcionais (Figuras 22 e 24), para podermos comparar o desempenho funcional com a análise histológica.

Realizamos o teste do cilindro antes da isquemia, após a isquemia e 2 dias após o tratamento, quando os animais foram perfundidos para análise histológica. A taxa de simetria de ambos os grupos diminuiu significativamente após a isquemia, semelhante à observada para os grupos que foram submetidos ao teste do cilindro com sobrevivência de 77 dias (Figura 13 e 18). O desempenho funcional do grupo JT 1DPI/3 apresentou uma tendência de melhora após o tratamento, mas

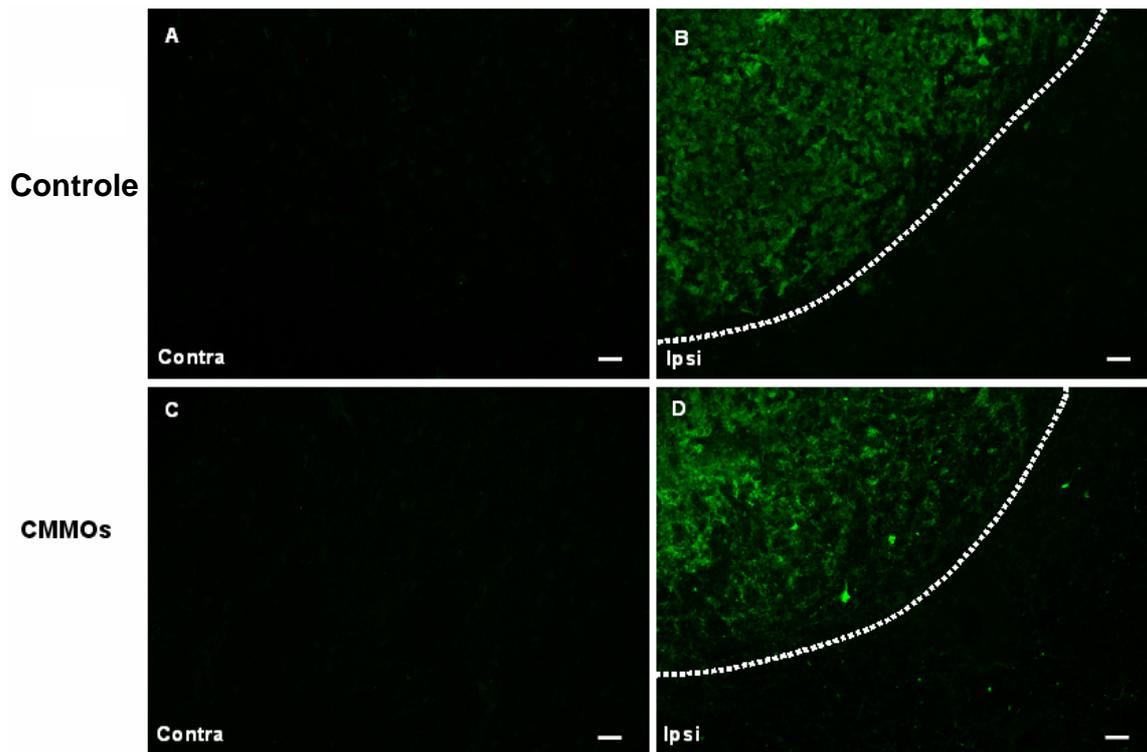
esta não foi significativa. O desempenho funcional nos grupos JT 1DPI/77 e JT 7DPI/77 foram avaliados sempre 7 dias após o tratamento, apresentando melhora significativa (Figuras 13 e 18). Isto sugere que o efeito das células não é imediato, além disso, o número de animais utilizados nos testes funcionais para os grupos JT 1DPI/77 e JT 7DPI/77 foram maiores que os utilizados para os JT 1DPI/3 e JT 7DPI/9.



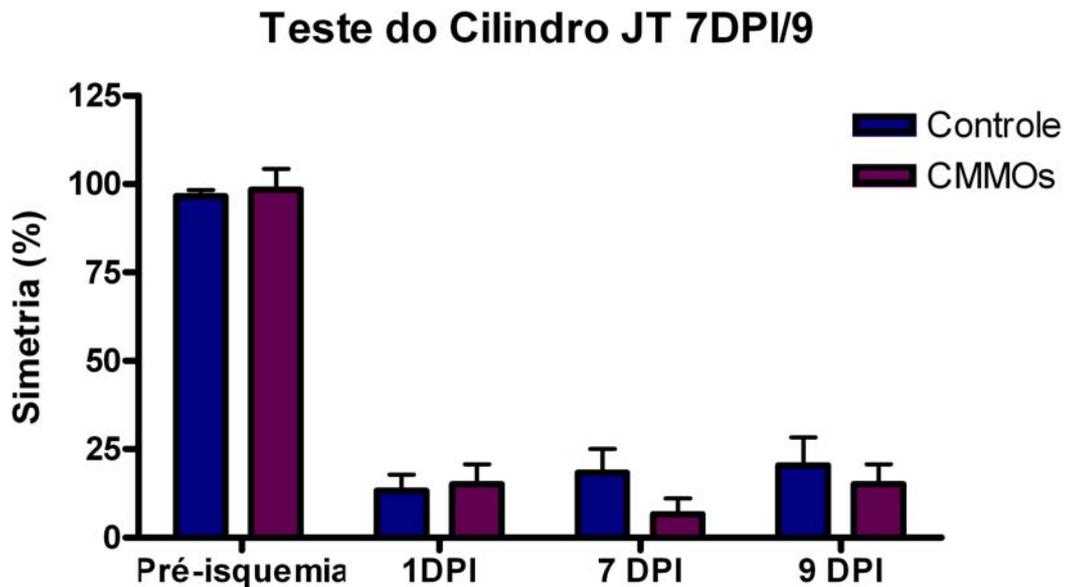
**Figura 22: Avaliação funcional – Teste do cilindro JT 1DPI/3.** A figura mostra a taxa de simetria avaliada pelo teste do cilindro realizado antes da isquemia, *pré-isquemia*; 1 dia pós-isquemia, *1DPI* (neste dia foram injetadas CMMOs - JT 1DPI) e 3 dias pós-isquemia, *3DPI*. n=3; ANOVA two-way.

Podemos observar na figura 23, a análise histológica com Fluoro-Jade C para o grupo JT 7DPI/9. A marcação segue um padrão diferente do grupo JT 1DPI/3, o tecido apresenta um aspecto de degeneração quase completa, sendo difícil observar células marcadas. Existe uma perfeita delimitação entre o

parênquima sadio e o parênquima degenerado. No grupo tratado com CMMOs (Figura 23D) encontramos algumas células marcadas na periferia da lesão, mas estas são raras.



**Figura 23: Células Fluoro-Jade C positivas na área de lesão – JT 7DPI/9DPI.** As figuras A e B representam marcação com Fluoro-Jade C nos córtices contra e ipsilateral de animais injetados com salina. Em C e D podemos observar o padrão de marcação para os animais submetidos ao tratamento com CMMOs. Contra: contralateral; Ipsi: ipsilateral; Barra de calibração, 20 $\mu$ m.

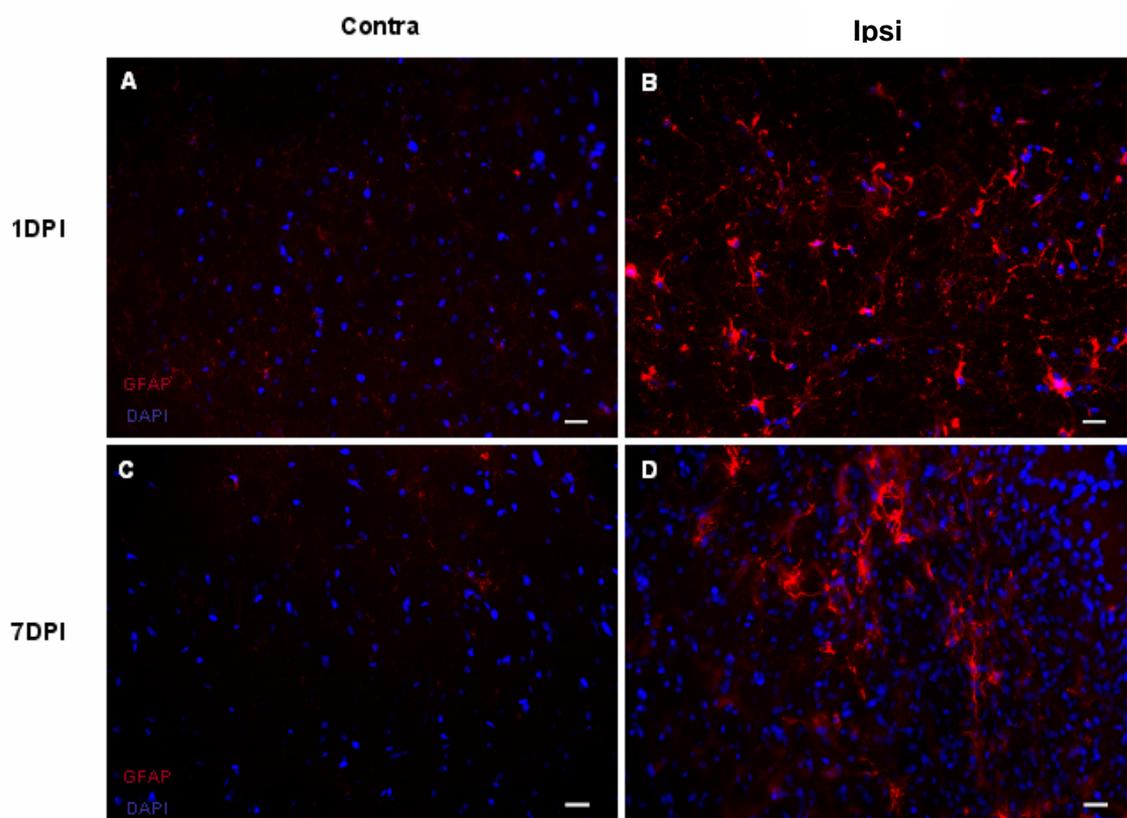


**Figura 24: Avaliação funcional – Teste do cilindro JT 7DPI/9.** Os animais seleccionados para análise da morte neuronal também foram acompanhados por testes funcionais. A figura mostra a taxa de simetria avaliada pelo teste do cilindro realizada antes da isquemia, *pré-isquemia*; 1 dia pós-isquemia, *1DPI* (neste dia foram injetadas CMMOs - JT 1DPI) e 3 dias pós-isquemia, *3DPI*. n=3; ANOVA two-way.

#### 4.4.2 Gliose reativa – Expressão de GFAP

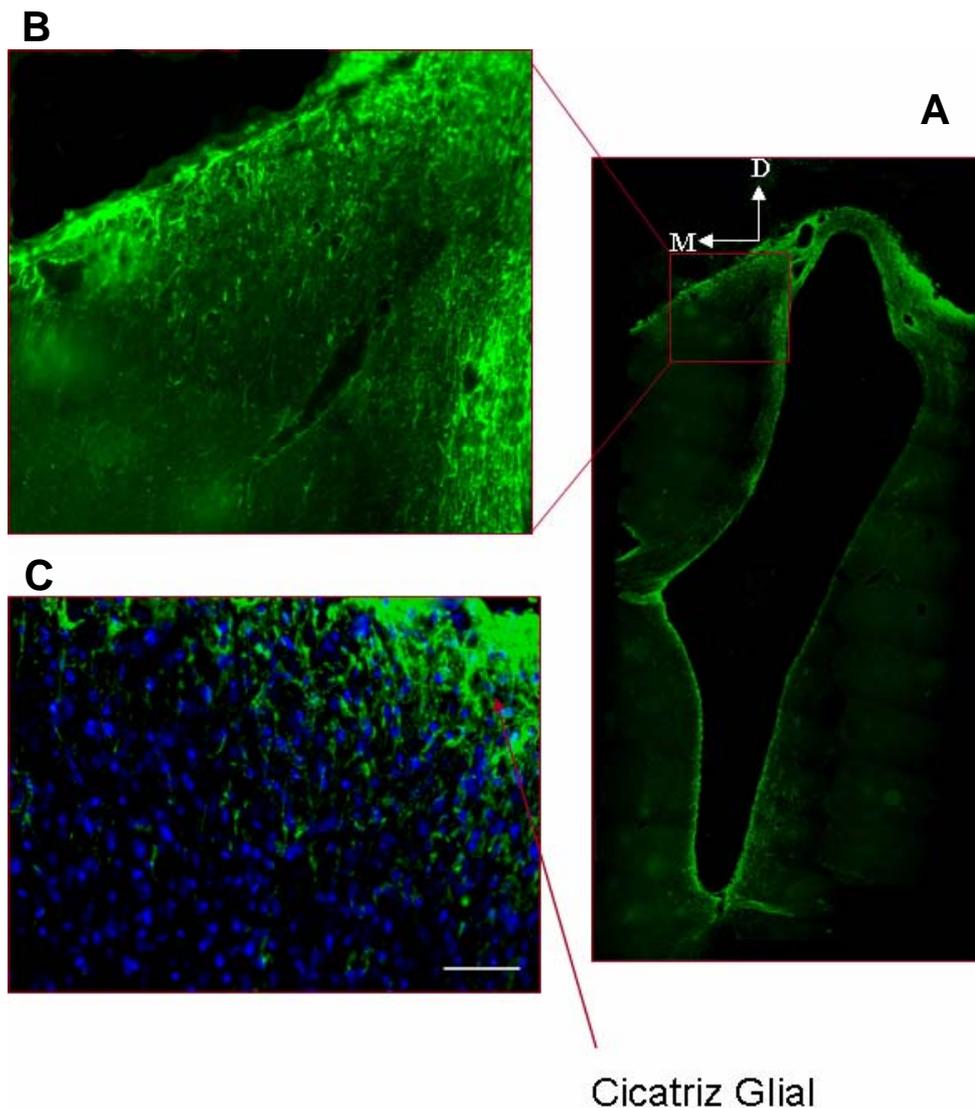
As células gliais são fortemente ativadas após lesão isquêmica, formando uma cicatriz glial, que impede química e estruturalmente, o crescimento axônico (Person *et al.*, 1989). Para avaliar se as CMMOs desempenham algum efeito sobre este fenômeno, realizamos reações imuno-histoquímicas para a proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (Figuras 25, 26, 27 e 28).

Estas reações foram realizadas na tentativa de avaliar, se a melhora funcional observada nos grupos JT 1DPI/77 e JT 7DPI/77, poderia estar relacionada ao tratamento com CMMOs sobre a expressão de GFAP. Inicialmente, realizamos reação para GFAP em 1 e 7 dias pós-isquemia (Figura 25). Observamos intensa gliose reativa em ambos os grupos, no primeiro dia pós-isquemia (Figura 25B) a gliose apresentou um aspecto mais difuso, enquanto que em 7DPI, mostra-se mais localizada (Figura 25D).



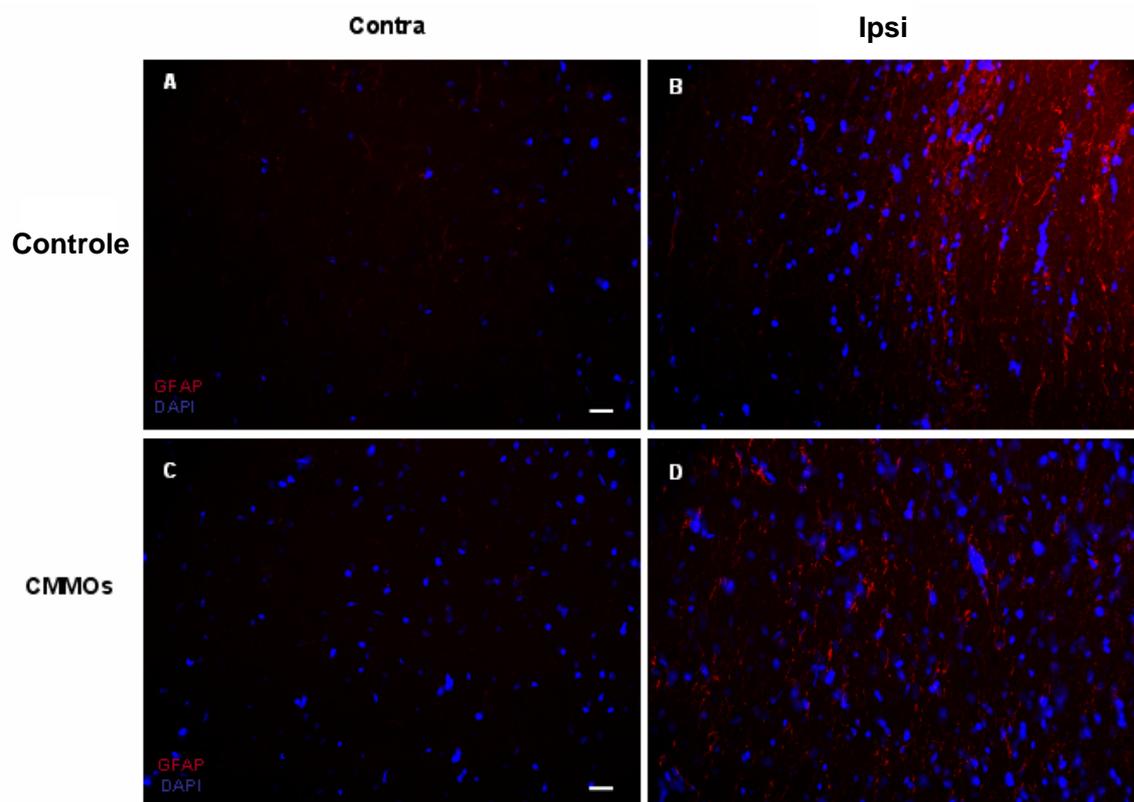
**Figura 25: Gliose reativa – 1 e 7 DPI.** A figura mostra expressão de GFAP (vermelho) nos córtices contra e ipsilateral a lesão 1 dia pós-isquemia A e B, e 7 dias pós-isquemia, C e D. Em azul o marcador de núcleo, DAPI. Barra de calibração 20 $\mu$ m.

Posteriormente, analisamos a expressão de GFAP nos mesmos animais que foram utilizados nos testes funcionais. No término da sobrevivência de 77 dias, os animais foram perfundidos e o tecido analisado. As imagens das imunohistoquímicas foram obtidas da região mostrada na figura abaixo (Figura 26).

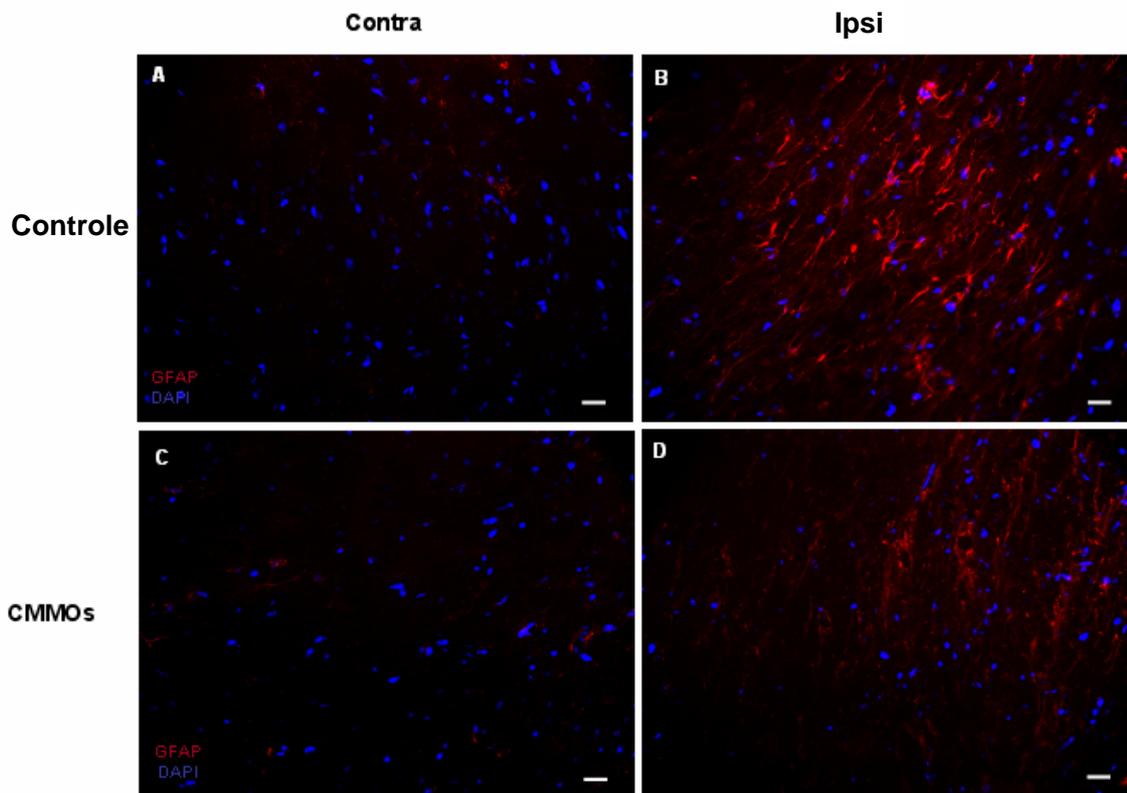


**Figura 26: Imagens mostrando a cicatriz glial 77 dias após a isquemia.** As imagens representam imunohistoquímicas para GFAP (verde). Em A, podemos observar uma fotomontagem, mostrando o ventrículo lateral expandido (Hidrocefalia ex- vácuo) situado no hemisfério ipsilateral a lesão. No *insert* (B) observamos a área utilizada para aquisição das fotos utilizadas em todas as análises da expressão de GFAP. Em C observamos a cicatriz glial (verde) e o marcador de núcleo DAPI, em azul.

A figura 27 mostra a expressão de GFAP para o grupo tratado com CMMOs 1 dia pós-isquemia (JT 1DPI/77). Observamos uma aparente diminuição da marcação no grupo tratado em relação ao grupo controle, injetado com salina. Um padrão semelhante foi observado para o grupo JT 7DPI/77 (Figura 28).



**Figura 27: Gliose reativa – JT 1DPI/77.** A figura mostra expressão de GFAP (vermelho) nos córtices contra e ipsilateral a lesão 1 dia pós-isquemia A e B, e 7 dias pós-isquemia, C e D. Em azul o marcador de núcleo, DAPI. Barra de calibração 20 $\mu$ m.

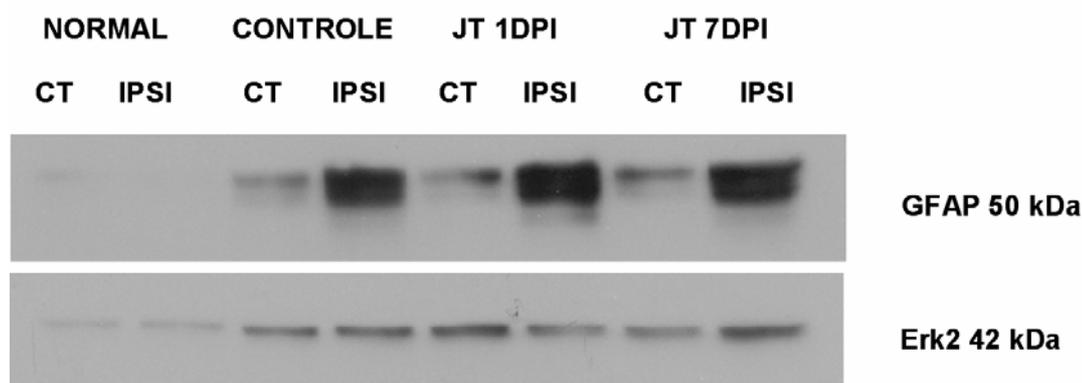


**Figura 28: Gliose reativa – JT 7 DPI/77.** A figura mostra expressão de GFAP (vermelho) nos córtices contra e ipsilateral a lesão 1 dia pós-isquemia A e B, e 7 dias pós-isquemia, C e D. Em azul o marcador de núcleo, DAPI. Barra de calibração 20 $\mu$ m.

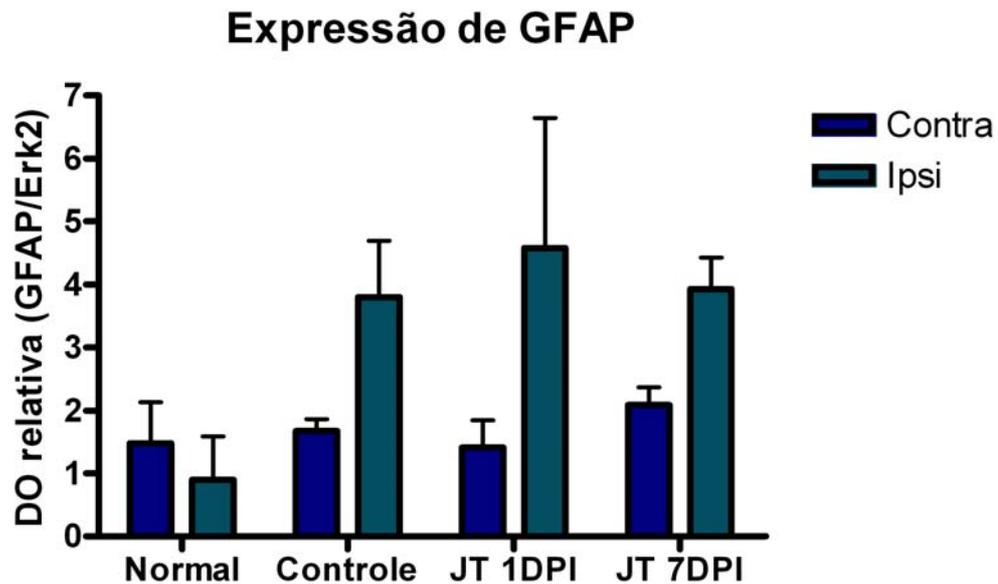
A expressão de GFAP nos córtices dos animais que passaram por testes funcionais com sobrevivência de 77 dias, também foi avaliada por *Western blot*. A análise foi realizada em quatro grupos: Animal normal (sem lesão); Controle (injetado com salina), JT 1DPI e JT 7DPI (injetados com CMMOs em 1 e 7 dias pós-isquemia, respectivamente); foram utilizados 3 animais por grupo

experimental, e os ensaios foram feitos separadamente, com um animal para cada grupo.

As figuras 29 e 30 mostram a expressão de GFAP. Os dados revelam grande aumento na expressão de GFAP nos córtices ipsilaterais a lesão para todos os grupos, exceto para o grupo não operado (animais normais). No entanto, não observamos nenhuma diferença entre os grupos isquêmicos tratados com CMMOs e o controle.



**Figura 29: Expressão da proteína GFAP.** A análise da expressão de GFAP foi realizada 77 dias pós-isquemia. A proteína Erk2 foi utilizada como controle de carregamento. NORMAL: animal normal; SALINA: animal isquêmico que recebeu injeção de salina; JT1DPI e JT7DPI, animais isquêmicos que receberam injeção de CMMO em 1 e 7 dias pós-isquemia, respectivamente. CT: contralateral; IPSI: ipsilateral



**Figura 30: Quantificação por densitometria óptica da expressão de GFAP.** Observamos diferenças significativas na expressão de GFAP no hemisfério ipsilateral de animais isquêmicos quando comparado aos animais normais. No entanto, esta diferença não é observada nos grupos experimentais. Normal: animal sem lesão; CONTROLE: animal isquêmico que recebeu injeção de salina; JT1DPI e JT7DPI, animais isquêmicos que receberam injeção de CMMO em 1 e 7 dias pós-isquemia, respectivamente. Contra: contralateral; Ipsi: ipsilateral. Para cada grupo experimental utilizou-se um n=3. As análises de densitometria foram feitas no programa Image J. ANOVA two way.

## 5 DISCUSSÃO

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, as doenças cerebrovasculares são responsáveis por cerca de 90.000 de mortes por ano, sendo consideradas a primeira causa de morte no nosso país.

Algumas intervenções durante a fase aguda do AVE, tais como agentes trombolíticos, têm sido reconhecidas por melhorar as condições de sobrevivência e incapacidade residual dos indivíduos. Contudo, uma vez que o dano celular isquêmico é estabelecido, pouco pode ser feito para restaurar as condições que o precederam. Observações em roedores e primatas sugerem que a administração de progenitores e células-tronco adultas derivadas de medula óssea poderia ser uma potencial terapia para lesões no SNC, tais como isquemia e lesão traumática da medula espinhal (Ohtaki *et al.*, 2008; Prockop, 2007; Deng *et al.*, 2005).

Durante o insulto isquêmico, uma série de mecanismos celulares e moleculares contribui para a morte neuronal. Dentre os mecanismos celulares podemos destacar a resposta da microglia. Na fase aguda da isquemia, as células microgliais residentes tornam-se ativadas e migram para a área de lesão (Del Zoppo *et al.*, 2000; Dirnagl *et al.*, 1999). Além disso, monócitos derivados da medula óssea e do sangue são recrutados para o sítio de lesão e adotam um fenótipo semelhante ao de microglia (Beck *et al.*, 2003). As células microgliais ativadas ajudam a remover os debris celulares, mas também liberam moléculas citotóxicas, incluindo citocinas inflamatórias, bem como radicais livres (Stoll e Jander, 1999).

As citocinas liberadas após a isquemia pelas células gliais podem desempenhar tanto efeitos pró-inflamatórios como anti-inflamatórios (Allan e Rothwell, 2001). O resultado desta inflamação pós-isquemia sugere uma resposta proapoptótica, levando ao aumento da morte celular e consequente expansão da área de infarto (Dirnagl *et al.*, 1999). Diante do evento inflamatório gerado pela isquemia, células do sistema imunológico são atraídas da circulação e do baço para a área infartada. Esta migração é mediada por quimiocinas liberadas pelas células gliais, que também desempenham um papel importante no recrutamento de células-tronco e de células precursoras derivadas da medula óssea para o sítio de lesão (Stumm *et al.*, 2002). O SDF-1 (do inglês: *stromal-derived factor 1*), por exemplo, é uma quimiocina expressa no encéfalo lesado (Shen *et al.*, 2007; Robin *et al.*, 2006), conhecida por favorecer o *homing* das células de medula óssea administradas na corrente sanguínea para a área de lesão.

A oclusão da ACM é o modelo experimental de isquemia cerebral amplamente utilizado no estudo dos efeitos do transplante de células de medula óssea em roedores. Resultados provenientes de estudos com este modelo mostraram que o transplante de CTMs melhora o desempenho funcional dos animais. Na maioria dos casos, o melhor resultado foi observado com o transplante feito 24 h após a oclusão da ACM, tanto por via intracerebral como sistêmica (Chen *et al.*, 2001 e 2003; Li *et al.*, 2001 e 2002).

As CTMs de medula óssea têm sido extensamente estudadas em modelos de isquemia (Chen *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Nomura *et al.*, 2005; Honma *et al.*, 2006; Horita *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006). Existem poucos grupos estudando os efeitos do transplante de toda a fração de células mononucleares de medula

óssea (CMMOs) em modelos pré-clínicos de AVE. Iihoshi e colaboradores (2004) transplantaram estas células por via intravenosa nos períodos de 3 - 72 h após oclusão da artéria cerebral média (OACM), realizaram análises histológicas e observaram o efeito do tratamento sobre o tamanho da área de lesão isquêmica. Estes autores observaram que o tratamento com as células mononucleares diminuiu o volume de lesão quando comparado ao grupo controle. Além da análise histológica, Iihoshi e colaboradores avaliaram o desempenho funcional dos animais em apenas uma janela terapêutica (12 horas após a OACM) e demonstraram melhora funcional significativa.

Em estudos anteriores, investigamos o efeito do tratamento com CMMOs administradas por via intravenosa 24 h após a isquemia cortical. Os resultados revelaram efeito benéfico sobre o desempenho funcional dos animais, quando avaliados pelo teste do cilindro até 28 dias após a isquemia (Giraldi-Guimarães, *et al.*, 2009). No entanto seria necessário realizar a avaliação funcional com uma sobrevida maior após o tratamento, bem como investigar a janela terapêutica ideal para a administração das CMMOs.

Neste trabalho, estendemos a sobrevida de 28 para 77 dias pós-isquemia, e buscamos determinar até que período pós-isquemia as CMMOs poderiam exercer efeito terapêutico. Avaliamos, através do teste do cilindro, grupos transplantados em 1, 7, 14 e 30 dias pós-isquemia e obtivemos melhora funcional significativa nas janelas terapêuticas que representam fases mais precoces do tratamento: 1 e 7 dias pós-isquemia, JT 1DPI e JT 7DPI, respectivamente. O efeito benéfico manteve um padrão estável por pelo menos 70 dias após o tratamento. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, que obtiveram melhora

significativa no desempenho funcional após transplante em períodos pós-isquemia iniciais (Shen *et al.*, 2006; Zhang, *et al* 2006).

Shen e colaboradores (2007) administraram CTMs na fase crônica (1 mês após a OACM), e obtiveram efeitos positivos de melhora funcional. Além disso, estes autores evidenciaram aumento na expressão da quimiocina SDF-1 na periferia da área isquêmica e detectaram a expressão do receptor desta quimiocina (CXCR4) nas CTMs, sugerindo que a janela para a administração de CMs é de pelo menos um mês após a isquemia. Diferentemente dos resultados obtidos por Shen e colaboradores (2007), não encontramos resposta funcional significativa após administração das CMMOs em períodos mais tardios após a isquemia (14 e 30 dias pós-isquemia). No entanto devemos levar em consideração o tipo de teste funcional avaliado nos dois estudos, bem como o modelo de isquemia, que são distintos. A melhor maneira de comparar o efeito dos diferentes tipos celulares seria utilizando o mesmo modelo de isquemia e os mesmo testes funcionais.

No nosso estudo, a melhora funcional observada após o tratamento com CMMOs foi significativa apenas quando estas células foram transplantadas 1 e 7 dias após a isquemia, sendo que o efeito destas foi maior em 1DPI. De posse destas informações, avaliamos o possível efeito de CTMs transplantadas nesta mesma janela temporal no modelo de isquemia cortical, utilizando o mesmo teste funcional. Os resultados obtidos mostram que as CTMs também apresentam um efeito terapêutico no nosso modelo. Quando comparamos os efeitos entre os dois tratamentos (CMMOs x CTMs) na janela de 1 dia pós-isquemia obtivemos efeitos similares sobre o desempenho funcional dos animais. Até o momento, este efeito

terapêutico das CTMs foi investigado nesta única janela. Seria interessante avaliar no modelo de lesão cortical o tratamento com CTMs em uma das fases mais tardias da isquemia, nas quais as CMMOs não tiveram efeito.

Os mecanismos de ação das CTMs vêm sendo investigados em modelo de OACM. Os dados provenientes destes estudos demonstram que as CTMs migram preferencialmente para o hemisfério isquêmico (Eglits *et al.*, 1999). Chopp e Li (2002) encontraram recuperação funcional após transplante de CTMs e atribuíram os efeitos benéficos ao aumento dos processos restaurativos endógenos. Este estudo revelou que CTMs obtidas de roedores ou de humanos podem ser administradas tanto por via intravenosa como por intra-arterial, atingindo o tecido lesado e melhorando a recuperação funcional. Contudo foi observado que a injeção intra-arterial não fornece benefício adicional e pode causar isquemia. Este trabalho sugere que o benefício terapêutico pode ser atribuído à plasticidade cerebral, incluindo mecanismos de angiogênese, neurogênese, sinaptogênese, arborização dendrítica e redução da apoptose na periferia da lesão.

Estudos adicionais deste mesmo grupo, utilizando o modelo de OACM, demonstraram efeitos benéficos após o tratamento com CTMs, tais como redução da cicatriz glial, aumento da proliferação celular e aumento no número de precursores de oligodendrócitos ao longo da zona subventricular (ZSV) no hemisfério ipsilateral à lesão (Shen *et al.*, 2006).

No nosso modelo investigamos os possíveis mecanismos envolvidos na recuperação funcional observada. Para isso, avaliamos primeiramente se a atuação do tratamento com CMMOs estaria relacionada à neuroproteção.

Utilizamos para esta finalidade o marcador de morte celular Fluoro-Jade C, que é específico para morte neuronal (Schmued *et al.* 1997).

Utilizando este marcador observamos células Fluoro-Jade C positivas 1 e 7 dias após a isquemia, mas estas não estavam presentes em 14 e 30 dias após a isquemia. Estes resultados indicam que a morte neuronal, detectada por este método, ocorre ao longo da primeira semana após a isquemia.

Para identificar o possível efeito da terapia com CMMOs na morte neuronal, comparamos o número de células Fluoro-Jade C positivas em animais isquêmicos tratados ou não. Os animais foram tratados 1 ou 7 dias após a isquemia e analisados 2 dias após o tratamento (JT 1DPI/3 e JT 7DPI/9, transplantados em 1 e 7 dias pós-isquemia analisados 2 dias após o tratamento).

O parênquima cerebral do grupo JT 1DPI/3 apresentava-se mais íntegro, quando comparado ao seu correspondente injetado com salina. A quantificação do número de células Fluoro-Jade C positivas na periferia da lesão foi semelhante no grupo tratado e no injetado com salina. Os animais do grupo JT 7DPI/9 apresentavam o parênquima cerebral em processo de degeneração avançada, caracterizado por uma coloração verde clara intensa e pela presença de cavidades, não havendo mais células visíveis, sugerindo que este não foi o mecanismo responsável pela recuperação funcional dos grupos tratados nas fases agudas da isquemia, pelo menos para o modelo de lesão do córtex sensoriomotor.

Ohtaki e colaboradores (2008) observaram uma diminuição da morte neuronal em um modelo de isquemia global transiente após injeção de CTMs derivadas de medula óssea humana. Neste trabalho, as células foram injetadas dentro do hipocampo de camundongos 1 dia após a isquemia, persistindo no local

da lesão por menos de 7 dias. No entanto conseguiram causar a diminuição da expressão de mais de 10% dos genes induzidos pela isquemia, muitos dos quais envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias, obtendo-se então resultados significativos na melhora funcional e neuroproteção. Os efeitos benéficos desempenhados pelas CTMs humanas foram explicados pela modulação das respostas imunes e inflamatórias.

Outro mecanismo avaliado no nosso trabalho foi a ativação astrocitária. A resposta astrocitária à lesão no SNC resulta na formação da cicatriz glial, a qual é caracterizada pela intensa proliferação de astrócitos reativos e liberação de moléculas inibitórias ao crescimento (Davies *et al.*, 1999; Ishiguro *et al.*, 1993; Katsman *et al.*, 2003). Após a isquemia, a gliose é fortemente ativada na periferia da área isquêmica (Person *et al.*, 1989). Os astrócitos reativos rapidamente circundam o sítio de lesão com fibrilas e assim delimitam o tecido necrótico do parênquima viável.

A ativação astrocitária após o tratamento com CMMOs foi avaliada através da expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP), a qual se encontra aumentada em astrócitos reativos. Nossos resultados de imuno-histoquímica para GFAP demonstram uma leve diminuição nos grupos que receberam injeção de células quando comparado com o grupo injetado com salina. No entanto os dados obtidos com o *Western blot* não apontaram diferença entre os grupos tratados em relação ao grupo controle, injetado com salina. Estes dados foram avaliados nos animais que passaram por testes funcionais e tiveram sobrevida de 77 dias após a isquemia.

A maioria dos trabalhos avalia a expressão de GFAP, bem como moléculas liberadas por astrócitos reativos (GFAP positivos) com sobrevividas menores de aproximadamente uma semana e com administração de células de medula em períodos mais precoces à lesão (Shen *et al.*, 2008). Portanto é necessário avaliar, no nosso modelo, a expressão de GFAP em períodos mais próximos à isquemia, pois as células podem estar atuando sobre a gliose em fases mais precoces. Além da gliose, seria interessante avaliar a microgliose reativa, para investigar se as CMMOs poderiam estar atuando modulando a inflamação.

Alguns trabalhos demonstram que grande parte dos efeitos das CTMs baseia-se no remodelamento cerebral, acelerando a regeneração axônica (Liu *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006, 2007) e diminuindo a espessura da parede de cicatriz glial (Li *et al.*, 2005; Shen *et al.* 2007). Li e colaboradores (2005) transplantaram CTMs 7 dias após OACM e avaliaram os animais por 4 meses pós-isquemia. Observaram melhora funcional e diminuição da espessura da cicatriz glial, bem como aumento na expressão do marcador de crescimento axônico GAP-43.

A cicatriz glial libera moléculas inibitórias, que impedem o crescimento axônico. Dentre as moléculas inibitórias estão os proteoglicanos condroitin sulfato (CSPGs). A esta classe pertence a neurocan, o principal CSPG do tecido nervoso, cuja expressão e clivagem proteolítica são bem reguladas no encéfalo normal. A forma íntegra desta molécula pode ser encontrada no encéfalo imaturo, enquanto no adulto existe apenas a sua forma fragmentada (Matisui *et al.*, 1994; Meyer-Puttlitz *et al.*, 1995). Algumas evidências indicam que a neurocan na sua forma íntegra reaparece e se acumula em torno de várias lesões no SNC, tais como lesão traumática (Asher *et al.*, 2000) e isquemia focal (Deguchi *et al.*, 2005).

A expressão de neurocan foi avaliada em ratos submetidos a 2 h de OACM seguida do tratamento com CTMs derivadas da medula óssea 24 h depois, com sobrevivência de 8 dias pós-isquemia. Os resultados demonstraram que os astrócitos reativos foram a fonte primária de neurocan e os animais tratados com CTMs apresentaram menor expressão desta molécula e maior expressão de GAP-43 na região de penumbra, quando comparados ao grupo controle (Shen *et al.*, 2008).

Foi demonstrado por Shewarting e colaboradores (2008) que o tratamento com células-tronco hematopoiéticas (HSCs) derivadas de medula óssea, 24 h após a isquemia, reduziu a inflamação pós-isquemia e melhorou a lesão cerebral isquêmica. Nesse trabalho, as CTHs se infiltraram no parênquima encefálico isquêmico 24 h após o transplante e apresentaram um fenótipo semelhante a microglia ou macrófagos 72 h após o transplante. Para tentar investigar o mecanismo responsável pela neuroproteção observada, foram feitas análises dos transcritos de fatores neurotróficos e citocinas dentro do hemisfério isquêmico, contendo as células transplantadas, mas não houve nenhuma mudança significativa em 72 h após a injeção das CTHs.

Vários estudos descreveram a contribuição da inflamação para modelos de isquemia cerebral (Hallenbrck, 1996; Yilmaz *et al.*, 2006). Após a isquemia, o número de células da microglia e macrófagos ativados é aumentado em 24 h, as células T em 72 h, e os neutrófilos em até 96 h (Stevens *et al.*, 2002). O tratamento com CTHs diminuiu a infiltração de células do sistema imune, particularmente linfócitos T na área periinfarto (Shewarting *et al.*, 2008).

Após o AVE, a contribuição da angiogênese para a vascularização é insuficiente para suportar a plasticidade cerebral requerida para a recuperação

funcional. As CTMs secretam vários fatores de crescimento, incluindo o VEGF (Hamano *et al.*, 2000; Villars *et al.*, 2000), este tem um notável papel na formação vascular (Villars *et al.*, 2000). A administração de VEGF após a isquemia aumenta significativamente a angiogênese na área de penumbra e promove recuperação funcional (Zhang *et al.*, 2000). Existe uma estreita associação entre vasos sanguíneos e proliferação de progenitores neurais na zona subgranular no hipocampo (Palmer *et al.*, 2000). As células endoteliais liberam fatores que podem induzir a proliferação de células-tronco neurais *in vitro* (Shen *et al.*, 2004).

Gotts e Chesselet (2005) observaram que a lesão por termocoagulação (TCL) do córtex sensoriomotor, que tem localização distal à ZSV e à via migratória rostral (RMS), induz mudanças na vascularização nestas regiões. Estes estudiosos relacionaram a angiogênese com o aumento na expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e correlacionaram estes eventos com a expansão da ZSV. Esta expansão ou proliferação celular aumentada tem sido observada na ZSV após diversos tipos de lesões encefálicas (Iwai *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2001; Parent *et al.*, 2002; Szele e Chesselet 1996; Willis *et al.*, 1976); mas os mecanismos desses efeitos não estão esclarecidos. A infusão de vários fatores de crescimento no ventrículo pode induzir a proliferação celular na ZSV (Kuhn *et al.*, 1997; Pencea *et al.*, 2001), contudo não está claro se fatores de crescimento endógenos são aumentados por lesões distais.

Existe um aumento de VEGF na periferia da lesão em 3 dias após a isquemia por termocoagulação (Gotts e Chesselet, 2005), o que está de acordo com outros modelos de isquemia cortical focal (Kovacs *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002). No modelo de termocoagulação, as arteríolas piais são coaguladas,

mantendo os ramos ventrais da ACM, que suprem o estriado, intactos. Foi observado que as artérias corticoestriatais, que percorrem através da ZSV, foram preenchidas com sangue 24 horas após a isquemia. Estas mudanças vasculares também ocorreram em outros vasos sanguíneos originados da ACM, incluindo alguns próximos à RMS, sugerindo que eles podem induzir mudanças locais na expressão de VEGF observada no local (Gotts e Chesselet, 2005).

Algumas evidências indicam que as CTMs derivadas da medula óssea transplantadas induzem o aumento da expressão de VEGF endógeno e do seu receptor (VEGFR2) (Chen *et al.*, 2003), e que esta indução seria responsável por um aumento da neurogênese endógena no encéfalo adulto (Shen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2002). Sendo assim, seria interessante investigar se as CMMOs poderiam estar potencializando a neurogênese endógena induzida pelo modelo de termocoagulação. Este poderia ser um dos possíveis mecanismos pelo qual as CMMOs poderiam estar atuando para promover a melhora funcional observada nos nossos estudos.

## 6 CONCLUSÕES

- O tratamento com CMMOs exerceu um efeito benéfico significativo quando estas células foram injetadas até 7 dias após a isquemia;
- O grupo de animais tratados com CTMs 1 dia após a isquemia apresentou melhora funcional significativa, semelhante à observada no grupo tratado com CMMOs;
- O tratamento com CMMOs aparentemente não alterou o número de células em degeneração na periferia da lesão;
- Observamos elevada expressão de GFAP na periferia da lesão em 77 dias pós-isquemia. No entanto esta não foi alterada após o tratamento com CMMOs.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Ver. Neurosci.* (2): 734 –744, 2001.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; SERI, B.; DOETSCH, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res. Bull.* (57): 751-758, 2002.

ANDREWS, P.W.; DAMJANOV, I.; SIMON, D.; BANTING, G.S.; CARLIN, C.; DRACOPOLI, N.C.; FOGH, J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* (50): 147-162, 1984.

ASHER, R.A.; MORGENSTERN, D.A.; FIDLER, P.S.; ADCOCK, K.H.; OOHIRA, A.; BRAISTEAD, J.E.; LEVINE, J.M.; MARGOLIS, R.U.; ROGERS, J.H.; FAWCETT, J.W. Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* (20): 2427–2438, 2000.

BECHMANN, I.; NITSCH, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique, *Glia* (20): 145-154, 1997.

BECK, H.; VOSWINCKEL, R.; WAGNER, S.; ZIEGELHOEFFER, T.; HEIL, M.; HELISCH, A.; SCHAPER, W.; ACKER, T.; HATZOPOULOS, A.K.; PLATE, K.H. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (23): 709 –717, 2003.

BENVENISTE, E.N. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* (9): 259–275, 1998.

BENVENISTE, E.N.; NGUYEN, V.T.; O'KEEFE, G.M. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.* (39): 381–391, 2001.

BESCHORNER, R.; SCHLUESENER, H.J.; GOZALAN, F.; MEYERMANN, R.; SCHWAB, J.M. Infiltrating CD14<sup>+</sup> monocytes and expression of CD14 by activated parenchymal microglia/macrophages contribute to the pool of CD14<sup>+</sup> cells in ischemic brain lesions. *J. Neuroimmunol.* (126): 107–115, 2002.

BORLONGAN, C.V.; TAJIMA, Y.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M.; SANBERG, P.R. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp. Neurol.* (149): 310-321, 1998.

BRAUN, K.M.; NIEMANN, C.; JENSEN, U.B.; et al. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in whole mounts of mouse epidermis. *Development.* (130): 5241-5255, 2003.

BUHNEMANN, C.; SCHOLZ, A.; BERNREUTHER, C.; MALIK, C.Y.; BRAUN, H.; SCHACHNER, M.; REYMANN, K.G.; DIHN, M. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* (129): 3238-3248, 2006.

CAO, Y.; VIKINGSTAD, E. M.; HUTTENLOCHER, P.R.; TOWLE, V.L.; LEVIN, D.N. "Functional magnetic resonance studies of the reorganization of the human hand sensorimotor area after unilateral brain injury in the perinatal period," *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* (91): 9612-9616, 1994.

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* (213): 341-347, 2007.

CAPONE, C.; FRIGERIO, S.; FUMAGALLI, S.; GELATI, M.; PRINCIPATO, M.C.; STORINI, C.; MONTINARO, M.; KRAFTSIK, R.; DE CURTIS, M.; PARATI, E.; DE SIMONI, M.G. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *Plos. One.* (4): 1-11, 2007.

CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* (27): 1124–1129, 1996.

CHE, X.; YE, W.; PANGA, L.; WU, D.C.; YANG, G.Y. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res.* (902): 171–177, 2001.

CHEN, J.; LI, Y.;, WANG, L.;, LU, M.;, ZHANG, X.;, CHOPP, M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J. Neurol. Sci.* (189): 49-57, 2001.

CHEN, J.; LI Y.; KATAKOWSKI, M.; CHEN, X.; WANG, L.; LU, D.; LU, M.; GAUTAM, S.C.; CHOPP, M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res.* (6):778-86, 2003a.

CHEN, J.; ZHANG, Z.G.; LI, Y.; WANG, L.; XU, Y.X.; GAUTAM, S.C.; LU, M.; ZHU, Z.; CHOPP, M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ. Res.* (92): 692-696, 2003b.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LU, D.; LU, M.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* (32): 1005-1011, 2001.

CHOI, D. *Stroke. Neurob. Dis.* (7): 552-558, 2000.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol.* (1): 92-100, 2002.

CORTI, S.; LOCATELLI, F.; PAPADIMITRIOU, D.; DONADONI, C.; SALANI, S.; DEL BO, R.; STRAZZER, S.; BRESOLIN, N.; COMI, G.P. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cell* (24): 975-985, 2006.

CRAMER, S.C.; BASTINGS, E.P. "Mapping clinically relevant plasticity after stroke," *Neuropharmacology.* (39): 842-851, 2000.

DARSALIA, V.; KALLUR, T.; KOKAIA, Z. Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum. *Eur. J. Neurosci.* (26): 605-614, 2007.

DAVIES, S.J.; GOUCHER, D.R.; DOLLER, C.; SILVER, J. Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* (19): 5810-5822, 1999.

DEGRABA, T.J. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology.* (51): S62–S68, 1998.

DEL ZOPPO, G.; GINIS, I.; HALLENBECK, J.M.; IADECOLA, C.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G.Z. Inflammation and stroke: Putative role for cytokines, adhesion molecules and ions in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* (10): 95-112, 2000.

DEGUCHI, K.; TAKAISHI, M.; HAYASHI, T.; OOHIRA, A. NAGOTANI, S.; LI, F.; JIN, G.; NAGANO, I.; SHOJI, M.; MIYAZAKI, M.; ABE, K.; HUH, N.H. Expression of neurocan after transient middle cerebral artery occlusion in adult rat brain. *Brain Res.* (1037): 194-199, 2005.

DENG, Y.B; YUAN, Q.T.; LIU, X.G.; LIU, X.L.; LIU, Y.; LIU, Z.G. et al. Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal-stem cell derived neurons. *Chin. Med. J. (Engl)* (118): 1533-1541, 2005.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.* (22): 391-397, 1999.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. *Glia.* (36): 180–190, 2001.

DUCKWORTH, E.A.; BUTLER, T.L.; DE MESQUITA, D.; COLLIER, S.N.; COLLIER, L.; PENNYPACKER, K.R. Temporary focal ischemia in the mouse: technical aspects and patterns of Fluoro-Jade evident neurodegeneration. *Brain Res.* (1042): 29-36, 2005.

DUNNETT, S.B.; RYAN, C.N.; LEVIN, P.D.; REYNOLDS, M.; BUNCH S.T. Functional consequences of embryonic neocortex transplanted to rats with prefrontal cortex lesions. *Behav. Neurosci.* (101): 489-503, 1987.

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharm. Biochem. Beh.* (87): 179–197, 2007.

EGLITIS, M.A.; DAWSON, D.; PARK, K.W.; MOURADIAN, M.M. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* (10): 1289-1292, 1999.

EMSLEY, H.C.; TYRRELL, P.J., Inflammation and infection in clinical stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (22): 1399–1419, 2002.

FAGAN, A.M.; GAGE, F.H. Mechanisms of sprouting in the adult central nervous system: cellular responses in areas of terminal degeneration and reinnervation in the rat hippocampus, *Neuroscience.* (58): 705– 725, 1994.

GATES, M.A.; FRICKER-GATES, R.A.; MACKLIS, J.D. Reconstruction of cortical circuitry. *Prog. Brain Res.* (127): 115-156, 2000.

GIBSON, C.L.; BATH, P.M.; MURPHY, S.P.; *et al.* G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb Blood Flow Metab.* (25): 431–439, 2005.

GIRALDI-GUIMARÃES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F.P.; MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. *Brain Research in press* .

GOTTS, J.E.; CHESSELET, M-F.T. Vascular changes in the subventricular zone after distal cortical lesions. *Exp. Neurol.* (194):139-150, 2005.

GRAEBER, M.B.; TETZLAFF, W.; STREIT, W.J.; KREUTZBERG, G.W.; Microglial cells but not astrocytes undergo mitosis following rat facial nerve axotomy, *Neurosci. Lett.* (85): 317– 321, 1988.

HAILER, N.P.; GRAMPP, A.; NITSCH, R. Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study, *Eur. J. Neurosci.* (11): 3359– 3364, 1999

HALL, R.D.; LINDHOLM, E.P. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rats. *Brain Res.* (66) :23–8, 1974.

HALLENBECK, J.M. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv. Neurol.* (71): 281-300, 1996.

HAMANO, K.; LI, T.S; KOBAYASHI, T.; KOBAYASHI, S.; MATSUZAKI, M.; ESATO, K. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Trans.* 9(): 439-443, 2000.

HAU, S.; REICH,D.M.; SCHOLZ, M.; NAUMANN, W.; EMMRICH, F.; KAMPRAD, M.; BOLTZE, J. Evidence for neuroprotective properties of human umbilical cord blood cells after neuronal hypoxia in vitro. *BMC Neurosci.* (9): 30, 2008.

HAYASHI, J., TAKAGI, Y., FUKUDA, H., IMAZATO, T., NISHIMURA, M., FUJIMOTO, M., TAKAHASHI, J., HASHIMOTO, N. AND NOZAKI, K. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (26): 906–914, 2006.

HORITA, Y.; HONMOU, O.; HARADA, K.; HOUKIN, K.; HAMADA, H.; KOCSIS, J.D. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *J. Neurosci. Res.* 7():1495-504, 2006.

HORWITZ, E. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (7): 393–395, 2005.

HUANG, X.; CHO, S.; SPANGRUDE, G.J. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal *Cell Death and Differentiation* (14): 1851–1859, 2007.

HUNTER, A. J.; GREEN, A. R.; CROSS, A. J. Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *TIPS* – (16): 123-128, 1995.

IIHOSHI, S.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J.D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.* (1007): 1-9, 2004.

ISHIGURO, H.; INUZUKA, T.; FUJITA, N.; SATO, S. NAKANO, R. TAMURA, A. KIRINO, T.; MIYATAKE, T. Expression of the large myelin-associated glycoprotein isoform in rat oligodendrocytes around cerebral infarcts. *Mol. Chem. Neuropathol.* (20): 173-179, 1993.

IWAI, M.; SATO, K.; KAMADA, H.; OMORI, N.; NAGANO, I.; SHOJI, M.; ABE, K. Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (23): 331-341, 2003.

JIN, K.; MINAMI, M.; LAN, J.Q.; MAO, X.O.; BATTEUR, S.; SIMON, R.P.; GREENBERG, D.A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (98): 4710-4715, 2001.

KATSMAN, D.; ZHENG, J.; SPINELLI, K.; CARMICHAEL, S.T. Tissue microenvironments within functional cortical subdivisions adjacent to focal stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (23): 997-1009, 2003.

KELLY, S.; BLISS, T.M.; SHAH, A.K.; SUN, G.H.; MA, M.; FOO, W.C.; MASEL, J.; YENARI, M.A.; WEISSMAN, I.L.; UCHIDA, N.; PALMER, T.; STEINBERG, G.K. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (101): 11839-11844, 2004.

KIEL, M.J.; MORRISON, S.J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Rev. Immunol.* (8): 290–301, 2008.

KIM, S.S.; YOO, S.W.; PARK, T.S.; AHN, S.C.; JEONG, H.S.; KIM, J.W.; CHANG, D.Y.; CHO, K.G.; KIM, S.U.; HUH, Y.; LEE, J.E.; LEE, S.Y.; LEE, Y.D.; SUH-KIM, H. Neural Induction with Neurogenin1 Increases the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells in the Ischemic Brain. *Stem Cells* (26): 2217-2228, 2008.

KOMINE-KOBAYASHI, M.; ZHANG, N.; LIU, M.; *et al.* Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J. Cereb Blood Flow Metab.* (26): 402–413, 2006.

KONDZIOLKA, D.; STEINBERG, G.K.; WECHSLER, L.; MELTZER, C.C.; ELDER, E.; GEBEL, J.; DE CESARE, S.; JOVIN, T.; ZAFONTE, R.; LEBOWITZ, J.; FLICKINGER, J.C.; TONG, D.; MARKS, M.P.; JAMIESON, C.; LUU, D.; BELL-STEPHENS, T.; TERAOKA, J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* (103): 38-45, 2005.

KOVACS, Z.; IKEZAKI, K.; SAMOTO, K.; INAMURA, T.; FUKUI, M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* (27): 1865-1872, 1996.

KUHN, H.G.; WINKLER, J.; KEMPERMANN, G.; THAL, L.J.; GAGE, F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* (17): 5820-5829, 1997.

LADEBY, R.; WIRENFELDT, M.; DALMAU, I.; GREGERSEN, R.; GARCÍA-OVEJERO, D.; BABCOCK, A.; OWENS, T.; FINSEN, B. Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury, *Glia.* (2): 121-31, 2005.

LAPERGUE, B.; MOHAMMAD, A.; SHUAIB, A. Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases. *Prog. Neurobiol.* (6): 349-362, 2007.

LAWRENCE, R.; WECHSLER, M.D. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS) Bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *J. Am. Heart Assoc.* 2008.

LEMON, R.N.; GRIFFITHS, J. Comparing the function of the corticospinal system in different species: organizational differences for motor specialization? *Muscle Nerve.* (32): 261-279, 2005.

LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL; ZHANG, Z.G.; ZHANG, L.; JIANG, Q.; ZHANG, R.; DAVIES, K.; POWERS, C.; BRUGGEN, N.; CHOPP, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* (106): 829-838, 2000.

LI, Y.; CHEN, J; CHEN, XG; WANG, L; GAUTAM, SC; XU, YX; KATAKOWSKI, M; ZHANG, LJ; LU, M; JANAKIRAMAN, N; CHOPP, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59(4): 514-523, 2002.

LI, Y.; CHEN, J.; WANG, L.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* (56): 1666-1672, 2001.

LI, Y.; CHEN, J.; ZHANG, C.L.; WANG, L.; LU, D.; KATAKOWSKI, M.; GAO, Q.; SHEN, L.H.; ZHANG, J.; LU, M.; CHOPP, M. Gliosis and Brain Remodeling After Treatment of Stroke in Rats With Marrow Stromal Cells. *Glia* (49): 407-417, 2005.

LIEPERT, J.; GRAEF, S.; UHDE, I.; LEIDNER, O.; WEILLER, C. "Training-induced changes of motor cortex representations in stroke patients," *Acta Neurologica Scandinavica*. (101): 321-326, 2000.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* (441): 1094-1096, 2006.

LIU, D.D.; SHYU, W.C.; LIN, S.Z. Stem cell therapy in stroke: strategies in basic study and clinical application. *Acta Neurochir. Suppl.* (99): 137-139, 2006.

LIU, Z.; LI, Y.; QU, R.; SHEN, L.; GAO, Q.; ZHANG, X.; LU, M.; SAVANT-BHONSALE, S.; BORNEMAN, J.; CHOPP, M. Axonal sprouting into the denervated spinal cord and synaptic and postsynaptic protein expression in the spinal cord after transplantation of bone marrow stromal cell in stroke rats. *Brain Res.* (1149):172-180, 2007.

LIU, Y.; ROUILLER, E.M. "Mechanisms of recovery of dexterity following unilateral lesion of the sensorimotor cortex in adult monkeys," *Experimental Brain Research*. (128): 149-159, 1999.

LOCATELLI, F.; BERSANO, A.; BALLABIO, E.; LANFRANCONI, S.; PAPADIMITRIOU, D.; STRAZZERA, S.; BRESOLINA, N.; COMI, G.; CORTI, P.S. Stem cell therapy in stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1-16, 2008.

LONGA, E. Z.; WEINSTEIN, I.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. *Stroke* (20): 84-91, 1989.

MAHMOOD, A.; LU, D.; WANG, L.; LI, Y.; LU, M.; CHOPP, M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* (49): 1196-1203, 2001.

MATSUI, F.; WATANABE, E.; OOHIRA, A. Immunological identification of two proteoglycan fragments derived from neurocan, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. *Neurochem. Int.* (25): 425-431, 1994.

MATTSSON, B.; SORENSEN, J.C.; ZIMMER, J.; JOHANSSON, B.B. Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* (28): 1225-1231, 1997.

MAZHARI, R.; HARE, J.M. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* (4): S21-S26, 2007.

MCGEER, P.L.; KAWAMATA, T.; WALKER, D.G.; AKIYAMA, H.; TOOYAMA, I.; MCGEER, E.G. Microglia in degenerative neurological disease, *Glia* (7): 84– 92, 1993.

MEIRELLES, L.D.A.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J. Cell Sci.* (119): 2204–2213, 2006.

MEYER-PUTTLITZ, B.; MILEV, P.; JUNKER, E.; ZIMMER, I.; MARGOLIS, R.U.; MARGOLIS, R.K. Chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of nervous tissue: Developmental changes of neurocan and phosphacan. *J. Neurochem.* (65): 2327-2337, 1995.

MOHR, J.I.; GAUTIER, J.C.; HIER, D.; STEIN, R.W. in *Stroke: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Vol. 1) (Bamett, H. J. M., Stein, B. M., Mohr, J. P. and Yatsu, F. M., eds), pp. 377-450, Churchill Livingstone 20, 1986.

Molina-Luna, K.; Buitrago, M.M.; Hertler, B.; Schubring, M.; Haiss, F.; Nisch, W.; Schulz, J.B.; Luft, A.R. Cortical stimulation mapping using epidurally implanted thin-film microelectrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods.* (161): 118–125, 2007.

NG, Y.Y.; BAERT, M.R.; DE HAAS, E.F.; PIKE-OVERZET, K.; STAAL, F.J. Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells. *Methods Mol. Biol.* (506):13-21, 2009.

NUDO, R. J. Postinfarct Cortical Plasticity and Behavioral Recovery. *Stroke* (38): 840-845, 2007.

NUDO, R.J.; MASTERTON, R.B. Descending pathways to the spinal cord, III:sites of origin of the corticospinal tract. *J. Comp. Neurol.* (296): 559-583, 1990.

NUDO, R.J.; MILLIKEN, G.W. "Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys," *Journal of Neurophysiology.* (75): 2144-2149,1996.

NUDO, R.J.; SUTHERLAND, D.P.; MASTERTON, R.B. Variation and evolution of mammalian corticospinal somata with special reference to primates. *J Comp Neurol.* (358):181–205, 1995.

OHTA, M.; SUZUKI, Y.; NODA, T.; EJIRI, Y.; DEZAWA, M.; KATAOKA, K.; CHOU, H.; ISHIKAWA, N.; MATSUMOTO, N.; IWASHITA, Y.; MIZUTA, E.; KUNO, S.; IDE C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* (187): 266-278, 2004.

OHTAKI, H.; YLOSTALO, J.H.; FORAKER, J.E.; ROBINSON, A.; REGER, R.L.; SHIODA, S.; PROCKOP, D.J. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (105): 14638-14643, 2008.

ONDA, T.; HONMOU, O.; HARADA, K.; HOUKIN, K.; HAMADA, H.; KOCSIS, J.D. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (28): 329-340, 2008.

ORKIN, S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* (1): 57-64, 2000.

PARENT, J.M.; VALENTIN, V.V.; LOWENSTEIN, D.H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zoneolfactory bulb pathway. *J. Neurosci.* (22): 3174- 3188, 2002.

PARK, K.I. Transplantation of neural stem cells: cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med. J.* (41): 825-835, 2000.

PARR, A.M.; TATOR, C.H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* (40): 609-619, 2007.

PASCHEN, W. Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic- cell damage. *Med. Hypotheses* (47): 283–288, 1996.

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

PENCEA, V.; BINGAMAN, K.D.; WIEGAND, S.J.; LUSKIN, M.B. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* (21): 6706- 6717, 2001.

PRILLER, J.; FLUGEL, A.; WEHNER, T.; BOENTERT, M.; HAAS, C.A.; PRINZ, M.; FERNANDEZ-KLETT, F.; PRASS, K.; BECHMANN, I.; DE BOER, B.A.; FROTSCHER, M.; KREUTZBERG, G.W.; PERSONS, D.A.; DIRNAGL, U. Targeting genemodified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment, *Nat. Med.* (7): 1356–1361, 2001.

PROCKOP, D.J. “Stemness” does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin. Pharmacol. Ther.* (82): 241-243, 2007.

RAIVICH, G.; BOHATSCHKEK, M.; KLOSS, C.U.; WERNER A.; JONES, L.L.; KREUTZBERG, G.W. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function, *Brain Res. Brain Res. Rev.* (30): 77– 105, 1999.

ROBIN, A.M.; ZHANG, Z.G.; WANG, L.; ZHANG, R.L.; KATAKOWSKI, M.; ZHANG, L.; WANG, Y.; ZHANG, C.; CHOPP, M. Stromal cell-derived factor 1a mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (26): 125-134, 2006.

ROBINSON, M.J.; MACRAE, I.M.; TODD, M.; REID, J.L.; MCCULLOCH, J. *Neurosci. Lett.* (118): 269-272, 1990.

ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G. Pharmacology of interleukin-1 actions in the brain, *Adv. Pharmacol.* (25): 1–20, 1994.

ROUILLER, E.M.; MORET, V.; LIANG, F. Comparison of the connective properties of the two forelimb areas of the rat sensorimotor cortex: support for the presence of a premotor or supplementary motor cortical area. *Somatosens. Mot. Res.* (10): 269-289, 1993.

SAMDANI, A.F.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* (28):1283–1288, 1997.

SCHABITZ, W.R.; KOLLMAR, R.; SCHWANINGER, M.; *et al.* Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. (34): 745–751, 2003.

SCHACHINGER, V.; ASSMUS, B.; BRITTEN, M.B.; HONOLD, J.; LEHMANN, R.; TEUPE, C.; ET AL. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* (44):1690-1699, 2004.

SCHNEIDER, A.; KRUGER, C.; STEIGLEDER, T.; *et al.* The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J. Clin. Invest.* (115): 2083–2098, 2005.

SCHMUED, L.C; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W.JR. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* (1): 37-46, 1997.

SCHWARTING, S.; LITWAK, S.; HAO, W.; BAHR, M.; WEISE, J.; NEUMANN, H. Hematopoietic Stem Cells Reduce Postischemic Inflammation and Ameliorate Ischemic Brain Injury. *Stroke* (10): 2867-2875, 2008.

SHEN, L.H.; LI, Y.; CHEN, J.; ZACHAREK, A.; GAO, Q.; KAPKE, A.; LU, M.; RAGINSKI, K.; VANGURI, P.; SMITH, A.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (27): 6-13, 2007.

SHEN, L.H.; LI, Y.; CHEN, J.; CUI, Y.; ZHANG, C.; KAPKE, A.; LU, M.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke* (38): 2150–2156, 2007

SHEN, L.H.; LI, Y.; GAO, Q.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M. Down-Regulation of Neurocan Expression in Reactive Astrocytes Promotes Axonal Regeneration and Facilitates the Neurorestorative Effects of Bone Marrow Stromal Cells in the Ischemic Rat Brain. *Glia* (56): 1747-1754, 2008.

SHEN, L.H.; LI, Y.; CHEN, J.; ZHANG, J.; VANGURI, P.; BORNEMAN, J.; CHOPP, M. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neurosci.* (137): 393-399, 2006.

SHEN, Q.; GODERIE, S.K.; JIN, L.; KARANTH, N.; SUN, Y.; ABRAMOVA, N.; VINCENT, P.; PUMIGLIA, K.; TEMPLE, S. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* (304): 1338- 1340, 2004.

SHYU, W.C.; LIN, S.Z.; CHIANG, M.F.; SU, C.Y.; LI, H. Intracerebral Peripheral Blood Stem Cell (CD34<sub>+</sub>) Implantation Induces Neuroplasticity by Enhancing  $\alpha_1$  Integrin-Mediated Angiogenesis in Chronic Stroke Rats. *The Journal of Neuroscience* (13): 3444 –3453, 2006.

SHYU, W.C.; LIN, S.Z.; YANG, H.I.; *et al.* Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation.* (110): 1847–1854, 2004.

STEWART, O.; ZHENG, B.; HO, C.; ANDERSON, K.; TESSIER-LAVIGNE, M. The dorsolateral corticospinal tract in mice: an alternative route for corticospinal input to caudal segments following dorsal column lesions. *J. Comp. Neurol.* (472): 463-477, 2004.

STEVENS, S.L.; BAO, J.; HOLLIS, J.; LESSOV, N.S.; CLARK, W.M.; STENZEL-POORE, M.P. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* (932): 110-119, 2002.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* (58): 233-247, 1999.

STRAUER, B.E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; BARTSCH, T.; SCHANNWELL, C.; ANTKE, C.; *et al.* Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT study. *J Am Coll Cardiol.* (9): 1651–8, 2005.

STREIT, W.J.; KREUTZBERG, G.W. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin, *J. Comp. Neurol.* (268): 248– 263, 1988.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis, *Prog. Neurobiol.* (57): 563–581, 1999.

STUMM, R.K.; RUMMEL, J.; JUNKER, V.; CULMSEE, C.; PFEIFFER, M. KRIEGLSTEIN, J.; HOLLT, V.; SCHULZ, S. A dual role for the sdf-1/cxcr4 chemokine receptor system in adult brain: Isoform-selective regulation of sdf-1 expression modulates cxcr4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J. Neurosci.* (22): 5865-5878, 2002.

SUGHRUE, M.E.; MEHRA, A.; CONNOLLY, J.R.; E.S.; D'AMBROSIO, A.L. Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm. Res.* (53): 497–508, 2004.

SZELE, F.G.; CHESSELET, M.F. Cortical lesions induce an increase in cell number and PSA-NCAM expression in the subventricular zone of adult rats. *J. Comp. Neurol.* (368): 439-454, 1996.

TAGUCHI, A.; SOMA, T.; TANAKA, H.; KANDA, T.; NISHIMURA, H.; YOSHIKAWA, H.; TSUKAMOTO, Y.; ISO, H.; FUJIMORI, Y.; STERN, D.M.; NARITOMI, H.; MATSUYAMA, T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* (114): 330-338, 2004.

TANAKA, R.; KOMINE-KOBAYASHI, M.; MOCHIZUKI, H.; YAMADA, M.; FURUYA, T.; MIGITA, M.; SHIMADA, T.; MIZUNO, Y.; URABE, T. Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia, *Neuroscience.* (117): 531–539, 2003.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev. Immunol.* (8): 726-736, 2008.

UKAI, R.; HONMOU, O.; HARADA, K.; HOUKIN, K.; HAMADA, H.; KOCSIS, J.D. Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J. Neurotrauma* (24): 508-520, 2007.

VAQUERO, J.; ZURITA, M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol. Histopathol.* (24): 107-116, 2009.

VEIZOVIC, T.; BEECH, J.S.; STROEMER, R.P.; WATSON, W.P.; HODGES, H. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* (32): 1012-1019, 2001.

VILLARS, F.; BORDENAVE, L.; BAREILLE, R.; AMEDEE, J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J. Cell. Biochem.* (79): 672-685, 2000.

WANG, Q.; TANG, X.N.; YENARI, M.A. The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology.* (184): 53-68, 2007.

WARLOW, C.; SUDLOW, C.; DENNIS, M.; WARDLAW, J.; SANDERCOCK, P. Stroke. *Lancet.* (362): 1211-24, 2003.

WARLOW, C.P.; DENNIS, M.S.; VAN, G.I.J.N.J, *et al.* What caused this transient or persisting ischaemic event? In: *Stroke: a practical guide to management.* Oxford: Blackwell Science, 223-300, 2001.

WANG, Y.; DENG, Y.; ZHOU, G.Q. SDF-1alpha/CXCR4- mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res.* (1195): 104-112, 2008.

WATT, F.M.; HOGAN, B.L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* (287):1427-1430, 2000.

WILLING, A.E.; VENDRAME, M.; MALLERY, J.; CASSADY, C.J.; DAVIS, C.D.; SANCHEZ-RAMOS, J.; SANBERG, P.R. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant.* (12): 449-454, 2003.

WILLIS, P.; BERRY, M.; RICHES, A.C. Effects of trauma on cell production in the subependymal layer of the rat neocortex. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (2): 377-388, 1976.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Rev. Immunol.* (6): 93–106, 2006.

Wirenfeldt, M.; Dissing-Olesen, L.; Babcock, A.A.; Nielsen, M.; Meldgaard, M.; Zimmer, J.; Azcoitia, I.; Leslie, R.G.Q.; Dagnaes-Hansen, F.; Finsen, B. Population Control of Resident and Immigrant Microglia by Mitosis and Apoptosis *The American Journal of Pathology*, (171): 617-631, 2007.

WISE, S.P.; DONOGHUE. Motor cortex of rodents. In: Jones E.G., Peters A. *Cerebral cortex - Sensorimotor areas and aspects of cortical connectivity*. Editora Plenum Press. Vol.5; cap. 7, p. 243-270, 1986.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T.V.; STOKES, K.Y.; GRANGER, D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* (113): 2105-2112, 2006.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T.; KOISTINAHO J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (95): 15769–15774, 1998.

ZHANG, Z.G.; ZHANG, L.; JIANG, Q.; ZHANG, R.; DAVIES, K.; POWERS, C.; BRUGGEN, N.; CHOPP, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* (106): 829-838, 2000.

ZHANG, Z.G.; ZHANG, L.; TSANG, W.; SOLTANIAN-ZADEH, H.; MORRIS, D.; ZHANG, R.; GOUSSEV, A.; POWERS, C.; YEICH, T.; CHOPP, M. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood–brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (22): 379-392, 2002.

ZHANG, C.; LI, Y.; CHEN, J.; GAO, Q.; ZACHAREK, A.; KAPKE, A.; CHOPP, M. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neurosci.* (141): 687-695, 2006.

ZHANG, L.; ARNIEGO, P.; HO, K.L.; CHOPP, M. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann. Neurol.* (53): 259-263, 2003.

# 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](#)