Universidade Federal do Rio de Janeiro Centro de Ciências da Saúde Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia)

Fernanda de Mello e Souza Valente Gubert

Terapia celular após isquemia cerebral modula diferenciação de células do tipo glia radial em ratos adultos

Rio de Janeiro

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Terapia celular após isquemia cerebral modula diferenciação de células do tipo glia radial em ratos adultos

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências biológicas Fisiologia)

Orietador: Rosalia Mendez Otero Marcelo Felippe Santiago

Rio de Janeiro

TERAPIA CELULAR APÓS ISQUEMIA GLOBAL INDUZ DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DO TIPO GLIA RADIAL EM RATOS ADULTOS".

FERNANDA DE MELLO E SOUZA VALENTE GUBERT

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 05\DE MARÇO DE 2010.

PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ) Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia)

posalia mendez Olito

PROFª ROSALIA MENDEZ OTERØ (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADORA

MARCELO FELIRPE SANTIAGO (DOUTOR - UFRJ) -ORIENTADOR PROF./

Flana alpmen.

PROFª FLAVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES (DOUTOR - UFRJ) - REVISORA

h L L

PROF. JOÃO GUEDES DA FRANCA (DOUTOR - UFRJ)

PROF^a. LENY ALVES CAVALCANTE (DOUTOR - UFRJ)

Roldonbes.

PROF^a. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR - UFRJ)

Agradecimentos

Escrever os agradecimentos deveria ser uma tarefa fácil, mas por algum motivo está sendo a parte mais difícil da tese, não consegui nem entregar para a banca a tempo. Talvez porque tenho tanto a agradecer que não existem palavras adequadas para expressar isso.

Quero agradecer primeiramente a família toda, principalmente aos meus pais, Ernesto e Sheila, minha irmã, Carol, e minhas avós, Eunice e Theresa. Muito obrigada por me amarem tanto e me apoiarem sempre. Vocês sempre demonstram o orgulho que sentem pela escolha profissional que fiz, e isso só me faz ter mais certeza do que quero ser e de buscar sempre ser uma pessoa melhor.

Quero agradecer a minha orientadora, Rosalia, por toda instrução, ensinamento e incentivo.

Quero agradecer ao meu orientador, Marcelo, pela paciência durante todos esses anos, acreditando sempre no meu potencial.

Quero agradecer muito a minha quase gêmea Mila, que está sempre me dando apoio e me ajudando em todos os momentos. Uma pessoa tão especial, que espero ter sempre ao meu lado não só na vida como no trabalho.

Quero agradecer aos membros do Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular por fazer o trabalho diário mais agradável.

E por fim, gostaria de agradecer a Deus por me dar forças para seguir em frente.

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 UFRJ, sob a orientação da Dra Rosalia Mendez Otero e do Dr Marcelo Felippe Santiago e na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Resumo

GUBERT, Fernanda. Terapia celular após isquemia cerebral modula diferenciação de células do tipo glia radial em ratos adultos. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, a glia radial (RG) contribuí para a migração neuronal e neurogênese, diferenciando-se em astrócitos ao final desse período. Foi proposto que as células-tronco neurais (NSCs) da zona subventricular (SVZ) têm origem a partir das células de RG embrionária. No adulto, foi demonstrada a presença de células com morfologia radial em regiões neurogênicas como na SVZ e na zona subgranular (SGZ) hipocampal. Essas são denominadas células do tipo glia radial (RGL). O primeiro objetivo desse trabalho foi caracterizar, por técnicas imuno-histoquímicas, as células RGL na SVZ. Observou-se que essas células apresentam algumas características fenotípicas em comum com a RG embrionária, como a expressão de vimentina, GLAST e Pax6. Assim como RG, as células RGL também possuem a capacidade de proliferar e dar suporte à migração neuronal, embora este último seja um evento raro no adulto. Tal como no desenvolvimento, no adulto, cerca de 70% dos prolongamentos das células RGL estão associados a vasos sanguíneos. A isquemia cerebral pode estimular a neurogênese no adulto embora não resulte na reposição significativa dos neurônios perdidos. Foi proposto que a terapia celular com células de medula óssea (MO) promove uma melhora funcional pós-isquêmica, possivelmente, devido à liberação de fatores tróficos/de crescimento. Portanto, o segundo objetivo desse estudo foi investigar a influência da isquemia e do transplante de células de MO sobre as regiões neurogênicas no adulto. Inicialmente foi utilizado como modelo a oclusão permanente das carótidas comuns, que resulta em uma isquemia global branda denominada oligoemia. As células de MO foram então injetadas intravenosamente 24 horas após a isquemia. Observouse lesão no trato óptico evidenciada pela diminuição de 3,6x na expressão da proteína básica de mielina 7 dias após o insulto. Esta diminuição foi atenuada nos animais que receberam as células de MO, sendo observada uma redução de 1,8x na expressão dessa proteína. Na SVZ, foi observado um aumento de aproximadamente 1,5x no número de células RGL na parede lateral dos animais isquêmicos 3 dias após a lesão e este aumento persistiu até 21 dias apenas nos animais tratados com células de MO. O transplante também induz o aumento de 1,5x na proliferação na SVZ 7 dias após a isquemia. Na SGZ, o transplante de células de MO aumentou 1,3x o número de células RGL 7 dias após a isquemia. Em um modelo de isquemia cortical focal observou-se uma diminuição de 2x no número de células RGL na SVZ posterior que foi revertida nos animais que receberam as células de MO. Resultados preliminares indicam uma tendência ao aumento nos níveis de RNAm para BDNF na SVZ nos animais que receberam o transplante de células de MO 7 dias após a isquemia global comparado com os animais que não receberam o transplante. Portanto, podemos sugerir que as células de MO atuem de forma parácrina, através da liberação de fatores tróficos/ de crescimento, estimulando o aparecimento das células RGL que modulariam a neurogênese e migração dos novos precursores neurais para as áreas lesadas.

Abstract

GUBERT, Fernanda. Cell therapy after cerebral ischemia in adult rats stimulates neurogenesis and modulates radial glia like-cell differentiation at the SVZ. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

During development, radial glia cells (RG) contribute to neuronal migration and neurogenesis, and differentiate into astrocytes by the end of the developmental period. It has been shown that neural stem cells (NSCs) from subventricular zone (SVZ) are originated from RG. In the adulthood, it was demonstrated the presence of cells that share similar characteristics with RG, called radial glia-like cells (RGL) on neurogenic regions, like SVZ and the hippocampal subgranular zone (SGZ). Here, we aimed to characterize RGL around the LVs using immunohistochemical techniques. We identified cells with features that are similar to the embryonic RG, like the expression of vimentin, GLAST and Pax6. These RGL is capable to proliferate and support neuronal migration, even though this event does not occur frequently in the adulthood. Approximately 70% of the RGL cells processes are associated with blood vessels similar to what have been described for the embryonic RG. Cerebral ischemia increases neurogenesis at the adulthood, however, this event is not enough to replace a significant number of lost neurons. It has been proposed that bone marrow cells (BMC) release several growth/trophic factors that would stimulate neuroprotection or/and regeneration after transplantation in some neurological injury models. The second aim of this work was to investigate the influence of BMC therapy and cerebral ischemia in the SVZ and SGZ. Adult rats were submitted to bilateral occlusion of the common carotid that results in a global ischemia, called oligemia. BMC were transplanted intravenously 24 hrs later. The oligemia induced a white matter damage characterized by a 3.6 fold reduction in the expression of myelin basic protein. After BMC therapy we observed a reduction less pronounced (1.8x) in the expression of this protein. We have shown that, in this model, there is 1.5 fold increase in RGL cells numbers in the SVZ 3 days after ischemia, this increase persists only in the ischemic animals that receive BMC therapy until 21 days after ischemia. The BMC also stimulate 1.5 fond increase in the SVZ proliferation of the ischemic animals 7 days after the lesion. In the SGZ, we observed 1.3 fold increase in RGL cells numbers in the ischemic animals that receive BMC 7 days after the procedure. In model of cortical focal ischemia there was 2 fold reduction in the RGL cells numbers in the posterior region of the SVZ seven days after ischemia. This reduction was not observed in the animals that receive BMC transplant. Our preliminary results showed that BDNF mRNA levels are up regulated in the treated animals but not in the other groups. We suggest that the BMC could act in a paracrine way releasing growth/trophic factors which stimulate the differentiation of RGL that might regulate the neurogenesis and migration of new neurons to the lesion area.

Lista de figuras:

Figura 1: Esquema representativo da SVZ	21
Figura 2: Esquema representativo da SGZ	26
Figura 3: Esquema representativo da neurogênese durante o desenvolvimento	36
Figura 4: Lesão gerada pela oligoemia e esquema representativo do Polígono	de
Willis	44
Figura 5: Esquema representativo das populações presentes na MO	52
Figura 6: Esquemas representativos dos procedimentos de oclusão das carótidas	e
termocoagulação dos vasos do córtex sensoriomotor	62
Figura 7: Esquema representativo das regiões do VL onde foram feitas	as
quantificações	71
Figura 8: Células RGL na parede lateral do VL	79
Figura 9: Células RGL ao redor do VL em corte sagital	81
Figura 10: Células RGL ao redor do VL no animal com 7 meses	82
Figura 11: Marcação de vimentina ao redor do VL do mesmo animal utilizando-se diferen	tes
anticorpos anti-vimentina	84
Figura 12: Expressão de GLAST e Pax6 nas células RGL em anim	ais
adulto	86
Figura 13: Células RGL proliferando na parede lateral do VL	88
Figura 14: Associação das células DCX-positivas com prolongamentos radiais vimentin	na-
positivas ao redor do VL	90
Figura 15: Associação dos prolongamentos das células RGL vimentina-positivas a vas	sos
sanguíneos	92
Figura 16: Fenótipo das células mononucleares de MO	95
Figura 17: Distribuição das células de MO após o transplante intravenoso nos anim	ais
isquêmicos	97
Figura 18: Análise da degeneração no trato óptico 3 dias após a oligoemia	99
Figura 19: Análise por Western Blotting da expressão da MBP 7 dias após	a
isquemia1	
	01
Figura 20: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 3 dias após	01 a

Figura 21: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 3
dias após a isquemia105
Figura 22: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 7 dias após a
isquemia107
Figura 23: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 7
dias após a isquemia108
Figura 24: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 21 dias após a
isquemia111
Figura 25: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 21
dias após a isquemia112
Figura 26: Quantificação da porcentagem de prolongamentos vimentina-positivos das células
RGL que fazem contato com vasos sanguíneos114
Figura 27: Quantificação das células RGL na SGZ 7 dias após a isquemia116
Figura 28: Quantificação dos prolongamentos das células RGL ao redor do VL após a
isquemia focal119
Figura 29: Quantificação dos prolongamentos das células RGL ao redor do VL após a
isquemia focal e transplante de células de MO120
Figura 30: Quantificação das células que incorporaram BrdU na parede lateral dos diferentes
grupos
Figura 31: Expressão de Ki67 na parede lateral
Figura 32: Quantificação das células Ki67-positivas na parede lateral dos diferentes
grupos
Figura 33: Quantificação das células Ki67-positivas na SGZ dos diferentes grupos
Figura 34: Análise na parede lateral dos níveis de RNAm para diferentes fatores tróficos 3
dias após a isquemia
Figura 35: Análise na parede lateral dos níveis de RNAm para diferentes fatores tróficos/de
crescimento 7 dias após a isquemia

Lista de Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

Ang 1 – Angiopoetina 1

AVC - Acidente vascular cerebral

BCCAO - Oclusão bilateral permanente das carótidas comuns (do inglês *bilateral common carotid artery occlusion*)

BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês brain derived neurotrophic factor)

BLBP – Proteína ligadora de lipídio do cérebro (do inglês *brain lipid binding protein*)

BMP – Proteína morfogênica de osso (do inglês *bone morphogenetic protein*)

BrdU - 5-bromo-2-desoxiuridina

CBF - Fluxo sanguíneo cerebral

CC – Corpo caloso

CNTF - Fator neurotrófico ciliar (do inglês *ciliary neurotrophic factor*)

DAPI – 4'-6-diamino-2-fenilindol

DCX – Doublecortina

DEPC – Dietil-pirocarbonato

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Médium*

DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês desoxiribonucleic acid)

ECL – do inglês *enhanced* chemiluminescence

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês ethylenediamine tetraacetic acid)

EGF - Fator de crescimento epidermal (do inglês epidermal growth factor)

 $\ensuremath{\textit{Es}}$ - Estriado

FGF-2 - Fator de crescimento de fibroblastos -2 (do inglês *fibroblast growth factor-2*) **FO** – Falso-operado

FO + cls – Falso-operado que recebeu transplante de células de medula óssea

GDNF - Fator de crescimento derivado de glia (do inglês *glial cell line-derived trophic factor*)

GFAP – Proteína acídica fibrilar de glia (do inglês glial fibrillary acidic protein)

GLAST – Transportador de L-glutamato/L-aspartato (do inglês *L-glutamate/L-aspartate transporter*)

HGF - Fator de crescimento de hapatócitos (do inglês hepatocyte growth factor)

HSA – Antígeno estável ao calor (do inglês *heat-stable antigen*)

HSC - Células-tronco hematopoiéticas (do inglês hematopoietic stem cell)

Isq – Isquêmico

Isq + cls - Isquêmico que recebeu transplante de células de medula óssea

Isq F – Animais que sofreram isquemia focal por termocoagulação

Isq $\mathbf{F} + \mathbf{cls} - Animais que sofreram isquemia focal por termocoagulação e receberam transplante de células de medula óssea$

MBP – Proteína básica de mielina (do inglês *myelin basic protein*)

MO - Medula óssea

MSC - Células-tronco mesenquimais (do inglês mesenchymal stem cell)

NGF - Fator de crescimento de nervo (do inglês nerve growth factor)

NGS - Soro normal de cabra (do inglês *normal goat serum*)

NSC - Células-tronco neurais (do inglês *neural stem cell*)

OCT – Meio de montagem inerte (do inglês *optimal cutting temperature*)

PBS - Salina tamponada em tampão fosfato (do inglês phosphate buffered saline)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polimerase chain reaction*)

PEDF - Fator derivado de epitélio pigmentar (do inglês *pigment epithelium-derived factor*)

PNA – Aglutinina de amendoim (do inglês *peanut agglutinin*)

PSA-NCAM – Molécula de adesão neural polisialilada (do inglês *polysialylated neural cell adhesion molecule*)

RMS - Corrente migratória rostral (do inglês *rostral migratory stream*)

RGL - Tipo glia radial (do inglês *radial glia-like*)

RNA - Ácido ribonucléico (do inglês *ribonucleic acid*)

SCF - Fator de células tronco (do inglês *stem cell factor*)

SDF-1 – Fator derivado de célula estomal -1 (do inglês *stromal cell-derived factor-1*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SGZ - Camada subgranular (do inglês *subgranular zone*)

SNC - Sistema nervoso central

SVZ - Zona subventricular (do inglês *subventricular zone*)

TGF- α - Fator de crescimento de transformação alfa (do inglês *transforming growth facto -* α)

TNF - Fator de necrose tumoral (do inglês tumor necrosis factor)

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endothelial growth factor*)

VL - Ventrículo lateral

VZ - Zona ventricular (do inglês *ventricular zone*)

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Neurogênese em mamíferos adultos	.14
1.2 Células-tronco neurais	16
1.3 Zona subventricular	19
1.4 Camada Subgranular	24
1.5 Nicho neurogênico	27
1.6 Reguladores da neurogênese	30
1.7 Origem das NSCs - Glia radial	.34
1.8 Isquemia cerebral	.41
1.9 Oligoemia	42
1.10 Neurogênese após isquemia cerebral	.47
1.11 Terapia celular - Células de medula óssea	50
2 Objectives	50
2. Objeuvos	.59
3. Materiais e Métodos	60
3.1 Animais	60
3.2 Isquemia cerebral global	60
3.3 Isquemia cerebral focal	61
3.4 Isolamento das células mononucleares da MO	63
3.5 Marcação das células de MO	.63
3.6 Análise das células mononucleares por citometria de fluxo	64
3.7 Injeções de BrdU	65
3.8 Perfusão e criocortes	.66
3.9 Imuno-histoquímica	.67
3.10 Imuno-histoquímica para BrdU e Ki67	68
3.11 Observação de lâminas e aquisição de imagens	69
3.12 Quantificação dos prolongamentos radiais expressando vimentina e das células	em
proliferação na SVZ e SGZ	69
3.13 Análise de degeneração neuronal - FluoroJade C	72
3.14 Análise por Western Blotting	72

5. Discussão	133
5.1 Presença de células RGL na SVZ de ratos adultos	133
5.2 Lesão na substância branca após oligoemia e transplante das células de MO	137
5.3 Influência da terapia celular sobre a proliferação das células na SVZ e SGZ	142
5.4 Influência da oligoemia e do transplante de células de MO sobre o número d	le células
RGL	143
6. Conclusões	154
7. Referências	155
8. Anexo	180

1. Introdução:

O sistema nervoso central (SNC) é formado por uma rede de células conectadas que são essenciais para o processamento e resposta de todo os tipos de estímulos que recebemos a cada instante. Para que ele funcione de maneira adequada é necessário que processos, que ocorrem principalmente durante o desenvolvimento, ocorram de uma forma temporalmente organizada. Podemos dividir o desenvolvimento do SNC nas seguintes etapas: neurogênese, proliferação, migração, diferenciação, morte celular e refinamento sináptico.

O SNC é formado principalmente por duas populações celulares, os neurônios e as células de glia. Os neurônios são responsáveis pela transmissão de sinais no sistema nervoso. Dentro da população de células de glia presentes no SNC estão contidos os astrócitos, oligodendrócitos e a microglia, que por muito tempo foram consideradas somente como células de suporte a transmissão sináptica. Acreditava-se que essas populações neurais se diferenciam a partir de progenitores diferentes durante o desenvolvimento (para revisão ver: KRIEGSTEIN E ALVAREZ-BUYLLA., 2009). No entanto, nos últimos anos diversos grupos têm demonstrado que algumas células de glia, as células de glia radial presentes durante o desenvolvimento, e alguns astrócitos no adulto, são capazes de proliferar e formar neurônios (NOCTOR ET AL., 2001; DOETSCH ET AL., 1999; SERI ET AL., 2001).

1.1 Neurogênese em mamíferos adultos:

Por muito tempo, o dogma existente era de que não havia formação de novos neurônios ou plasticidade no cérebro adulto, como pode ser observado na citação do neurocientista Santiago Ramon y Cajal: "*In the adult centers, the nerve paths are something fixed, ended, and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated*" (RAMON Y

CAJAL, 1913-14 *apud* COLUCCI-D'AMATO ET AL., 2006). Os primeiros trabalhos que contrariaram essa hipótese demonstraram a presença de figuras mitóticas no cérebro de ratos adultos (SCHAPER, 1897; LEVI, 1898 *apud* GROSS, 2000). No entanto, esses trabalhos foram criticados devido à ausência, naquela época, de métodos adequados para detectar células em divisão e para distinguir neurônios de células gliais.

Nos anos 60, utilizando um novo método para marcar células em divisão, a timidina tritiada, Joseph Altman publicou uma série de artigos onde evidenciava a presença de novos neurônios em várias estruturas encefálicas de ratos jovens e adultos, incluindo o neocórtex (ALTMAN, 1963; ALTMAN, 1966), giro denteado (ALTMAN, 1963; ALTMAN E DAS, 1965) e bulbo olfatório (ALTMAN, 1969). Posteriormente, Michael Kaplan confirmou, por microscopia eletrônica, que as células marcadas com timidina tritiada no giro denteado e bulbo olfatório de ratos e macacos adultos tinham características ultra-estruturais de neurônios (KAPLAN E HINDS, 1977; KAPLAN E BELL, 1984; KAPLAN, 1983). Mesmo com essas evidências, a neurogênese em mamíferos adultos ainda demorou a ser amplamente aceita (GROSS, 2000). Entretanto, após uma série de trabalhos consistentes que utilizaram técnicas mais modernas para demonstrar a existência de neurogênese em adultos, tanto em aves, como em roedores e humanos, esse evento passou a ser aceito pela maioria da comunidade científica (GOLDMAN E NOTTEBOHM, 1983; GALILEO ET AL., 1990; CAMERON ET AL., 1993; LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1993; GOULD ET AL., 1999; ZHAO ET AL 2008).

A neurogênese ocorre em duas regiões específicas em mamíferos adultos: na zona subventricular (SVZ) ao redor dos ventrículos laterais (VL) (**Figura 1A**) (LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1993; LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1994) e na camada subgranular (SGZ) no giro denteado hipocampal (**Figura 2**) (KAPLAN E BELL, 1984; CAMERON ET AL., 1993; GAGE ET AL., 1998). Os novos neurônios formados na SVZ migram por uma longa distância pela corrente migratória rostral (RMS) até o bulbo olfatório onde se

diferenciam em neurônios granulares e periglomerulares (**Figura 1B**) (LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1994). Já os neurônios formados na SGZ migram por curto trajeto até a camada granular onde se diferenciam em neurônios granulares. Os novos neurônios se integram nas suas regiões de destino estabelecendo conexões sinápticas funcionais (MARKAKIS E GAGE, 1999; VAN PRAAG ET AL., 2002; CARLEN ET AL., 2002; BELLUZZI ET AL., 2003; TONI ET AL., 2008).

1.2 Células-tronco neurais:

Acredita-se que a neurogênese no SNC adulto ocorre a partir de células-tronco neurais (NSC) ou progenitores neurais presentes na SVZ e SGZ (CHIASSON ET AL., 1999; DOETSCH ET AL., 1999; SERI ET AL., 2001). Células-tronco são definidas por serem capazes de se auto-renovar e de se diferenciar em mais de um tipo celular. As células-tronco podem ser classificadas como pluripotentes, quando são capazes de se diferenciar em células de todos os folhetos germinativos, ou multipotentes, quando se diferenciam somente nas células do seu tecido de origem. As NSCs são consideradas multipotentes, pois se diferenciam somente nas células do SN, como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (DOETSCH ET AL., 1999; MENN ET AL., 2006). Acredita-se que os progenitores neurais, diferentemente das NSCs, possuam capacidade proliferativa limitada, não sendo capazes de se auto-renovarem por tempo indeterminado e se diferenciando em uma variedade mais restrita de tipos celulares. As primeiras células retiradas do SNC adulto caracterizadas como capazes de gerar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos in vitro foram isoladas do corpo estriado de camundongos, em 1992, por Reynolds e Weiss. Essas células classificadas como NSCs se mostraram imunorreativas para nestina, uma proteína de filamento intermediário, expressa em

progenitores neurais e musculares (FREDERIKSEN E MACKAY, 1988; ZIMMERMAN ET AL1., 1994).

As NSCs podem ser isoladas a partir da SVZ e mantidas *in vitro* na presença do fator de crescimento de fibroblastos -2 (FGF-2) e fator de crescimento epidermal (EGF). Nessas condições, as NSCs proliferam formando agregados chamados neuroesferas. As neuroesferas podem ser dissociadas em células isoladas e plaqueadas de forma clonal sob as mesmas condições formando neuroesferas secundárias, demonstrando a capacidade de auto-renovação das NSCs (CHIASSON ET AL., 1999; DOETSCH ET AL., 1999). Na ausência dos fatores de crescimento, as neuroesferas aderem e se diferenciam em neurônios e células da glia, demonstrando a multipotencialidade das NSCs (GRITTI ET AL., 1996). No entanto, cada neuroesfera é heterogênea, contendo tanto NSCs como progenitores mais diferenciados. Dessa forma, somente uma pequena parte (menos de 1%) das células presentes nas neuroesferas possuem NSCs capazes de formar neuroesferas sencundárias (MORSHEAD ET AL., 2002).

É possível formar neuroesferas a partir de células isoladas tanto da SVZ quanto da SGZ, no entanto essas esferas apresentam características diferentes. Ao contrário das neuroesferas obtidas da SVZ, aquelas obtidas na SGZ são menores e não são capazes de formar neuroesferas secundárias. Além disso, só é possível diferenciar um tipo celular por esfera de SGZ. Dessa forma, conclui-se que as neuroesferas obtidas da SGZ seriam derivadas de progenitores e não de células-tronco (SEABERG E VAN DER KOOY, 2002; BULL E BARTLETT, 2005).

Apesar da identidade das NSCs *in vivo* ainda ser um tema discutido, acredita-se que essas seriam células com características de astrócitos, expressando no citoesqueleto a proteína acídica fibrilar de glia (GFAP), tanto na SVZ como na SGZ. Os astrócitos das regiões germinativas, mesmo semelhantes aos astrócitos do parênquima cerebral, têm características

próprias. Por exemplo, a maioria dos astrócitos da SVZ e os astrócitos radiais da SGZ não expressam S100beta, proteína expressa por astrócitos maduros. Além disso, os astrócitos da SVZ que expressam ambos S100beta e GFAP formam menos neuroesferas do que aqueles que só expressam GFAP (RAPONI ET AL., 2007). Da mesma forma, Imura e colaboradores (2006) demonstraram que somente os astrócitos que expressam GFAP, nestina e o trissacarídeo de membrana Lex/SSEA-1 são capazes de formar neurônios *in vitro*. Células com essas características, no entanto, não são observadas a partir de astrócitos do córtex cerebral adulto (IMURA ET AL., 2006). O Lex é considerado um marcador positivo das NSCs e progenitores neurais da SVZ (CAPELA E TEMPLE, 2002). Esses estudos demonstram que apesar de apresentarem características em comum, as NSCs expressam alguns marcadores específicos que não são encontrados nos astrócitos maduros.

Ainda há muita discussão, se existem NSCs em outras regiões do cérebro adulto, além da SVZ e SGZ. Alguns grupos conseguiram isolar células com características, *in vitro*, de NSCs a partir de regiões não neurogênicas, tais como medula espinhal, córtex cerebral e substância negra (GRITTI ET AL., 1996; WEISS ET AL., 1996; PALMER ET AL., 1997; SHIHABUDDIN ET AL., 2000; TAUPIN ET AL., 2000; YAMAMOTO ET AL., 2001; MAGAVI E MACKILS, 2002; LIE ET AL., 2002). No entanto, outros grupos obtiveram resultados contraditórios a esses, conseguindo isolar NSCs somente das regiões consideradas neurogênicas *in vivo* (LAYWELL ET AL., 2000; MORSHEAD ET AL., 2004; IMURA ET AL., 2006). Laywell e colaboradores, por exemplo, só conseguiram isolar NSCs de regiões não-neurogênicas em camundongos com até 10 dias de vida, não observando mais essa capacidade nos animais adultos (LAYWELL ET AL., 2000). Dessa forma, os astrócitos das regiões neurogênicas parecem ter características, que permitem que eles atuem como progenitores neurais no SNC de mamíferos adultos. Mesmo assim, é preciso analisar melhor

se, sob condições especiais, como por exemplo, na presença de fatores de crescimento ou de lesões cerebrais, células de outras regiões poderiam atuar também como progenitores.

1.3 Zona subventricular

Em mamíferos adultos, a SVZ é uma das principais regiões neurogênicas. Novos neurônios formados nessa região migram constantemente em direção ao bulbo olfatório para repor interneurônios (LUSKIN, 1993; LOIS E ALVAREZ-BUYLLA, 1994), um processo que ocorre inclusive em primatas não-humanos (KORNACK E RAKIC, 2001) e humanos (SANAI ET AL., 2004). No bulbo olfatório de ratos adultos jovens, aproximadamente 80000 novos neurônios granulares são formados por dia a partir dos progenitores da SVZ (PETERSON, 2002).

A composição da SVZ foi detalhadamente descrita pelo grupo de Alvarez-Buylla, utilizando-se microscopia eletrônica e imuno-histoquímica (DOETSCH ET AL., 1997). Segundo estes autores, a SVZ é composta basicamente por 3 tipos celulares: pelas células A, células B e células C (**Figura 1A**). As células B são células com características de astrócitos, expressam GFAP e apresentam núcleo irregular com invaginações e citoplasma claro. As células A são os neuroblastos migratórios que expressam doublecortina (DCX) e PSA-NCAM, apresentam corpo celular alongado, um ou dois prolongamentos e possuem citoplasma escuro. As células C expressam o fator de transcrição Dlx2, apresentam corpo celular grande e mais esférico e invaginações profundas no núcleo (DOETSCH ET AL., 2002). Entre a SVZ e o lúmen do VL há uma camada de células ependimárias multiciliadas, também denominadas células E. As células B podem ainda ser dividas em dois tipos: B1 e B2. As células B1 são maiores e apresentam mais citoplasma do que as B2. As células B1 apresentam superfície apical em contato com o lúmen do VL e emitem um prolongamento

curto em direção a este. Elas se localizam entre as células ependimárias, as quais apresentam superfície apical em contato com o VL em formato de diamante, formando um padrão de catavento (**Figura 1C**). Esse padrão é observado somente na superfície ventricular de regiões neurogênicas (MIRZADEH ET AL., 2008).



Figura 1: Esquema representativo da SVZ. (A) Modelo esquemático de um corte coronal do cérebro de um roedor. A figura à esquerda mostra a SVZ (laranja) ao redor dos VLs. A figura à direita apresenta um modelo detalhado das células existentes na SVZ. Células B (azul); células C (verde); células A (vermelho) e células ependimárias (cinza). Ax (axônio); LV (ventrículo lateral); BV (vaso sanguíneo). Modificado de RIQUELME ET AL., 2008. (B) Desenho em câmera lúcida de um corte sagital demonstrando a migração dos neuroblastos formados na SVZ até o bulbo olfatório pela RMS. Modificado de LUSKIN, 1993. (C) Desenho esquemático da disposição das células em contato com o lúmen do VL. É possível observar as células E multicilidadas dispostas em forma de catavento com os prolongamentos apicais das células B no centro. CC, corpo caloso; Ctx, córtex; OB, bulbo olfatório. Modificado de MIRZADETH ET AL., 2008.

A neurogênese ocorre por toda parede lateral do VL enquanto que na parede medial, voltada para o septo, só há neurogênese na região anterior (MIRZADEH ET AL., 2008). No entanto, a proliferação celular é maior na porção mais anterior da parede lateral, voltado para o estriado, a partir de onde a maioria das novas células vão migrar pela RMS até o bulbo olfatório (DOETSCH ET AL., 1997). Apesar de a neurogênese ser maior na SVZ anterior, o número de células B é maior na SVZ posterior (DOETSCH ET AL., 1997).

As células B são consideradas as NSCs, que estão quiescentes e/ou tem ciclo celular lento, e após algum estímulo se diferenciam nas células C. Essas, por sua vez, são consideradas amplificadores transitórios, com alta taxa de proliferação, aumentando o número de progenitores na região, se diferenciando por fim nas células A, que irão migrar tangencialmente até o bulbo olfatório (DOETSCH ET AL., 1999). Acredita-se que somente as células B ativadas, ou seja, já programadas para gerar as células tipo C, toquem o ventrículo com o cílio (DOETSCH ET AL., 2002). A presença das células C para amplificar o número de progenitores na região é importante para que as NSCs não precisem passar por muitos ciclos celulares, dessa forma diminuindo a chance de mutações serem incorporadas nas células-tronco (REYA ET AL., 2001).

Apesar de muitos grupos acreditarem que as células B sejam as NSCs, há outra corrente que discorda dessa visão e propõe que sejam as células ependimárias, as células tronco presente ao redor do VL (JOHANSSON ET AL., 1999). As células E expressam nestina (DOETSCH ET AL., 1997), proteína expressa em progenitores neurais, e receptores para EGF e FGF-2, fatores de crescimento necessários para formação das neuroesferas (CRAIG ET AL., 1996; MATSUO ET AL., 1994). Johansson e colaboradores (1999) demonstraram que células ependimárias, marcadas através de injeções intraventriculares de DiI ou utilizando uma abordagem de marcação com retrovírus, possuem capacidade proliferativa *in vivo* e *in vitro*, e formam neurônios diferenciados no bulbo olfatório

(JOHANSSON ET AL., 1999). No entanto, outros grupos tentaram reproduzir esses experimentos sem sucesso, demonstrando que provavelmente as células proliferando na camada ependimária, seriam células B ativadas, que se localizam entre as células E (CHIASSON ET AL., 1999; DOETSCH ET AL., 1999; DOETSCH ET AL., 2002; SPASSKY ET AL., 2005; MIRZADEH ET AL., 2008). Recentemente, essa discussão foi reiniciada com o trabalho de Coskun e colaboradores que observaram uma subpopulação de células ependimárias CD133-positivas e CD24-negativas é capaz de proliferar in vitro e in vivo e se diferenciar em células A (COSKUN ET AL., 2008). Esse trabalho foi criticado pelo grupo de Alvarez-Buylla que demonstrou que células B ativadas também expressam CD133 (MIRZADEH ET AL., 2008). Já o grupo de Jonas Frisén, o primeiro a sugerir a possibilidade das células E serem as NSCs, demonstrou que as células E só teriam capacidade proliferativa em resposta a uma lesão, por exemplo, a isquemia cerebral. Nesse caso, as células E se diferenciariam em células B e/ou células A na SVZ para, só então, proliferar, diminuindo o número de células na camada ependimária. Esses resultados mostram que as células E não são capazes de se auto-renovar, demonstrando não cumprir um dos requisitos para ser considerada como célula-tronco (CARLEN ET AL., 2009), no entanto elas podem ter um papel importante na neurogênese após lesão, podendo favorecer a formação de novos neurônios que poderiam migrar, repondo os neurônios perdidos na região lesada.

Além de formar neuroblastos, foi demonstrado que as NSCs da SVZ também são capazes de formar oligodendrócitos *in vivo*. Marcando especificamente as células B da SVZ, o grupo de Arturo Alvarez-Buylla demonstrou que essas células são capazes de formar precursores de oligodendrócitos Olig2-positivos, que migram para o corpo caloso, estriado e fimbria do fornix, onde se diferenciam em oligodendrócitos mielinizantes e não mielinizantes. Eles demonstraram também que uma única célula B, *in vitro*, é capaz de formar neurônios e

oligodendrócitos, demonstrando novamente a multipotencialidade dessas células (MENN ET AL., 2006).

Mesmo conhecendo as características morfológicas das NSCs da SVZ, ainda não existe nenhum marcador exclusivo das NSCs. Alguns grupos têm procurado um marcador específico para as NSCs e já foram propostos marcadores negativos, como por exemplo, o PNA (aglutinina de amendoim) e o HSA (antígeno *heat-stable*) e marcadores positivos como o Lex/SSEA-1 ou CD15 e o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 ou CD60b (RIETZE ET AL., 2001; CAPELA E TEMPLE, 2002; MENDEZ-OTERO ET AL., 2005; IMURA ET AL., 2006). No entanto, esses marcadores não são exclusivos das NSCs, o que dificulta a visualização e isolamento dessas células.

1.4 Camada Subgranular

A SGZ está localizada no hipocampo, na interface entre o hilo e a camada granular do giro denteado. Calcula-se que são formados aproximadamente 100-150 novos neurônios por dia na SGZ de roedores adultos (KEMPERMANN ET AL., 1997). Esses neurônios se diferenciam em neurônios granulares e permanecem na camada granular onde estabelecem projeções axonais até a área CA3, tornando-se indistinguíveis das células locais (CARLEN ET AL., 2002; TAUPIN E GAGE., 2002). Os novos neurônios formados que se integram sobrevivem pelo menos oito meses em roedores e dois anos em humanos (ERIKSSON ET AL., 1998; DAYER ET AL., 2003)

As NSCs ou as células progenitoras neurais existentes na SGZ também apresentam características de astrócitos. Essas células, também chamadas de células B, ou progenitores do tipo I, expressam nestina e GFAP e possuem prolongamentos radiais proeminentes (SERI ET AL., 2001; FILIPPOV ET AL., 2003; STEINER ET AL., 2006). As células B originam as

células D ou progenitores do tipo II que têm proliferação mais acentuada formando agregados entre os prolongamentos radiais das células B (SERI ET AL., 2001; FAKUDA ET AL., 2003; KEMPERMANN ET AL., 2004). As células D expressam somente nestina, e podem ser consideradas amplificadores transitórios, como as células C da SVZ (KRONENBERG ET AL., 2003). Na SGZ, ainda existem astrócitos horizontais, que são nestina-negativos, mas ainda não se sabe se esses também são progenitores neurais (SERI ET AL., 2001) (**Figura 2**).



Figura 2: Esquema representativo da SGZ. Desenho esquemático de um corte coronal do cérebro de um roedor evidenciando o hipocampo. Em destaque, a composição da SGZ e da camada de células granulares. Os astrócitos da SGZ (células B) apresentam prolongamentos radiais que transpassam as camadas celulares do giro denteado. As células B se dividem e geram células imaturas (células D1, D2 e D3) que se dividem e diferenciam em novos neurônios granulares (células G). BV, vaso sanguíneo; Ctx, córtex. Modificado de RIQUELME ET AL., 2008

O hipocampo está relacionado com a memória e o aprendizado, dessa forma é necessário que haja uma constante plasticidade nessa região. Apesar de alguns artigos demonstrarem o aumento da neurogênese na SGZ após estímulos de aprendizagem (VAN PRAAG ET AL., 1999), Gould e colaboradores demonstraram que o aprendizado não estaria estimulando a formação de novos neurônios, mas sim a sobrevivência dos novos neurônios formados no período que antecedeu o estímulo. Isso indicaria que estímulos externos podem contribuir para a sobrevivência dos novos neurônios formados na SGZ (GOULD ET AL., 1999). No entanto, somente estímulos de aprendizado que dependem do hipocampo íntegro têm esse efeito (GOULD ET AL., 1999). A atividade física e a exposição de roedores a ambientes enriquecidos aumenta o número de neurônios funcionais e esse aumento está associado com a melhor performance desses animais em tarefas dependentes do hipocampo, indicando a contribuição dos novos neurônios para o funcionamento dessa região (KEMPERMANN ET AL., 1997, VAN PRAAG ET AL., 1999). No entanto, a atividade física está relacionada com o aumento na proliferação de precursores neurais, enquanto estímulos cognitivos estão relacionados com a sobrevivência dos novos neurônios formados (Kempermann et al., 2008).

1.5 Nicho neurogênico

As regiões neurogênicas formam um nicho permissivo à diferenciação neuronal, devido não só a presença de estímulos positivos à diferenciação neuronal, como também a ausência de sinais inibitórios desta. Dessa forma, se NSCs cultivadas *in vitro* forem transplantadas para regiões não-neurogênicas elas formam preferencialmente células da glia e tem sobrevivência limitada, indicando a presença de fatores inibitórios à diferenciação neuronal nessas regiões *in vivo* (TEMPLE, 2001).

Um exemplo de sinal inibitório à diferenciação neuronal presente nas regiões nãoneurogênicas ocorre através da sinalização pela proteína morfogênica de osso (BMP). As BMPs influenciam na proliferação, diferenciação e na determinação do fenótipo celular no início da embriogênese. As BMPs 2 e 4 inibem a neurogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo* (LIM ET AL., 2000). No entanto, na SVZ as células E, e em níveis mais baixos, as células B, liberam noguina, um polipeptídeo que se liga as BMPs inibindo sua ação através do impedimento da ligação da BMP aos seus receptores. Conseqüentemente, a presença da noguina permite a diferenciação neuronal na SVZ (LIM ET AL., 2000; PERETTO ET AL., 2004). Na SGZ, um fator permissivo à neurogênese seria o Wnt-3. O Wnt-3 faz parte da família Wnt, a qual está relacionada com a posteriorização neural durante o desenvolvimento (VAN DE WATER ET AL., 2001). A superexpressão do Wnt3 ou o bloqueio da sua ação no giro denteado adulto, leva a um aumento e diminuição, respectivamente, da neurogênese (LIE ET AL., 2005).

O líquido cefalorraquidiano, presente no VL, é uma fonte importante de sinais que mantém o nicho neurogênico. Alguns fatores de crescimento, que podem influenciar a neurogênese na SVZ, são produzidos pelo plexo coróide e distribuídos pela SVZ pelas células E. Além disso, foi demonstrado que os batimentos dos cílios das células E direcionam a migração neuronal da SVZ para a RMS, por formar um gradiente de Slit2, proteína quimiorepulsora (SAWAMOTO ET AL., 2006). As células ependimárias são capazes de se comunicar com as células B através de junções comunicantes, o que permite a transdução de sinais do líquido cefalorraquidiano para as NSCs (MIRZADEH ET AL., 2008).

Outro componente do nicho neurogênico que tem chamado cada vez mais a atenção são os vasos sanguíneos. A neurogênese tanto na SVZ como na SGZ ocorre próxima a essas estruturas (PALMER ET AL., 2000; MIRZADEH ET AL., 2008; SHEN ET AL., 2008). Na SGZ, por exemplo, os progenitores neurais podem ser encontrados como agregados próximos

a vasos sanguíneos (PALMER ET AL., 2000). Nesses agregados podem ser observadas também células endoteliais proliferando, demonstrando que talvez sinais em comum influenciem tanto a neurogênese como a angiogênese, como já foi observado durante o desenvolvimento (PALMER ET AL., 2000; CARMELIET E TESSIER-LAVIGNE., 2005). As células endoteliais liberam fatores solúveis que mantêm um maior número de NSCs indiferenciadas *in vitro*. Além disso, após a retirada do estímulo endotelial, as NSCs são capazes de formar mais neurônios do que as NSCs mantidas na ausência de tal estímulo, mantendo estas indiferenciadas (SHEN ET AL., 2004). Um dos possíveis fatores que podem ser responsáveis por tais efeitos é o fator derivado de epitélio pigmentar (PEDF), que é liberado tanto pelas células vasculares como pelas células ependimárias, e aumenta o número de NSCs indiferenciadas tanto *in vitro* como *in vivo* (RAMIREZ-CASTILLEJO ET AL., 2006).

Na SVZ, 3 grupos independentes demonstraram recentemente a importância dos vasos na neurogênese nessa região. Utilizando a técnica de *whole mounting*, eles analisaram em 3D toda a parede lateral do VL. O grupo de Arturo Alvarez-Buylla demonstrou que as células B1 apresentam prolongamentos basais longos tangenciais à parede lateral e que 96% desses prolongamentos terminam em vasos sanguíneos (MIRZADEH ET AL., 2008). Esses prolongamentos basais podem permitir que as células B1 respondam a sinais perivasculares. O grupo de Fiona Doetsch demonstrou que as células B e C, principalmente quando estão proliferando, se localizam adjacentes a vasos onde não há barreira astrocitária, o que facilitaria a troca de moléculas entre as células da SVZ e a circulação. Essas regiões onde falta a barreira astrocitária existem somente ao redor do VL (TAVAZOIE ET AL., 2008). O grupo de Sally Temple também observou a associação das células B e C com os vasos e propôs que essa associação ocorra pela ligação da integrina $\alpha 6\beta 1$, presente nas células progenitoras e laminina, presente nas células endoteliais. Se a integrina for bloqueada, um número

significativo de células progenitoras é encontrado longe dos vasos (SHEN ET AL., 2008). Em conjunto, esses experimentos demonstram a complexidade do nicho neurogênico, e a importância da vasculatura para mantê-lo, dando suporte a proliferação dos progenitores neurais e, possivelmente, regulando essa proliferação através da troca de moléculas sinalizadoras.

1.6 Reguladores da neurogênese

Diversos fatores tanto fisiológicos como patológicos podem regular a neurogênese na SVZ e SGZ (**Tabela 1**). A idade, por exemplo, pode influenciar no número de neurônios formados, assim ratos com mais de 12 meses de idade apresentam menor proliferação dos precursores neuronais na SGZ (KUHN ET AL., 1996). Na SVZ e no bulbo olfatório também ocorre diminuição da neurogênese com a idade, o que leva a um déficit na discriminação olfatória com a idade (SEKI ET AL., 1995; ENWERE ET AL., 2004). A fase do ciclo estral nas fêmeas também pode influenciar na taxa de neurogênese. As fêmeas que estão em próestro, quando os níveis de estrogênio estão mais altos, formam mais neurônios na SGZ. Já na SVZ, ocorre a maior neurogênese quando as fêmeas estão em fase de estro (TANAPAT ET AL., 1999; SMITH ET AL., 2001). Durante a gestação também é possível observar aumento da neurogênese na SVZ, esse efeito é mediado pela prolactina (SHINGO ET AL., 2003).

Como já foi descrito anteriormente, ambientes enriquecidos são capazes de estimular a neurogênese na SGZ (KEMPERMANN ET AL., 1997). Esse aumento, no entanto, não é observado na SVZ, demonstrando que, dependendo do estímulo, somente uma região neurogênica pode ser influenciada. O exercício físico é outro exemplo; atividades físicas de intensidade baixa e moderada estimulam a neurogênese somente na SGZ, não sendo

observado tal efeito da SVZ (VAN PRAAG ET AL., 1999; RA ET AL., 2002; BROWN ET AL., 2003).

Alguns estímulos patológicos também influenciam a neurogênese. A isquemia cerebral, por exemplo, estimula a formação de novos neurônios tanto na SVZ como na SGZ (LIU ET AL., 1998; DASH ET AL., 2001; KEE ET AL., 2001; LI ET AL., 2002; KOKAIA ET AL., 2006). Já o estresse reduz a neurogênese na SGZ (GOULD ET AL., 1998; MALBERG ET AL., 2003). Doenças neurodegenerativas também influenciam na neurogênese. Assim, a doença de Alzheimer aumenta a formação de novos neurônios na SGZ, e a doença de Hungtington aumenta na SVZ (CURTIS ET AL., 2003; JIN ET AL., 2004; JIN ET AL., 2005; BATISTA ET AL., 2006). Já na doença de Parkinson foi observada uma diminuição da proliferação na SVZ, tanto em roedores como em humanos (BAKER ET AL., 2004; HOGLINGER ET AL., 2004). O aumento da neurogênese após lesão já foi relacionado com melhora cognitiva em animais que sofreram lesão cerebral traumática (SUN ET AL., 2007). Esse aumento da neurogênese demonstra que, em alguns tipos de trauma, o SNC tenta se regenerar estimulando o aumento da proliferação de seus progenitores neurais endógenos, no entanto, o número de novos neurônios formados não é suficiente para repor os neurônios perdidos e o insulto cerebral permanece importante.

	SVZ	SGZ	Referência
Idade	Diminui a	Diminui a	KUHN ET AL., 1996;
	neurogênese	neurogênese	SEKI ET AL., 1995;
	_		ENWERE ET AL., 2004
Ciclo estral	Aumenta	Aumenta	TANAPAT ET AL., 1999;
	neurogênese em	neurogênese em	SMITH ET AL., 2001
	estro	pró-estro	
Ambiente	Não tem efeito	Aumenta	KEMPERMANN ET AL.,
enriquecido		sobrevivência dos	1997
		novos neurônios	
Exercício físico	Não tem efeito	Aumenta	VAN PRAAG ET AL.,
voluntário		neurogênese	1999; RA ET AL., 2002;
			BROWN ET AL., 2003
Isolamento social	-	Dimuinui a	LU ET AL., 2003
		neurogênese	
Estresse	Dimuinui a	Dimuinuí a	OHL ET AL., 1999;
	neurogênese	neurogênese	MINEUR ET AL., 2007
Isquemia cerebral	Aumenta	Aumenta	LIU ET AL., 1998; DASH
	neurogênese	neurogênese	ET AL., 2001; KEE ET
			AL., 2001; LI ET AL.,
			2002; KOKAIA ET AL.,
			2006
Privação de odor	Diminui a	Diminui a	COROTTO ET AL., 1994
	neurogênese	neurogênese	

Tabela 1: Fatores fisiológicos e patológicos que podem modular a neurogênese na SVZ e SGZ de roedores adultos.

Ainda não se sabe quais seriam os mecanismos reguladores da neurogênese na presença de diferentes estímulos. Possivelmente, a influência de diferentes fatores de crescimento podem modular a neurogênese na SVZ e SGZ. Esses fatores podem modular não só a proliferação, como também a migração e diferenciação de células progenitoras. Dessa forma, foi observado que as células da SVZ expressam alguns receptores para fatores de crescimento, como FGF-2 e EGF (DOETSCH ET AL., 2002; ZHENG ET AL., 2004). Esses fatores, como descrito anteriormente, são utilizados para manter as NSCs indiferenciadas *in vitro*. A administração intraventricular ou subcutânea de FGF-2 é capaz de estimular o aumento da neurogênese *in vivo* (KUHN ET AL., 1997; WAGNER ET AL., 1999). Camundongos nocaute para FGF-2 apresentam uma redução em torno de 50% das células em divisão na SVZ. Essa redução é observada no número de NSCs, demonstrando que FGF-2 age

nas células mais quiescentes dessa região (ZHENG ET AL., 2004). A infusão de EGF também estimula o aumento na proliferação na SVZ, no entanto o EGF atua principalmente nos progenitores transitórios, como as células C, já que essas expressam abundantemente o receptor para o EGF (DOESTCH ET AL., 2002). Somente uma parte das células B possui o receptor do EGF, dessa forma, após a infusão intraventricular de EGF não foi observado aumento na proliferação das células B, no entanto, foi observado o aparecimento de um maior numero de células B que estendem prolongamentos para o VL, aumentando desta forma o número de células B ativadas (DOESTCH ET AL., 2002).

Outros fatores de crescimento também podem modular a neurogênese, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator neurotrófico ciliar (CNTF) que estimulam a neurogênese (JIN ET AL., 2002; EMSLEY ET AL., 2003). Já o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um dos fatores relacionados com a neurogênese induzida pelo exercício físico na SGZ e com a sobrevivência dos novos neurônios formados (CHOI ET AL., 2009). Na SVZ, a ação do BDNF ainda é controversa, enquanto alguns grupos observaram aumento da neurogênese após infusão de BDNF no VL, outros observaram redução utilizando o mesmo protocolo (ZIGOVA ET AL., 1998; BENRAISS ET AL., 2001; GALVÃO ET AL., 2008). Como a neurogênese basal não é suficiente para repor os neurônios perdidos após uma lesão grave, alguns grupos têm tentado estimular a neurogênese e a migração dos novos neurônios para a área de lesão com a infusão de fatores de crescimento. O FGF-2 é importante para que ocorra o aumento da neurogênese em resposta à lesão, já que animais nocaute para FGF-2 não apresentam esse aumento (YOSHIMURA ET AL., 2001; YOSHIMURA ET AL., 2003). Dessa forma, Sun e colaboradores observaram que após 7 dias de infusão intraventricular de FGF-2, os animais que sofreram lesão cerebral traumática além de apresentar maior neurogênese, apresentam melhor resposta a testes cognitivos quando comparados com os animais lesados que não receberam a infusão (SUN ET AL., 2009). Outro grupo demonstrou que a infusão intraventricular de FGF-2 e EGF também leva à recuperação cognitiva em animais que sofreram isquemia global transitória. Nesse caso, os autores correlacionaram essa melhora com o aumento da formação e migração de progenitores neurais do VL posterior para CA1, onde os novos neurônios amadurecem e estabelecem sinapses funcionais (NAKATOMI ET AL., 2002). A infusão de FGF-2 também estimula a neurogênese na SVZ de camundongos com doença de Huntington e a migração dos novos neurônios para o estriado, região afetada pela doença (JIN ET AL., 2005). Esses trabalhos demonstraram a importância de se estudar os fatores intrínsecos moduladores da neurogênese e os seus mecanismos de ação, para que eles possam ser manipulados de forma a estimular uma maior proliferação, migração e diferenciação neuronal após um eventual trauma no SNC.

1.7 Origem das NSCs - Glia radial

Durante o desenvolvimento, a neurogênese ocorre principalmente na zona ventricular (VZ). A VZ é um epitélio pseudo-estratificado adjacente ao lúmen do ventrículo onde estão localizadas as NSCs. Uma segunda zona germinativa presente durante o desenvolvimento é a SVZ, que se localiza adjacente a VZ. A expansão da SVZ ocorre concomitantemente com a diminuição da VZ, no final da neurogênese (para revisão ver: BONFANTI ET AL., 2007). A VZ é formada primeiramente pelas células neuroepiteliais que se dividem simetricamente, aumentando o número de progenitores na região (RAKIC, 1995). Com o decorrer do desenvolvimento, surgem células com características de glia, com o corpo celular na VZ e prolongamento radial que se estende até a pia mater. Essas células são denominadas glia radial (**Figura 3**) (PARNAVELAS E NADARAJAH, 2001). A glia radial também atua como progenitor neural durante o desenvolvimento, formando os neurônios corticais (NOCTOR ET AL., 2001; MALATESTA ET AL., 2003; ANTHONY ET AL., 2004). Tanto as células

neuroepiteliais como a glia radial apresentam migração nuclear intercinética durante o ciclo celular. Durante a fase de síntese de DNA, os núcleos dessas células se deslocam para a região mais apical das células. Já durante a mitose, os núcleos estão próximos à supefície do ventrículo. Durante as fases G1 e G2, os núcleos estariam em uma posição intermediária entre a região mais apical e mais basal das células (SAUER E WALKER, 1959, SIDMAN ET AL. 1959).


Figura 3: Esquema representativo da neurogênese durante o desenvolvimento. Pode-se observar as células neuroepiteliais que são capazes de gerar neurônios e células de glia radial. O corpo da glia radial está presente na zona ventricular (VZ) com prolongamentos basais que se estendem até a superfície pial, fazendo contato, em alguns casos, com vasos sanguíneos, e prolongamentos apicais para o ventrículo. Os novos neurônios (rosa) migram sobre esses prolongamentos até as camadas corticais. A glia radial também gera progenitores intermediários, que se localizam na SVZ. Esses progenitores podem gerar neurônios (nIPC) ou oligodendrócitos (oIPC). Ao final do desenvolvimento a célula de glia radial retraí seu prolongamento em contato com o VL e se diferencia em astrócitos. CP, placa cortical; IZ, zona intermediária; NE, neuroepitélio; MZ, zona marginal. Modificado de KRIEGSTEIN E ALVAREZ-BUYLLA, 2009.

As células de glia radial foram conhecidas primeiramente por sua capacidade de dar suporte à migração neuronal durante o desenvolvimento, contribuindo para a morfogênese do cérebro, principalmente do córtex (RAKIC, 1978). Ao final do desenvolvimento elas retraem seus prolongamentos e se diferenciam em astrócitos (LEVITT E RAKIC, 1980; VOIGT, 1989; MISSION ET AL., 1991). No entanto, recentemente foi demonstrada a capacidade das células de glia radial se diferenciarem também em neurônios (NOCTOR ET AL., 2001, 2002, 2004; ANTHONY ET AL., 2004), oligodendrócitos (MERKLE ET AL., 2004) e células ependimárias (SPASSKY ET AL., 2005). Uma vez que as células de glia radial se autorenovam e diferenciam em mais de um tipo celular, sendo assim multipotentes, pode-se concluir que, durante o desenvolvimento, essas células apresentam características de célulastronco.

As células de glia radial compartilham várias características em comum com as células neuroepiteliais, como a expressão de nestina e a migração nuclear intercinética (ALVAREZ-BUYLLA ET AL., 2001; GOTZ E HUTTNER., 2005). Acredita-se que as células de glia radial se originam das células neuroepiteliais, no entanto, diferentemente das células neuroepiteliais, as células de glia radial apresentam algumas características em comum com os astrócitos, como, por exemplo, a presença de grânulos de glicogênio (GADISSEUX E EVRARD, 1985). As células de glia radial expressam marcadores como a proteína ligadora de lipídio do cérebro (BLBP) (FENG E HEINTZ, 1995), o transportador de L-glutamato/L-aspartato (GLAST) (SHIBATA ET AL., 1997) e proteínas de filamento intermediário como o RC2 em camundongos (MISSON ET AL., 1988), a nestina (HOCKFIELD E MCKAY, 1985), a vimentina (PIXLEY E DE VELLIS, 1984), e o GFAP em primatas (RAKIC, 2003). Alguns desses marcadores também são expressos por astrócitos, como o GFAP, GLAST e BLBP (para revisão ver KRIEGSTEIN E GOTZ, 2003).

Ao final do desenvolvimento, concomitantemente com a diferenciação da glia radial em astrócitos, há a diminuição na expressão de vimentina, nestina e RC2 enquanto ocorre um aumento na expressão de GFAP. Dessa forma, a glia radial está presente principalmente durante o desenvolvimento, não persistindo em mamíferos adultos. Em algumas regiões do SNC adulto existem células com morfologia radial como a glia de Muller, na retina, e a glia de Bergmann, no cerebelo. Essas células, apesar da morfologia, não apresentam certas características funcionais no adulto, como a capacidade de dar suporte a migração neuronal, da mesma forma que a glia radial embrionária o faz (MOREST E SILVER, 2003). Nos últimos anos, células do tipo glia radial (RGL) foram observadas no hipocampo de mamíferos adultos. Como foi dito anteriormente, os astrócitos radiais do hipocampo são os progenitores neurais da região (ALVAREZ-BUYLLA ET AL., 2002; SHAPIRO ET AL., 2005). Outros trabalhos demonstraram que os astrócitos radiais do hipocampo, além de serem considerados NSCs dessa região, dão suporte a migração dos novos neurônios formados em direção à camada granular tendo, portanto, características semelhantes a das células de glia radial (SEKI E ARAI, 1999; SERI ET AL., 2001; NAMBA ET AL., 2005; STEINER ET AL., 2006).

Ao redor do VL de camundongos adultos também já foram observadas células RGL. Essas células foram observadas principalmente na região ventral do VL, emitindo prolongamentos em direção ao núcleo acumbens. As células RGL, nessa região, expressam vimentina, GFAP e nestina, e, além disso, são encontradas próximas a células com morfologia migratória (SUNDHOLM-PETERS ET AL., 2004). Esse grupo propõe a partir desses resultados que essas células RGL são remanescentes das células de glia radial presentes durante o desenvolvimento.

Em 2004, Merkle e colaboradores demonstraram que as NSCs da SVZ se originam das células de glia radial existentes durante o desenvolvimento. Para isso, eles infectaram as

células de glia radial através de seus prolongamentos distais com adenovírus, fazendo com que essas células expressassem permanentemente a proteína fluorescente verde ou a fosfatase alcalina. Dessa forma, eles conseguiram acompanhar a progênie das células de glia radial, e puderam observar que essas formavam os astrócitos da SVZ com capacidade de formar neuroesferas *in vitro* e neuroblastos *in vivo* (MERKLE ET AL., 2004).

É possível estimular a diferenciação de astrócitos maduros em células RGL na presença de fatores de crescimento como FGF-2 e o TGF-α. Essas células expressam Lex, vimentina, nestina, RC2 e mantêm a expressão de GFAP (IMURA ET AL., 2006; ZHOU ET AL., 2001). Sharif e colaboradores demonstraram inclusive que, na presença de TGF- α , astrócitos maduros, in vitro, se diferenciavam em células de glia radial capazes de dar suporte à migração neuronal e de gerar novos neurônios funcionais (SHARIF ET AL., 2006). A expressão do receptor tirosina kinase, ErbB2, em astrócitos maduros, in vivo, também leva a diferenciação destes em células com as mesmas características morfológicas e funcionais da glia radial embrionária (GHASHGHAEI ET AL., 2007). A infusão dos fatores de crescimento EGF e TGF- α no VL estimula o aparecimento de células RGL na SVZ de camundongos adultos. Essas células compartilham várias características com as células de glia radial presentes durante o desenvolvimento, como a expressão de RC2, BLBP e a capacidade de proliferar, observada através da incorporação de BrdU. Além disso, após a infusão desses fatores, foram observados neuroblastos migratórios DCX-positivos migrando em direção ao estriado sobre células RGL (GREGG E WEISS, 2003). A infusão de FGF-2 no VL também estimula o aparecimento de células com prolongamento radial ao redor do VL, no entanto, diferentemente do que é observado quando há a infusão de EGF e TGFa, esses prolongamentos não expressam RC2 e não dão suporte à migração neuronal. A razão para tal diferença pode ser devido ao fato do FGF-2 estimular o aparecimento de prolongamentos radiais nas células ependimárias, enquanto o EGF e TGFα estimulam em algumas células da SVZ (GREGG E WEISS, 2003).

O aparecimento de células RGL em roedores adultos também pode ser estimulado por lesões cerebrais como a isquemia cerebral ou lesão cortical (LEAVITT ET AL., 1999; ZHANG ET AL., 2007). No caso da isquemia cerebral, esta estimularia a proliferação das células ependimárias 1 a 2 dias depois da isquemia. Nesse período, as células ependimárias apresentaram morfologia radial e fenótipo semelhante ao das células de glia radial. Essa proliferação, no entanto, é transitória e não é mais observada 7 dias após a isquemia (ZHANG ET AL., 2007). Na lesão cortical, astrócitos corticais apresentaram morfologia de células RGL expressando RC2 próximas à àrea de lesão. Essa transformação é transitória, aparecendo entre 4 e 7 dias após a lesão (LEAVITT ET AL., 1999).

A presença de células RGL na SVZ e SGZ, regiões neurogênicas de roedores adultos, pode indicar que elas mantenham características de NSCs também no cérebro adulto. É importante caracterizar as células RGL no animal adulto e analisar o aparecimento dessas células após lesão cerebral, como no caso da isquemia cerebral, para estudar sua resposta ao dano cerebral. Essas células, no cérebro de animais adultos, podem ajudar os novos neurônios formados na SVZ a migrarem por outra trajetória além da RMS (SUNDHOLM-PETERS ET AL., 2004). No caso de uma lesão, as células de glia radial podem guiar os novos neurônios para regenerar a área lesada (LEAVITT ET AL., 1999). Dessa forma, seria de grande importância, estimular a diferenciação das NSCs em células RGL, após uma lesão isquêmica, para a formação e direcionamento dos novos neurônios para regeneração do tecido lesado.

1.8 Isquemia cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) pode ocorrer em decorrência de uma diminuição transitória ou permanente do fluxo sanguíneo cerebral (CBF) e é uma das maiores causas de morte e incapacitação de adultos no mundo. No Brasil, o AVC é a maior causa de morte, com aproximadamente 90 mil casos/ano (ANDRÉ ET AL., 2006). O AVC pode deixar seqüelas graves nos pacientes dependendo da área cerebral afetada pelo insulto, como: paralisia, déficits sensoriais, perda de memória, mudanças de personalidade entre outros.

O AVC pode ser dividido em AVC isquêmico e AVC hemorrágico, sendo o AVC isquêmico mais freqüente do que o hemorrágico (www.strokecenter.org). O AVC isquêmico pode levar a uma isquemia focal ou global. A isquemia focal pode ocorrer pela oclusão de uma artéria cerebral, como a artéria cerebral média, gerando uma lesão delimitada à região do cérebro que aquela artéria irrigava. Na isquemia focal, há um centro na lesão onde o fluxo sanguíneo é praticamente nulo, e uma região na periferia da lesão, onde ainda existe algum fluxo sanguíneo, devido à irrigação colateral. Essa região se chama penumbra isquêmica (OBRENOVITCH, 1995). Diferentemente, na isquemia global ocorre uma diminuição do fluxo cerebral por todo o cérebro, como, por exemplo, após uma parada cardiorrespiratória, causando morte neuronal seletiva de certas populações de neurônios mais vulneráveis, como os neurônios piramidais da camada CA1 do hipocampo (KOKAIA E LIDVALL., 2003). Essa injúria pode ser causada pela oclusão da coronária, por uma hemorragia grave ou perda da função cardíaca.

O AVC hemorrágico ocorre quando há o rompimento de um vaso sanguíneo cerebral, o qual impediria a distribuição adequada do fluxo sanguíneo para o cérebro, além de causar danos no tecido devido ao extravasamento do sangue.

A isquemia global em roedores pode ser feita através da oclusão de quatro vasos (artérias carótidas e vertebrais) ou da oclusão de somente dois vasos, normalmente as artérias carótidas. A oclusão de dois vasos gera uma isquemia moderada também chamada de oligoemia. Esse tipo de modelo de isquemia cerebral gera danos semelhantes ao observado na demência senil, quando há mudanças na vasculatura devido à idade, ou a danos gerados por parada cardíaca (PLASCHKE, 2005). Em roedores, a isquemia nesse modelo é moderada devido às irrigações colaterais em roedores, através do polígono de Willis (FARKAS ET AL., 2007) (**Figura 4B**).

1.9 Oligoemia

A oligoemia ocorre quando há uma diminuição do CBF, gerando uma hipoperfusão cerebral que não acomete a função elétrica do sistema nervoso. Essa característica difere da observada durante a isquemia cerebral onde a diminuição do CBF é mais drástica levando à perda da atividade elétrica normal dos neurônios e conseqüente efluxo de potássio no meio extracelular (OBRENOVITCH, 1995). A diminuição do CBF pode ocorrer de forma aguda durante uma parada cardíaca ou de forma crônica devido à mudança na vasculatura em idosos, estando neste caso relacionada com a demência senil (PLASCHKE, 2005; FARKAS ET AL., 2007). A hipoperfusão cerebral também agrava os déficits neurológicos observados em doenças neurodegenerativas como Alzhemer (TSUCHIYA ET AL., 1993; OHTA ET AL., 1997).

A oligoemia gera lesão cerebral branda, observada principalmente na substância branca onde ocorre a rarefação e desorganização da mielina e gliose reativa (OHTA ET AL., 1997). Se a oligoemia for crônica pode levar à morte neuronal, observada principalmente no hipocampo (OHTA ET AL., 1997; FARKAS ET AL., 2006) (**Figuras 4A e 4C**). É possível obter um bom modelo animal para se estudar a oligoemia através da oclusão bilateral permanente das carótidas comuns (BCCAO). Em ratos adultos, nos primeiros dias após a BCCAO, há uma grande diminuição no CBF, gerando isquemia cerebral global. No período seguinte, os níveis do CBF tendem a aumentar, alcançando os níveis normais após 2 ou 3 meses. Essa segunda fase é a fase de oligoemia, onde há uma hipoperfusão cerebral crônica (FARKAS ET AL., 2007).

A BCCAO leva a uma redução do CBF em torno de 60% dos níveis normais nos primeiros dias após a oclusão, sendo que em regiões específicas, como na substância branca essa diminuição pode chegar a aproximadamente 40% dos níveis normais em ratos (ULRICH ET AL., 1998; MARSHALL ET AL., 2001; OTORI ET AL., 2003). O fluxo sanguíneo começa a se regularizar devido a mecanismos compensatórios, realizados através do polígono de Willis, o qual conecta as artérias carótidas com as artérias vertebrais, permitindo que estas compensem a ausência de irrigação pelas carótidas (**Figura 4B**). Já foi demonstrado que 15 semanas após a BCCAO, há um aumento no calibre dos vasos que saem do Polígono de Willis, o que poderia indicar um desses mecanismos compensatórios para restabelecer o fluxo sanguíneo (CHOY ET AL., 2006).



Figura 4: Lesão gerada pela oligoemia e esquema representativo do Polígono de Willis (A) Imagem feita por microscopia eletrônica de axônios mielinizados intacto (figura da esquerda) e de axônios com degeneração na mielina após oligoemia (figura da direita). Modificado de Farkas et al., 2004 (B) Figura representativa do encontro das artérias carótidas com as artérias vertebrais através do Polígono de Willis, o qual permite a irrigação colateral através das artérias vertebrais quando as carótidas são ocluídas. Modificado de http://a248.e.akamai.net/7/248/847/20050308160759/www.msd.es/publicaciones/mmerck hogar/seccion 06/image s/seccion 06 36.gif. (C) Marcação com cresil violeta do hipocampo, mostrando a camada CA1 em um rato adulto normal. (D) Marcação com cresil violeta do hipocampo mostrando a degeneração neuronal em CA1 12 semanas após a oligoemia. Modificado de FARKAS ET AL., 2007.

Apesar da morte neuronal nesse modelo de oligoemia ser observada principalmente em períodos crônicos da doença, é possível observar déficit nas memórias de curta e longa duração nos primeiros dias após a oclusão (NI ET AL., 1995; SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2005; FARKAS ET AL., 2006). Essa redução deve estar relacionada à diminuição nas concentrações de ATP, devido à redução da atividade da enzima citocromo oxidase e fosfocreatina, alterações na expressão de canais de sódio/cálcio e ao aumento da formação de radiais livres (DE LA TORRE ET AL., 1997; HEIM ET AL., 2000; LU ET AL., 2002). Após 3 semanas de oligoemia, as concentrações de ATP tendem a voltar ao normal, e esse aumento está associado com a melhora na memória dos animais. Após um longo período de oligoemia, a concentração de fosfocreatina ainda está baixa, no entanto, os níveis de ATP estão normais. Nessa fase mais tardia os animais têm um déficit maior na memória de longa duração do que na de curta (para revisão ver PLASCHKE, 2005).

Um dos sistemas mais afetados pelo BCCAO é o sistema visual, devido à irrigação direta dos olhos e nervo óptico pela carótida comum interna. Para tentar observar o efeito do BCCAO na memória e aprendizado de ratos sem a influência da perda visual, Ohta e colaboradores ocluíram somente o ramo da carótida que irriga o cérebro, mantendo o ramo da carótida interna o qual irriga o sistema visual intacto. Os autores observaram que a dificuldade de aprendizado apresentada pelos animais após BCCAO se deve, em parte, à lesão no sistema visual, já que quando não era observada perda visual, os déficits cognitivos não eram tão acentuados. No entanto, os animais ainda apresentam déficits neurológicos na memória de trabalho comparado com animais normais utilizando o teste de labirinto radial (OHTA ET AL., 1997).

A rarefação na substância branca pode ser observada a partir do terceiro dia após a BCCAO no trato e nervo óptico, aumentando progressivamente nessas regiões. Trinta dias após a oclusão ela pode ser observada também em outras regiões como no corpo caloso e

cápsula interna (WAKITA ET AL., 2002). Após esse mesmo período, também é possível observar lesão axonal nessas regiões através da análise da expressão da proteína precursora amilóide, que se deposita quando há lesão axonal (WAKITA ET AL, 2002). A rarefação da substância branca pode ser conseqüência da perda de oligodendrócitos, já que foram observados oligodendrócitos em apoptose nesse modelo de oligoemia (TOMIMOTO ET AL., 2003; LEE ET AL., 2006).

Outra característica observada na oligoemia é a ativação dos astrócitos e da microglia na substância branca. A ativação da microglia foi observada 3 dias após a BCCAO e persiste até pelo menos 13 semanas no corpo caloso, cápsula interna e trato óptico (ABRAHAM E LAZAR, 2000; FARKAS ET AL., 2004). A ativação astrocitária também pode ser observada na primeira semana após a BCCAO no trato óptico e após 13 semanas no corpo caloso e cápsula interna (PAPPAS ET AL., 1996; FARKAS ET AL., 2004a, b, 2006; SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2005). No entanto, no trato óptico após 13 semanas ocorre degeneração astrocitária (FARKAS ET AL., 2004). Isso pode estar relacionado com o fato dessa região ser mais afetada pela hipoperfusão.

Apesar do modelo de BCCAO já ter sido utilizado por diversos grupos, há uma grande variabilidade no tamanho da lesão observada entre os grupos. Essa divergência pode ser justificada pelas diferenças na linhagem, idade dos animais e tipo de anestesia utilizada, entre outros. Por exemplo, a BCCAO em gerbilos gera uma lesão mais grave do que a observada em ratos, devido à ausência do polígono de Willis completo em gerbilos. A extensão da lesão após a oligoemia também varia de acordo com a idade do animal. Assim, em animais mais jovens ocorrem mudanças compensatórias na vasculatura que elevam o fluxo sanguíneo ao normal em algumas semanas, o que poderia justificar o fato desses animais não apresentarem danos progressivos no tecido, enquanto ratos de meia idade já apresentam lesões no

hipocampo duas semanas após serem submetidos à BCCAO (PAPPAS ET AL., 1996; BENNETT ET AL., 1998; OTORI ET AL., 2003; SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2005).

As alterações observadas após a oligoemia demonstram que essa lesão atinge principalmente os oligodendrócitos, mas também gera estresse neuronal. Dessa forma, terapias para esse tipo de insulto devem visar, não só a recuperação dos circuitos neuronais perdidos, como a recuperação das células de glia que ajudam a manter esses circuitos e a condução de sinais por eles.

1.10 Neurogênese após isquemia cerebral

Como foi dito anteriormente, a isquemia cerebral é capaz de estimular a neurogênese tanto na SVZ como no hipocampo. Diferentes modelos de isquemia cerebral, apesar de atingirem regiões distintas no cérebro, são capazes de induzir o aumento da neurogênese, como na isquemia global e na isquemia focal pela oclusão da artéria cerebral média (KEE ET AL., 2001; TAKASAWA ET AL., 2002). Esse aumento após isquemia foi observado inclusive em humanos (MACAS ET AL., 2006; MARTÍ-FÀBREGAS ET AL., 2010). O pico de proliferação celular após a isquemia focal ocorre 7 dias após o insulto, e persiste até pelo menos 21 dias (ZHANG ET AL., 2001; ZHANG ET AL., 2004).

Após a isquemia focal pela oclusão da artéria cerebral média, neuroblastos migram da SVZ para a periferia da lesão ao invés de seguirem seu caminho habitual pela RMS (ZHANG ET AL., 2001; ARVIDSSON ET AL., 2002; PARENT ET AL., 2002; JIN ET AL., 2003, ZHANG ET AL., 2004b). Os neuroblastos que migram para o estriado são em sua maioria aqueles que foram formados pelo estímulo isquêmico, porém neuroblastos que foram formados antes da isquemia também são recrutados para a área de lesão (ARVIDSSON ET AL., 2002). Após a isquemia focal, é possível observar que alguns desses novos neurônios sobrevivem na periferia da lesão e se integram ao tecido fazendo sinapses com células vizinhas (YAMASHITA ET AL., 2006). Outro grupo observou que cinco semanas após a isquemia cerca de 42% das novas células formadas são positivas para DARPP-32, marcador específico de neurônios estriatais, demonstrando que os novos neurônios formados, além de migrarem para a área de lesão, se diferenciaram no tipo neuronal adequado (ARVIDSSON ET AL., 2002; PARENT ET AL., 2002). Kokaia e colaboradores demonstraram que ainda há migração de novos neurônios formados na SVZ para o estriado 1 ano após a isquemia, apesar de não ser mais observado diferença na taxa de proliferação na SVZ (KOKAIA ET AL., 2006). Embora exista a possibilidade de novos neurônios se estabelecerem na área lesada, a maioria dos novos neurônios estriatais formados morrem duas a cinco semanas após a isquemia, sendo repostos somente 0,2% dos neurônios perdidos (PARENT ET AL., 2002). Dessa forma, o aumento da neurogênese após a lesão isquêmica demonstra uma tentativa do SNC em recuperar os neurônios perdidos na lesão, no entanto, ainda é necessário estudar uma maneira de estimular a adequada sobrevivência e integração destes.

Apesar do aumento na neurogênese após a isquemia cerebral não ser suficiente para recuperar a lesão, quando há um pré-condicionamento à isquemia, a lesão resultante é menor ou até mesmo nula. O pré-condicionamento ocorre quando há um breve episódio de isquemia e reperfusão, o qual não é suficiente para gerar morte neuronal, antes do episódio isquêmico prolongado. Mesmo não gerando lesão cerebral, o pré-condicionamento é capaz de estimular a neurogênese (JIN ET AL., 2001; MAYSAMI ET AL., 2008). Esse aumento parece estar relacionado com o papel protetor do pré-condicionamento, já que matando seletivamente as células progenitoras neurais, não é mais observado esse efeito protetor (MAYSAMI ET AL., 2008).

Ainda não se sabe exatamente quais são os fatores liberados pelo insulto isquêmico que estariam levando ao aumento da proliferação celular. Evidências demonstraram que o FGF-2

e o fator de células tronco (SCF) são candidatos em potencial, já que estão em maior concentração no meio de cultura coletado de culturas de neurônios corticais de murinos, após hipóxia (JIN ET AL., 2002a). In vivo foi observado o aumento no número de células que expressam c-kit, receptor para o SCF, em animais isquêmicos; e a infusão do SCF no VL de animais adultos induz o aumento da proliferação celular (JIN ET AL., 2002a). A migração dos novos neurônios formados para a periferia da lesão foi relacionada com a expressão do fator derivado de célula estomal -1 (SDF-1) e angiopoetina 1 (Ang 1) pelas células endoteliais. Após a isquemia cerebral, há aumento da expressão dessas moléculas na região peri-infarto. Os neuroblastos migram para o local da lesão associados com vasos sanguíneos e para regiões onde há remodelamento vascular após a isquemia cerebral (OHAB ET AL., 2006; YAMASHITA ET AL., 2006). Kokaia e colaboradores também demonstraram a importância do SDF-1 na migração dos neuroblastos para a área de lesão. Eles observaram que o SDF-1 estava sendo expresso em astrócitos reativos na região lesada até 16 semanas após a isquemia, e seu receptor CXCR4 é expresso pelas NSCs da SVZ. Utilizando um bloqueador desse receptor eles observaram redução na migração dos neuroblastos para a área de lesão (KOKAIA ET AL., 2006). Provavelmente, esses não são os únicos fatores envolvidos nesse processo.

A migração dos novos neurônios também pode ser facilitada por outros tipos celulares, como por exemplo, pelas células RGL. Já foi demonstrado que após lesão cortical, alguns astrócitos apresentam transitoriamente prolongamentos radiais sobre os quais neuroblastos embrionários transplantados próximo à lesão migram para esta (LEAVITT ET AL., 1999). A identificação de fatores que atraiam novos neurônios para a lesão, e principalmente que estimulem a sobrevivência e integração deles no tecido lesado é de extrema importância para alcançar uma terapia eficaz no tratamento de pacientes isquêmicos. A terapia celular tem surgido como uma grande promessa no tratamento de doenças do SNC, principalmente a

terapia com células de medula óssea (MO) que são capazes de migrar para a região de lesão e liberar diversos fatores tróficos importantes para a recuperação da mesma, como será descrito no próximo item.

1.11 Terapia celular - Células de medula óssea

Atualmente não existem terapias eficazes para a recuperação de pacientes que sofreram AVC. Os métodos disponíveis, como os trombolíticos, só são eficazes se o paciente chegar ao hospital até 3 horas após o início do insulto (HAAS ET AL., 2005). Uma nova perspectiva no tratamento de isquemias cerebrais são as terapias celulares. Devido à capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares, muitos grupos têm estudado, nas últimas décadas, o potencial das células-tronco como terapia para diversos tipos de injúrias. As células-tronco embrionárias são pluripotentes, sendo capazes de se diferenciar em células dos 3 folhetos germinativos. No entanto, a utilização de células-tronco embrionárias está sendo bastante discutida devido, não só às questões éticas, como pelo potencial carcinogênico observado após a utilização dessas células. Portanto, ainda são necessários mais estudos utilizando as células-tronco embrionárias em modelos animais, antes dessas células serem utilizadas em testes clínicos. Já a terapia celular com células-tronco adultas têm se mostrado segura e eficaz em diversos modelos de lesão no sistema nervoso (ANKENY ET AL., 2004; SCHWARTING ET AL., 2008; PIMENTEL-COELHO ET AL., 2009; RIBEIRO-RESENDE ET AL., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). As células-tronco de MO, por exemplo, são boas candidatas para terapia celular pela facilidade de obtenção, por poderem ser utilizadas autologamente e por terem baixa taxa de proliferação e diferenciação limitada sendo, portanto, improváveis causas de tumores pós-transplantes. Dessa forma, esse estudo vai se focar no efeito da terapia de células de MO no SNC.

Na MO existem, pelo menos, 2 tipos de células-tronco bem caracterizadas: as célulastronco hematopoiéticas (HSC), dão origem a toda linhagem linfóide e mielóide (FUCHS E SEGRE, 2000) e as células-tronco mesenquimais (MSC), que servem de suporte à hematopoiese intramedular, além de formarem osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI ET AL., 2006) (**Figura 5**). Esses 2 tipos podem ser obtidos a partir da fração de células mononucleares extraídas da MO. Estima-se que 0,001% a 0,01% das células obtidas a partir da fração mononuclear possuí característica de MSCs (PITTENGER ET AL., 1999). As HSCs constituem aproximadamente 0,0001% das células presentes na MO (ORKIN, 2000; WEISSMAN ET AL., 2001).



Figura 5: Esquema representativo das populações presentes na MO. Na MO existem pelo menos dois tipos de células-tronco bem caracterizados, as células-tronco hematopoiéticas (HSC) e as células-tronco mesenquimais (MSC) ou estromais. As HSCs são capazes de gerar todas as células das linhagens linfóide e mielóide. As MSCs dão suporte à hematopoiese e formam as células do tecido conjuntivo da medula, como osteócitos, condrócitos e adipócitos (THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001).

É possível diferenciar as HSCs das MSCs utilizando-se um painel de marcadores positivos e negativos específicos para cada uma dessas populações, através da capacidade de diferenciação de cada população de células-tronco ou devido às características dessas células quando colocadas em cultura. As MSCs em cultura, diferentemente das HSCs, são capazes de aderir ao plástico e se expandir, podendo ser passadas até pelo menos 50 vezes mantendo-se indiferenciada (DEVINE ET AL., 2003). Os marcadores conhecidos utilizados para selecionar as HSCs são: CD11b⁻, CD34^{-/low}, SCA-1⁺, CD117⁺, e CD45⁺ (TARNOK ET AL., 2010). Já as MSCs são positivas para CD44, CD106, CD29, CD90 e negativas para CD45, CD34 e CD11b (BOBIS ET AL., 2006; DOMINICI ET AL., 2006; KARAOZ ET AL., 2009).

Tanto as HSC como as MSC já foram utilizadas em modelos animais de doenças neurogedenerativas, e na isquemia cerebral (LI ET AL., 2006; SCHWARTING ET AL., 2008; GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). O transplante dessas células levou à melhora funcional, e em alguns casos, à diminuição da área de lesão (IIHOSHI ET AL., 2004). O efeito obtido pelo transplante de células de MO pode ser observado se essas células forem transplantadas tanto intravenosamente como diretamente no SNC (CHEN ET AL., 2001a; CHEN ET AL., 2001b; IIHOSHI ET AL., 2004; GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009; de VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). A barreira hemato-encefálica torna-se permeável a partir de 3h após a isquemia focal, possibilitando a entrada das células de MO no cérebro (HATASHITA E HOFF, 1990). Porém, diversos grupos têm estudado a janela terapêutica para a administração intravenosa das células em diferentes modelos de isquemia cerebral. Em modelo de isquemia focal da artéria cerebral média foi observado que até 1 mês após o insulto, as MSCs ainda são capazes de gerar melhora funcional quando injetadas intravenosamente (SHEN ET AL., 2007). No entanto, no caso da isquemia por termocoagulação, as células de MO só levam à melhora funcional quando injetadas até 7 dias depois da lesão (DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). Quando injetadas intravenosamente, as células de MO seriam atraídas para o local da lesão possivelmente pela liberação de SDF-1 nessa região. Já foi demonstrado que após hipóxia-isquemia cerebral neonatal em roedores e transplante periférico de células mononucleraes de cordão umbilical humano, os astrócitos presentes na região da lesão expressam SDF-1, e este fator é responsável pelo recrutamento de células do cordão umbilical para a região de lesão (ROSENKRANZ ET AL., 2009). O SDF-1 continua sendo expresso até 1 mês após a isquemia em roedores (HILL ET AL., 2004; IMITOLA ET AL., 2004). Após esse período, para tentar alguma terapia celular, uma estratégia interessante seria injetar as células diretamente no SNC. No entanto, já foi observado que as células de MO migram para região isquêmica em pacientes que sofreram isquemia cerebral pela oclusão da artéria cerebral, mesmo quando o transplante intra-arterial é feito 82 dias após a isquemia (BARBOSA DA FONSECA ET AL., 2010),

Na MO, além das HSCs e MSCs, é possível que os outros tipos celulares também ar atuem a favor da recuperação da área lesada. Por exemplo, já foi demonstrado que, após esmagamento do nervo óptico, quando também há lesão no cristalino, os macrófagos são atraídos para essa região e liberam fatores tróficos que estimulam a sobrevivência e extensão axonal das células ganglionares da retina, contribuindo para a regeneração no nervo lesado (LEON ET AL., 2000; CUI ET AL., 2009). Outro grupo também observou que os linfócitos T regulatórios são neuroprotetores em um modelo de isquemia focal. Nesse caso, através da liberação de IL-10, os linfócitos T inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo os danos causados pela inflamação (LIESZ ET AL., 2009).

Em humanos, testes clínicos utilizando terapia com células de MO em pacientes que sofreram AVC já começaram a ser realizados. No entanto, a maioria desses ensaios clínicos ainda está em fase I, ou seja, estudando a viabilidade e a segurança do método. Um dos estudos mais avançados foi realizado na Coréia do Sul, onde pacientes com oclusão da artéria cerebral média receberam transplante de MSCs intravenosamente, após cuidadosa expansão dessas células em cultura. Esses pacientes apresentaram mudanças no quadro neurológico com melhora funcional após 1 ano quando, comparado ao grupo controle (BANG ET AL., 2005). No Brasil, pacientes com isquemia no território da artéria cerebral média, receberam células mononucleares de MO na área cerebral afetada através de cateterismo entre 3 e 10 dias após a isquemia. O procedimento demonstrou ser seguro, e nenhum dos pacientes apresentou piora no quadro clínico (MENDONÇA ET AL., 2006). Em alguns casos, as células de MO foram previamente marcadas com um traçador radioativo, o tecnécio 99m, para avaliar sua distribuição. As células transplantadas foram encontradas preferencialmente na área de lesão 2 a 48 horas após a isquemia (CORREA ET AL., 2007; BARBOSA DA FONSECA ET AL., 2009; BARBOSA DA FONSECA ET AL., 2010).

Muitos grupos têm estudado qual seria o mecanismo pelo qual as células da MO levariam à melhora funcional após diferentes tipos de lesões, como é observado no caso da terapia em modelos animais com isquemia cerebral. Primeiramente, foi discutido a capacidade das células-tronco da MO em regenerar o tecido lesado, se transdiferenciando em células do sistema nervoso, como neurônios. Alguns grupos demonstraram *in vitro* (WOODBURY ET AL., 2000; SANCHEZ-RAMOS ET AL., 2000; KOHYAMA ET AL., 2001; KABOS ET AL., 2002) e *in vivo* (BRAZELTON ET AL., 2000; MEZEY E CHANDROSS, 2000; PRILLER ET AL., 2001) que as HSC e MSC são capazes de se diferenciar em neurônios e células da glia. No entanto, esses trabalhos, *in vitro*, foram criticados por não mostrarem análises funcionais dessas células. Recentemente, foi demonstrado que as MSCs em cultura, quando estimuladas a se diferenciar em neurônios, apesar de expressar marcadores específicos e apresentando morfologia semelhante a de neurônios, não possuem potencial de ação, não sendo, portanto, funcionais (BARNABÉ ET AL., 2009). *In vivo*, a capacidade de transdiferenciação das células da medula também foi questionada, devido à possibilidade

dessas células entrarem em fusão com as células do hospedeiro (TERADA ET AL., 2002; YING ET AL., 2002). Essa fusão traria uma conclusão errônea de que as células transplantadas teriam o potencial de se diferenciarem em células do tecido alvo do hospedeiro. Dessa forma, é improvável que as células de MO sejam capazes de se transdiferenciar em células do SNC e, assim, regenerar a área lesada.

Uma hipótese bastante discutida atualmente é de que as células da MO liberem fatores tróficos que poderiam contribuir para a neuroproteção e/ou regeneração do tecido lesado. Nesse caso, os fatores liberados por essas células diminuiriam a apoptose, diminuindo a inflamação causada pela lesão, estimulando a sinaptogênese e neuritogênese dos neurônios sobreviventes, e/ou estimulando a proliferação, migração e diferenciação das NSCs do próprio animal a regenerarem a área de lesão. De acordo com essa hipótese, alguns trabalhos foram publicados, demonstrando a capacidade das células de MO em influenciar essas diferentes vias contribuindo, então, para a recuperação funcional observada após a isquemia cerebral. Foi demonstrado, por exemplo, que animais que receberam transplante de MSCs após isquemia focal apresentam uma menor cicatriz glial e menor ativação da microglia (LI ET AL., 2005). Em outro trabalho, foi observado que o transplante de células de MO 1 dia após isquemia global transitória diminuiu a ativação de 10% dos genes induzidos pela isquemia. A maioria desses genes está relacionada com inflamação e resposta imune, demonstrando que o efeito benéfico da terapia com células de MO pode estar relacionado com a diminuição da inflamação gerada pela lesão (OHTAKI ET AL., 2008). O transplante intravenoso das MSCs em animais que sofreram isquemia focal também estimula a proliferação das células da SVZ do lado ipsilateral à lesão. Na mesma região é observado o aumento na expressão de FGF-2, podendo indicar que as células de MO estimulam a expressão desse fator pelas células do hospedeiro (CHEN ET AL., 2003). O transplante de MSCs também é capaz de estimular a neurogênese no hipocampo, quando transplantadas diretamente nessa região. Os novos neurônios formados sobreviveram, sendo capazes de se integrar no tecido (MUNOZ ET AL., 2005). Portanto, o estímulo da proliferação, migração e sobrevivência dos novos neurônios formados pelas NSCs pode auxiliar significativamente a regeneração de tecidos lesados após diferentes tipos de insultos isquêmicos, por exemplo.

Já foi demonstrado que as células de MO expressam alguns fatores tróficos/de crescimento que podem ser os responsáveis pela neuroproteção observada, como o FGF-2, o BDNF, o fator de crescimento de nervo (NGF), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e VEGF (CHEN ET AL., 2002). A expressão de alguns desses fatores, como BDNF e VEGF ainda é exacerbada quando essas células são estimuladas por citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), ou quando são cultivadas com extrato de cérebro isquêmico (CHEN ET AL., 2002; WANG ET AL., 2006). In vivo, foi observado que o transplante intravenoso de MSCs em animais que sofreram isquemia global transitória foi capaz de induzir o aumento nos níveis de BDNF no hipocampo. Nesse trabalho, o aumento de BDNF foi correlacionado com a diminuição da apoptose nos neurônios em CA1 e melhora funcional nos animais que receberam o transplante (ZHENG ET AL., 2009). O BDNF, um dos fatores neurotróficos mais expressos no SNC, tem ação anti-apoptótica conhecida e é capaz de gerar neuroproteção após isquemia cerebral quando injetado intravenenosamente (SCHABITZ ET AL., 2000). Outros fatores tróficos, como o fator de crescimento derivado de glia (GDNF), NGF, EGF e FGF-2, também limitam o volume de lesão após isquemia (HIROUCHI E UKAI, 2002 apud IIHOSHI ET AL., 2004). Os fatores liberados pelas células de MO poderiam estar estimulando também a formação de novos vasos sanguíneos o que impediria o aumento da área de lesão isquêmica. Foi observado que as células de MO liberam fatores angiogênicos, como o VEGF e FGF-2, fortalecendo essa hipótese (HAMANO ET AL., 2000).

Portanto, de acordo com o que foi descrito anteriormente, a terapia com células de MO seria uma boa alternativa para o tratamento de lesões cerebrais, como a isquemia cerebral. A liberação de diferentes fatores que poderiam agir em sinergia poderia atuar de diferentes formas promovendo neuroproteção e regeneração do tecido lesado. Uma possibilidade é de que as células de MO poderiam estar agindo sobre as NSCs do animal na tentativa de estimular a proliferação, migração e diferenciação dessas células contribuindo para a regeneração do tecido lesado. A diferenciação das NSCs em células RG, por exemplo, pode ajudar os novos neurônios formados na SVZ a migrar para a região de lesão. Dessa forma, esse estudo irá se focar na capacidade das células de MO em influenciar as NSCs em modelo de isquemia moderada.

2. Objetivos:

Objetivo geral:

Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as células RGL ao redor do VL de ratos adultos e analisar a influência de estímulos externos no número de células RGL e na proliferação das NSCs nas regiões neurogênicas em ratos adultos.

Objetivos específicos:

- Caracterizar as células com prolongamentos radial ao redor do VL de ratos adultos;

- Analisar a influência da isquemia global e do transplante de células de MO no número de células RGL na SVZ e SGZ;

- Analisar a influência da isquemia global e do transplante de células de MO na proliferação das células da SVZ e SGZ em ratos adultos;

- Analisar a influência da isquemia focal no número de células RGL na SVZ;

- Analisar os níveis de diferentes fatores de crescimento na SVZ após isquemia global e transplante de células de MO.

3. Material e Métodos:

3.1 Animais

Nesse estudo foram utilizados ratos machos adultos entre 3 e 7 meses da variedade Lister-Hooded (260-300g). Esses animais foram fornecidos pelo biotério do Programa de Terapia Celular e Bioengenharia do IBCCF e foram utilizados seguindo os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais - CEUA (número de referência DAHEICB 051 e DAHEICB 076).

3.2 Isquemia cerebral global

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (5mg/kg) (Vetbrands) e cloridrato de cetamina (50mg/kg) (Vetbrands) através de uma injeção intraperitoneal. Os animais foram, então, submetidos a uma incisão longitudinal na linha média no pescoço de aproximadamente 1 cm. Após divulsionar a musculatura do pescoço, as carótidas comuns foram cuidadosamente isoladas. Para interromper o fluxo sanguíneo completamente, as carótidas comuns foram amarradas em dois pontos com uma linha de algodão, para posterior transecção entre esses pontos sem risco de sangramento (**Figura 6A**). Ao final do procedimento, os animais foram suturados e mantidos sob aquecimento até a recuperação da anestesia. Os animais do grupo falso-operados foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima, sem haver a oclusão ou a transecção das carótidas comuns.

3.3 Isquemia cerebral focal

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (5mg/Kg) e cloridrato de cetamina (50mg/kg). A cabeça dos animais foi imobilizada no aparelho estereotáxico (Insight), e foi feita uma incisão na pele e aponeuroses para a exposição do crânio. Uma craniotomia foi efetuada para expor o córtex sensoriomotor do hemisfério cerebral esquerdo nas seguintes coordenadas estereotáxicas: eixo ântero-posterior, de +2,0mm a -6,0mm do Bregma e 2,0mm lateral em relação à linha média (PAXINOS E WATSON, 1986). Os vasos sanguíneos foram cauterizados com um ferro de solda (40W, 450-550°C) montado verticalmente em um manipulador e que era aproximado cuidadosamente do hemisfério cerebral, tomando cuidado para não atingir a dura-máter (**Figura 6B**). Após o final da cauterização, a pele foi suturada e os animais foram mantidos sob aquecimento até a recuperação da anestesia (DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010).



Figura 6: Esquemas representativos dos procedimentos de oclusão das carótidas e termocoagulação dos vasos do córtex sensoriomotor (A) Desenho esquemático demonstrando o modelo de oligoemia feito através da oclusão bilateral das carótidas comuns. As duas artérias carótidas são isoladas e amarradas em dois pontos com linha de algodão para posterior transecção entre esses pontos como pode ser observado no *box* em destaque. Modificado de (THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001). (B) Desenho esquemático do modelo de isquemia focal por termocoagulação, demonstrando os vasos do córtex sensoriomotor que são cauterizados com uma sonda aquecida. Esse procedimento é realizado em somente um hemisfério cerebral.

3.4 Isolamento das células mononucleares da MO

Ratos Lister-Hooded adultos foram anestesiados para posterior sacrifício por deslocamento cervical. O fêmur e a tíbia desses animais foram, então, dissecados em ambiente estéril. Após retirar toda a musculatura que envolve os ossos, uma das epífises dos mesmos foi retirada e os ossos foram colocados com a extremidade aberta para baixo dentro de um tubo de 15ml. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 300xg, permitindo a saída da MO de dentro do fêmures e da tíbia. O material obtido foi homogeneizado e ressuspendido em meio DMEM F12 (Invitrogen) e então submetido a um gradiente de Histopaque 1083 (Sigma), em uma proporção de 1:2. Essa mistura foi, então, centrifugada por 30 minutos a 800xg. Após esse período, foi formada uma interface entre o Histopaque e o meio de cultura, onde estão presentes as células mononucleares. Essas células foram, então, recolhidas e lavadas 3x com salina tamponada em tampão fosfato 10mM (PBS - NaCl 0,13M, Na₂HPO₄.7H₂O0,007 M e NaH₂PO₄0,003M) centrifugando as amostras a 300xg para a retirada de qualquer resíduo de Histopaque remanescente. Transplantaram-se 2 x 10⁷ células mononucleares por animal isquêmico ou falso-operados. O transplante era sempre realizado 24 horas após a cirurgia de oclusão das carótidas. Para o transplante, as células foram injetadas em um volume de 400µl de solução salina pela veia da cauda com uma seringa 27,5 G ½.

3.5 Marcação das células de MO

Para que as células de MO possam ser visualizadas após o transplante, elas foram marcadas através de 2 protocolos. No primeiro, as células foram coradas com *Cell Trace*TM Far Red DDAO-SE (Molecular Probes), um traçador fluorescente que permanece nas células

por um longo período de tempo, permitindo a visualização das mesmas após o transplante. Para isso, as células foram incubadas em uma solução de *Cell Trace* 1:1000, diluído em meio DMEM F-12 e foram mantidas na estufa com mistura de ar/CO₂ (95%/5%) a 37°C, por 40 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3x em PBS e centrifugadas a 300xg por 5 minutos.

No segundo protocolo, as células de MO foram marcadas com o traçador radioativo tecnécio 99m. Para isso, as células mononucleares foram incubadas em uma solução de cloreto estanoso (12µg/ml) por 10 minutos. O tecnécio 99m foi adicionado à solução anterior e as células foram incubadas por mais 10 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas em solução salina 0,9%. A detecção dessa marcação foi visualizada com a câmera Millennium GE (General Electric Medical Systems), portanto, sem que haja a necessidade do sacrifício do animal. No entanto, devido ao rápido decaimento do tecnécio (~6 horas), a visualização das células de MO só pode ser feita nas primeiras 24 horas após o transplante.

3.6 Análise das células mononucleares por citometria de fluxo

Para identificar a população de células de MO que transplantamos, antes da injeção, parte das células de MO foi separada e incubada por 20 minutos com os seguintes anticorpos: anti-CD11b/c-FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Invitrogen), anti-CD29-FITC, anti-CD45-ficoeritrina-cianina (PE-Cy5) e CD90-PE (BD Biosciences). Na **Tabela 2** estão descritos os tipos celulares que cada um desses anticorpos reconhece (*PathologyOutlines.com*). Após a incubação, as células foram fixadas com solução de lise (BD *Lysing Solution*, BD Biosciences) e, posteriormente, lavadas com PBS antes de serem analisadas no citômetro. Todos os anticorpos foram diluídos 1:100 em PBS. A análise dos dados foi feita através do programa *Infinicyt* 1.2 (Cytognos).

Antígeno	Outras	Tipo celular em que é expresso			
	nomenclaturas				
CD11b	Integrina alfa M,	Prómielócitos, granulócitos, macrófagos,			
	Mac 1	células natural killer			
CD29	Integrina beta 1	Fibroblastos, plaquetas, células T,			
		monócitos, mastócitos, células epiteliais			
CD45	Antígeno comum de	Células hematopoiéticas, exceto eritrócito.			
	leucócitos (LCA)				
CD90	Thy1	HSCs, MSCs, neurônios, fibroblastos e			
		tecido conjuntivo			

Tabela 2: Marcadores utilizados para a caracterização da população de células mononucleares injetadas. Descrição dos tipos células que expressam cada um desses antígenos (*PathologyOutlines.com*).

3.7 Injeções de BrdU

No primeiro protocolo de avaliação de proliferação, os animais submetidos à cirurgia e os falso-operados, receberam injeções intraperitoneais de bromodesoxiuridina (BrdU) diluído em NaOH 1N em salina 0,9% (50mg/Kg) (Sigma) por 7 dias consecutivos, a partir do dia da cirurgia, em intervalos de 24 horas.



Alternativamente, foram administradas quatro injeções intraperitoneais de BrdU (50mg/Kg) com um intervalo de 3 horas, no sexto dia após cirurgia. Os animais foram sacrificados no dia seguinte às injeções o que corresponde ao sétimo dia após a cirurgia.



3.8 Perfusão e criocortes:

Três, sete ou vinte e um dias após a cirurgia os animais foram perfundidos. Para isso, o sangue do animal foi, primeiramente, substituído por solução salina e, posteriormente, o animal foi perfundido com 4% de paraformaldeído diluído em tampão fosfato (5,28g de Na₂PO₄.H₂O e 28,63g de Na₂HPO₄.2H₂O) por 30 minutos e 4% de paraformaldeído com 10% de sacarose por 10 minutos. A perfusão foi realizada injetando a salina ou o fixador através de uma cânula posicionada no ventrículo direito e acoplada a uma bomba peristáltica. Uma abertura foi feita na aurícula esquerda para permitir a saída dos fluidos. Os cérebros dos animais foram retirados e pós-fixados por 1 hora em paraformaldeído 4% com 10% de sacarose. Posteriormente, os cérebros foram transferidos para uma solução de tampão fosfato com 20% de sacarose até descerem ao fundo do frasco. Em seguida, a solução foi trocada para tampão fosfato com 30% de sacarose, permitindo a saída de água do tecido e a crioproteção. Os cérebros foram, então, emblocados em resina OCT (do inglês *optimal cutting temperature*) e cortados em criostato (Leica) no plano coronal com 20µm ou 60 µm de espessura. Em alguns casos, o cérebro dos animais foi processado no víbratomo para obtenção de cortes coronais com 200µm de espessura.

3.9 Imuno-histoquímica:

Para o procedimento imuno-histoquímico, os cortes foram primeiramente lavados com PBS pH 7,4 adicionado de Triton X-100 a 0,3% (Sigma), e então foram pré-incubados por 30 minutos com 5% de soro normal de cabra (NGS – Sigma) para bloqueio de sítios inespecíficos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C, com anticorpos primários contra diversos antígenos (**Tabela 3**).

Anticorpo	Antígeno	Características	Diluição	Fornecedor	Metodologia
		imunogênicas			
Anti-α-tubulina	α-Tubulina	Camundongo	1:40000	Sigma	Western-Blotting
Anti-BrdU	BrdU	Rato monoclonal	1:100	Abcam	Imuno-histoquímica
Anti-DCX	Doublecortina	Cobaia polyclonal	1:1000	Chemicon	Imuno-histoquímica
Anti-GFAP	GFAP	Coelho polyclonal	1:500	Dako	Imuno-histoquímica
Anti-GLAST	GLAST	Cobaia polyclonal	1:100	Chemicon	Imuno-histoquímica
Anti-Ki67	Ki67	Coelho monoclonal	1:500	Abcam	Imuno-histoquímica
Anti-Laminina	Laminina	Coelho polyclonal	1:40	Sigma	Imuno-histoquímica
Anti-MBP	MBP	Rato monoclonal	1:3000	Abcam	Western-Blotting
Anti-Pax6	Pax6	Coelho policlonal	1:500	Abcam	Imuno-histoquímica
Anti-vimentina	Vimentina	Camundongo	1:200	Chemicon	Imuno-histoquímica
		monoclonal			
Anti-vimentina	Vimentina	Camundongo	1:200	Hibridoma	Imuno-histoquímica
		monoclonal		Bank	

Tabela 3: Anticorpos primários utilizados nesse trabalho tanto nas reações de imunohistoquímicas como para *Western Blotting*. Os cortes foram, então, lavados 3x em PBS ou PBS + Triton 0,3% e incubados com os anticorpos secundários por 2 horas a temperatura ambiente (**Tabela 4**).

Anticorpo	Molécula	Diluição	Fornecedor
	conjugada		
Anti-IgG coelho	Alexa 488	1:200	Invitrogen
Anti-IgG cobaia	Alexa 488	1:100	Invitrogen
Anti-IgG camundongo	Peroxidase	1:3000	Sigma
Anti-IgG camundongo	Alexa 488	1:200	Invitrogen
Anti-IgG camundongo	Cy3	1:1000	Jackson
Anti-IgM camundongo	Alexa 488	1:200	Invitrogen
Anti-IgM camundongo	Cy3	1:800	Jackson
Anti-IgG rato	Alexa 488	1:100	Invitrogen
Anti-IgG rato	Peroxidase	1:4000	GE Healthcare

Tabela 4: Anticorpos sencundários utilizados nas reações de imuno-histoquímica e

 Western Blotting.

Após esse procedimento, os cortes foram novamente lavados com PBS e contracorados com o corante nuclear TO-PRO-3 (Molecular Probes) na diluição de 1:1000, junto da incubação do anticorpo secundário. Após a última incubação as lâminas foram montadas com VectaShield (Vector).

3.10 Imuno-histoquímica para BrdU e Ki67:

As reações para a análise da incorporação de BrdU e para detectar o fator de transcrição Ki67 foram feitas com procedimento diferente do descrito no item 3.7 devido à localização nuclear desses antígenos. Primeiramente, os cortes foram pós-fixados em paraformaldeído 4% à 37°C por 15 minutos. Para a reação de BrdU, os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos, incubados em HCl 2N por 30 minutos e, a seguir, lavados em tampão borato 0,1M (pH 8,5) por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS com Triton 0,3% por 3 minutos. Após estas etapas que permitem a permeabilização da membrana nuclear para acesso dos anticorpos ao núcleo, seguimos o mesmo protocolo que foi utilizado para os outros antígenos, como descrito no item 3.9.

Para as reações de Ki67, os cortes foram colocados em uma solução de tampão citrato 10mM pH6.0 e, então, colocados no microondas até a solução ser aquecida à 100°C. Imediatamente após, as lâminas foram retiradas e transferidas para um recipiente contendo água destilada gelada por 5 minutos. Após esse procedimento, os cortes foram lavados 3x em PBS com Triton 0,3% por 3 minutos, pré-incubados com soro normal de cabra NGS 5% por 30 minutos e, então, seguimos como descrito no item 3.9.

3.11 Observação de lâminas e aquisição de imagens:

As lâminas foram observadas ao microcópio Zeiss Axiovert 200M da Zeiss equipado com o sistema Apotome. Foi utilizada a câmera AxioCam HRC para obtenção de imagens digitalizadas. Alternativamente, foi utilizado o microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta para obtenção de cortes ópticos de alta resolução, além de reconstruções de tecidos em 3D.

3.12 Quantificação dos prolongamentos radiais expressando vimentina e das células em proliferação na SVZ e SGZ:

Os prolongamentos expressando vimentina foram quantificados com objetiva de 40x com 0,75 de abertura numérica no microscópio Axiovert 200M (Zeiss) equipado com o sistema Apotome como descrito no item 3.11. Foram quantificados apenas os prolongamentos com mais de 80µm de comprimento. O ventrículo lateral foi dividido em 3 porções iguais ao longo do eixo ântero-posterior: região anterior, região intermédia e região posterior como exemplificado na **Figura 7B**. Quatro cortes coronais de 20µm de cada porção foram quantificados para cada animal. Nesses cortes, os VLs foram subdivididos e quantificados, separadamente, em 3 porções: parede lateral, parede medial e porção ventral (**Figura 7A**).

Os prolongamentos radiais associados aos vasos sanguíneos na parede lateral da SVZ foram quantificados no microscópio Axiovert 200 (Zeiss) utilizando a objetiva de 40x com 0,75 de abertura numérica. Foram analisados dois cortes coronais de 60µm de cada animal.

As células em proliferação foram analisadas através da imunomarcação da proteína nuclear Ki67 e análise da incorporação de BrdU. O número de células em proliferação foi também quantificado na SVZ utilizando-se o microscópio Axiovert 200 (Zeiss). Foram quantificados 4 cortes coronais de 20µm de cada região do VL por animal, sendo analisada a parede lateral e, em alguns grupos, a RMS.

Para quantificar os prolongamentos GFAP-positivos e as células Ki67-positivas no giro denteado foram analisados 12 cortes coronais de 20µm no microscópio Axiovert 200 (Zeiss). Foram considerados apenas os prolongamentos GFAP-positivos que atravessavam o giro denteado, com o corpo celular localizado na SGZ.

O teste estatístico foi realizado no programa GraphPad Prism 4 e os dados foram analisados utilizando ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison. Os valores foram considerados significativos com p≤ 0,05.


3.13 Análise de degeneração neuronal - FluoroJade C:

Para a análise da morte celular causada pelo BCCAO, foram reagidos cortes dos animais 3 dias após a cirurgia com FluoroJade C (Histo-Chem Inc.). Primeiramente os cortes foram lavados com água destilada e colocados para secar na estufa à 45° C por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas consecutivamente com álcool 100% por 1 minuto, álcool 70% por 1 minuto e água destilada por 1 minuto. As lâminas foram, então, submersas em uma solução de permanganato de potássio 0,06% em água destilada por 15 minutos, lavadas com água destilada 3 vezes por 1 minuto e incubadas com FluoraJade C 0,001% diluído em ácido acético 0,1% por 30 minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada por 1 minuto e colocadas na estufa para secar por 5-10 minutos. Por fim, Xilol (Vetec) foi utilizado para o clareamento e as lâminas foram montadas em Entellan (Merck).

3.14 Análise por Western Blotting:

Para analisar a expressão de MBP, o cérebro dos animais falso-operados e dos animais isquêmicos foi dissecado 7 dias após a cirurgia. A região do trato óptico foi isolada do restante do cérebro e processada separadamente. Os tecidos dissecados foram homogeneizados em uma solução de lise contendo: Tris HCl 20mM pH7,4; NaCl 150mM; EDTA 2mM, Triton X-100 0,2% e coquetel de inibidores de protease (1:1000 – Calbiochem).

As amostras foram centrifugadas a 13.000xg por 15 minutos à 4° C, sendo recolhidos os sobrenadantes ao final da centrifugação. A quantidade de proteínas no sobrenadante foi dosada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), para isso 5µl de cada amostra foram

diluídos em 1000µl de reagente de Bradford. Para fazer a curva padrão, foram utilizadas concentrações específicas de albumina bovina.

Para a separação eletroforética, 30µg de proteína (por amostra) foram aplicadas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e 15% de acrilamida em condições de redução como descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). As amostras foram fervidas durante 3 minutos para desnaturar as proteínas antes de serem aplicadas no gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *Rainbow Improved* (GE Healthcare). A separação eletroforética foi realizada com uma voltagem constante de 100.

A transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) foi feita sobre corrente constante de 200mA por 2 horas. Utilizamos o sistema de transferência como descrito por Towbin e colaboradores (1979). A membrana foi corada com uma solução de 0,2% de vermelho de Ponceau em 3% de ácido acético para verificar o padrão da corrida e conferir a transferência.

Para a reação de imuno-blotting, a membrana foi colocada em solução de bloqueio de PBS com 0,05% de Tween-20 (Sigma) e 5% de leite desnatado (Molico[®]) por 1 hora, para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos. Posteriormente, a membrana foi lavada 3x por 5 minutos com PBS com Tween-20 0,05% e, então, incubada por 3 horas com anticorpo primário anti-MBP diluído em PBS com Tween 0,05% e 0,1% desnatado (Molico[®]). A membrana foi, novamente, lavada e incubada com anticorpo secundário anti-rato conjugado com peroxidase por 3 horas. Após esse período, a membrana foi lavada, novamente, com PBS Tween 0,05%. Durante todo esse procedimento, a membrana foi deixada em constante agitação. A proteína de interesse foi observada após revelação por quimioluminescência, usando o kit comercial (ECL – *Chemiluminescence Luminol Reagent* – Santa Cruz). A membrana foi exposta por 10 minutos em um filme fotográfico (Amersham Biosciences). Os filmes revelados foram digitalizados e analisados no programa Image J (NIH) para determinação das densidades ópticas das bandas obtidas.

Para controle de carregamento foi utilizado o anticorpo anti-alfa tubulina e como anticorpo secundário anti-mouse.

3.15 Reação de transcrição reversa e reação em cadeia polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*):

Para a análise dos fatores de crescimento expressos na SVZ antes e depois do transplante de células de MO, a SVZ dos animais operados e falso-operados foi dissecada 3 ou 7 dias após a cirurgia. Para isso, após a retirada do cérebro da caixa craniana, esse foi colocado em uma placa de Petri sobre gelo. Os hemisférios cerebrais foram separados a partir da linha média e, com o auxílio de uma lupa, o córtex cerebral foi retirado para a visualização e posterior dissecção da SVZ. A SVZ dissecada foi colocada imediatamente em TRIzol (Invitrogen) e dissociada com o auxílio de uma pipeta.

Para a extração do RNA, as amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, posteriormente, adicionado 200µl de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas por 15 segundos e centrifugadas por 15 minutos à 4°C, 12000xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado em um novo tubo, onde foram adicionados 500µl de álcool isopropílico (Merck). As amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos à 4°C, 12000xg. O sobrenadante foi retirado e as amostras foram ressuspendidas em 10µl de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, Sigma).

A quantidade de RNA extraída das amostras foi quantificada no nanodrop nd-1000 (Thermo Scientific). Para eliminar a contaminação de DNA, 2µg de RNA foram tratados com DNAse I (Invitrogen) por 30 minutos à temperatura ambiente. Para desnaturar a DNAse, 1µl de EDTA 25mM foi adicionado e as amostras foram incubadas por 10 minutos à 65°C. Para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, foi utilizada a enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e OligodT₁₈ (IDT, Coralville, IA, USA). A reação de síntese de cDNA foi incubada por 50 minutos a 42°C e 15 minutos a 72°C. FGF-2, TGF alfa, CNTF e GAPDH foram amplificados utilizando temperatura de dissociação de 60°C. BDNF e VEGF foram amplificados utilizando temperatura de dissociação de 63° C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% e marcados com brometo de etídeo.

seqüências: Os primers utilizados possuem as seguintes **BDNF** 5'-AATGCTCACACAACACTGCCCA e 5'-GGAGGAGGGAGGGAAAGAATGT; FGF-2 5'-AGGAAGATGGACGGCTGCTG e 5'-GCCCAGTTCGTTTCAGTGCC; CNTF 5'-TGAAGACAGAAGCAAACCAGC e 5'-AGAACGGCTACAGAGGTCCC; VEGF 5'-GAGTATATCTTCAAGCCGTCCTGT e 5'-ATCTGCATAGTGACGTTGCTCTC; TGF 5 '-AACAAGTGCCCAGATTCCCACA e 5'-ACACATGCTGGCTTCTCTTCCT; GAPDH 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG e 5'-AGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCT.

3.16 Reação de PCR em tempo real

Para análise dos níveis de RNAm para GAPDH, CNTF, VEGF, TGF alfa e FGF-2 foi utilizado Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems, CA, USA). As reações foram realizadas no termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett). No protocolo para o RT-PCR utilizamos a seguinte ciclagem: 95°C por 10 minutos, 60 ciclos de 20 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Somente no caso do VEGF, utilizamos a temperatura de dissociação de 63°C. Os níveis de RNAm dos diferentes fatores foram normalizados com o níveis de RNAm de GAPDH. Os níveis de RNAm foram calculados utilizando a curva padrão com exceção do FGF-2 que foi utilizado o método $\Delta\Delta$ CT (Livak e Schmittgen, 2001). O teste estatístico foi feito no programa GraphPad Prism 4, através do teste *one-way* ANOVA não paramétrico com pós-teste Dunns.

4. Resultados

Em uma análise preliminar (durante o mestrado; GUBERT, 2006), foi observada a presença de células RGL ao redor do VL de ratos adultos. Essas células foram observadas na parede lateral, medial e porção ventral do VL, expressando vimentina, nestina e GFAP. Foi observado o aumento no número de células RGL na parede lateral do VL de animais que foram submetidos à oligoemia e posteriormente foram transplantados com células de MO pela veia da cauda. Esses resultados iniciais estimularam a continuidade desse trabalho para caracterizar melhor as células RGL ao redor do VL e a resposta das mesmas ao transplante de células de MO. Para isso, as análises iniciais foram repetidas, o número de animais analisados aumentado e novos experimentos foram feitos. Parte da caracterização inicial das células RGL ao redor do VL, juntamente com os novos resultados obtidos durante o doutorado foram publicados em 2009 na revista *Brain Research* (Anexo 1).

4.1 Caracterização das células RGL em ratos adultos normais

A maioria das células de glia radial presentes durante o desenvolvimento não permanece no cérebro adulto, porém, algumas células com morfologia radial ainda podem ser observadas no adulto em regiões neurogênicas como a SGZ e SVZ. Até o momento, as que permanecem na SVZ foram pouco estudadas, sendo importante investigar as semelhanças e diferenças entre elas e as células de glia radial presentes durante o desenvolvimento. Para analisar detalhadamente a morfologia das células RGL encontradas ao redor do VL, cortes coronais de 200µm de espessura de animais com mais de 3-4 meses foram reagidos com anticorpo anti-vimentina. A vimentina é uma proteína de citoesqueleto expressa pelas células de glia radial, astrócitos reativos e células ependimárias (PIXLEY E DE VELLIS, 1984;

HARTFUSS ET AL., 2001). No nosso estudo, foi identificado com esta técnica a presença de células RGL por toda a extensão do VL, principalmente em sua parede lateral (**Figura 8**). Os prolongamentos radiais que se direcionam ao estriado apresentam comprimentos entre 80 - 600µm de comprimento, no entanto não foi observado nenhum prolongamento que atravessasse o estriado, chegando até a pia mater, como ocorre com os prolongamentos das células de glia radial durante o desenvolvimento. Além disto, foi observado que os prolongamentos são mais espessos e ramificados próximos ao lúmen do VL (cabeça de seta) e se tornam cada vez mais finos e com menos ramificações quanto mais distantes do VL (seta) (**Figura 8B**).



Figura 8: Células RGL na parede lateral do VL. Fotomontagem, ilustrando os prolongamentos das células RGL vimentina-positivas na parede lateral de ratos adultos em um corte de 200 m. (A) Podem-se observar inúmeros prolongamentos radiais em direção ao estriado. Em B, é possível observar em maior detalhe os prolongamentos presentes no *box* amarelo. Podem-se observar prolongamentos de diferentes comprimentos, chegando até aproximadamente 600 m de comprimento (seta). Notar que os prolongamentos apresentam um diâmetro maior (cabeça de seta) e mais ramificações na região apical, próxima ao VL. Barra de calibração: 75mm. CC, corpo caloso; Es, estriado.

Além de serem observados em direção ao estriado, em cortes coronais pode-se observar prolongamentos radiais em direção ao septo (linha média) a partir da parede medial do VL e ao núcleo accumbens (**Figura 11D**). Em cortes sagitais de 20µm, pode-se observar ainda os prolongamentos radiais em direção à cápsula interna e ao caudado-putamen (**Figura 9**).

A maior parte das análises foi realizada em animais adultos jovens entre 3-4 meses de idade, no entanto é possível observar células RGL com características semelhantes a estas ao redor do VL mesmo em animais com 7 meses de idade (**Figura 10**).



Figura 9: Células RGL ao redor do VL em corte sagital (A) Fotomicrografía de um corte sagital corado com hematoxilina e eosina (Modificado de brainmaps.org). **(B)** Reconstrução tridimensional da região anterior do VL. Pode ser observada a expressão de vimentina (verde) nos prolongamentos das células RGL em direção ao caudado putamen. **(C)** Reconstrução tridimensional da região ventral do VL, onde podem ser observados prolongamentos vimentina-positivos em direção à cápsula interna. É possível observar alguns desses prolongamentos conectados a vasos sanguíneos (seta). V – vaso sanguíneo; A – anterior; D - dorsal. Barra de calibração: 50 m. Hp, hipocampo.



Figura 10: Células RGL ao redor do VL no animal com 7 meses. (A-B) Reconstrução de imagens confocais de cortes coronais demonstrando a expressão de vimentina em prolongamentos radiais das células RGL ao redor do VL em ratos com 7 meses de idade. (A) Prolongamentos radiais estendendo a partir da porção ventral do VL. É possível observar diversos prolongamentos associados a vasos sanguíneos. (B) Prolongamentos radiais na parede lateral em direção ao estriado. É possível observar forte expressão de vimentina nas células ependimárias. V – vaso. Barra de calibração: 10 μm. CC, corpo calos; Es, estriado.

Células RGL ao redor da SVZ de roedores adultos só foram anteriormente descritas na porção ventral do VL de camundongos adultos (SUNDHOLM-PETERS ET AL., 2004). Em outros artigos descritivos da SVZ, principalmente do grupo de Arturo Alvarez-Buylla, essas células nunca foram observadas, e a expressão de vimentina foi observada somente em células ependimárias e fracamente nas células do tipo B (DOETSCH ET AL., 1997). Para conseguir comparar melhor nossos resultados com os descritos anteriormente na literatura, a SVZ de ratos adultos foi analisada utilizando o anticorpo anti-vimentina clone P3U, produzido e depositado no Hibridoma Bank pelo grupo do Alvarez-Buylla e utilizado em seu trabalho descritivo da SVZ (DOETSCH ET AL., 1997). Pode-se observar que o clone P3U antivimentina não marca os prolongamentos radiais, ficando restrito principalmente às células ependimárias na porção ventral do VL (Figura 11C) e a algumas células com morfologia de astrócitos na parede lateral (Figura 11A). Comparando a marcação da vimentina com o clone V9 da Chemicon, com o clone utilizado por Alvarez-Buylla, em cortes següenciais do mesmo animal, é possível observar prolongamentos radiais vimentina-positivos na parede lateral e porção ventral do VL (Figuras 11B e 11D), demonstrando uma clara diferença de reatividade entre os dois anticorpos.



Figura 11: Marcação de vimentina ao redor do VL do mesmo animal utilizando-se diferentes anticorpos anti-vimentina. (A,C) Marcação de vimentina utilizando-se anticorpo anti-vimentina do Hybridoma-Bank clone P3U. Esse anticorpo foi utilizado pelo grupo de Alvarez-Buylla que descreveu a composição da SVZ. (A) Podem-se observar células com morfologia de astrócitos marcadas com vimentina na parede lateral. (C) Expressão de vimentina utilizando-se anticorpo da chemicon clone V9. (B) Observam-se diversos prolongamentos radiais expressando vimentina na parede lateral. (D) É possível observar a marcação de vimentina tanto nas células ependimárias como nos prolongamentos radiais na porção ventral do VL. Barra de calibração: (A-B) 20 m. (C-D) 100 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.

4.2 As células RGL do adulto apresentam características em comum com as da glia radial embrionária

O nosso grupo observou previamente que algumas células RGL expressam, além de vimentina, nestina e GFAP (Anexo 1 - GUBERT ET AL., 2009). A nestina é também expressa pelas células de glia radial embrionárias, no entanto, o GFAP é expresso principalmente por astrócitos maduros, sendo observado em células de glia radial durante o desenvolvimento em algumas espécies, como em primatas (RAKIC, 2003). Para indentificar possíveis semelhanças e/ou diferenças entre esses dois tipos celulares, a expressão de diferentes marcadores conhecidos de glia radial foi analisada primeiramente através de reações imuno-histoquímicas. Um dos marcadores utilizado foi GLAST, um transportador de glutamato presente tanto nas células de glia radial como em astrócitos imaturos. A análise da expressão de GLAST e de vimentina nos animais adultos mostrou que alguns prolongamentos radiais expressam os dois marcadores (Figura 12A). Outra molécula expressa por célula glia radial (durante o desenvolvimento) é o Pax6 (HEINS ET AL., 2002). O Pax6 é um fator de transcrição expresso pelas células de glia radial neurogênica. Analisando a expressão de vimentina e Pax6 nos adultos foi observada a co-localização desses marcadores (Figura 12B), demonstrando que as células RGL no adulto compartilham algumas características fenotípicas e, talvez até funcionais, com as células de glia radial embrionárias. É possível observar algumas células Pax6-positivas/vimentina-negativas no estriado, próximas aos prolongamentos radiais (Figura 12B). Como Pax6 também é expresso em neuroblastos no adulto, é possível que estas células que podem ser observadas no estriado sejam neuroblastos que estariam migrando sobre os prolongamentos radiais.



Figura 12: Expressão de GLAST e Pax6 nas células RGL em animais adultos. (A) Reconstrução tridimensional mostrando a expressão de vimentina (vermelho) e GLAST (verde) no prolongamento radial da célula RGL na parede lateral. Pode-se observar a típica marcação puntiforme do GLAST no prolongamento radial. (B) Expressão de vimentina (vermelho) e Pax6 (verde) na parede lateral, mostrando a co-localização desses marcadores nas células RGL (seta). Pode-se observar a típica marcação nuclear de Pax6, enquanto a vimentina está presente no citoplasma da célula. Pax 6 é expresso em progenitores neurais, inclusive na glia radial neurogênica, demonstrando a presença de diversos progenitores nessa região. Barra de calibração: (A) 8 m; (B) 10 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.

Outra característica encontrada nas células de glia radial durante o desenvolvimento é a capacidade de proliferar, podendo se auto-renovar e/ou gerar uma célula filha mais diferenciada, como um neuroblasto. Para analisar se as células RGL são capazes de proliferar, BrdU foi injetado intraperitonealmente quatro vezes com intervalo de 3 horas entre cada injeção e perfundimos os animais 24 horas depois da última injeção. Foram observadas células RGL vimentina-positivas que incorporaram BrdU (**Figura 13A**). No entanto, não foi possível quantificar o número de células RGL BrdU-positivas, devido à dificuldade de identificar o corpo celular de cada prolongamento radial que se localiza próximo ao VL, na SVZ ou na camada de células ependimárias, uma vez que as células ependimárias também expressam fortemente vimentina. Foi observada também a expressão de Ki67, outro marcador de proliferação celular, nas células RGL, confirmando a capacidade proliferativa dessas células no adulto (**Figura 13B**).



Figura 13: Células RGL proliferando na parede lateral do VL. Reconstrução tridimensional da parede lateral de ratos adultos analisando a proliferação das células RGL. (A) É possível observar células RGL vimentina-positivas (vermelho) que incorporaram BrdU (verde) (seta) na parede lateral. (B) Marcação de Ki67 (verde) e vimentina (vermelho), mostrando que algumas células RGL também expressam Ki67 (seta) na parede lateral. Barra de calibração: (A) 6 m, (B) 20 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.

Umas das características principais da glia radial durante o desenvolvimento é a sua capacidade de dar suporte à migração neuronal (RAKIC, 2003). Para verificar se as células RGL possuem essa característica, foi analisada a disposição de células DCX-positivas em relação aos prolongamentos radiais. A DCX é uma proteína expressa em neuroblastos migratórios (FRANCIS ET AL., 1999). A maioria das células DCX-positivas foi observada na SVZ e RMS e somente uma pequena porcentagem dessas células foi observada fora da SVZ, no estriado, septo e na base do VL. Alguns desses neuroblastos encontrados fora da SVZ estavam em associação com prolongamentos radiais vimentina-positivos (Figura 14A, 14C, 14D). Foram observadas tanto células individuais associadas aos prolongamentos radiais como agregados de células próximos aos prolongamentos. Algumas células co-expressando DCX e Ki67 foram observadas em associação com prolongamentos radiais, demonstrando que progenitores neuronais originados na SVZ podem estar migrando sobre os prolongamentos das células RGL (Figura 14C). No entanto, foram encontradas algumas células DCX-positivas fora da SVZ sem associação aparente com os prolongamentos radiais (Figura 14B). O número de células DCX-positivas em associação ou não com prolongamentos vimentina-positivos foram quantificadas ao redor do VL. Foi observado que essa associação não ocorre com muita freqüência, já que o número de células DCX-positivas em associação com os prolongamentos radiais é muito baixo em relação ao número de prolongamentos radiais vimentina-positivos que observamos ao redor do VL. A associação foi observada principalmente na parede lateral (Tabela 5). Esse resultado sugere que a migração radial guiada por glia não é um evento freqüente no cérebro adulto.



Figura 14: Associação das células DCX-positivas com prolongamentos radiais vimentina-positivas ao redor do VL. Expressão de DCX (verde) e vimentina (vermelho) ao redor do VL em ratos adultos. (A,C,D) Podem-se observar células DCX-positivas associadas aos prolongamentos da células RGL na parede lateral. (C) É possível notar uma célula associada a um prolongamento radial na porção ventral do VL expressando tanto DCX como Ki67 (azul) (seta). (D) Reconstrução tridimensional, onde é possível observar através de cortes ortogonais, apresentados nos boxes, a proximidade da célula DCX-positiva com o prolongamento vimentina-positivo. (B) Célula DCX-postiva sem associação evidente com os prolongamentos das células RGL na parede lateral. (A,B,D) Núcleo em azul. Barra de calibração: (A,B) 6 m; (C,D) 10 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.

	Parede lateral	Parede medial	Ventral
Prolongamentos vimentina-positivos	$26,4 \pm 7,3$	$9,23 \pm 6,2$	$12,15 \pm 3,8$
Células DCX-positivas associadas a	$1,4 \pm 0,4$	$0,09 \pm 0,2$	0.29 ± 0.3
prolongamentos vimentina-positivos			
Células DCX-positivas sem associação com	$1,3 \pm 0,5$	$0,42 \pm 0,4$	$0,39 \pm 0,4$
prolongamentos vimentina-positivos			

Tabela 5: Os valores representam o número de células RGL ou de células DCX-positivas ao redor de cada VL em cortes de 20 μ m. As células DCX-positivas foram analisadas até 300 μ m de distância da SVZ. Os dados representam a média dos valores ± SD para cada grupo (n=3).

Recentemente alguns trabalhos demonstraram a importância dos vasos sanguíneos na neurogênese na SVZ e SGZ. Foi observado, inclusive, que a maioria das células B1 emite prolongamentos para os vasos presentes na SVZ (MIRZADEH ET AL., 2008). No nosso estudo, foram observados muitos prolongamentos das células RGL em contacto com vasos sanguíneos (**Figura 15**). Para corroborar esta afirmação, os prolongamentos radiais foram marcados com vimentina e os vasos com laminina e dessa forma pôde-se observar diversos prolongamentos fazendo contacto com vasos sanguíneos (**Figura 15A**). Essa associação foi quantificada, e foi observado que 68.5% dos prolongamentos radiais vimentina-positivos se conectavam com vasos sanguíneos laminina-positivos na parede lateral do VL.



Figura 15: Associação dos prolongamentos das células RGL vimentina-positivas a vasos sanguíneos (A) Reconstrução tridimensional da região próxima à parede lateral onde pode ser observado os prolongamentos das células RGL marcados com vimentina (vermelho) fazendo contato com vasos sanguíneos marcados com laminina (verde) (setas). (B) Fotomontagem da porção ventral do VL, onde pode-se observar prolongamentos vimentina-positivos em direção aos vasos sanguíneos. Núcleos celulares em azul. Barra de calibração: (A) 20 m, (B)25 m. CC, corpo caloso; Es, estriado; V, vaso sanguíneo.

Analisando os resultados obtidos na caracterização das células RGL ao redor do VL em ratos adultos, pode-se concluir que essas células apresentam várias características em comum com a glia radial embrionária como pode ser observado na **Tabela 6**.

Característica	Célula RGL ao redor do VL	Glia radial embrionária	
Capacidade proliferativa	+	++	
Capacidade de auto-	Não se sabe	+	
renovação			
Expressão de vimentina	+++	+++	
Expressão de nestina	++	+++	
Expressão de GLAST	++	+++	
Expressão de Pax6	+	++	
Expressão de GFAP	++	-	
Capacidade de dar suporte a	+	+++	
migração neuronal			
Associação a vasos	+++	+++	
sanguíneos			
Extensão do prolongamento	+++	++	
radial (tamanho absoluto)			
Extensão do prolongamento	+	+++	
radial (tamanho relativo ao			
tamanho do cérebro)			

Tabela 6: Tabela comparativa das características presentes nas células RGL ao redor do VL de ratos adultos e a glia radial presente em ratos embrionários. + - característica pouco observada; ++ - característica observada com freqüência; +++ - característica observada com muita freqüência

4.3 Caracterização e eficiência do transplante intravenoso das células mononucleares de

MO

A terapia celular tem surgido como uma promessa para o tratamento de diversas doenças incluindo a isquemia cerebral (GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). Muitos trabalhos têm demonstrado o efeito benéfico do transplante de células de MO em animais que sofreram isquemia, no entanto, os mecanismos responsáveis por estes efeitos ainda são objeto de controvérsias. No nosso estudo, foi investigado o possível efeito de terapia celular com células de MO nas células RGL de ratos adultos. Com este objetivo, 2×10^7 células da fração mononuclear da MO foram transplantadas na veia da cauda de animais falso-operados e isquêmicos. Os animais foram, então, divididos em 4 grupos: falso-operados (FO), falso-operados transplantados com células de MO (FO + cls), isquêmicos (Isq) e isquêmicos transplantados com células de MO (Isq + cls).

As células de MO transplantadas foram caracterizadas por citometria de fluxo. Foram analisados o tamanho e granulosidade das células transplantadas conjuntamente com a expressão dos seguintes marcadores: CD29, CD90, CD45 e CD11b. A descrição de cada marcador pode ser encontrada no item 3.6 dos materiais e métodos. Foi observado que as amostras contêm, aproximadamente, 21% de linfócitos (**Figura 16A**), 55% de granulócitos (**Figura 16D**) e 15% de monócitos (**Figura 16C**). Também foi observado um total de 93% de células CD45-positivas, o que indica que a maioria das células é da linhagem hematopoiética (**Figura 16B**) (TARNOK ET AL., 2010). A população de MSCs pode ser definida pela expressão CD29 e CD90, e ausência de expressão de CD45 (BOBIS ET AL., 2006). Dessa forma, analisando a porcentagem de células mononucleares aproximadamente 6% de células CD45 foram encontradas na fração de células mononucleares aproximadamente 6% de células CD29-positivas/CD45-negativas (**Figura 16B**) A viabilidade foi analisada com iodeto de propídio (PI) e observou-se que somente cerca de 2% das células incorporou PI, demonstrando que, aproximadamente, 98% das células de MO injetadas estavam viáveis (**Figura 16F**).



Figura 16: Fenótipo das células mononucleares de MO. Análise da fração de células mononucleares de MO por citometria de fluxo. (A) Gráfico de dispersão das células, por tamanho e granulosidade. É possível observar em vermelho a população de lifócitos presentes nessa fração. (B) Marcação das células com CD29 e CD45. Aproximadamente 93% das células sao CD45-positivas, e 6% são CD29-positivas/CD45-negativas. (C) Marcação de CD11b e CD45, mostrando (em azul) que aproximadamente 15% das células são monócitos. (D) Marcação com Gran e CD45, indicando que 55% são granulócitos. (E) Expressão de CD90 e CD45, indicando que 3% são CD90-positivas/CD45-negativas. (F) Gráfico de incorporação de iodeto de propídio (vermelho), mostrando que 98% das células estavam viáveis antes do transplante. (B-E) Os quadrantes Q1 representam a marcação positiva da molécula no eixo y e negativa da molécula no eixo x. Os quadrantes Q2 representam a marcação positiva das moléculas presentes nos eixos x e y. Os quadrantes Q4 representam a marcação negativa das moléculas presentes nos eixos x.

Para confirmar que a injeção pela veia da cauda foi eficiente, as células de MO foram marcadas com um traçador radioativo, tecnécio 99m. Uma hora após a injeção verificou-se que as células se distribuíram por todo corpo do animal, chegando inclusive na região da cabeça do animal (**Figura 17A**). No entanto, a maior parte das células foi observada no figado, bexiga e baço. Dados anteriores do nosso grupo mostraram a presença de células mononucleares de MO no parênquima cerebral dos ratos 7 dias após o mesmo protocolo de lesão (GUBERT, 2006). Nesse caso, as células foram marcadas previamente com DAPI, sendo possível observar algumas células no estriado.

No presente trabalho, foi utilizado traçador fluorescente *Cell Trace* para avaliar a migração das células para o parênquima cerebral. Foram observadas células no parênquima cerebral 7 dias após a oligoemia. As células de MO distribuíram-se por todo o encéfalo, como no cerebelo (**Figura 17B**) e tálamo (**Figura 17C**). Muitas dessas células foram encontradas próximas a vasos sanguíneos (**Figura 17B**). No entanto, não foram observadas células de MO na SVZ. Esses resultados demonstram que células de MO são capazes de penetrar no parênquima cerebral quando injetadas intravenosamente 24 horas após isquemia.



Figura 17: Distribuição das células de MO após o transplante intravenoso nos animais isquêmicos. (A) Análise na distribuição das células de MO uma hora após o transplante pela veia da cauda. As células foram previamente marcadas com tecnécio 99m. Pode-se observar que a maioria das células migrou para órgãos periféricos, como figado e baço, mas algumas circulavam também pela região da cabeça. (B,C) Seis dias após o transplante de MO, podem-se observar as células de MO marcadas com o traçador fluorescente, *Cell Trace* (vermelho) dentro do parênquima cerebral. (B) As células de MO podem ser observadas no cerebelo próxima a vasos sanguíneos. (C) Células de MO no tálamo. Núcleo em azul. Barra de calibração: (A) 20 m, (B) 40 m. V, vaso sanguíneo.

4.4 Caracterização da lesão após oligoemia

A oligoemia é caracterizada por uma hipoperfusão cerebral global que gera degeneração principalmente na substância branca e, pouca ou nenhuma, morte neuronal (FARKAS ET AL., 2007). Para induzir a oligoemia, as carótidas comuns de ratos Lister-Hooded adultos foram ocluídas bilateralmente e permanentemente. Apesar de ser considerada uma isquemia cerebral branda, após o procedimento cirúrgico, a maioria dos animais apresentava perda significativa de peso e dificilmente sobrevida maior que 10 dias após a isquemia.

Outra característica bem marcante nesse modelo é a degeneração do sistema visual. Os olhos são irrigados por um ramo da carótida interna, dessa forma, após a oclusão das carótidas comuns, a irrigação sanguínea para essa região é anulada levando à degeneração das células da retina. Analisando o trato óptico com o marcador de degeneração neuronal, FluoroJade C, 3 dias após a isquemia, observa-se intensa marcação nos animais isquêmicos (**Figura 18**). Além disso, podem-se observar algumas células marcadas com FluoroJade C em diferentes regiões encefálicas, como por exemplo no hipocampo. Sete dias após a oligoemia não é mais observada marcação para FluoroJade C no trato óptico. Como o FluoroJade C só marca neurônios em processo de degeneração, a ausência de marcação após 7 dias pode indicar que a morte neuronal na retina e posterior degeneração axonal no trato óptico já ocorreu após esse intervalo de tempo. Além disso, após 7 dias decorridos da isquemia, os olhos da maioria dos animais se apresentava com sinais claros de degeneração.



Figura 18: Análise da degeneração no trato óptico 3 dias após a oligoemia. (A-B) Marcação para FluoroJade C, que marca neurônios em degeneração. (A) Nos animais FO não foi observada marcação de FluoroJade C (verde), demonstrando que não há degeneração nessa região. (C) Marcação de FluoroJade C nos animais isquêmicos. Pode-se observar uma forte marcação para FluoraJade C, demonstrando a degeneração axonal nessa região. (B,D) Fotomicrografia feita com contraste interferencial e diferencial indicando a região do trato óptico analisada por FluoroJade C. Barra de Calibração: 50 m.

Para analisar a lesão gerada pela oligoemia na substância branca, foram avaliados os níveis da proteína básica de mielina (MBP), por Western Blotting, no cérebro e, separadamente, no trato óptico 7 dias após o procedimento cirúrgico. O MBP é representado através de duas bandas na membrana, uma com peso em torno de 21kDa e outra em torno de 17kDa. Ambas as bandas foram quantificadas para a análise nos níveis de MBP. Observa-se uma diminuição significativa nos níveis de MBP no trato óptico nos animais isquêmicos comparados com os animais falso-operados (Figura 19A). Analisando os níveis de MBP em todo o cérebro não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, no entanto, há uma tendência à redução nos níveis de MBP nos animais Isq (Figura 19B). Esses resultados corroboram os dados descritos na literatura de que a oligoemia causa lesão na substância branca e desmielinização principalmente no sistema visual (KURUMATANI ET AL., 1998; FARKAS ET AL., 2004). No trato óptico, entretanto, não se observa diferença significativa na expressão de MBP nos animais Isq + cls em relação aos animais FO ou aos animais Isq. Esse resultado demonstra que a desmielinização no trato óptico nos animais Isq + cls não foi tão significativa em relação aos animais controle quanto a desmielinização observada nos Isq em relação aos animais controle na mesma região, indicando que o transplante de células de MO poderia atenuar a lesão gerada pela oligoemia (Figura 19A).



Figura 19: Análise por Western Blotting de MBP 7 dias após a isquemia. (A) Pode-se observar uma diminuição significativa nos níveis de MBP no trato óptico nos animais Isq comparado com os níveis nos animais FO (p<0,05). Essa diferença não foi observada entre os animais FO e os animais Isq + cls. (B) Analisando os níveis de MBP no restante do cérebro não foi observada diferença significativa entre os grupos. As análises foram normalizadas pelos níveis de -Tubulina. Os valores foram expressos nos gráficos como média ± SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

A glia radial embrionária, além de servir como suporte à migração neuronal, possui características de NSCs, sendo capaz de se auto-renovar e diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Em 2004, o grupo de Alvarez-Buylla demonstrou que glia radial embrionária também dá origem às NSCs da SVZ (MERKLE ET AL., 2004). No cérebro adulto, diversos trabalhos demonstraram a presença de células RGL na SGZ (SERI ET AL., 2001; SHAPIRO ET AL., 2005). Existem células RGL também na SVZ, como foi demonstrado pelo nosso grupo (**Anexo 1** - GUBERT ET AL., 2009). Na SGZ, as células RGL são consideradas progenitores neurais (SERI ET AL., 2001). No entanto, como essas células não haviam sido descritas anteriormente na SVZ de animais normais, não se sabe exatamente qual seria a sua função na SVZ. O nosso grupo demonstrou previamente que o transplante intravenoso de células de MO é capaz de estimular o aparecimento de um maior número de células do tipo glia radial na parede lateral do VL 7 dias após a oligoemia (GUBERT, 2006).

Em uma análise mais detalhista, foi avaliado ao longo de 3 semanas o número de prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL após a isquemia e/ou transplante de células de MO. Três dias após a isquemia observa-se um aumento no número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas na parede lateral em direção ao estriado nos animais Isq (43,51 ± 3,08; n=6) e Isq + cls (42,73 ± 4,55; n=6) comparados com o grupo de animais FO (27,88 ± 1,98; n=12; p<0,01) e FO + cls (28,29 ± 1,29; n=4; p<0,01) (**Figura 20 e 21A**). Devido à grande variação que foi encontrada no comprimento dos prolongamentos radiais, também foi realizada uma análise contando somente os prolongamentos radiais vimentina-positivos com mais de 150µm de comprimento na parede lateral dos VLs. Dessa forma observa-se um aumento significativo no número de prolongamentos vimentina-positivos com mais de 150µm nos animais Isq (17,8 ± 1,73; n=6) comparado aos animais FO (9,29 ± 1,04; n=12; p<0,01) e dos animais Isq + cls (16,39 ± 2,88; n=6) comparado com os

animais FO (p<0,05) (**Figura 21C**). Não houve diferença significativa no número de prolongamentos de células RGL vimentina-positivas com mais de 150 μ m de comprimento entre os animais isquêmicos (Isq e Isq + cls) em relação aos animais FO + cls (10,69 ± 0,85; n=4). Esses resultados indicam que a isquemia foi capaz de induzir o aumento no número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivos na parede lateral 3 dias após a oligoemia.

A parede lateral é considerada a região neurogênica ao redor do VL, apesar de existirem algumas NSCs na parede medial do VL anterior (CHIASSON ET AL., 1999). No entanto, células RGL foram observadas também na parede medial e porção ventral do VL. Por essa razão, foi quantificado, separadamente, o número de células RGL vimentina-positivas na parede medial e na porção ventral do VL. Na parede medial, não foi observada diferença significativa no número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas entre os grupos ($8,88 \pm 4,44$; n=12, animais FO - $8,7 \pm 0,96$; n=4, animais FO + cls - $9,36 \pm 1,32$; n=6, animais Isq - $10,63 \pm 1,43$; n=6, animais Isq + cls) (**Figura 21B**). Na porção ventral do VL, também não houve diferença significativa no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas entre os grupos ($11,83 \pm 1,08$; n=12, animais FO - $9,59 \pm 1,24$; n=4, animais FO + cls - $15,34 \pm 1,78$; n=6, animais Isq - $14,39 \pm 1,55$; n=6, animais Isq + cls) (**Figura 21D**).



Figura 20: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 3 dias após a isquemia. Reconstrução tridimensional da expressão de vimentina (vermelho) na parede lateral dos animais 3 dias após o procedimento cirúrgico. Podem-se observar prolongamentos das células RGL nos animais falsooperados (A), falso-operados que receberam o transplante de células de MO (B), isquêmicos (C) e isquêmicos que receberam o transplante de células de MO (D). Pode-se observar o maior número de prolongamentos radiais nos animais isquêmicos comparado com os animais falso-operados. Barra de calibração: 50 m. CC, corpo caloso; Es, estriado



Figura 21: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 3 dias após a isquemia. Os prolongamentos foram visualizados através da marcação de vimentina em cortes coronais de 20 m. (A) Prolongamento radiais das células RGL na parede lateral do VL. (*) representa a diferença estatística de p<0,01, entre os animais Isq e Isq + cls comparados com os animais FO e os FO + cls. (B) Número de prolongamentos radiais na parede medial do VL. Não é observada diferença significativa entre os grupos. (C) Número de prolongamentos radiais na parede lateral com mais de 150 m de comprimento. Podese observar um aumento significativo no número desses prolongamentos nos animais Isq (p<0,01) e Isq + cls (p<0,05) comparado com os animais FO e FO + cls. (D) Número de prolongamentos radiais na porção ventral do VL. Não foi observada diferença significativa nessa região entre os grupos. Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

Quantificando o número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas 7 dias após a isquemia, observa-se o aumento no número dessas células na parede lateral dos animais Isq + cls $(50,03 \pm 7,12; n=4)$ quando comparados com os animais FO $(27,88 \pm 1,98;$ n=12; p<0,05) e com os animais Isq $(25,73 \pm 3,66; n=4; p<0,01)$ (Figura 22 e 23A). Não foi observada diferença significativa entre o número de prolongamentos radiais dos animais Isq comparado com os animais FO, nem entre os animais Isq + cls e os animais FO + cls $(40,35 \pm$ 5,19; n=5) (Figura 23A). O aumento no número de prolongamentos das RGL vimentinapositivas nos animais Isq + cls $(19,96 \pm 4,28; n=4)$ também foi observado quantificando somente os prolongamentos com mais de 150µm de comprimento em relação aos animais FO $(9,29 \pm 1.04; n=6; p<0.05)$ e Isq $(8.09 \pm 1.44; n=5; p<0.05)$ (Figura 23C). Novamente não foi observada diferença significativa no número de prolongamentos das células RGL vimentinapositivas entre os animais Isq e FO e os animais Isq + cls e os animais FO + cls $(13,75 \pm 3,3)$; n=5). No entanto, nos animais FO + cls observa-se uma tendência ao aumento no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas entre os grupos na parede lateral (Figura 23A). Na parede medial do VL, não houve diferença no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas entre os grupos ($8,88 \pm 4,44$; n=12, animais FO - 10,53 \pm 1.65; n=5, animais FO + cls - $10,11 \pm 3,25$; n=4, animais Isq - $15,89 \pm 4$; n=4, animais Isq + cls) (Figura 23B). Na porção ventral do VL, também não foi observada diferença significativa no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas entre os grupos (11,83 \pm 1,08; n=12, animais FO - 10,99 \pm 1,66; n=5, animais FO + cls - 9,68 \pm 2,58; n=5, animais Isg - 14,01 \pm 2,87; n=4, animais Isq + cls) (Figura 23D). Com esses resultados, pode-se concluir que o transplante de células de MO é capaz de induzir ou manter por 7 dias um elevado número prolongamentos das células RGL na parede lateral de animais isquêmicos.



Figura 22: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 7 dias após a isquemia. Reconstrução tridimensional da expressão de vimentina (verde) na parede lateral dos animais 7 dias após o procedimento cirúrgico. Pode-se observar prolongamentos das células RGL nos animais falso-operados (A), falso-operados que receberam o transplante de células de MO (B), isquêmicos (C) e isquêmicos que receberam o transplante de células de MO (B). Pode-se observar um maior número de prolongamentos radiais na parede lateral do animais que receberam transplante de células de MO. Barra de calibração: 20 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.


Figura 23: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 7 dias após a isquemia. Os prolongamentos foram visualizados através da marcação de vimentina em cortes coronais de 20 m. (A) Prolongamento radiais das células RGL na parede lateral do VL. (*) representa a diferença estatística de p<0,01, entre os animais Isq + cls comparados com os animais FO e Isq. (B) Número de prolongamentos radiais na parede medial do VL. Não é observada diferença significativa entre os grupos. (C) Número de prolongamentos radiais na parede lateral com mais de 150 m de comprimento. Pode-se observar um aumento significativo no número desses prolongamentos nos animais Isq + cls (p<0,05) comparado com os animais FO e Isq. (B) Número de prolongamentos radiais na parede lateral com so sanimais Isq + cls (p<0,05) comparado com os animais FO e Isq. (D) Número de prolongamentos radiais na porção ventral do VL. Não foi observada diferença significativa nessa região entre os grupos. Os valores foram expressos nos gráficos como média ± SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

Para determinar se o aumento no número de prolongamentos de células RGL se mantinha por um tempo prolongado na parede lateral dos animais Isq + cls, o número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas foi quantificado 21 dias depois da isquemia. Analisando o número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas na parede lateral nesse período, ainda observa-se um aumento significativo nos animais Isq + cls ($55,89 \pm 11,18$; n=5) em relação aos animais FO ($27,88 \pm 1,98$; n=12; p<0,05) No entanto, não foi observada diferença significativa no número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas nos animais Isq + cls em relação aos animais FO + cls ($51,28 \pm 6,36$; n=4) ou aos animais Isq ($44,62 \pm 10,61$; n=5) (**Figura 24 e 25A**). Quantificando o número de prolongamentos radiais com mais de 150µm de comprimento na parede lateral, diferentemente do observado nas sobrevidas anteriores, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ($17,69 \pm 4,38$; n=3, animais FO - $15,82 \pm 2,51$; n=4, animais FO + cls (**Figura 25C**).

De acordo com esses resultados, apesar de haver aumento no número de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas na parede lateral dos animais Isq + cls comparado aos animais FO, essa diferença não é observada quando quantificam-se somente os prolongamentos radiais com mais de 150µm de comprimento. A quantificação do número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas na parede medial não mostrou diferença significativa entre os grupos (8,88 ± 4,44; n=12, animais FO - 12,54 ± 2,57; n=4, animais FO + cls - 7,44 ± 1,32; n=5, animais Isq - 11,73 ± 2,23; n=5, animais Isq + cls) (**Figura 25B**). Na porção ventral do VL, também não foi encontrada diferença significativa no número de células RGL entre os grupos (11,83 ± 1,08; n=12, animais FO - 14,03 ± 1,44; n=4, animais FO + cls - 12,28 ± 2,99; n=5, animais Isq - 14,33 ± 3,06; n=5, animais Isq + cls) (**Figura 25D**).

Analisando em conjunto os resultados obtidos em 3, 7 e 21 dias após a isquemia, observa-se que o número de células RGL na parede lateral aumenta 3 dias após a isquemia, mas esse aumento só se mantém até pelo menos 21 dias após a isquemia nos animais que receberam o transplante de células de MO (**Figura 25E**).



Figura 24: Células RGL na parede lateral dos diferentes grupos 21 dias após a isquemia. Reconstrução tridimensional da expressão de vimentina (vermelho) na parede lateral dos animais 21 dias após o procedimento cirúrgico. Podem-se observar prolongamentos das células RGL nos animais falso-operados (A), falso-operados que receberam o transplante de células de MO (B), isquêmicos (C) e isquêmicos que receberam o transplante de células de MO (B). Pode-se observar um número maior de prolongamentos radiais no animais isquêmico que recebeu o transplante de células de MO comparado com os animais falso-operados. Barra de calibração: 50 m. CC, corpo calos; Es, estriado.



Figura 25: Quantificação dos prolongamentos radiais vimentina-positivos ao redor do VL 21 dias após a isquemia. Os prolongamentos foram visualizados através da marcação de vimentina em cortes coronais de 20 m. (A) Prolongamento radiais das células RGL na parede lateral do VL. (#) p<0,05, entre os animais Isq + cls comparados com os animais FO. (B) Número de prolongamentos radiais na parede medial do VL. Não é observada diferença significativa entre os grupos. (C) Número de prolongamentos radiais na parede lateral com mais de 150 m de comprimento. Não observa-se diferença significativa no número desses prolongamentos entre os grupos. (D) Número de prolongamentos radiais na porção ventral do VL. Não foi observada diferença significativa nessa região entre os grupos. (E) Gráfico temporal do número de prolongamentos das células RGL na parede lateral dos animais Isq + cls, demonstrando a quantidade semelhante 3, 7 e 21 dias após a isquemia. Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. Análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

A análise morfológica dos prolongamentos das células RGL marcados para vimentina, revela que a maioria apresenta a porção basal associada a vasos sanguíneos. Para verificar se essa relação é alterada após a isquemia ou o transplante de células de MO, foi quantificado em cortes de 60 μ m, o número de RGL vimentina-positivas na parede lateral do VL conectadas a vasos sanguíneos marcados com laminina. Nos animais FO observa-se que 68,51 % ± 4,64 (n=3) dos prolongamentos radiais estão associados aos vasos. Essa porcentagem não é alterada nos animais Isq (68,94 ± 2,32 %; n=3) ou Isq + cls (71,7 ± 1,99 %; n=3) 7 dias após a lesão. Dessa forma, o estímulo da isquemia ou do transplante de células de MO não altera o contato das células RGL com os vasos que se mantém igual ao observado nos animais FO (**Figura 26**).



Figura 26: Quantificação da porcentagem de prolongamentos vimentina-positivos das células RGL que fazem contato com vasos sanguíneos. (A, C) Marcação de vimentina (vermelho) e laminina (verde) na parede lateral dos VLs 7 dias após isquemia. (A) Reconstrução tridimensional (60 m) da parede lateral, onde pode ser observado o contato dos prolongamentos radiais vimentina-positivos (seta) com os vasos. (C) Reconstrução tridimensional, onde observa-se através de cortes ortogonais (*boxes*), o contato de prolongamentos vimentina-positivos com vasos laminina-positivos (setas). Quantificou-se a porcentagem de prolongamentos das células RGL vimentina-positivas que fazem contato com vasos sanguíneos marcados com laminina em cortes de 60 m. Observa-se que nos animais FO 70% dos prolongamentos fazem contato com os vasos. Essa porcentagem não se altera nos animais Isq e Isq + cls 7 dias depois da isquemia. Os valores foram expressos no gráfico como média ± SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

Foi analisado também se a oligoemia e o transplante de células de MO seriam capazes de influenciar o número de células RGL na SGZ. Para isso foi quantificado o número de prolongamentos GFAP-positivos que transpassavam as camadas do giro denteado a partir da camada subgranular 7 dias após a isquemia (**Figura 27A e 27B**). Foi observado um aumento significativo no número de prolongamentos GFAP-positivos no giro denteado nos animais Isq + cls (116,31 ± 3,85; n=5) comparados com os animais dos demais grupos (91,43 ± 5,12; n=5, animais FO - 84,03 ± 5,97; n=3, animais FO + cls - 96,33 ± 4,66; n=5, animais Isq; p<0,01) (**Figura 27C**). Esses resultados demonstraram que o transplante de células de MO é capaz de estimular o aumento no número de células RGL tanto na SVZ como na SGZ 7 dias após a oligoemia.



Figura 27: Quantificação das células RGL na SGZ 7 dias após a isquemia. Reconstrução tridimensional da SGZ marcada com GFAP (verde) nos animais FO (**A**,**B**) e nos animais Isq + cls (**C**,**D**) 7 dias depois da isquemia. Núcleo em azul. Pode-se observar as células RGL estendendo prolongamentos pelo giro denteado nessa região (setas). Barra de calibração: 50 m. (**E**) Pode-se observar aumento significativo no número de prolongamentos nos animais Isq + cls comparado com os demais grupos (p<0,01). Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

4.6 Efeito isquemia focal sobre as células RGL ao redor dos VLs

Para verificar se o aumento no número de células RGL não se manteve nos animais Isq 7 dias após a oligoemia, devido à escassa morte neuronal observada normalmente nesse modelo, foi quantificado o número de prolongamentos radiais ao redor do VL em animais que sofreram isquemia focal por termocoagulação (Isq F). Após a isquemia focal é possível observar uma grande região de degeneração neuronal que atinge as seis camadas corticais (Figura 28E) (GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009). Não se observa diferença significativa no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas na parede lateral do VL comparando o lado ipsilateral à lesão $(29,67 \pm 3,13; n=5)$ com o lado contralateral $(34,3 \pm$ 3,6; n=5) (Figuras 28A, 28B e 28C). No entanto, analisando somente a região posterior do VL, observa-se que os animais Isq F apresentam um menor número de prolongamentos no lado ipsilateral $(22,5 \pm 4,98; n=5)$ à lesão, em relação ao lado contralateral $(45,29 \pm 5,29; n=5;$ p<0,05) (Figura 28D). É importante ressaltar que a lesão gerada pela isquemia focal se inicia na altura do VL posterior (Figura 28E). Comparando a parede lateral da região posterior do VL do hemisfério ipsilateral à lesão dos animais Isq F ($22,5 \pm 4,98$; n=5), observa-se uma redução significativa no número de prolongamentos das RGL vimentina-positivas em relação aos animais FO (36,91 \pm 3,26; n=13; p<0,05) (Figura 29C). No entanto, nos animais nos quais as células mononucleares foram injetadas pela veia da cauda 24 horas após a isquemia focal (Isq F + cls) não se observa redução no número de células RGL na parede lateral (38,79 ± 5,66; n=5) em relação aos animais FO (Figura 29C). Alternativamente, a análise dos prolongamentos radiais vimentina-positivos com mais de 150µm de comprimento, não revelou diferença significativa entre os grupos ($13,53 \pm 1,84$; n=10, animais FO - $13,85 \pm$ 4,21; n=5, animais Isq F - 16,29 \pm 3,28; n=5, animais Isq F + cls) (Figura 29D). De acordo com esses resultados pode-se concluir que a isquemia focal afeta o número de células RGL na SVZ posterior ipsilateral à lesão, reduzindo o número de células RGL, no entanto, essa isquemia atinge somente as células com prolongamentos de menor comprimento. Essa redução é revertida quando células de MO são injetadas nos animais isquêmicos.



Figura 28: Quantificação dos prolongamentos das células RGL ao redor do VL após a isquemia focal. (A,B) Reconstrução tridimensional da parede lateral do VL nos animais 7 dias após isquemia focal. Pode-se observar prolongamentos radiais vimentina-positivos (vermelho) no lado ipsilateral à lesão (A) e no lado contralateral (B). (C) Quantificação do número de prolongamentos vimentina-positivos na parede lateral no lado ipsilateral comparado ao contralateral. Não é possível observar diferença significativa entre os VLs. (D) Quantificação do número de prolongamentos vimentina-positivos na parede lateral da região posterior do VL no lado ipsilateral comparado ao contralateral. Foi observada redução no número de prolongamentos radiais no lado ipsilateral comparado ao contralateral. Foi observada redução no número de prolongamentos radiais no lado ipsilateral comparado ao contralateral (p<0,05). Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se teste t não paramétrico com pós-teste Mann-Whitney. (E) Reconstrução tridimensional da lesão cortical na altura do VL posterior, sete dias após a isquemia focal. É possível observar a região de lesão que atinge as camadas corticais até o corpo caloso. Marcação para vimentina (vermelho) e núcleo (TO-PRO-3 - azul). Barra de calibração: (A,B) 20 m, (E) 50 m.





Figura 29: Quantificação dos prolongamentos das células RGL ao redor do VL após a isquemia focal e transplante de células de MO (A,B) Reconstrução tridimensional da parede lateral do VL posterior nos animais sete dias após isquemia focal. Pode-se observar prolongamentos radiais vimentina-positivos (vermelho) no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (A) e no lado ipsilateral à lesão nos animais isquêmicos (P) Quantificação no número de prolongamentos nos animais isquêmicos (p<0,05). Essa redução não é observada nos animais isquêmicos que receberam o transplante de células. (D) Quantificação no número de prolongamentos radiais vimentina-positivos com mais de 150 m na parede lateral posterior do VL. Não observamos diferença significativa entre os grupos. Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison. Barra de Calibração: 50 m. CC, corpo caloso; Es, estriado.

Muitos grupos demonstraram que alguns modelos de isquemia cerebral estimulam o aumento da neurogênese na SVZ e SGZ (KEE ET AL., 2001; TAKASAWA ET AL., 2002). O transplante de células de MO também é capaz de estimular a neurogênese nessas regiões (CHEN ET AL., 2003; MUNOZ ET AL., 2005), podendo ser um dos mecanismos de ação que leva à melhora funcional já descrita em animais isquêmicos, após o transplante dessas células (CHEN ET AL., 2001a; CHEN ET AL., 2001b; IIHOSHI ET AL., 2004; GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009; de VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2010). Para estudar a influência do transplante intravenoso de células de MO sobre a proliferação das NSCs de ratos adultos no modelo de oligoemia, primeiramente, BrdU foi injetado uma vez por dia durante seis dias a partir do dia da isquemia, e os animais foram perfundidos 24 horas após a última injeção. Quantificando o número de células BrdU-positivas na parede lateral do VL não se observa diferença entre os grupos ($44 \pm 7,7$; n=4, animais FO - 51 $\pm 6,7$; n=4, animais FO + cls - 51 ± 7.9 ; n=4, animais Isq - 47 ± 6.9 ; n=4 animais Isq + cls) (Figura 30A). Foi quantificado também o número de células BrdU-positivas no vértice dorso-lateral (parte mais caudal da RMS) do VL por μm^2 . Nessas análises também não se observa diferença entre os grupos $(0,0065 \pm 0,0009; n=4, animais FO; 0,0068 \pm 0,0007; n=4, animais$ FO + cls; $0,0065 \pm 0,0003$; n=4, animais Isq; $0,0067 \pm 0,0001$; n=4, animais Isq + cls) (Figura 30B). Esse resultado diverge dos outros dados descritos na literatura que utilizam outros modelos de isquemia cerebral, como a isquemia focal e observam o aumento na proliferação, principalmente nos animais que receberam o transplante de células de MO (CHEN ET AL., 2003; MUNOZ ET AL., 2005).

Para analisar se a isquemia e o transplante de células de MO estariam estimulando o aumento na proliferação em um período específico, foi utilizado outro protocolo de injeção de

BrdU, no qual os animais receberam 4 injeções de BrdU no sexto dia após a isquemia e foram perfundidos 24 horas após a última injeção. Já foi demonstrado que por volta do sétimo dia após a isquemia focal, ocorre o pico de proliferação na SVZ (ZHANG ET AL., 2001). Dessa forma, se a resposta à isquemia global for semelhante, com esse outro protocolo é possível marcar somente as células no pico da resposta proliferativa. Dessa maneira, pôde-se observar um aumento significativo no número de células BrdU-positivas na parede lateral no grupo Isq + cls (91,5 ± 8,41; n=3) comparado com o grupo FO (60,9 ± 10,45; n=3; p<0,05). Não se observou diferença significativa no número de células que incorporaram BrdU nos animais Isq (78,9 ± 13,82; n=4) em relação aos animais FO e Isq + cls diferente do que ocorre na isquemia focal que apresenta pico de proliferação entre 6-7 dias após o insulto (**Figura 30C**). Esses resultados demonstram que o transplante de células de MO aumenta significativamente a proliferação das células da SVZ em animais que sofreram oligoemia 6 dias após a lesão.



Figura 30: Quantificação das células que incorporaram BrdU na parede lateral dos diferentes grupos. (A,B,C) Quantificação do número absoluto de células BrdU positivas na parede lateral (A,C) e RMS (B) 7 dias após a isquemia em um corte de 20 m. (A,B) BrdU foi administrado uma vez por dia durante 7 dias a partir do dia da isquemia. Não foi observada diferença no número de células que incorporaram BrdU entre os grupos nessas regiões. (C) BrdU foi administrado 4x no sexto dia após a isquemia. Foi observado aumento significativo no número de células BrdU-positivas nos animais Isq + cls comparado com os animais FO (p<0,05). Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

A proliferação ao redor do VL também foi analisada através da marcação de Ki67; fator de transcrição nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, estando ausente somente na fase de repouso G₀ (Figura 31). O número de células Ki67-positivas foi quantificado na parede lateral do VL 3, 7 e 21 dias após a isquemia. Três dias após a cirurgia, não se observa diferença significativa no número de células Ki67-positivas entre os grupos $(122,59 \pm 13,1; n=7, animais FO - 114,87 \pm 19,6; n=4, animais FO + cls - 108,35 \pm 14,4; n=6,$ animais Isq - 103.43 ± 15.5 ; n=5, animais Isq + cls) (Figura 32A). Sete dias após a isquemia, pode-se observar um aumento no número de células Ki67-positivas na parede lateral nos animais Isq + cls (192,58 \pm 14,49; n=6) em relação aos animais FO (122,59 \pm 13,1; n=7; p<0,01) e aos animais Isq (132.46 ± 10.52; n=5; p<0,05) (Figura 32B). Não foi observada diferença significativa no número de células Ki67-positivas entre os animais isquêmicos (Isq e Isq + cls) em relação aos animais FO + cls (167.51 \pm 17.57; n=4). Novamente, não foi observada diferenca entre os animais Isq e FO em 7 dias, corroborando os dados apresentados com marcação de BrdU. Vinte e um dias após a isquemia não é mais observado aumento no número de células Ki67-positivas na parede lateral dos animais Isq + cls (Figura 32C). Nessas análises, não foi observada diferença significativa entre os grupos ($145,83 \pm 12,06$; n=4, animais FO + cls - $126,29 \pm 14,97$; n=5, animais Isq - $139 \pm 11,85$; n=5, animais Isq + cls). Esses resultados corroboram os resultados obtidos pelo segundo protocolo de BrdU utilizado, demonstrando que, aproximadamente, 7 dias após a isquemia (e seis dias após o transplante de células de MO) há um pico de proliferação das células da SVZ, retornando aos níveis basais 21 dias após o procedimento cirúrgico (Figura 32E).



Figura 31: Expressão de Ki67 na parede lateral. Imagem confocal da parede lateral, onde pode ser observada a marcação de Ki67 (verde) dos animais FO (**A**,**B**), Isq (**C**,**D**) e Isq + cls (**E**,**F**) 7 dias após a isquemia. É possível notar maior número de células Ki67-positivas nos animais Isq + cls. Núcleo (TO-PRO-3) em azul. Barra de calibração: 50 m.



Figura 32: Quantificação do número de células Ki67-positivas na parede lateral dos diferentes grupos. A quantificação foi realizada 3 (A), 7 (B) e 21 (C) dias após a isquemia em cortes de 20 m. Não foi observada diferença significativa no número de células Ki67-positivas 3 e 21 dias após a isquemia entre os grupos. Foi observado aumento significativo no número de células Ki67-positivas sete dias após a isquemia nos animais Isq + cls comparado com os animais FO (p<0,01) e Isq (p<0,05). (E) Gráfico temporal do número de células Ki67-positivas na parede lateral dos animais Isq + cls, demonstrando o pico de proliferação 7 dias após a isquemia. Os valores foram expressos nos gráficos como média ± SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

No hipocampo, a neurogênese acontece na SGZ e é responsiva a alguns modelos de isquemia cerebral (TAKASAWA ET AL., 2002; JIN ET AL., 2004), inclusive em insultos isquêmicos rápidos, onde não há morte neuronal (MAYSAMI ET AL., 2008). Após a oligoemia, é possível observar morte neuronal nessa região, no entanto, essa só acontece algumas semanas após a oclusão (NI ET AL., 1995; SCHMIDT-KASTNER ET AL., 2005; FARKAS ET AL., 2006). Foi analisado se a oligoemia e o transplante de células de MO são capazes de estimular a proliferação nessa região. Dessa forma, o número de células Ki67-positivas foi quantificado na SGZ 7 dias após a isquemia. Não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados (7,05 \pm 1,19; n=5, animais FO - 7,08 \pm 1,91; n=4, animais FO + cls - 11,09 \pm 1,53; n=7, animais Isq - 7,8 \pm 0,7; n=5, Isq + cls) (**Figura 33**). Esses resultados sugerem que a oligoemia ou o transplante de células de MO não é capaz de estimular a neurogênese na SGZ 7 dias após a lesão, no entanto, será necessário avaliar outros períodos de sobrevida, quando já ocorre morte neuronal no hipocampo para confirmar esses resultados.



Figura 33: Quantificação do número de células Ki67-positivas na SGZ. As quantificações foram realizadas 7 dias após a isquemia em cortes de 20 m. Não foi observada diferença significativa no número de células Ki67-positivas entre os grupos. Os valores foram expressos no gráfico como média \pm SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA com pós-teste Newman-Keuls Multiple Comparison.

4.8 Análise dos níveis de RNAm de diferentes fatores tróficos (BNDF por exemplo) e de crescimento (FGF por exemplo) após oligoemia e transplante de células de MO

Para tentar entender por quais mecanismos as células de MO poderiam estar estimulando o aumento na proliferação celular e o aumento no número de células RGL na SVZ nos animais após oligoemia, os níveis de diferentes fatores foram analisados por RT-PCR 3 e 7 dias depois da isquemia. Por PCR em tempo real, os níveis de RNAm foram analisados 3 dias após a oligoemia, e conseqüentemente dois dias após o transplante de células de MO, na parede lateral do VL. Os seguintes fatores de tróficos foram analisados: VEGF, FGF-2, CNTF e TGF- α . Não foi observada diferença significativa nos níveis desses fatores entre os grupos, apesar de ser observada uma tendência ao aumento nos níveis de VEGF, FGF-2 e TGF- α nos animais Isq (**Figura 34**).



Parede lateral – 3d

Figura 34: Análise na parede lateral dos níveis de RNAm para diferentes fatores tróficos 3 dias após a isquemia. Análise através de PCR em tempo real, dos níveis de RNAm de VEGF (A), FGF-2 (B), CNTF (C) e TGF- (D) na parede lateral. Não foi observada diferença significativa nos níveis de RNAm para esses fatores entre os grupos. Os valores foram normalizados pelos níveis de RNAm de GAPDH. Os valores foram expressos nos gráficos como média ± SEM em cada grupo. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se ANOVA não paramétrico com pós-teste Dunns.

Foram analisados também, qualitativamente, os níveis de RNAm desses fatores 7 dias após a isquemia. Nesse estudo, os níveis de BDNF também foram analisados na parede lateral. Novamente não foi observada diferença significativa nos níveis de VEGF, FGF-2, CNTF e TGF- α entre os grupos, no entanto, pode-se observar o aumento nos níveis de RNAm para BDNF nos animais que receberam o transplante de células de MO, tanto nos animais FO como nos animais Isq (**Figura 35**). Esse resultado indica que as células de MO podem estar estimulando a expressão de BDNF na parede lateral 7 dias após a isquemia, no entanto, é necessário analisar os níveis desses fatores quantitativamente para confirmar tal hipótese.





Figura 35: Análise na parede lateral dos níveis de RNAm para diferentes fatores tróficos/de crescimentos 7 dias após a isquemia. Análise qualitativa dos níveis de RNAm de VEGF, FGF-2, CNTF e TGF- α na parede lateral sete dias após a isquemia. Não foi observada diferença nos níveis de RNAm para esse fatores entre os grupos. No entanto, é possível observar que nos animais que receberam o transplante de células de MO, parece haver um aumento nos níveis de RNAm para BDNF. Os valores foram normalizados pelos níveis de RNAm de GAPDH. Os valores foram expressos nos gráficos como média \pm SEM em cada grupo.

6. Discussão

Neste estudo foram caracterizadas as células RGL presentes na SVZ, uma das regiões neurogênicas presentes no cérebro adulto. Essas células apresentam características semelhantes às células de glia radial embrionária. Foi analisada também a influência de fatores externos, como a isquemia cerebral e o transplante de células de MO, na proliferação e número de células RGL na SVZ e SGZ. Os resultados deste estudo demonstraram que as células de MO estimulam a proliferação celular na SVZ 7 dias após a isquemia, e o aparecimento de células RGL na SVZ nos animais isquêmicos a partir do terceiro dia pós lesão. Na SGZ, as células de MO estimulam o aparecimento de células RGL 7 dias após a isquemia. Apesar de ainda não se saber a função das células RGLs na SVZ de ratos adultos, é possível que essas atuem como progenitores neurais e/ou guiando novos neurônios para áreas de lesão, o que seria extremamente vantajoso para tentativa de regenerar o tecido lesado após isquemia cerebral.

6.1 Presença de células RGL na SVZ de ratos adultos

Neste estudo, as células RGL foram caracterizadas ao redor do VL em ratos adultos. Nós observamos que as células RGL do adulto apresentam algumas características em comum com as células de glia radial presentes durante o desenvolvimento, tais como a expressão de vimentina, GLAST, Pax6. Além disto, estas células do adulto também são capazes, tais como as do desenvolvimento, de proliferar e de dar suporte à migração neuronal. Apesar destas características em comum, as células RGL do adulto não parecem dar suporte à migração neuronal com uma grande freqüência e não apresentam prolongamentos que se estendam até a pia mater. A extensão de prolongamentos até a pia mater é uma característica freqüente da glia radial durante o desenvolvimento. No entanto, no animal adulto, a distância é bem maior para o prolongamento alcançar a superfície pial, mesmo assim, foram observado prolongamentos radiais com até 600µm, comprimento maior do que o da glia radial em ratos P6 que é de aproximadamente 400µm (NOCTOR ET AL., 2002). No animal adulto, por outro lado, foi observado que a maioria dos prolongamentos da célula RGL termina em associação com vasos sanguíneos, característica observada também na glia radial embrionária. Dessa forma, é possível que as células RGL tenham funções parecidas com a glia radial embrionária no cérebro adulto, como ser neurogênica, mas como elas não parecem dar suporte à migração neuronal com freqüência, não podemos descartar a hipótese de que elas apresentem outra função no cérebro adulto.

Na literatura, há várias descrições detalhadas da SVZ de roedores adultos (DOETSCH ET AL., 1997; MIRZADEH ET AL., 2008) no entanto, a presença de células de glia radial nessa região foi relatada em apenas um artigo que mostrou células RGL na região ventral do VL de camundongos adultos voltadas para o núcleo accumbens (SUNDHOLM-PETERS ET AL., 2004). No nosso estudo, as células RGL foram identificadas por todo o VL: na parede lateral, com prolongamentos se estendendo para o estriado; na parede medial, com prolongamentos se estendendo para o septo e na porção ventral, com prolongamentos se estendendo para o núcleo accumbens. Uma possível explicação para a não identificação de células de glia radial nos animais adultos na maioria dos estudos pode ser devido às diferentes espécies de roedores utilizadas. No nosso trabalho, foram utilizados ratos da linhagem Lister-Hooded enquanto que na maioria dos outros estudos foram utilizados camundongos. Outra diferença importante diz respeito às diferentes técnicas utilizadas para a análise imunohistoquímica do tecido. Foi observado neste trabalho que as células RGL do adulto expressam marcadores também presentes em células de glia radial durante o desenvolvimento e de astrócitos, como vimentina, nestina, GLAST e GFAP (Anexo 1 - GUBERT ET AL., 2009). No entanto, a proteína que marca um maior número de prolongamentos radiais foi a vimentina, sendo analisada, por isso, a presença de células RGL no adulto com base na expressão dessa proteína em prolongamentos radiais na SVZ. O anticorpo contra-vimentina que foi utilizado nesse trabalho, entretanto, não foi o mesmo utilizado nos trabalhos descritivos da SVZ, como os realizados pelo grupo de Alvarez-Buylla. Quando o anticorpo contra vimentina produzido por esse grupo foi utilizado, não foi possível observar os prolongamentos radiais, mas apenas uma marcação restrita às células ependimárias e a alguns astrócitos com morfologia estrelar na SVZ (Figura 11). Esses resultados sugerem que um dos possíveis motivos da não identificação destas células em outros estudos possa ser a utilização de anticorpos anti-vimentina com características de marcação diferentes.

Apesar de não descrever a presença de células RGL na SVZ, recentemente, o grupo do pesquisador Alvarez-Buylla descreveu que as células B1 consideradas as NSCs da SVZ, apresentam um prolongamento basal paralelo ao VL que se estende até os vasos sanguíneos da SVZ (MIRZADEH ET AL., 2008). Nós observamos células RGL que incorporaram BrdU na parede lateral do VL e que a maioria dos prolongamentos vimentina-positivos emitidos por essas células também terminam em vasos sanguíneos, o que demonstra a semelhança entre as células RGL observadas e as células B1. Isso poderia indicar que as células RGL na parede lateral do VL são remanescentes das células de glia radial durante o desenvolvimento atuando como NSCs no cérebro adulto. No entanto, os prolongamentos analisados na parede lateral são radiais em direção ao estriado, enquanto as células B1 possuem prolongamentos paralelos à luz do VL. Além disso, células RGL foram observadas ao redor de todo o VL, em regiões, inclusive, onde não foram descritas NSCs, como na parede medial da região posterior do VL.

As células RGL também compartilham algumas características com os tanicitos. Os tanicitos são células ependimárias especializadas localizadas ao redor do terceiro ventrículo (FLAMENT-DURAND E BRION, 1985). Essas células expressam vimentina, e apresentam prolongamentos radiais que se estendem até os vasos sanguíneos (FLAMENT-DURAND AND BRION, 1985; KAMEDA ET AL, 2003). Dessa forma, é possível que uma parte das células que descrevemos neste trabalho seja similar aos tanicitos do terceiro ventrículo. Xu e colaboradores demonstraram, inclusive, que progenitores neurais presentes no terceiro ventrículo são tanicitos, que apresentam atividade mitótica após estímulo com fatores de crescimento (XU ET AL., 2005).

A presença de células RGL também já foi descrita em regiões não neurogênicas do cérebro adulto como no quarto ventrículo. Pecchi e colaboradores demonstraram a presença de células GFAP-positivas estendendo prolongamentos radiais a partir do quarto ventrículo em direção ao núcleo do trato solitário em ratos adultos. Algumas dessas células também eram positivas para vimentina e nestina e se apresentam próximas a neuroblastos DCX-positivos (PECCHI ET AL., 2007). Apesar do quarto ventrículo não ser considerado uma região neurogênica no cérebro de roedores adultos, Weiss e colaboradores demonstraram que é possível formar neuroesferas *in vitro* a partir das células do assoalho do quarto ventrículo (WEISS ET AL., 1996) e este e um dos critérios de identificação de NSC.

Nos trabalhos anteriores que descreveram a presença de células RGL no cérebro adulto, foi observada a associação de células DCX-positivas a esses prolongamentos, o que indicaria que essas células poderiam estar dando suporte à migração neuronal no adulto, assim como as células de glia radial durante o desenvolvimento. No entanto, nenhum desses trabalhos quantificou a taxa de migração. Neste trabalho, foi observado que somente um número pequeno de células DCX-positivas associadas aos prolongamentos das células RGL vimentina-positivas ao redor do VL. Apesar de pouco freqüente, seria interessante analisar se a freqüência dessa associação aumenta após lesões no SNC. Nesse caso, ensaios de migração neuronal, através da marcação dos novos neurônios, por exemplo, pela tranfecção dessas células com uma proteína fluorescente em fatias de cérebro de animais isquêmicos poderia indicar a taxa de migração pela RGL e o eventual re-direcionamento das novas células.

6.2 Lesão na substância branca após oligoemia e transplante das células de MO

Como dito anteriormente, a neurogênese no adulto pode ser influenciada pela isquemia cerebral. Após a isquemia focal é possível observar o aumento na proliferação na SVZ e migração dos novos neurônios formados para a área de lesão (ARVIDSSON ET AL., 2002; PARENT ET AL., 2002; KOKAIA ET AL., 2006). O aumento da neurogênese também é observado na SGZ após isquemia global transitória. Esse tipo de isquemia causa morte neuronal principalmente nos neurônios em CA1 no hipocampo (KOKAIA E LIDVALL., 2003). No nosso estudo, foi analisada a influência da oligoemia, uma isquemia global branda, sobre a SVZ e SGZ. Essa análise pode nos indicar se uma lesão que gera pouca morte neuronal é capaz de influenciar as NSCs no cérebro adulto.

Para gerar a oligoemia ocluímos permanentemente as artérias carótidas comuns de ambos os lados. Apesar desse procedimento diminuir o fluxo sanguíneo em torno de 60% dos níveis normais nos primeiros dias, ele é restabelecido gradualmente devido às irrigações colaterais vindas do polígono de Willis, que conecta as carótidas com as vertebrais, que continuam intactas (FARKAS ET AL., 2007). A oligoemia gera pouca morte neuronal, sendo esta observada principalmente no hipocampo alguns meses após o procedimento. Nos nossos animais não observamos morte neuronal significativa no hipocampo, no entanto, a maioria dos animais isquêmicos não sobrevive por mais de 10 dias, período este que pode não ser suficiente para se observar morte neuronal. Essa diferença de sobrevida encontrada pelo nosso

grupo e a descrita na literatura pode ser devido ao fato de que, nesse trabalho, utilizamos ratos da linhagem Lister-Hooded, enquanto nos outros trabalhos, são utilizados principalmente ratos Wistar (OHTA ET AL., 1997; WAKITA ET AL., 2002; FARKAS ET AL., 2004). Já foi descrito que existe diferença na vulnerabilidade ao BCCAO dependendo da linhagem utilizada, já que existem variações na circulação cerebral entre os animais. Por exemplo, os ratos da linhagem Fischer 344 são mais vulneráveis à isquemia global do que os da linhagem Sprague-Dawley e Wistar (IWASAKI ET AL., 1995). Provavelmente, o ratos Lister-Hooded tem menos irrigação colateral do que os ratos da linhagem Wistar, o que leva a uma isquemia mais severa. Essa diversidade pode ser genética, embora, mesmo dentro da mesma linhagem a BCCAO possa gerar diferentes danos (DE BUTTE ET AL., 2002).

Os animais após o BCCAO apresentam significativa perda de peso e mesmo com diferentes tentativas, eles não se alimentam adequadamente, o que leva a maioria dos animais isquêmicos ao óbito em aproximadamente 10 dias. Essa perda de peso pode ser resultado na diminuição do fluxo sanguíneo observada no hipotálamo, o maior centro de controle autonômico, que controla a fome e a saciedade (TSUCHIYA ET AL., 1992; OTORI ET AL., 2003).

Embora no nosso modelo não tenhamos observado significativa morte neuronal no hipocampo, uma das populações neuronais mais sensíveis à isquemia global, identificamos lesões na substância branca, principalmente no trato óptico. Uma intensa marcação de FluoroJade C foi demonstrada no trato óptico 3 dias após a isquemia, o que pode estar indicando lesão axonal, já que esse marcador é específico de neurônios em degeneração (**Figura 18**). Sete dias após a lesão, também observamos diminuição na expressão de MBP, proteína presente na mielina, demonstrando a desmielinização e possível morte de oligodendrócitos após a oligoemia (**Figura 19**). Esses resultados já eram esperados, já que esse modelo de isquemia é descrito por gerar lesão na substância branca, principalmente das

vias visuais, devido à irrigação direta dos olhos e do nervo óptico pela carótida interna (OHTA ET AL., 1997; OTORI ET AL., 2003).

O beneficio do transplante de células de MO já foi observado em diversos animais com isquemia cerebral (IIHOSHI ET AL., 2004; GIRALDI-GUIMARÃES ET AL., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS ET AL., 2009, LI E CHOPP, 2009). A maioria desses trabalhos foi realizada em modelos de isquemia focal pela oclusão da artéria cerebral média, onde se demonstrou que, após o transplante dessas células, os animais apresentavam melhora em testes de memória e motores (CHEN ET AL., 2001; IIHOSHI ET AL., 2004). Neste trabalho, foi analisado o efeito do transplante intravenoso da fração mononuclear das células de MO 24 horas após a oligoemia.

Na MO existem pelo menos duas populações de células-tronco, as HSCs e as MSCs e ambas populações estão presentes na fração mononuclear isolada da MO. Além delas, há vários precursores. As células da MO foram analisadas por citometria de fluxo, onde além de analisarmos o perfil das células por tamanho e granulosidade, analisamos a expressão de alguns marcadores. Observamos que a maioria das células são CD45-positivas (93%). Considerando que as MSCs não expressam esse marcador, podemos concluir que, na população que injetamos, menos de 7% apresenta este fenótipo. Utilizando marcadores expressos nas MSCs, foi observado que aproximadamente 6% de células CD29-positivas/CD45-negativas e aproximadamente 3% de células CD90-positivas/CD45-negativas da fração mononuclear tem característica de células-tronco *in vitro* (JIANG ET AL., 2002). Se considerarmos os resultados desse artigo, estaríamos injetando 800 células-tronco, o que corresponde a 0,004% do total de células. No entanto, além da diferença nas espécies utilizadas, nesse trabalho os autores cultivaram as células em placa aderente, dessa forma, não foi considerado o número de HSCs presente na fração mononuclear. No nosso caso, o número

de células-tronco é provavelmente maior; já que injetamos, tanto as MSCs, como as HSCs, presentes na fração mononuclear.

Sugere-se que o efeito gerado pelo transplante de células de MO possa estar relacionado com a liberação de fatores tróficos/de crescimento pelas células-tronco e precursores presentes nessa população. Os efeitos do transplante de células de MO observados no nosso estudo podem indicar que o número de células-tronco injetadas é capaz de liberar fatores tróficos suficientes para estimular a proliferação e diferenciação nas regiões neurogênicas dos animais que sofreram isquemia, no entanto, outras hipóteses também podem ser levantadas, como: indução da expressão desses fatores pelas células do hospedeiro e a contribuição de outras populações presentes na medula para a recuperação do animal como monócitos e/ou precursores endoteliais. As células-tronco presentes na população injetada, além de liberarem fatores tróficos/de crescimento, são capazes de estimular as células do hospedeiro a produzir tais fatores que irão atuar localmente sobre a SVZ e SGZ. Neste sentido, já foi demonstrado que as MSCs estimulam a liberação de BDNF, VEGF e FGF-2 por astrócitos submetidos à hipóxia, *in vitro* (GAO ET AL., 2005).

Outros tipos celulares existentes na MO também poderiam estar liberando fatores tróficos. Da fração mononuclear injetada, 55% são granulócitos, 15% monócitos e aproximadamente 21% de linfócitos. Já foi demonstrado, por exemplo, que os macrófagos, células diferenciadas a partir dos monócitos, são capazes de estimular a regeneração e neuroproteção após lesão no SNC (LEON ET AL., 2000; YIN ET AL., 2003). Na fração mononuclear também estão presentes precursores endoteliais que podem gerar uma neovascularização no cérebro, o que ajudaria na perfusão das áreas isquêmicas, diminuindo o dano causado pela isquemia. Sabe-se que em modelo de isquemia de membros posteriores, as células mononucleares transplantadas localmente se incorporam à rede vascular e estimulam a angiogênese nessa região (SHINTANI ET AL., 2001). A separação dos diferentes tipos

celulares presentes na fração mononuclear, e a posterior utilização dessas células no nosso modelo, pode responder qual o tipo celular responsável pelo efeito observado neste trabalho. No entanto, ainda é possível que várias populações celulares estejam agindo concomitantemente gerando o resultado final.

No nosso estudo, 7 dias após o transplante, algumas células de MO, que foram marcadas previamente ao transplante com um traçador fluorescente, foram observadas no parênquima cerebral. Após a isquemia cerebral, ocorre a ruptura da barreira hematoencefálica o que permitiria a passagem das células de MO para o cérebro. No entanto, algumas células presentes na circulação sanguínea passam normalmente pela barreira hematoencefálica, como monócitos e leucócitos (HICKEY, 1999). Já foi demonstrado também que as células de MO transplantadas intravenosamente são atraídas para o local da lesão por citocinas locais como, por exemplo, o SDF-1 (ROSENKRANZ ET AL., 2009). Apesar da oligoemia gerar uma isquemia branda, é possível que as células de MO sejam atraídas para o parênquima cerebral, já que observamos áreas de lesão, como o trato óptico. No entanto, talvez não seja necessário que as células da MO atravessem a barreira para ter um efeito terapêutico. Já foi observado que células de cordão umbilical, quando injetadas intravenosamente, são capazes de influenciar as células neuronais mesmo antes de entrar no parênquima cerebral (BORLONGAN ET AL., 2004). Isso indica que fatores liberados pelas células do cordão ou possivelmente da MO seriam capazes de auxiliar na recuperação de traumas no SNC sem estarem presentes no cérebro.

Embora o objetivo principal desse trabalho não seja observar a influência do transplante de células de MO sobre a lesão gerada pela oligoemia, nós observamos que nos animais Isq + cls a desmielinização no trato óptico 7 dias após a isquemia não foi tão acentuada como nos animais que não receberam o transplante. Esse resultado pode indicar

que o transplante de células de MO estaria protegendo e/ou estimulando a regeneração dessa região, como foi observado em outros modelos de isquemia (IIHOSHI ET AL., 2004).

6.3 Influência da terapia celular sobre a proliferação das células na SVZ e SGZ

A neurogênese pode ser estimulada pela isquemia cerebral. No entanto, não é necessário que haja morte neuronal para que ocorra o aumento da neurogênese na SGZ, já que esse aumento pode ser observado após o pré-condicionamento, quando há um breve episódio de isquemia e reperfusão que não gera lesão (JIN ET AL., 2001; MAYSAMI ET AL., 2008). O transplante de células de MO, por sua vez, aumenta ainda mais a neurogênese após a isquemia cerebral, podendo ser um dos mecanismos pelos quais essas células geram melhora funcional nesse modelo (CHEN ET AL., 2003; MUNOZ ET AL., 2005).

Analisando a proliferação celular no modelo de isquemia utilizado neste trabalho, não foi observado aumento na proliferação em nenhuma das duas regiões neurogênicas analisadas, a SVZ ou SGZ. Esse resultado não está de acordo com outros dados da literatura que mostram o aumento da proliferação na SVZ em diversos modelos de isquemia cerebral. No entanto, nos animais isquêmicos que receberam o transplante de células de MO, há um aumento na proliferação na SVZ 7 dias após a lesão. Esse aumento não é observado em um período mais curto (3 dias) ou prolongado (21dias), demonstrando realmente existir um pico de proliferação após o transplante. Como o aumento na proliferação não foi observado nos animais que sofreram isquemia e não receberam o transplante de células de MO, é possível que a lesão causada não seja suficiente para estimular esse aumento na SVZ, ocorrendo somente quando há o transplante.

Como esse tipo de isquemia, além de afetar a substância branca, pode gerar morte neuronal no hipocampo a longo prazo, a proliferação nessa região foi investigada. Na SGZ não foi observado, no entanto, aumento na proliferação nos animais Isq + cls 7 dias após a isquemia. Esse resultado pode indicar que nos animais que receberam células de MO, a lesão ou a inflamação gerada pela isquemia foi menor devido a uma possível ação neuroprotetora das células de MO, não sendo suficiente para estimular a neurogênese na SGZ. No entanto, o aumento da proliferação foi observado na SVZ dos animais isquêmicos que receberam transplante de células de MO. Apesar da SVZ e SGZ serem consideradas as regiões neurogênicas no cérebro de mamíferos adultos, elas apresentam algumas características bastante distintas. A SVZ, por exemplo, se localiza próxima ao VL, contendo células que fazem contato com o lúmen do VL, como as células B1. Dessa forma, essa região é influenciada, e possivelmente modulada, por diversos fatores que são liberados no líquido cefalorraquidiano. Já a SGZ, localizada no giro denteado do hipocampo não tem contato com esses sinais regulatórios. Outra diferença está na barreira hemato-encefálica, na SVZ existem lacunas na barreira astrocitária, o que permite a troca de moléculas mais facilmente entre a circulação e a SVZ (TAVAZOIE ET AL., 2008). Além disso, a maioria das células B1, que são consideradas as NSCs nessa região fazem contato com os vasos, o que poderia facilitar a influência das células de MO sobre as células da SVZ. Já na SGZ não existem essas lacunas, o que poderia dificultar a sinalização a partir das células de MO, apesar da barreira hematoencefálica estar possivelmente aberta devido à isquemia.

6.4 Influência da oligoemia e do transplante de células de MO sobre o número de células RGL

Como descrito anteriormente, foi proposto que as NSCs da SVZ são originadas das células de glia radial transitórias presentes somente durante o desenvolvimento (MERKLE ET AL., 2004). Recentemente, o nosso grupo, em um estudo pioneiro, demonstrou a existência de
células RGL ao redor do VL em ratos adultos (**Anexo 1** - GUBERT ET AL., 2009). Para entender melhor a função dessas células no cérebro adulto, foi avaliada a resposta das células RGL a insultos isquêmicos como a oligoemia e a isquemia focal, por exemplo. Além disso, também avaliamos a possível modulação dessa resposta à terapia celular com células de MO.

Trabalhos anteriores demonstraram que a injeção no VL de fatores de crescimento, como o EGF e o TGF-α, estimulam o aparecimento de células RGL ao redor do VL (GREG E WEISS, 2003). Isso demonstra que estímulos externos podem induzir o aparecimento de um de células RGL no SNC adulto. No presente trabalho demonstra-se que 3 dias após a isquemia há um maior número de células RGL na parede lateral dos animais Isq e Isq + cls comparados com os animais FO. No entanto esse número elevado só se mantém nos animais Isq + cls 7 e21 dias após a isquemia e a terapia. Esses resultados indicam que o aumento no número de células RGL é transitório nos animais Isq, não sendo mais observado 7 dias após o insulto. Entretanto, nos animais isquêmicos que receberam o transplante de células do MO não há a diminuição no número de células RGL até, pelo menos, 21 dias após a isquemia, o que pode indicar que as células de MO estejam liberando algum fator trófico/de crescimento que mantém esse número elevado. Não foi observada diferença no número de células RGL na parede medial ou na porção ventral do VL entre os grupos. Esse resultado pode indicar que as células RGL tem propriedades diferentes dependendo da sua localização, já que as essas regiões apresentam composição celular distintas. As NSCs, por exemplo, estão presentes principalmente na parede lateral, sendo encontradas somente na região anterior da parede medial (CHIASSON ET AL., 1999). Durante o desenvolvimento, a glia radial apresenta características diferentes dependendo da sua localização. Essas células expressam diferentemente alguns marcadores e fatores de transcrição como BLBP e Pax6, o que resulta em uma progênie distinta (GOTZ ET AL., 1998; HARTFUSS ET AL., 2001). Dessa forma, as células RGL também podem ser heterogêneas, dependendo da sua localização.

O aumento transitório no número de células RGL está de acordo com o trabalho de Zhang e colaboradores (2007) que descreveram o aparecimento de células RGL 3 dias após isquemia focal em ratos adultos. Nesse trabalho, eles observaram que essas células se diferenciavam a partir das células ependimárias. No nosso trabalho, não foi possível concluir de que tipo celular presente na SVZ as células RGL foram originadas, já que essas células foram analisadas através da marcação de vimentina, que também é fortemente expressa pelas células ependimárias, dificultando a localização do corpo celular das células RGL. No entanto, foram observadas que algumas células RGL incorporaram BrdU, o que pode indicar que essas células podem estar se auto-renovando ou diferenciando a partir de um precursor que estava proliferando na SVZ.

O número de prolongamentos das células RGL foi quantificado através da marcação de vimentina nos prolongamentos radiais, portanto, o aumento observado pode não ser resultado da diferenciação de mais células RGL, e sim do aumento na expressão de vimentina por prolongamentos já existentes nessa região. Nesse caso, somente alguns prolongamentos estariam expressando vimentina no animal normal, e devido a algum fator liberado pela isquemia/transplante, surgiria um estímulo para que as células RGL aumentasse os níveis desta proteína. Esse tipo de resposta pode ser observada na retina após lesão, por exemplo, do nervo óptico. Nessa região, também existem células com prolongamentos radiais, a glia de Muller, que normalmente expressa fortemente vimentina e, em pequenas quantidades, GFAP. No entanto, quando há lesão no nervo óptico essas células são ativadas e aumentam a expressão de GFAP (CHEN E WEBER, 2002; LEWIS E FISHER, 2003). O aumento na expressão da vimentina na SVZ pode ocorrer nos astrócitos dessa região, uma vez que já foi demonstrado que astrócitos maduros, *in vitro*, podem re-expressar vimentina e apresentar morfologia de glia radial na presença de alguns fatores tróficos, como o TGF- α (HUNTER E HATTEN, 1995; ZHOU ET AL., 2001)

O aumento transitório no número de células RGL na SVZ dos animais Isq que não receberam o transplante de células de MO pode ser resultado da lesão branda causada pela oligoemia, que apresenta um período com menor fluxo sanguíneo nos primeiros dias após a isquemia restabelecendo-se gradualmente a partir do terceiro dia (FARKAS ET AL., 2007). Para avaliar se uma isquemia cerebral que gera mais morte neuronal influencia nas células RGL, o número de prolongamentos das células RGL foi quantificado na SVZ 7 dias após a isquemia focal por termocoagulação. Similar ao que foi observado nos animais que sofreram oligoemia, não houve aumento no número de células RGL. No entanto, analisando somente a região mais posterior do VL, é possível observar uma diminuição no número de prolongamentos radiais. Essa diminuição é revertida pelo transplante de células de MO. A lesão cortical em decorrência desse modelo de isquemia focal se inicia na região cortical próxima ao VL posterior e se estende até a região próxima ao hipocampo. Como a lesão é extensa, atravessando as camadas corticais até o corpo caloso, ocorre grande inflamação nessa região. Apesar da lesão não alcançar o VL, é possível que sinais liberados pela inflamação ou pelas células que estão infiltrando no tecido lesado, como astrócitos reativos e microglia, influenciem o número de células RGL na SVZ, levando a sua diminuição. Nos animais que receberam células de MO, essas células podem estar gerando neuroproteção, o que levaria a uma menor lesão causada pela isquemia. Em modelos de isquemia focal, nem todos os grupos conseguiram observar diminuição da área de lesão após terapia com células de MO, mesmo observando melhora funcional (CHEN ET AL., 2003; LI ET AL., 2006). No entanto, a terapia pode contribuir de outras maneiras para gerar essa melhora, como por exemplo, diminuindo a inflamação gerada pela isquemia. Essa inflamação poderia recrutar células, como a microglia, que liberaria fatores na região, modulando o número de células RGL na SVZ (OHTAKI ET AL., 2008; SCHWARTING ET AL., 2008).

Para avaliar se o transplante de células de MO era capaz de estimular o aparecimento de células RGL na SGZ, outra região neurogênica no cérebro adulto, o número de prolongamentos das células RGL foi quantificado no giro denteado. Nesse caso, foi utilizado GFAP para quantificar os prolongamentos radiais, pois a expressão de vimentina nessas células é insignificante. É preciso ressaltar que, GFAP é uma proteína de citoesqueleto presente também em astrócitos maduros; dessa forma, é possível que, além dos prolongamentos das células RGL, ramificações de astrócitos também tenham sido quantificadas. O aumento de prolongamentos GFAP-positivos nos animais Isq + cls em relação aos Isq e FO no giro denteado, assim como foi observado na SVZ, indica que as células dessas regiões respondem de maneira similar ao transplante. As células RGL na SGZ são consideradas progenitores neurais. Além disso, demonstrou-se nesse trabalho o potencial proliferativo das RGL na SVZ. Portanto, é possível que as células RGL da SVZ e SGZ apresentem função similar no adulto. No entanto, não foi observada uma correlação entre o aumento na proliferação e o aumento no número de células RGL em nenhuma das duas regiões. Na SVZ, as células RGL estão aumentadas desde o terceiro dia nos animais Isq e Isq + cls, período esse onde não foi observado aumento no número de células Ki67-positivas. Já na SGZ, só foi observada uma tendência ao aumento no número de células proliferando nos animais Isq, que não apresentam maior número de células RGL.

Como não foi observada uma correlação direta da proliferação celular com o aumento no número de prolongamentos das células RGL é possível que haja algum estímulo que induza a radialização de células presentes na SVZ. Sabe-se que sobre determinados estímulos, como o TGF α , astrócitos maduros são capazes de se diferenciar em células de glia radial (HUNTER E HATTEN, 1995; ZHOU ET AL., 2001; SHARIF ET AL., 2007). Esses estímulos estão presentes durante o desenvolvimento e mantêm a identidade da glia radial até o final do desenvolvimento, quando essas células de glia radial se transformam em astrócitos (VOIGHT ET AL., 1988; ALVES ET AL., 2002). Infusões de fatores de crescimento, como o EGF e o TGF α são capazes de estimular a formação de células do tipo glia radial na SVZ de camundongos adultos (GREGG E WEISS, 2003). Da mesma forma, foi observado a radialização de astrócitos madutos, *in vivo*, quando há a expressão de ErbB2 (GHASHGHAEI ET AL., 2007). Dessa forma, as células da MO poderiam estar liberando algum fator semelhante ao que existe durante o desenvolvimento (por exemplo o TGF α ou o EGF), o que poderia levar a diferenciação dos astrócitos da SVZ em células com morfologia de glia radial.

Alternativamente, as células RGL na SVZ podem estar dando suporte à migração dos novos neurônios formados nessa região. Em condições fisiológicas, foi observado que a associação das células RGL com neuroblasto é muito rara, o que sugere que essas células tenham outras funções no adulto que não dar suporte a migração neuronal. É preciso avaliar, no entanto, se após a lesão cerebral, como na isquemia, há um aumento nessa migração radial para o local da lesão. Já foi demonstrado que após a isquemia focal, alguns dos novos neurônios formados na SVZ migram para a região de lesão, diminuindo o número de neuroblastos migrando pela RMS, seu trajeto normal (ARVIDSSON ET AL., 2002; PARENT ET AL., 2002; KOKAIA ET AL., 2006). Esse tipo de migração sobre células RGL já foi observado após degeneração dos neurônios de projeção do córtex somatosensório. Neste estudo, neuroblastos embrionários transplantados localmente migraram para região de lesão sobre RGL. Essas RGL se diferenciaram transitoriamente a partir de astrócitos do animal lesado (LEAVITT ET AL., 1999). Como no nosso modelo de isquemia, a lesão ocorre principalmente na substância branca, é possível que as células RGL estejam dando suporte à migração de progenitores de oligodendrócitos para a região lesada. Já foi observado que após infusão de EGF no VL, as células B da SVZ proliferam e migram para o parênquima ao redor do VL onde se diferenciam em oligodendrócitos (GONZALEZ-PEREZ ET AL., 2009). Quando há lesão no corpo caloso, esses progenitores migram para essa região, repondo os oligodendrócitos perdidos (GONZALEZ-PEREZ ET AL., 2009). A grande maioria dos trabalhos mostra que, durante o desenvolvimento, os progenitores de oligodendrócitos migram sobre axônios para alcançar seus destinos finais. Além disso, alguns grupos demonstraram que a glia radial embrionária também poderia dar suporte a migração desses progenitores (DIERS-FENGER ET AL., 2001; HORIUCHI E TOMOOKA, 2006). Uma hipótese interessante é a de que as células RGL poderiam dar suporte à migração dos progenitores de oligodendrócitos gerados na SVZ para as regiões desmielinizadas após a lesão, como o trato óptico.

No nosso estudo foi observado que cerca de 70% dos prolongamentos das células RGL na SVZ fazem contato com vasos sanguíneos. Essa porcentagem não é alterada pela isquemia e/ou o transplante, o que indica que essa característica se mantém nas novas células RGL formadas. A associação dos prolongamentos radiais com os vasos sanguíneos pode indicar que as células RGL da SVZ no cérebro adulto sejam potenciais alvos de sinais oriundos da circulação ou das células endoteliais, ajudando na manutenção do estado neurogênico dessa região, por exemplo. Sabe-se que existe comunicação, através de junções comunicantes, entre algumas células da SVZ, como entre as células B1 ou entre as células B1 e as células E (MIRZADEH ET AL., 2008). Diversos sinais liberados na SVZ e SGZ permitem a formação de neurônios nessas regiões como descrito a seguir. A noguina, por exemplo, é um polipeptídeo liberado pelas células ependimárias na SVZ que inibe a ligação de BMP ao seu receptor favorecendo a formação de neurônios em detrimento as células da glia (LIM ET AL., 2000). As células endoteliais também liberam fatores importantes para a neurogênese. Estas células estimulam a proliferação e a diferenciação de neurônios quando colocadas em co-cultura com NSCs (SHEN ET AL., 2004). Como a barreira hematoencefálica na SVZ é mais permissiva a moléculas presentes na circulação (TAVAZOIE ET AL., 2008) é possível que existam sinais importantes oriundos da circulação para manter o

estado neurogênico da SVZ. Essa hipótese é corroborada pelos relatos de que as NSCs, tanto na SVZ como na SGZ, localizam-se próximas aos vasos sanguíneos (PALMER ET AL., 2000; SHEN ET AL., 2004). Dessa forma, se as células RGL fizerem contato com as outras células da SVZ, é possível que elas difundam os sinais vindos da circulação para a SVZ, mantendo o nicho neurogênico.

Outra possibilidade é que as células de MO e/ou a isquemia estejam estimulando a expressão de fatores tróficos/de crescimento na SVZ. Esses fatores poderiam ser responsáveis pelo aumento no número de células RGL na SVZ. Foram analisados os níveis de RNAm para diferentes fatores tróficos/de crescimento expressos pelas células da SVZ 3 dias após a isquemia e/ou do transplante de células de MO. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando analisamos os níveis de RNAm de CNTF, FGF-2, VEGF e TGF-α presentes na SVZ 3 dias após a lesão, mas foram observadas tendências ao aumento nos níveis de RNAm para FGF-2, VEGF e TGF-α somente nos animais Isq. Essa tendência não foi observada nos animais que receberam o transplante de células de MO. Esses resultados indicam que a Isq pode estar estimulando a expressão desses fatores pelas células da SVZ, no entanto, quando há transplante de células de MO, pode ocorrer uma proteção do tecido cerebral à isquemia, gerando lesão isquêmica menor que não seria suficiente para estimular a expressão de tais fatores na SVZ. Já foi demonstrado que após o transplante de MSCs, ocorre a diminuição dos níveis de alguns genes que normalmente são induzidos pela isquemia. Esses genes estão relacionados principalmente à inflamação e resposta imune, demonstrando que há menor ativação desses processos nos animais isquêmicos que receberam transplante de MSCs (OHTAKI ET AL., 2008).

No entanto, é necessário repetir a análise dos níveis de RNAm no nosso modelo para que essa hipótese seja confirmada. Sete dias após a isquemia, foram analisados qualitativamente os níveis de RNAm dos mesmos fatores de crescimento, incluindo nesse

estudo a análise do BDNF. Foi possível observar o aumento nos níveis de BDNF nos animais que receberam o transplante de células de MO, tanto os FO como os Isq, comparado com os demais grupos. No entanto, é necessário analisar os níveis de BDNF com PCR em tempo real para inferir de quanto seria esse aumento. Sete dias após a isquemia também foi possível observar aumento no número de células RGL somente nos animais Isq + cls, o que poderia indicar que o BDNF pode estar sendo expresso pelas células RGL ou estimulando o aparecimento delas. Sabe-se que a glia de Muller, um tipo de glia radial presente na retina adulta, expressa BDNF e esse fator pode ser um dos responsáveis pelo efeito neuroprotetor dessas células sobre as células ganglionares da retina após lesão (SEKI ET AL., 2005). É importante ressaltar que foi observado aumento nos níveis de BDNF também nos animais FO + cls, demonstrando que esse resultado é gerado pelas células de MO e não pela isquemia. No entanto, não foi observado aumento no número de células RGL nos animais FO + cls nessa região, apesar de existir uma tendência. Isso vai de encontro à hipótese de que o BDNF é o responsável pelo aparecimento das células RGL. Na análise de distribuição das células de MO no parênquima cerebral, não foram observadas células na SVZ, indicando que os níveis de RNAm analisados neste estudo não são das células transplantadas, que por sua vez, poderiam ser somente as moduladoras dessa expressão diferencial.

Sabe-se que infusões de EGF e TGF- α no VL são capazes de estimular a formação de células RGL na SVZ de camundongos adultos (GREGG E WEISS, 2003). O TGF- α também é capaz de, *in vitro*, estimular a diferenciação de astrócitos maduros em células de glia radial (ZHOU ET AL., 2001). É possível que esses fatores estejam sendo liberados pelas células de MO estimulando o aparecimento das células RGL, no entanto, é necessário, estudar a expressão dessas moléculas nas células de MO para confirmar essa hipótese.

Greg e Weiss (2003) demonstraram também o aparecimento de células RGL a partir das células ependimárias após a infusão de FGF-2. No entanto, apesar da morfologia radial,

essas células não eram capazes de dar suporte à migração neuronal. De forma contrária, as células RGL originadas a partir de células da SVZ, após a infusão de EGF e TGF- α , eram capazes de dar suporte à migração neuronal. Analisando os níveis de FGF-2 3 dias após a isquemia, pode-se observar uma tendência ao aumento somente nos animais isquêmicos que não receberam o transplante de células. Três dias após a isquemia também é observado aumento no número de células RGL nos animais isquêmicos, aumento este que não se mantém 7 dias após a isquemia. O aparecimento transitório de células RGL na SVZ já foi observado em um modelo de isquemia focal. Nesse caso, as células ependimárias apresentam morfologia radial 1-2 dias após o insulto, não sendo mais observado após 7 dias (ZHANG ET AL., 2007). Como nos animais isquêmicos o aumento no número de células RGL é transitório, é possível que a isquemia esteja estimulando o aparecimento de células RGL a partir das células ependimárias, após estímulo com FGF-2, por exemplo. Já nos animais isquêmicos que receberam transplante de células de MO o aumento no número de células RGL não parece ser transitório, se mantendo pelo menos até 21 dias após a isquemia. Dessa forma, é possível que no caso dos animais que receberam o transplante de células, as células RGL se formaram a partir das células da SVZ.

A terapia com células de MO tem surgido como uma grande esperança no tratamento de lesões no SNC, e na isquemia cerebral essas células já tem sido utilizadas inclusive em ensaios clínicos, como descrito anteriormente. As células de MO liberam diversas moléculas que podem ser as responsáveis pelos efeitos positivos gerados em modelos animais de isquemia cerebral. Neste estudo, foi observado que o transplante de células de MO, mesmo em um modelo de isquemia branda, estimula o aumento da proliferação na SVZ e o aumento do número de células RGL nessa região por até 21 dias após a isquemia. As células de MO também estimulam o aumento no número de prolongamentos das células RGL no giro denteado, outra região neurogênica no SNC de adultos. Ainda não está clara, no entanto, a função das células RGL na SVZ. Devido a sua associação com vasos sanguíneos, elas podem ser importantes para manter o nicho neurogênico, captando sinais oriundos na circulação para a SVZ. É possível também que as células RGL atuem como NSCs ou progenitores na SVZ, uma vez que são capazes de proliferar e apresentam diversas características semelhantes às células de glia radial embrionárias, consideradas NSCs durante o desenvolvimento. O efeito do transplante de células de MO sobre a SVZ e SGZ pode ser fundamental para a regeneração do tecido lesado, já que as NSCs no animal isquêmico podem ser estimuladas a proliferar, formando mais neuroblastos que migram para área isquêmica repondo os neurônios perdidos. As células RGL também podem ajudar nessa regeneração, dando suporte à migração dos neuroblastos para a região de lesão. Dessa forma, as células RGL no adulto podem ser de extrema importância para a recuperação de uma lesão no SNC., Por fim, ainda não se sabe por quais mecanismos as células de MO são capazes de estimular a proliferação e a formação de novas células RGL na SVZ.

7. Conclusões:

 As células RGL presentes ao redor dos VLs de ratos adultos apresentam características semelhantes às células de glia radial embrionária. Entretanto, a associação dessas células com neuroblastos migratórios é um evento raro.

 A oligoemia em ratos Lister-Hooded adultos gera lesão na substância branca e o transplante de células de MO atenua essa lesão.

 A oligoemia estimula o aumento transitório número de prolongamentos das células RGL na SVZ.

 O transplante de células de MO estimula o aumento no número de prolongamentos das células RGL na SVZ dos animais isquêmicos até pelo menos 21 dias após a lesão. As células de MO também estimulam o aumento no número de células RGL na SGZ 7 dias após a isquemia.

- As células de MO estimulam o aumento na proliferação na SVZ, sendo esta observada somente por volta do sétimo dia após a isquemia. Por outro lado, as células de MO não tem efeito na proliferação na SGZ 7 dias após a oligoemia.

- Os efeitos gerados pelo transplante das células de MO na SVZ, podem ser resultado do estímulo a expressão de BDNF nessa região, uma vez que os níveis de RNAm para BDNF parecem aumentar 6 dias após o transplante de células de MO.

 Os animais que sofreram isquemia focal apresentam diminuição no número de prolongamentos radiais na região posterior do VL que é previnido pelo transplante de células de MO.

Conclusão geral:

As células RGL presentes ao redor dos VLs de ratos adultos apresentam características semelhantes às células de glia radial embrionária, podendo ser remanescentes das mesmas. Se as células RGL na SVZ tiverem a capacidade de gerar novos neurônios e de dar suporte à migração dos mesmos, é possível que o aumento do número de células RGL, após o transplante de células de MO nos animais isquêmicos, esteja induzindo a formação de novos neurônios que irão migrar sobre a RGL até o local da lesão, onde poderão repor os neurônios perdidos. Sendo este um dos mecanismos pelos quais o transplante de células de MO leva a melhora funcional em modelos animais de isquemia cerebral.

Referências:

ABERG, M. A., N. D. ABERG, H. HEDBACKER, J. OSCARSSON e P. S. ERIKSSON. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. J Neurosci, v.20, n.8, p.2896-903. 2000.

ABRAHAM, H. e G. LAZAR. Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. Brain Res, v.862, n.1-2, p.63-73. 2000.

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Anat Rec, v.145, p.573-91. 1963.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. J Comp Neurol, v.137, n.4, p.433-57. 1969.

ALTMAN, J. e G. D. DAS. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol, v.124, n.3, p.319-35. 1965.

ALTMAN, J. e G. D. DAS. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J Comp Neurol, v.126, n.3, p.337-89. 1966.

ALVAREZ-BUYLLA, A., J. M. GARCIA-VERDUGO e A. D. TRAMONTIN. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. Nat Rev Neurosci, v.2, n.4, p.287-93. 2001.

ALVAREZ-BUYLLA, A., B. SERI e F. DOETSCH. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull, v.57, n.6, p.751-8. 2002.

ALVES, J. A., P. BARONE, S. ENGELENDER, M. M. FROES e J. R. MENEZES. Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone. J Neurobiol, v.52, n.3, p.251-65. 2002.

ANDRE, C., C. C. CURIONI, C. BRAGA DA CUNHA e R. VERAS. Progressive decline in stroke mortality in Brazil from 1980 to 1982, 1990 to 1992, and 2000 to 2002. Stroke, v.37, n.11, p.2784-9. 2006.

ANKENY, D. P., D. M. MCTIGUE e L. B. JAKEMAN. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp Neurol, v.190, n.1, p.17-31. 2004.

ANTHONY, T. E., C. KLEIN, G. FISHELL e N. HEINTZ. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. Neuron, v.41, n.6, p.881-90. 2004.

ARVIDSSON, A., T. COLLIN, D. KIRIK, Z. KOKAIA e O. LINDVALL. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. Nat Med, v.8, n.9, p.963-70. 2002.

BAKER, S. A., K. A. BAKER e T. HAGG. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. Eur J Neurosci, v.20, n.2, p.575-9. 2004.

BANG, O. Y., J. S. LEE, P. H. LEE e G. LEE. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. Ann Neurol, v.57, n.6, p.874-82. 2005.

BARBOSA DA FONSECA, L. M., V. BATTISTELLA, G. R. DE FREITAS, B. GUTFILEN, R. C. DOS SANTOS GOLDENBERG, A. MAIOLINO, E. WAJNBERG, P. H. ROSADO DE CASTRO, R. MENDEZ-OTERO e C. ANDRE. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial delivery in a patient with chronic stroke. Circulation, v.120, n.6, p.539-41. 2009.

BARBOSA DA FONSECA, L. M., B. GUTFILEN, P. H. ROSADO DE CASTRO, V. BATTISTELLA, R. C. GOLDENBERG, T. KASAI-BRUNSWICK, C. L. CHAGAS, E. WAJNBERG, A. MAIOLINO, S. SALLES XAVIER, C. ANDRE, R. MENDEZ-OTERO e G. R. DE FREITAS. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. Exp Neurol, v.221, n.1, p.122-8.

BARNABE, G. F., T. T. SCHWINDT, M. E. CALCAGNOTTO, F. L. MOTTA, G. MARTINEZ, JR., A. C. DE OLIVEIRA, L. M. KEIM, V. D'ALMEIDA, R. MENDEZ-OTERO e L. E. MELLO. Chemically-induced RAT mesenchymal stem cells adopt molecular properties of neuronal-like cells but do not have basic neuronal functional properties. PLoS One, v.4, n.4, p.e5222. 2009.

BATISTA, C. M., T. E. KIPPIN, S. WILLAIME-MORAWEK, M. K. SHIMABUKURO, W. AKAMATSU e D. VAN DER KOOY. A progressive and cell non-autonomous increase in striatal neural stem cells in the Huntington's disease R6/2 mouse. J Neurosci, v.26, n.41, p.10452-60. 2006.

BELLUZZI, O., M. BENEDUSI, J. ACKMAN e J. J. LOTURCO. **Electrophysiological** differentiation of new neurons in the olfactory bulb. J Neurosci, v.23, n.32, p.10411-8. 2003.

BENDEL, O., T. BUETERS, M. VON EULER, S. OVE OGREN, J. SANDIN e G. VON EULER. Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. J Cereb Blood Flow Metab, v.25, n.12, p.1586-95. 2005.

BENNETT, S. A., M. TENNISWOOD, J. H. CHEN, C. M. DAVIDSON, M. T. KEYES, T. FORTIN e B. A. PAPPAS. Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. Neuroreport, v.9, n.1, p.161-6. 1998.

BENRAISS, A., E. CHMIELNICKI, K. LERNER, D. ROH e S. A. GOLDMAN. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. J Neurosci, v.21, n.17, p.6718-31. 2001.

BOBIS, S., D. JAROCHA e M. MAJKA. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. Folia Histochem Cytobiol, v.44, n.4, p.215-30. 2006.

BONFANTI, L. e P. PERETTO. Radial glial origin of the adult neural stem cells in the subventricular zone. Prog Neurobiol, v.83, n.1, p.24-36. 2007.

BORLONGAN, C. V., M. HADMAN, C. D. SANBERG e P. R. SANBERG. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. Stroke, v.35, n.10, p.2385-9. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-54. 1976.

BRAZELTON, T. R., F. M. ROSSI, G. I. KESHET e H. M. BLAU. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science, v.290, n.5497, p.1775-9. 2000.

BROWN, J., C. M. COOPER-KUHN, G. KEMPERMANN, H. VAN PRAAG, J. WINKLER, F. H. GAGE e H. G. KUHN. Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. Eur J Neurosci, v.17, n.10, p.2042-6. 2003.

BULL, N. D. e P. F. BARTLETT. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. J Neurosci, v.25, n.47, p.10815-21. 2005.

CAMERON, H. A., C. S. WOOLLEY, B. S. MCEWEN e E. GOULD. **Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat**. Neuroscience, v.56, n.2, p.337-44. 1993.

CAPELA, A. e S. TEMPLE. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. Neuron, v.35, n.5, p.865-75. 2002.

CARLEN, M., R. M. CASSIDY, H. BRISMAR, G. A. SMITH, L. W. ENQUIST e J. FRISEN. Functional integration of adult-born neurons. Curr Biol, v.12, n.7, p.606-8. 2002.

CARLEN, M., K. MELETIS, C. GORITZ, V. DARSALIA, E. EVERGREN, K. TANIGAKI, M. AMENDOLA, F. BARNABE-HEIDER, M. S. YEUNG, L. NALDINI, T. HONJO, Z. KOKAIA, O. SHUPLIAKOV, R. M. CASSIDY, O. LINDVALL e J. FRISEN. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. Nat Neurosci, v.12, n.3, p.259-67. 2009.

CARMELIET, P. e M. TESSIER-LAVIGNE. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. Nature, v.436, n.7048, p.193-200. 2005.

CHEN, H. e A. J. WEBER. Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. Glia, v.38, n.2, p.115-25. 2002.

CHEN, J., Y. LI, M. KATAKOWSKI, X. CHEN, L. WANG, D. LU, M. LU, S. C. GAUTAM e M. CHOPP. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. J Neurosci Res, v.73, n.6, p.778-86. 2003.

CHEN, J., Y. LI, L. WANG, M. LU, X. ZHANG e M. CHOPP. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. J Neurol Sci, v.189, n.1-2, p.49-57. 2001.

CHEN, J., Y. LI, L. WANG, Z. ZHANG, D. LU, M. LU e M. CHOPP. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. Stroke, v.32, n.4, p.1005-11. 2001.

CHEN, X., Y. LI, L. WANG, M. KATAKOWSKI, L. ZHANG, J. CHEN, Y. XU, S. C. GAUTAM e M. CHOPP. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. Neuropathology, v.22, n.4, p.275-9. 2002.

CHIASSON, B. J., V. TROPEPE, C. M. MORSHEAD e D. VAN DER KOOY. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. J Neurosci, v.19, n.11, p.4462-71. 1999.

CHOI, S. H., Y. LI, L. F. PARADA e S. S. SISODIA. **Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF**. Mol Neurodegener, v.4, n.1, p.52. 2009.

CHOKYU, I., T. TERADA, Y. MATSUDA, H. OKUMURA, A. SHINTANI e Y. NAKAMURA. **[A case of spontaneous fusiform aneurysm in a middle cerebral artery branch which causes rapidly thrombosed formation in a short period]**. No Shinkei Geka, v.35, n.11, p.1109-13. 2007.

CHOY, M., V. GANESAN, D. L. THOMAS, J. S. THORNTON, E. PROCTOR, M. D. KING, L. VAN DER WEERD, D. G. GADIAN e M. F. LYTHGOE. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. J Cereb Blood Flow Metab, v.26, n.8, p.1066-75. 2006.

COLUCCI-D'AMATO, L., V. BONAVITA e U. DI PORZIO. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. Neurol Sci, v.27, n.4, p.266-70. 2006.

COROTTO, F. S., J. R. HENEGAR e J. A. MARUNIAK. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. Neuroscience, v.61, n.4, p.739-44. 1994.

CORREA, P. L., C. T. MESQUITA, R. M. FELIX, J. C. AZEVEDO, G. B. BARBIRATO, C. H. FALCAO, C. GONZALEZ, M. L. MENDONCA, A. MANFRIM, G. DE FREITAS, C. C.

OLIVEIRA, D. SILVA, D. AVILA, R. BOROJEVIC, S. ALVES, A. C. OLIVEIRA, JR. e H. F. DOHMANN. Assessment of intra-arterial injected autologous bone marrow mononuclear cell distribution by radioactive labeling in acute ischemic stroke. Clin Nucl Med, v.32, n.11, p.839-41. 2007.

COSKUN, V., H. WU, B. BLANCHI, S. TSAO, K. KIM, J. ZHAO, J. C. BIANCOTTI, L. HUTNICK, R. C. KRUEGER, JR., G. FAN, J. DE VELLIS e Y. E. SUN. **CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.3, p.1026-31. 2008.

CRAIG, C. G., V. TROPEPE, C. M. MORSHEAD, B. A. REYNOLDS, S. WEISS e D. VAN DER KOOY. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. J Neurosci, v.16, n.8, p.2649-58. 1996.

CUI, Q., Y. YIN e L. I. BENOWITZ. The role of macrophages in optic nerve regeneration. Neuroscience, v.158, n.3, p.1039-48. 2009.

CURTIS, M. A., E. B. PENNEY, A. G. PEARSON, W. M. VAN ROON-MOM, N. J. BUTTERWORTH, M. DRAGUNOW, B. CONNOR e R. L. FAULL. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.15, p.9023-7. 2003.

DASH, P. K., S. A. MACH e A. N. MOORE. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. J Neurosci Res, v.63, n.4, p.313-9. 2001.

DAYER, A. G., A. A. FORD, K. M. CLEAVER, M. YASSAEE e H. A. CAMERON. Shortterm and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. J Comp Neurol, v.460, n.4, p.563-72. 2003.

DE BUTTE, M., T. FORTIN e B. A. PAPPAS. **Pinealectomy: behavioral and neuropathological consequences in a chronic cerebral hypoperfusion model**. Neurobiol Aging, v.23, n.2, p.309-17. 2002.

DE LA TORRE, J. C., A. CADA, N. NELSON, G. DAVIS, R. J. SUTHERLAND e F. GONZALEZ-LIMA. Reduced cytochrome oxidase and memory dysfunction after chronic brain ischemia in aged rats. Neurosci Lett, v.223, n.3, p.165-8. 1997.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A., J. DA COSTA REIS, B. DIAZ PAREDES, L. MORAES, JASMIN, A. GIRALDI-GUIMARAES e R. MENDEZ-OTERO. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. Brain Res, v.1306, p.149-58.

DEVINE, S. M., D. R. ADKINS, H. KHOURY, R. A. BROWN, R. VIJ, W. BLUM e J. F. DIPERSIO. **Recent advances in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation**. J Lab Clin Med, v.141, n.1, p.7-32. 2003.

DIERS-FENGER, M., F. KIRCHHOFF, H. KETTENMANN, J. M. LEVINE e J. TROTTER. **AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia**. Glia, v.34, n.3, p.213-28. 2001.

DOETSCH, F., I. CAILLE, D. A. LIM, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell, v.97, n.6, p.703-16. 1999.

DOETSCH, F., J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci, v.17, n.13, p.5046-61. 1997.

DOETSCH, F., L. PETREANU, I. CAILLE, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. **EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells**. Neuron, v.36, n.6, p.1021-34. 2002.

DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH, F. MARINI, D. KRAUSE, R. DEANS, A. KEATING, D. PROCKOP e E. HORWITZ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-7. 2006.

EMSLEY, J. G. e T. HAGG. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. Exp Neurol, v.183, n.2, p.298-310. 2003.

ENWERE, E., T. SHINGO, C. GREGG, H. FUJIKAWA, S. OHTA e S. WEISS. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. J Neurosci, v.24, n.38, p.8354-65. 2004.

ERIKSSON, P. S., E. PERFILIEVA, T. BJORK-ERIKSSON, A. M. ALBORN, C. NORDBORG, D. A. PETERSON e F. H. GAGE. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med, v.4, n.11, p.1313-7. 1998.

FARKAS, E., G. DONKA, R. A. DE VOS, A. MIHALY, F. BARI e P. G. LUITEN. **Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain**. Acta Neuropathol, v.108, n.1, p.57-64. 2004.

FARKAS, E., A. INSTITORIS, F. DOMOKI, A. MIHALY e F. BARI. The effect of preand posttreatment with diazoxide on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Brain Res, v.1087, n.1, p.168-74. 2006.

FARKAS, E., A. INSTITORIS, F. DOMOKI, A. MIHALY, P. G. LUITEN e F. BARI. Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. Brain Res, v.1008, n.2, p.252-60. 2004.

FARKAS, E., P. G. LUITEN e F. BARI. **Permanent, bilateral common carotid artery** occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. Brain Res Rev, v.54, n.1, p.162-80. 2007.

FENG, L. e N. HEINTZ. Differentiating neurons activate transcription of the brain lipidbinding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. Development, v.121, n.6, p.1719-30. 1995. FILIPPOV, V., G. KRONENBERG, T. PIVNEVA, K. REUTER, B. STEINER, L. P. WANG, M. YAMAGUCHI, H. KETTENMANN e G. KEMPERMANN. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. Mol Cell Neurosci, v.23, n.3, p.373-82. 2003.

FLAMENT-DURAND, J. e J. P. BRION. **Tanycytes: morphology and functions: a review**. Int Rev Cytol, v.96, p.121-55. 1985.

FRANCIS, F., A. KOULAKOFF, D. BOUCHER, P. CHAFEY, B. SCHAAR, M. C. VINET, G. FRIOCOURT, N. MCDONNELL, O. REINER, A. KAHN, S. K. MCCONNELL, Y. BERWALD-NETTER, P. DENOULET e J. CHELLY. **Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons**. Neuron, v.23, n.2, p.247-56. 1999.

FREDERIKSEN, K. e R. D. MCKAY. **Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo**. J Neurosci, v.8, n.4, p.1144-51. 1988.

FUCHS, E. e J. A. SEGRE. Stem cells: a new lease on life. Cell, v.100, n.1, p.143-55. 2000.

GADISSEUX, J. F. e P. EVRARD. Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. Dev Neurosci, v.7, n.1, p.12-32. 1985.

GAGE, F. H., G. KEMPERMANN, T. D. PALMER, D. A. PETERSON e J. RAY. **Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus**. J Neurobiol, v.36, n.2, p.249-66. 1998.

GALILEO, D. S., G. E. GRAY, G. C. OWENS, J. MAJORS e J. R. SANES. Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.1, p.458-62. 1990.

GALVAO, R. P., J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. J Neurosci, v.28, n.50, p.13368-83. 2008.

GAO, Q., Y. LI e M. CHOPP. Bone marrow stromal cells increase astrocyte survival via upregulation of phosphoinositide 3-kinase/threonine protein kinase and mitogenactivated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathways and stimulate astrocyte trophic factor gene expression after anaerobic insult. Neuroscience, v.136, n.1, p.123-34. 2005.

GHASHGHAEI, H. T., J. M. WEIMER, R. S. SCHMID, Y. YOKOTA, K. D. MCCARTHY, B. POPKO e E. S. ANTON. Reinduction of ErbB2 in astrocytes promotes radial glial progenitor identity in adult cerebral cortex. Genes Dev, v.21, n.24, p.3258-71. 2007.

GIRALDI-GUIMARAES, A., M. REZENDE-LIMA, F. P. BRUNO e R. MENDEZ-OTERO. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. Brain Res. 2009.

GOLDMAN, S. A. e F. NOTTEBOHM. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.8, p.2390-4. 1983.

GONZALEZ-PEREZ, O., R. ROMERO-RODRIGUEZ, M. SORIANO-NAVARRO, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. Stem Cells, v.27, n.8, p.2032-43. 2009.

GOTZ, M. e W. B. HUTTNER. **The cell biology of neurogenesis**. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.10, p.777-88. 2005.

GOULD, E., A. BEYLIN, P. TANAPAT, A. REEVES e T. J. SHORS. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. Nat Neurosci, v.2, n.3, p.260-5. 1999.

GOULD, E., A. J. REEVES, M. S. GRAZIANO e C. G. GROSS. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. Science, v.286, n.5439, p.548-52. 1999.

GOULD, E., P. TANAPAT, B. S. MCEWEN, G. FLUGGE e E. FUCHS. **Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.6, p.3168-71. 1998.

GREGG, C. e S. WEISS. Generation of functional radial glial cells by embryonic and adult forebrain neural stem cells. J Neurosci, v.23, n.37, p.11587-601. 2003.

GRITTI, A., E. A. PARATI, L. COVA, P. FROLICHSTHAL, R. GALLI, E. WANKE, L. FARAVELLI, D. J. MORASSUTTI, F. ROISEN, D. D. NICKEL e A. L. VESCOVI. Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. J Neurosci, v.16, n.3, p.1091-100. 1996.

GROSS, C. G. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. Nat Rev Neurosci, v.1, n.1, p.67-73. 2000.

GUBERT, F. Influência das células de medula óssea e da isquemia global nas células tronco neurais de ratos adultos. 2006.Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

GUBERT, F., C. ZAVERUCHA-DO-VALLE, P. M. PIMENTEL-COELHO, R. MENDEZ-OTERO e M. F. SANTIAGO. **Radial glia-like cells persist in the adult rat brain**. Brain Res, v.1258, p.43-52. 2009.

HAMANO, K., T. S. LI, T. KOBAYASHI, S. KOBAYASHI, M. MATSUZAKI e K. ESATO. Angiogenesis induced by the implantation of self-bone marrow cells: a new material for therapeutic angiogenesis. Cell Transplant, v.9, n.3, p.439-43. 2000.

HARTFUSS, E., R. GALLI, N. HEINS e M. GOTZ. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol, v.229, n.1, p.15-30. 2001.

HATASHITA, S. e J. T. HOFF. Brain edema and cerebrovascular permeability during cerebral ischemia in rats. Stroke, v.21, n.4, p.582-8. 1990.

HEIM, C., J. ZHANG, J. LAN, M. SIEKLUCKA, T. KURZ, P. RIEDERER, M. GERLACH e K. H. SONTAG. Cerebral oligaemia episode triggers free radical formation and late cognitive deficiencies. Eur J Neurosci, v.12, n.2, p.715-25. 2000.

HEINS, N., P. MALATESTA, F. CECCONI, M. NAKAFUKU, K. L. TUCKER, M. A. HACK, P. CHAPOUTON, Y. A. BARDE e M. GOTZ. Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. Nat Neurosci, v.5, n.4, p.308-15. 2002.

HICKEY, W. F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. Semin Immunol, v.11, n.2, p.125-37. 1999.

HILL, W. D., D. C. HESS, A. MARTIN-STUDDARD, J. J. CAROTHERS, J. ZHENG, D. HALE, M. MAEDA, S. C. FAGAN, J. E. CARROLL e S. J. CONWAY. **SDF-1 (CXCL12)** is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. J Neuropathol Exp Neurol, v.63, n.1, p.84-96. 2004.

HIROUCHI, M. e Y. UKAI. [Current state on development of neuroprotective agents for cerebral ischemia]. Nippon Yakurigaku Zasshi, v.120, n.2, p.107-13. 2002.

HOCKFIELD, S. e R. D. MCKAY. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. J Neurosci, v.5, n.12, p.3310-28. 1985.

HOGLINGER, G. U., P. RIZK, M. P. MURIEL, C. DUYCKAERTS, W. H. OERTEL, I. CAILLE e E. C. HIRSCH. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. Nat Neurosci, v.7, n.7, p.726-35. 2004.

HORIUCHI, M. e Y. TOMOOKA. An oligodendroglial progenitor cell line FBD-102b possibly secretes a radial glia-inducing factor. Neurosci Res, v.56, n.2, p.213-9. 2006.

HUNTER, K. E. e M. E. HATTEN. Radial glial cell transformation to astrocytes is bidirectional: regulation by a diffusible factor in embryonic forebrain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.6, p.2061-5. 1995.

IIHOSHI, S., O. HONMOU, K. HOUKIN, K. HASHI e J. D. KOCSIS. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. Brain Res, v.1007, n.1-2, p.1-9. 2004.

IMITOLA, J., K. RADDASSI, K. I. PARK, F. J. MUELLER, M. NIETO, Y. D. TENG, D. FRENKEL, J. LI, R. L. SIDMAN, C. A. WALSH, E. Y. SNYDER e S. J. KHOURY. **Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.52, p.18117-22. 2004.

IMURA, T., I. NAKANO, H. I. KORNBLUM e M. V. SOFRONIEW. Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. Glia, v.53, n.3, p.277-93. 2006.

IWASAKI, H., Y. OHMACHI, E. KUME e J. KRIEGLSTEIN. Strain differences in vulnerability of hippocampal neurons to transient cerebral ischaemia in the rat. Int J Exp Pathol, v.76, n.3, p.171-8. 1995.

JIN, K., M. LAFEVRE-BERNT, Y. SUN, S. CHEN, J. GAFNI, D. CRIPPEN, A. LOGVINOVA, C. A. ROSS, D. A. GREENBERG e L. M. ELLERBY. **FGF-2** promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.50, p.18189-94. 2005.

JIN, K., X. O. MAO, Y. SUN, L. XIE e D. A. GREENBERG. **Stem cell factor stimulates neurogenesis in vitro and in vivo**. J Clin Invest, v.110, n.3, p.311-9. 2002.

JIN, K., M. MINAMI, J. Q. LAN, X. O. MAO, S. BATTEUR, R. P. SIMON e D. A. GREENBERG. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.8, p.4710-5. 2001.

JIN, K., A. L. PEEL, X. O. MAO, L. XIE, B. A. COTTRELL, D. C. HENSHALL e D. A. GREENBERG. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.1, p.343-7. 2004.

JIN, K., Y. SUN, L. XIE, A. PEEL, X. O. MAO, S. BATTEUR e D. A. GREENBERG. **Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum**. Mol Cell Neurosci, v.24, n.1, p.171-89. 2003.

JOHANSSON, C. B., S. MOMMA, D. L. CLARKE, M. RISLING, U. LENDAHL e J. FRISEN. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, v.96, n.1, p.25-34. 1999.

KABOS, P., M. EHTESHAM, A. KABOSOVA, K. L. BLACK e J. S. YU. Generation of neural progenitor cells from whole adult bone marrow. Exp Neurol, v.178, n.2, p.288-93. 2002.

KAMEDA, Y., Y. ARAI e T. NISHIMAKI. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. Cell Tissue Res, v.314, n.2, p.251-62. 2003.

KAMIJIMA, T., M. ISOBE, J. SUZUKI, D. FUKUI, M. ARAI, H. URAYAMA, K. NISHIMAKI, M. SEKIGUCHI e S. KAWASAKI. Enhanced embryonic nonmuscle myosin heavy chain isoform and matrix metalloproteinase expression in aortic abdominal aneurysm with rapid progression. Cardiovasc Pathol, v.8, n.5, p.291-5. 1999.

KAPLAN, M. S. Proliferation of subependymal cells in the adult primate CNS: differential uptake of DNA labelled precursors. J Hirnforsch, v.24, n.1, p.23-33. 1983.

KAPLAN, M. S. e D. H. BELL. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. J Neurosci, v.4, n.6, p.1429-41. 1984.

KAPLAN, M. S. e J. W. HINDS. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. Science, v.197, n.4308, p.1092-4. 1977.

KARAOZ, E., A. AKSOY, S. AYHAN, A. E. SARIBOYACI, F. KAYMAZ e M. KASAP. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. Histochem Cell Biol, v.132, n.5, p.533-46. 2009.

KEE, N. J., E. PRESTON e J. M. WOJTOWICZ. Enhanced neurogenesis after transient global ischemia in the dentate gyrus of the rat. Exp Brain Res, v.136, n.3, p.313-20. 2001.

KEMPERMANN, G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? Trends Neurosci, v.31, n.4, p.163-9. 2008.

KEMPERMANN, G., H. G. KUHN e F. H. GAGE. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature, v.386, n.6624, p.493-5. 1997.

KEMPERMANN, G., L. WISKOTT e F. H. GAGE. Functional significance of adult neurogenesis. Curr Opin Neurobiol, v.14, n.2, p.186-91. 2004.

KOHWI, M., N. OSUMI, J. L. RUBENSTEIN e A. ALVAREZ-BUYLLA. **Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb**. J Neurosci, v.25, n.30, p.6997-7003. 2005.

KOHYAMA, J., H. ABE, T. SHIMAZAKI, A. KOIZUMI, K. NAKASHIMA, S. GOJO, T. TAGA, H. OKANO, J. HATA e A. UMEZAWA. Brain from bone: efficient "metadifferentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation, v.68, n.4-5, p.235-44. 2001.

KOKAIA, Z. e O. LINDVALL. Neurogenesis after ischaemic brain insults. Curr Opin Neurobiol, v.13, n.1, p.127-32. 2003.

KOKAIA, Z., P. THORED, A. ARVIDSSON e O. LINDVALL. **Regulation of strokeinduced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress**. Cereb Cortex, v.16 Suppl 1, p.i162-7. 2006.

KORNACK, D. R. e P. RAKIC. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.8, p.4752-7. 2001.

KRIEGSTEIN, A. e A. ALVAREZ-BUYLLA. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu Rev Neurosci, v.32, p.149-84. 2009.

KRIEGSTEIN, A. R. e M. GOTZ. Radial glia diversity: a matter of cell fate. Glia, v.43, n.1, p.37-43. 2003.

KRONENBERG, G., K. REUTER, B. STEINER, M. D. BRANDT, S. JESSBERGER, M. YAMAGUCHI e G. KEMPERMANN. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. J Comp Neurol, v.467, n.4, p.455-63. 2003.

KUHN, H. G., H. DICKINSON-ANSON e F. H. GAGE. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci, v.16, n.6, p.2027-33. 1996.

KUHN, H. G., J. WINKLER, G. KEMPERMANN, L. J. THAL e F. H. GAGE. **Epidermal** growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J Neurosci, v.17, n.15, p.5820-9. 1997.

KURUMATANI, T., T. KUDO, Y. IKURA e M. TAKEDA. White matter changes in the gerbil brain under chronic cerebral hypoperfusion. Stroke, v.29, n.5, p.1058-62. 1998.

LAYWELL, E. D., P. RAKIC, V. G. KUKEKOV, E. C. HOLLAND e D. A. STEINDLER. **Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.25, p.13883-8. 2000.

LEAVITT, B. R., C. S. HERNIT-GRANT e J. D. MACKLIS. Mature astrocytes transform into transitional radial glia within adult mouse neocortex that supports directed migration of transplanted immature neurons. Exp Neurol, v.157, n.1, p.43-57. 1999.

LEE, J. H., S. Y. PARK, Y. W. SHIN, K. W. HONG, C. D. KIM, S. M. SUNG, K. Y. KIM e W. S. LEE. Neuroprotection by cilostazol, a phosphodiesterase type 3 inhibitor, against apoptotic white matter changes in rat after chronic cerebral hypoperfusion. Brain Res, v.1082, n.1, p.182-91. 2006.

LEON, S., Y. YIN, J. NGUYEN, N. IRWIN e L. I. BENOWITZ. Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. J Neurosci, v.20, n.12, p.4615-26. 2000.

LEVITT, P. e P. RAKIC. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. J Comp Neurol, v.193, n.3, p.815-40. 1980.

LEWIS, G. P. e S. K. FISHER. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. Int Rev Cytol, v.230, p.263-90. 2003.

LI, Y., J. CHEN e M. CHOPP. Cell proliferation and differentiation from ependymal, subependymal and choroid plexus cells in response to stroke in rats. J Neurol Sci, v.193, n.2, p.137-46. 2002.

LI, Y., J. CHEN, C. L. ZHANG, L. WANG, D. LU, M. KATAKOWSKI, Q. GAO, L. H. SHEN, J. ZHANG, M. LU e M. CHOPP. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. Glia, v.49, n.3, p.407-17. 2005.

LI, Y. e M. CHOPP. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. Neurosci Lett, v.456, n.3, p.120-3. 2009.

LI, Y., K. MCINTOSH, J. CHEN, C. ZHANG, Q. GAO, J. BORNEMAN, K. RAGINSKI, J. MITCHELL, L. SHEN, J. ZHANG, D. LU e M. CHOPP. Allogeneic bone marrow stromal cells promote glial-axonal remodeling without immunologic sensitization after stroke in rats. Exp Neurol, v.198, n.2, p.313-25. 2006.

LIE, D. C., S. A. COLAMARINO, H. J. SONG, L. DESIRE, H. MIRA, A. CONSIGLIO, E. S. LEIN, S. JESSBERGER, H. LANSFORD, A. R. DEARIE e F. H. GAGE. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. Nature, v.437, n.7063, p.1370-5. 2005.

LIE, D. C., G. DZIEWCZAPOLSKI, A. R. WILLHOITE, B. K. KASPAR, C. W. SHULTS e F. H. GAGE. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. J Neurosci, v.22, n.15, p.6639-49. 2002.

LIESZ, A., E. SURI-PAYER, C. VELTKAMP, H. DOERR, C. SOMMER, S. RIVEST, T. GIESE e R. VELTKAMP. **Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke**. Nat Med, v.15, n.2, p.192-9. 2009.

LIM, D. A., A. D. TRAMONTIN, J. M. TREVEJO, D. G. HERRERA, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. Neuron, v.28, n.3, p.713-26. 2000.

LIU, J., K. SOLWAY, R. O. MESSING e F. R. SHARP. Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. J Neurosci, v.18, n.19, p.7768-78. 1998.

LOIS, C. e A. ALVAREZ-BUYLLA. **Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.5, p.2074-7. 1993.

LOIS, C. e A. ALVAREZ-BUYLLA. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science, v.264, n.5162, p.1145-8. 1994.

LU, A., R. Q. RAN, J. CLARK, M. REILLY, A. NEE e F. R. SHARP. **17-beta-estradiol** induces heat shock proteins in brain arteries and potentiates ischemic heat shock protein induction in glia and neurons. J Cereb Blood Flow Metab, v.22, n.2, p.183-95. 2002.

LU, L., G. BAO, H. CHEN, P. XIA, X. FAN, J. ZHANG, G. PEI e L. MA. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. Exp Neurol, v.183, n.2, p.600-9. 2003.

LUSKIN, M. B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. Neuron, v.11, n.1, p.173-89. 1993.

MACAS, J., C. NERN, K. H. PLATE e S. MOMMA. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. J Neurosci, v.26, n.50, p.13114-9. 2006.

MAGAVI, S. S. e J. D. MACKLIS. Induction of neuronal type-specific neurogenesis in the cerebral cortex of adult mice: manipulation of neural precursors in situ. Brain Res Dev Brain Res, v.134, n.1-2, p.57-76. 2002.

MALATESTA, P., M. A. HACK, E. HARTFUSS, H. KETTENMANN, W. KLINKERT, F. KIRCHHOFF e M. GOTZ. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. Neuron, v.37, n.5, p.751-64. 2003.

MALBERG, J. E. e R. S. DUMAN. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology, v.28, n.9, p.1562-71. 2003.

MARKAKIS, E. A. e F. H. GAGE. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. J Comp Neurol, v.406, n.4, p.449-60. 1999.

MARSHALL, R. S., R. M. LAZAR, J. PILE-SPELLMAN, W. L. YOUNG, D. H. DUONG, S. JOSHI e N. OSTAPKOVICH. **Recovery of brain function during induced cerebral hypoperfusion**. Brain, v.124, n.Pt 6, p.1208-17. 2001.

MARTI-FABREGAS, J., M. ROMAGUERA-ROS, U. GOMEZ-PINEDO, S. MARTINEZ-RAMIREZ, E. JIMENEZ-XARRIE, R. MARIN, J. L. MARTI-VILALTA e J. M. GARCIA-VERDUGO. **Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke**. Neurology, v.74, n.5, p.357-65.

MASWOOD, N., J. YOUNG, E. TILMONT, Z. ZHANG, D. M. GASH, G. A. GERHARDT, R. GRONDIN, G. S. ROTH, J. MATTISON, M. A. LANE, R. E. CARSON, R. M. COHEN, P. R. MOUTON, C. QUIGLEY, M. P. MATTSON e D. K. INGRAM. Caloric restriction increases neurotrophic factor levels and attenuates neurochemical and behavioral deficits in a primate model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.52, p.18171-6. 2004.

MATSUO, A., I. TOOYAMA, S. ISOBE, Y. OOMURA, I. AKIGUCHI, K. HANAI, J. KIMURA e H. KIMURA. Immunohistochemical localization in the rat brain of an epitope corresponding to the fibroblast growth factor receptor-1. Neuroscience, v.60, n.1, p.49-66. 1994.

MATTSON, M. P., W. DUAN, R. WAN e Z. GUO. **Prophylactic activation of neuroprotective stress response pathways by dietary and behavioral manipulations**. NeuroRx, v.1, n.1, p.111-6. 2004.

MATTSON, M. P., S. MAUDSLEY e B. MARTIN. **BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders**. Trends Neurosci, v.27, n.10, p.589-94. 2004.

MATTSON, M. P., S. MAUDSLEY e B. MARTIN. A neural signaling triumvirate that influences ageing and age-related disease: insulin/IGF-1, BDNF and serotonin. Ageing Res Rev, v.3, n.4, p.445-64. 2004.

MAYSAMI, S., J. Q. LAN, M. MINAMI e R. P. SIMON. **Proliferating progenitor cells: a required cellular element for induction of ischemic tolerance in the brain**. J Cereb Blood Flow Metab, v.28, n.6, p.1104-13. 2008.

MENDEZ-OTERO, R., C. ZAVERUCHA-DO-VALLE, F. GUBERT, G. R. FREITAS e M. F. SANTIAGO. **Regulation and function of neurogenesis in the adult vertebrate brain**. Braz J Med Biol Res, v.38, n.10, p.1553-9. 2005.

MENDONCA, M. L., G. R. FREITAS, S. A. SILVA, A. MANFRIM, C. H. FALCAO, C. GONZALES, C. ANDRE, H. F. DOHMANN, R. BOROJEVIC e R. M. OTERO. [Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke]. Arq Bras Cardiol, v.86, n.1, p.52-5. 2006.

MENN, B., J. M. GARCIA-VERDUGO, C. YASCHINE, O. GONZALEZ-PEREZ, D. ROWITCH e A. ALVAREZ-BUYLLA. **Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain**. J Neurosci, v.26, n.30, p.7907-18. 2006.

MERKLE, F. T., A. D. TRAMONTIN, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. **Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone**. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.50, p.17528-32. 2004.

MEZEY, E., K. J. CHANDROSS, G. HARTA, R. A. MAKI e S. R. MCKERCHER. **Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow**. Science, v.290, n.5497, p.1779-82. 2000.

MINEUR, Y. S., C. BELZUNG e W. E. CRUSIO. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. Neuroscience, v.150, n.2, p.251-9. 2007.

MIRZADEH, Z., F. T. MERKLE, M. SORIANO-NAVARRO, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. Cell Stem Cell, v.3, n.3, p.265-78. 2008.

MISSION, J. P., T. TAKAHASHI e V. S. CAVINESS, JR. Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. Glia, v.4, n.2, p.138-48. 1991.

MISSON, J. P., M. A. EDWARDS, M. YAMAMOTO e V. S. CAVINESS, JR. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. Brain Res Dev Brain Res, v.44, n.1, p.95-108. 1988.

MIURA, T., Y. KATAKURA, K. YAMAMOTO, N. UEHARA, T. TSUCHIYA, E. H. KIM e S. SHIRAHATA. Neural stem cells lose telomerase activity upon differentiating into astrocytes. Cytotechnology, v.36, n.1-3, p.137-44. 2001.

MOREST, D. K. e J. SILVER. Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? Glia, v.43, n.1, p.6-18. 2003.

MORSHEAD, C. M. Adult neural stem cells: attempting to solve the identity crisis. Dev Neurosci, v.26, n.2-4, p.93-100. 2004.

MORSHEAD, C. M., P. BENVENISTE, N. N. ISCOVE e D. VAN DER KOOY. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. Nat Med, v.8, n.3, p.268-73. 2002.

MUNOZ, J. R., B. R. STOUTENGER, A. P. ROBINSON, J. L. SPEES e D. J. PROCKOP. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.50, p.18171-6. 2005.

NAKATOMI, H., T. KURIU, S. OKABE, S. YAMAMOTO, O. HATANO, N. KAWAHARA, A. TAMURA, T. KIRINO e M. NAKAFUKU. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. Cell, v.110, n.4, p.429-41. 2002.

NAMBA, T., H. MOCHIZUKI, M. ONODERA, Y. MIZUNO, H. NAMIKI e T. SEKI. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. Eur J Neurosci, v.22, n.8, p.1928-41. 2005.

NI, J. W., K. MATSUMOTO, H. B. LI, Y. MURAKAMI e H. WATANABE. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat. Brain Res, v.673, n.2, p.290-6. 1995.

NI, J. W., K. MATSUMOTO e H. WATANABE. Tetramethylpyrazine improves spatial cognitive impairment induced by permanent occlusion of bilateral common carotid arteries or scopolamine in rats. Jpn J Pharmacol, v.67, n.2, p.137-41. 1995.

NOCTOR, S. C., A. C. FLINT, T. A. WEISSMAN, R. S. DAMMERMAN e A. R. KRIEGSTEIN. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature, v.409, n.6821, p.714-20. 2001.

NOCTOR, S. C., A. C. FLINT, T. A. WEISSMAN, W. S. WONG, B. K. CLINTON e A. R. KRIEGSTEIN. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci, v.22, n.8, p.3161-73. 2002.

NOCTOR, S. C., V. MARTINEZ-CERDENO, L. IVIC e A. R. KRIEGSTEIN. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci, v.7, n.2, p.136-44. 2004.

OBRENOVITCH, T. P. The ischaemic penumbra: twenty years on. Cerebrovasc Brain Metab Rev, v.7, n.4, p.297-323. 1995.

OHAB, J. J., S. FLEMING, A. BLESCH e S. T. CARMICHAEL. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. J Neurosci, v.26, n.50, p.13007-16. 2006.

OHL, F. e E. FUCHS. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. Brain Res Cogn Brain Res, v.7, n.3, p.379-87. 1999.

OHTA, H., H. NISHIKAWA, H. KIMURA, H. ANAYAMA e M. MIYAMOTO. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. Neuroscience, v.79, n.4, p.1039-50. 1997.

OHTAKI, H., J. H. YLOSTALO, J. E. FORAKER, A. P. ROBINSON, R. L. REGER, S. SHIODA e D. J. PROCKOP. 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, v.105, n.38, p.14638-43. 2008.

OHWADA, A., M. SEKIYA, H. HANAKI, K. K. ARAI, I. NAGAOKA, S. HORI, S. TOMINAGA, K. HIRAMATSU e Y. FUKUCHI. **DNA vaccination by mecA sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant Staphylococcus aureus**. J Antimicrob Chemother, v.44, n.6, p.767-74. 1999.

ONODERA, S., M. TANAKA, M. AOYAMA, Y. ARAI, N. INABA, T. SUZUKI, A. NISHIZAWA, M. SHIBATA e Y. SEKINE. Antiulcer effect of lafutidine on indomethacin-induced gastric antral ulcers in refed rats. Jpn J Pharmacol, v.80, n.3, p.229-35. 1999.

ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nat Rev Genet, v.1, n.1, p.57-64. 2000.

OTORI, T., T. KATSUMATA, H. MURAMATSU, F. KASHIWAGI, Y. KATAYAMA e A. TERASHI. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.30, n.4, p.266-72. 2003.

PALMER, T. D., J. TAKAHASHI e F. H. GAGE. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol Cell Neurosci, v.8, n.6, p.389-404. 1997.

PALMER, T. D., A. R. WILLHOITE e F. H. GAGE. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. J Comp Neurol, v.425, n.4, p.479-94. 2000.

PAPPAS, B. A., J. C. DE LA TORRE, C. M. DAVIDSON, M. T. KEYES e T. FORTIN. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. Brain Res, v.708, n.1-2, p.50-8. 1996.

PARENT, J. M., Z. S. VEXLER, C. GONG, N. DERUGIN e D. M. FERRIERO. **Rat** forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. Ann Neurol, v.52, n.6, p.802-13. 2002.

PARNAVELAS, J. G. e B. NADARAJAH. Radial glial cells. are they really glia? Neuron, v.31, n.6, p.881-4. 2001.

PECCHI, E., M. DALLAPORTA, C. CHARRIER, J. PIO, A. JEAN, E. MOYSE e J. D. TROADEC. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. J Comp Neurol, v.501, n.3, p.353-68. 2007.

PERETTO, P., C. DATI, S. DE MARCHIS, H. H. KIM, M. UKHANOVA, A. FASOLO e F. L. MARGOLIS. Expression of the secreted factors noggin and bone morphogenetic proteins in the subependymal layer and olfactory bulb of the adult mouse brain. Neuroscience, v.128, n.4, p.685-96. 2004.

PETERSON, D. A. **Stem cells in brain plasticity and repair**. Curr Opin Pharmacol, v.2, n.1, p.34-42. 2002.

PIMENTEL-COELHO, P. M., E. S. MAGALHAES, L. M. LOPES, L. C. DEAZEVEDO, M. F. SANTIAGO e R. MENDEZ-OTERO. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. Stem Cells Dev. 2009.

PITTENGER, M. F., A. M. MACKAY, S. C. BECK, R. K. JAISWAL, R. DOUGLAS, J. D. MOSCA, M. A. MOORMAN, D. W. SIMONETTI, S. CRAIG e D. R. MARSHAK. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells**. Science, v.284, n.5411, p.143-7. 1999.

PIXLEY, S. K. e J. DE VELLIS. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. Brain Res, v.317, n.2, p.201-9. 1984.

PLASCHKE, K. Aspects of ageing in chronic cerebral oligaemia. Mechanisms of degeneration and compensation in rat models. J Neural Transm, v.112, n.3, p.393-413. 2005.

PRILLER, J., D. A. PERSONS, F. F. KLETT, G. KEMPERMANN, G. W. KREUTZBERG e U. DIRNAGL. **Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo**. J Cell Biol, v.155, n.5, p.733-8. 2001.

RA, S. M., H. KIM, M. H. JANG, M. C. SHIN, T. H. LEE, B. V. LIM, C. J. KIM, E. H. KIM, K. M. KIM e S. S. KIM. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. Neurosci Lett, v.333, n.2, p.123-6. 2002.

RAKIC, P. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. Postgrad Med J, v.54 Suppl 1, p.25-40. 1978.

RAKIC, P. Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.25, p.11323-7. 1995.

RAKIC, P. **Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia**. Cereb Cortex, v.13, n.6, p.541-9. 2003.

RAMIREZ-CASTILLEJO, C., F. SANCHEZ-SANCHEZ, C. ANDREU-AGULLO, S. R. FERRON, J. D. AROCA-AGUILAR, P. SANCHEZ, H. MIRA, J. ESCRIBANO e I. FARINAS. **Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal**. Nat Neurosci, v.9, n.3, p.331-9. 2006.

RAPONI, E., F. AGENES, C. DELPHIN, N. ASSARD, J. BAUDIER, C. LEGRAVEREND e J. C. DELOULME. **S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose**

their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. Glia, v.55, n.2, p.165-77. 2007.

REYA, T., S. J. MORRISON, M. F. CLARKE e I. L. WEISSMAN. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, v.414, n.6859, p.105-11. 2001.

REYNOLDS, B. A. e S. WEISS. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science, v.255, n.5052, p.1707-10. 1992.

RIBEIRO-RESENDE, V. T., P. M. PIMENTEL-COELHO, L. A. MESENTIER-LOURO, R. M. MENDEZ, J. P. MELLO-SILVA, M. C. CABRAL-DA-SILVA, F. G. DE MELLO, R. A. DE MELO REIS e R. MENDEZ-OTERO. Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increases peripheral nerve regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. Neuroscience, v.159, n.2, p.540-9. 2009.

RIETZE, R. L., H. VALCANIS, G. F. BROOKER, T. THOMAS, A. K. VOSS e P. F. BARTLETT. **Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain**. Nature, v.412, n.6848, p.736-9. 2001.

RIQUELME, P. A., E. DRAPEAU e F. DOETSCH. **Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain**. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.363, n.1489, p.123-37. 2008.

ROSENKRANZ, K., S. KUMBRUCH, K. LEBERMANN, K. MARSCHNER, A. JENSEN, R. DERMIETZEL e C. MEIER. The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to the 'homing' of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain. J Neurosci Res. 2009.

SANAI, N., A. D. TRAMONTIN, A. QUINONES-HINOJOSA, N. M. BARBARO, N. GUPTA, S. KUNWAR, M. T. LAWTON, M. W. MCDERMOTT, A. T. PARSA, J. MANUEL-GARCIA VERDUGO, M. S. BERGER e A. ALVAREZ-BUYLLA. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature, v.427, n.6976, p.740-4. 2004.

SANCHEZ-RAMOS, J., S. SONG, F. CARDOZO-PELAEZ, C. HAZZI, T. STEDEFORD, A. WILLING, T. B. FREEMAN, S. SAPORTA, W. JANSSEN, N. PATEL, D. R. COOPER e P. R. SANBERG. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol, v.164, n.2, p.247-56. 2000.

SAUER, M. E. e B. E. WALKER. Radioautographic study of interkinetic nuclear migration in the neural tube. Proc Soc Exp Biol Med, v.101, n.3, p.557-60. 1959.

SAWAMOTO, K., H. WICHTERLE, O. GONZALEZ-PEREZ, J. A. CHOLFIN, M. YAMADA, N. SPASSKY, N. S. MURCIA, J. M. GARCIA-VERDUGO, O. MARIN, J. L. RUBENSTEIN, M. TESSIER-LAVIGNE, H. OKANO e A. ALVAREZ-BUYLLA. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. Science, v.311, n.5761, p.629-32. 2006.

SCHABITZ, W. R., C. SOMMER, W. ZODER, M. KIESSLING, M. SCHWANINGER e S. SCHWAB. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and

counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. Stroke, v.31, n.9, p.2212-7. 2000.

SCHMIDT-KASTNER, R., C. AGUIRRE-CHEN, I. SAUL, L. YICK, D. HAMASAKI, R. BUSTO e M. D. GINSBERG. Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. Brain Res, v.1052, n.1, p.28-39. 2005.

SCHWARTING, S., S. LITWAK, W. HAO, M. BAHR, J. WEISE e H. NEUMANN. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. Stroke, v.39, n.10, p.2867-75. 2008.

SEABERG, R. M. e D. VAN DER KOOY. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. J Neurosci, v.22, n.5, p.1784-93. 2002.

SEKI, M., T. TANAKA, Y. SAKAI, T. FUKUCHI, H. ABE, H. NAWA e N. TAKEI. Muller Cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Muller cells. Neurochem Res, v.30, n.9, p.1163-70. 2005.

SEKI, T. e Y. ARAI. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. Neuroreport, v.6, n.18, p.2479-82. 1995.

SEKI, T. e Y. ARAI. Temporal and spacial relationships between PSA-NCAMexpressing, newly generated granule cells, and radial glia-like cells in the adult dentate gyrus. J Comp Neurol, v.410, n.3, p.503-13. 1999.

SERI, B., J. M. GARCIA-VERDUGO, B. S. MCEWEN e A. ALVAREZ-BUYLLA. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci, v.21, n.18, p.7153-60. 2001.

SHAPIRO, L. A., M. J. KORN, Z. SHAN e C. E. RIBAK. **GFAP-expressing radial glia-like** cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. Brain Res, v.1040, n.1-2, p.81-91. 2005.

SHARIF, A., P. LEGENDRE, V. PREVOT, C. ALLET, L. ROMAO, J. M. STUDLER, H. CHNEIWEISS e M. P. JUNIER. Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. Oncogene, v.26, n.19, p.2695-706. 2007.

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

SHEN, Q., S. K. GODERIE, L. JIN, N. KARANTH, Y. SUN, N. ABRAMOVA, P. VINCENT, K. PUMIGLIA e S. TEMPLE. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. Science, v.304, n.5675, p.1338-40. 2004.

SHEN, Q., Y. WANG, E. KOKOVAY, G. LIN, S. M. CHUANG, S. K. GODERIE, B. ROYSAM e S. TEMPLE. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. Cell Stem Cell, v.3, n.3, p.289-300. 2008.

SHIBATA, T., K. YAMADA, M. WATANABE, K. IKENAKA, K. WADA, K. TANAKA e Y. INOUE. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. J Neurosci, v.17, n.23, p.9212-9. 1997.

SHIHABUDDIN, L. S., P. J. HORNER, J. RAY e F. H. GAGE. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. J Neurosci, v.20, n.23, p.8727-35. 2000.

SHINGO, T., C. GREGG, E. ENWERE, H. FUJIKAWA, R. HASSAM, C. GEARY, J. C. CROSS e S. WEISS. **Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin**. Science, v.299, n.5603, p.117-20. 2003.

SHINTANI, A., N. NAKAO, K. KAKISHITA e T. ITAKURA. **Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells**. Brain Res, v.1186, p.48-55. 2007.

SHINTANI, S., T. MUROHARA, H. IKEDA, T. UENO, K. SASAKI, J. DUAN e T. IMAIZUMI. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. Circulation, v.103, n.6, p.897-903. 2001.

SIDMAN, R. L., I. L. MIALE e N. FEDER. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. Exp Neurol, v.1, p.322-33. 1959.

SMITH, M. T., V. PENCEA, Z. WANG, M. B. LUSKIN e T. R. INSEL. Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. Horm Behav, v.39, n.1, p.11-21. 2001.

SPASSKY, N., F. T. MERKLE, N. FLAMES, A. D. TRAMONTIN, J. M. GARCIA-VERDUGO e A. ALVAREZ-BUYLLA. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci, v.25, n.1, p.10-8. 2005.

STEINER, B., F. KLEMPIN, L. WANG, M. KOTT, H. KETTENMANN e G. KEMPERMANN. **Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis**. Glia, v.54, n.8, p.805-14. 2006.

SUN, D., M. R. BULLOCK, M. J. MCGINN, Z. ZHOU, N. ALTEMEMI, S. HAGOOD, R. HAMM e R. J. COLELLO. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. Exp Neurol, v.216, n.1, p.56-65. 2009.

SUN, D., M. J. MCGINN, Z. ZHOU, H. B. HARVEY, M. R. BULLOCK e R. J. COLELLO. Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. Exp Neurol, v.204, n.1, p.264-72. 2007.

SUNDHOLM-PETERS, N. L., H. K. YANG, G. E. GOINGS, A. S. WALKER e F. G. SZELE. Radial glia-like cells at the base of the lateral ventricles in adult mice. J Neurocytol, v.33, n.1, p.153-64. 2004.

TAKASAWA, K., K. KITAGAWA, Y. YAGITA, T. SASAKI, S. TANAKA, K. MATSUSHITA, T. OHSTUKI, T. MIYATA, H. OKANO, M. HORI e M. MATSUMOTO. Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab, v.22, n.3, p.299-307. 2002.

TANAPAT, P., N. B. HASTINGS, A. J. REEVES e E. GOULD. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J Neurosci, v.19, n.14, p.5792-801. 1999.

TARNOK, A., H. ULRICH e J. BOCSI. **Phenotypes of stem cells from diverse origin**. Cytometry A, v.77, n.1, p.6-10.

TAUPIN, P. e F. H. GAGE. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. J Neurosci Res, v.69, n.6, p.745-9. 2002.

TAUPIN, P., J. RAY, W. H. FISCHER, S. T. SUHR, K. HAKANSSON, A. GRUBB e F. H. GAGE. **FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor**. Neuron, v.28, n.2, p.385-97. 2000.

TAVAZOIE, M., L. VAN DER VEKEN, V. SILVA-VARGAS, M. LOUISSAINT, L. COLONNA, B. ZAIDI, J. M. GARCIA-VERDUGO e F. DOETSCH. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. Cell Stem Cell, v.3, n.3, p.279-88. 2008.

TEMPLE, S. The development of neural stem cells. Nature, v.414, n.6859, p.112-7. 2001.

TERADA, N., T. HAMAZAKI, M. OKA, M. HOKI, D. M. MASTALERZ, Y. NAKANO, E. M. MEYER, L. MOREL, B. E. PETERSEN e E. W. SCOTT. **Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion**. Nature, v.416, n.6880, p.542-5. 2002.

THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 2001. **Stem cells: scientific progress and future research directions.** Retirado do National Institutes of Health no World Wide Web: http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/PDFs/frontmatter.pdf

TOMIMOTO, H., M. IHARA, H. WAKITA, R. OHTANI, J. X. LIN, I. AKIGUCHI, M. KINOSHITA e H. SHIBASAKI. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. Acta Neuropathol, v.106, n.6, p.527-34. 2003.

TONI, N., D. A. LAPLAGNE, C. ZHAO, G. LOMBARDI, C. E. RIBAK, F. H. GAGE e A. F. SCHINDER. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. Nat Neurosci, v.11, n.8, p.901-7. 2008.

TOWBIN, H., T. STAEHELIN e J. GORDON. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, p.4350-4. 1979.

TSUCHIYA, M., K. SAKO, S. YURA e Y. YONEMASU. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. Exp Brain Res, v.89, n.1, p.87-92. 1992.

TSUCHIYA, M., K. SAKO, S. YURA e Y. YONEMASU. Local cerebral glucose utilisation following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: relation to changes in local cerebral blood flow. Exp Brain Res, v.95, n.1, p.1-7. 1993.

ULRICH, P. T., S. KROPPENSTEDT, A. HEIMANN e O. KEMPSKI. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. Stroke, v.29, n.11, p.2412-20. 1998.

VAN DE WATER, S., M. VAN DE WETERING, J. JOORE, J. ESSELING, R. BINK, H. CLEVERS e D. ZIVKOVIC. Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. Development, v.128, n.20, p.3877-88. 2001.

VAN PRAAG, H., G. KEMPERMANN e F. H. GAGE. **Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus**. Nat Neurosci, v.2, n.3, p.266-70. 1999.

VAN PRAAG, H., A. F. SCHINDER, B. R. CHRISTIE, N. TONI, T. D. PALMER e F. H. GAGE. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature, v.415, n.6875, p.1030-4. 2002.

VOIGT, T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. J Comp Neurol, v.289, n.1, p.74-88. 1989.

WAGNER, J. P., I. B. BLACK e E. DICICCO-BLOOM. Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. J Neurosci, v.19, n.14, p.6006-16. 1999.

WAKITA, H., H. TOMIMOTO, I. AKIGUCHI, A. MATSUO, J. X. LIN, M. IHARA e P. L. MCGEER. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Brain Res, v.924, n.1, p.63-70. 2002.

WANG, M., P. R. CRISOSTOMO, C. HERRING, K. K. MELDRUM e D. R. MELDRUM. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.291, n.4, p.R880-4. 2006.

WEISS, S., C. DUNNE, J. HEWSON, C. WOHL, M. WHEATLEY, A. C. PETERSON e B. A. REYNOLDS. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. J Neurosci, v.16, n.23, p.7599-609. 1996.

WEISSMAN, I. L., D. J. ANDERSON e F. GAGE. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol, v.17, p.387-403. 2001.

WOODBURY, D., E. J. SCHWARZ, D. J. PROCKOP e I. B. BLACK. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res, v.61, n.4, p.364-70. 2000.

XU, Y., N. TAMAMAKI, T. NODA, K. KIMURA, Y. ITOKAZU, N. MATSUMOTO, M. DEZAWA e C. IDE. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. Exp Neurol, v.192, n.2, p.251-64. 2005.

YAMAMOTO, S., M. NAGAO, M. SUGIMORI, H. KOSAKO, H. NAKATOMI, N. YAMAMOTO, H. TAKEBAYASHI, Y. NABESHIMA, T. KITAMURA, G. WEINMASTER, K. NAKAMURA e M. NAKAFUKU. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. J Neurosci, v.21, n.24, p.9814-23. 2001.

YAMASHITA, T., M. NINOMIYA, P. HERNANDEZ ACOSTA, J. M. GARCIA-VERDUGO, T. SUNABORI, M. SAKAGUCHI, K. ADACHI, T. KOJIMA, Y. HIROTA, T. KAWASE, N. ARAKI, K. ABE, H. OKANO e K. SAWAMOTO. Subventricular zonederived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. J Neurosci, v.26, n.24, p.6627-36. 2006.

YIN, Y., Q. CUI, Y. LI, N. IRWIN, D. FISCHER, A. R. HARVEY e L. I. BENOWITZ. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. J Neurosci, v.23, n.6, p.2284-93. 2003.

YING, Q. L., J. NICHOLS, E. P. EVANS e A. G. SMITH. Changing potency by spontaneous fusion. Nature, v.416, n.6880, p.545-8. 2002.

YOSHIMURA, S., Y. TAKAGI, J. HARADA, T. TERAMOTO, S. S. THOMAS, C. WAEBER, J. C. BAKOWSKA, X. O. BREAKEFIELD e M. A. MOSKOWITZ. **FGF-2** regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.10, p.5874-9. 2001.

YOSHIMURA, S., T. TERAMOTO, M. J. WHALEN, M. C. IRIZARRY, Y. TAKAGI, J. QIU, J. HARADA, C. WAEBER, X. O. BREAKEFIELD e M. A. MOSKOWITZ. **FGF-2** regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. J Clin Invest, v.112, n.8, p.1202-10. 2003.

ZHANG, R., Z. ZHANG, L. WANG, Y. WANG, A. GOUSEV, L. ZHANG, K. L. HO, C. MORSHEAD e M. CHOPP. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. J Cereb Blood Flow Metab, v.24, n.4, p.441-8. 2004.

ZHANG, R., Z. ZHANG, C. ZHANG, L. ZHANG, A. ROBIN, Y. WANG, M. LU e M. CHOPP. Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric
to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. J Neurosci, v.24, n.25, p.5810-5. 2004.

ZHANG, R. L., Z. G. ZHANG, Y. WANG, Y. LETOURNEAU, X. S. LIU, X. ZHANG, S. R. GREGG, L. WANG e M. CHOPP. Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. J Cereb Blood Flow Metab, v.27, n.6, p.1201-12. 2007.

ZHANG, R. L., Z. G. ZHANG, L. ZHANG e M. CHOPP. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. Neuroscience, v.105, n.1, p.33-41. 2001.

ZHAO, C., W. DENG e F. H. GAGE. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. Cell, v.132, n.4, p.645-60. 2008.

ZHENG, W., O. HONMOU, K. MIYATA, K. HARADA, J. SUZUKI, H. LIU, K. HOUKIN, H. HAMADA e J. D. KOCSIS. Therapeutic benefits of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow after global cerebral ischemia. Brain Res, v.1310, p.8-16.

ZHENG, W., R. S. NOWAKOWSKI e F. M. VACCARINO. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. Dev Neurosci, v.26, n.2-4, p.181-96. 2004.

ZHOU, R., X. WU e O. SKALLI. **TGF-alpha induces a stationary, radial-glia like phenotype in cultured astrocytes**. Brain Res Bull, v.56, n.1, p.37-42. 2001.

ZIGOVA, T., V. PENCEA, S. J. WIEGAND e M. B. LUSKIN. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. Mol Cell Neurosci, v.11, n.4, p.234-45. 1998.

ZIMMERMAN, L., B. PARR, U. LENDAHL, M. CUNNINGHAM, R. MCKAY, B. GAVIN, J. MANN, G. VASSILEVA e A. MCMAHON. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. Neuron, v.12, n.1, p.11-24. 1994.

8. Anexo 1

Artigo intitulado "Radial glia-like cells persist in the adult rat brain". Gubert F, Zaverucha-do-Valle C, Pimentel-Corlho PM, Mendez-Otero R, Santiago MF. Brain Res. Mar 3; 1258:43-52. 2008

Esse artigo contém a primeira parte dos resultados descritos nessa tese sobre a caracterização das células RGL ao redor do VL em ratos adultos. Esses resultados foram obtidos durante o período de mestrado e doutorado.

Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo