



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
MARCELO MARQUES CARDOSO

**SOBREVIVÊNCIA E DISPERSÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA
ÓSSEA TRANSPLANTADAS HETEROLOGAMENTE NO ESTRIADO APÓS ISQUEMIA
EXPERIMENTAL**

BELÉM – PARÁ
2015

MARCELO MARQUES CARDOSO

**SOBREVIVÊNCIA E DISPERSÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA
ÓSSEA TRANSPLANTADAS HETEROLOGAMENTE NO ESTRIADO APÓS ISQUEMIA
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Doutor, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Ghislain Saunier.

BELÉM – PARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Cardoso, Marcelo Marques, 1978-

Sobrevivência e dispersão de células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas heterologicamente no estriado após isquemia experimental /
Marcelo Marques Cardoso. - 2015.

Orientador: Wallace Gomes Leal;

Coorientador: Ghislain Saunier.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2015.

1. Isquemia cerebral. 2. Células da medula óssea. 3. Acidente vascular cerebral. I. Título.

CDD 22. ed. 616.81

MARCELO MARQUES CARDOSO

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SOBREVIVÊNCIA DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA
MEDULA ÓSSEA TRANSPLANTADAS HETEROLOGAMENTE APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Doutor, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Ghislain Saunier.

Aprovação em: 27 de fevereiro de 2015.

BANCA DE DEFESA

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Baia (ICS/UFPA)

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco (IEC/UFPA)

Prof^a. Dr^a. Vânia Castro Correa (ICB/UFPA)

DEDICATÓRIA

À minha família. Meus tios (Fátima, José Airton e Aguielo) que financeira e moralmente investiram em mim. Meus avós (Marina Galeno Cardoso e Antônio José Cardoso) que me conduziram à escola e oportunizaram como puderam minha educação e formação pessoal, profissional e acadêmica. Devo muito a vocês. Não tenho como retribuir a não ser reconhecendo todo o esforço realizado ontem e hoje. Obrigado a todos!

À minha esposa: Priscila Resque Cardoso. Pela parceria incondicional; pelo supremo apoio afetivo, intelectual e profissional; e por ser o esteio das minhas tomadas de decisão e por ser a grande substituta nas minhas ausências familiares e domésticas. Amor, amo você!

Aos meus irmãos de longa data: Josenildo, Miranda Júnior e Ulisses. Com vocês aprendi muito, o que hoje aplico na minha vida pessoal. Agora são apenas lembranças. Um enorme abraço para vocês e às respectivas famílias.

Aos meus grandes amigos de laboratório (LNNE/ LNP) e aos meus pares docentes da FFTO/ICS/UFPA.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental, em nome do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal. Muito obrigado pelo investimento intelectual.

Ao Laboratório de Neuroplasticidade, em nome do Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia. Grato pela colaboração.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio técnico superior do MSc. Sanderson Araújo, em nome do Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz.

Ao Laboratório de Anatomia da Universidade do Estado do Pará, em nome do Prof. Dr. Robson Domingues.

Ao laboratório de Dentística, ICS – UFPA, em nome da Prof^a. Dr^a. Sueli Kataoka.

E ao apoio financeiro dos órgãos de fomento: CAPES e CNPq. Sem o qual não teria como subsidiar minha permanência no Estado e no Laboratório assim como o material necessário à realização dos experimentos do presente estudo.

CARDOSO, M. M. SOBREVIVÊNCIA E DISPERSÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA TRANSPLANTADAS HETEROLOGAMENTE NO ESTRIADO APÓS ISQUEMIA EXPERIMENTAL UFPA, Belém-Pará. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. 64f. 2015.

Estudos experimentais evidenciam o potencial promissor das células da fração mononuclear da medula óssea (CMN-MO) no tratamento de modelos de isquemia cerebral. Sabe-se que as CMN-MOs são sensíveis às modificações microambientais, tal qual aquelas induzidas por uma isquemia, como eventos associados à inflamação. Contudo, pouco se conhece a respeito da biodistribuição e sobrevida dessas células no tecido nervoso pós-lesão. Objetiva-se investigar se a sobrevivência e a disseminação das CMN-MOs são influenciadas pela resposta inflamatória após isquemia estriatal. Parecer CEPAE, protocolo nº 073/12. Transplante heterólogo (5×10^5 de CMN-MOs) no estriado de ratos Wistar, agrupados entre controles não-tratados (IST) e falso-operado (FO) e tratados (ITCM), perfundidos em 1, 3, 7 e 28 dias. CMN-MO foram impregnadas com Nanocristais Qdot para posterior identificação por microscopia de fluorescência no tecido do receptor. Coloração, por violeta de cresila, e imunistoquímica básica (IBA1 e ED1) foram aplicadas para análise histopatológica do tecido em microscopia de luz. Testes neurocomportamentais (teste de remoção do adesivo e teste do cilindro) foram realizados para aferir a resposta dos grupos às intervenções. Os achados histopatológicos evidenciam a eficiência do modelo experimental de indução isquêmica em reproduzir a lesão no estriado dorsolateral. O infiltrado celular no grupo IST marca a resposta inflamatória, posteriormente confirmada por imunistoquímica para ED1 e IBA1; o infiltrado celular no grupo ITCM, evidencia a permanência das CMN-MO em todas as sobrevidas estudadas. O perfil de perda por morte das CMN-MO transplantadas no sítio de lesão é semelhante entre os grupos ITCM e FO, contudo, evidencia que resposta inflamatória do receptor causa maior decaimento do montante celular no grupo ITCM. Procedimentos de infusão celular mais refinados ou automatizados podem melhorar a sensibilidade dos testes comportamentais para discriminar a evolução entre os grupos estudados. Conclui-se que a alteração do microambiente pós-isquemia cria condições que determina a dispersão e a sobrevivência das CMN-MO. Outras análises de imunistoquímicas podem apontar resultados quanto ao perfil microglial presentes nas sobrevidas estudadas e o grau de imunomodulação pelo estudo da dinâmica das citocinas inflamatórias produzidas.

Palavras-chave: Isquemia Cerebral, Células Mononucleares, Sobrevida, Biodistribuição, Neuroinflamação.

(Fomento: Edital 019/2009, Projeto CNPq 556925/2009-2).

CARDOSO, M. M. SURVIVAL AND DISTRIBUTION OF BONE MARROW CELLS MONONUCLEAR TRANSPLANTED HETEROLOGOUSLY IN THE STRIATUM AFTER ISCHEMIA EXPERIMENTAL. UFPA, Belém-Pará. Program in Neuroscience and Cell Biology. 64p. 2015.

The studies show the promising potential of bone marrow mononuclear cells (BMNC) for the treatment of stroke models. It is known that the BMNC are sensitive to environmental changes, like those induced by ischemia, such as events associated with inflammation. However, little is known about the biodistribution and survival of these cells in the post-injury nerve tissue. Aims to investigate whether the survival and spread of BMNC are influenced by the inflammatory response after striatum stroke. Heterologous transplantation (5×10^5 BMNC) in the striatum of rats clustered among untreated controls (CNT) and sham (SHM) and treated (STBC) perfused at 1, 3, 7 and 28 days. BMNC were impregnated with Qdot nanocrystals for identification by fluorescence microscopy in the host tissue. Staining for cresyl violet, and basic immunohistochemistry (IBA1 and ED1) were applied for histopathological analysis of tissue by light microscopy. Neurobehavioral tests (adhesive removal test and cylinder test) were performed to assess the response of groups for interventions. The results show the effectiveness of the experimental model of ischemic induction to reproduce the injury in the dorsolateral striatum. The cell infiltrate in the CNT group shows the inflammatory response, later confirmed by immunohistochemistry for ED1 and IBA1; the cellular infiltrate in STBM group, shows the BMNC of stay in all studied survival. The loss profile for death of BMNC transplanted into the injury site is similar between STBM and SHM groups, however, shows that inflammatory response of the receptor causes more decay of cell amount in STBM group. More refined or automated cell infusion procedures can improve the sensitivity of behavioral tests to discriminate the evolution between groups. To summarize the change of post-ischemic microenvironment creates conditions that determine the distribution and survival of BMNC. Other immunohistochemical procedures may point to the results presented as microglial profile and the degree of the immunomodulation study of the dynamics of inflammatory cytokines produced.

Key-words: stroke, Bone Marrow Mononuclear Cells, Survival, Biodistribution, inflammation.

Financial Support: CNPq and CAPES.

LISTA DE ABREVIÇÕES

A	
AVE	- Acidente Vascular Encefálico
B	
BDNF	- Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo
BHE	- Barreira Hematoencefálica
C	
CEPAE	- Comitê de Ética e Pesquisa Animal de Experimentação
CMN-MO	- Células Mononucleares da Medula Óssea
F	
FO	- Falso Operado
G	
G-CSF	- Fator Estimulante de Formação de Colônia/Granulócitos
GDNF	- Fator Neurotrófico derivado da Glia
I	
i.a.	- Intraarterial
i.c.	- Intracerebral
i.v.	- Intravenoso
ICAMs	- Moléculas de Adesão Inter-Celular
IGF-1	- Fator-1 de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-1	- Interleucina-1
IL-10	- Interleucina-10
IL-2	- Interleucina-2
IST	- Isquêmicos Sem Tratamento
ITCM	- Isquêmicos Tratados com Células Mononucleares
M	
M1	- Microglia/macrófago clássico, citotóxico
M2	- Microglia/macrófago alternativo, anti-inflamatório
MHC-I	- Complexo de Histocompatibilidade Principal – Classe I
MHC-II	- Complexo de Histocompatibilidade Principal – Classe II
MMP	- Matriz Metaloproteinase
N	
NGF	- Fator de Crescimento Nervoso
NOS	- Óxido Nítrico Sintetase
R	
rtPA	- Ativador Plasminogênico Tecidual Recombinante
S	
SNC	- Sistema Nervoso Central
T	
TCE	- Traumatismo Crânioencefálico
TGF-beta	- Fator-beta de Crescimento Transformador
TLR	- Receptor Semelhante a Toll
TNF-alfa	- Fator-alfa de Necrose Tumoral
U	
UFPA	- Universidade Federal do Pará
V	
VEGF	- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	13
1.2	MORTALIDADE, DISFUNÇÕES E CUSTOS	14
1.3	1.3 FISIOPATOLOGIA	15
1.3.1	Centro Isquêmico e penumbra isquêmica	15
1.3.2	Mecanismos Moleculares e Células Inflamatórias	16
1.3.2.1	Neutrófilos	17
1.3.2.2	Linfócitos	17
1.3.2.3	Monócitos/ Macrófagos	17
1.3.2.4	Microglia	18
1.3.3	Ruptura da Barreira Hematoencefálica	19
1.3.4	Excitotoxicidade	20
1.4	INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS	21
1.4.1	Intervenção Clínica, Emergência Médica	21
1.4.2	Terapêutica Medicamentosa/ Farmacológica	21
1.4.2.1	Ativador Plasminogênico Tecidual Recobinante – rtPA	22
1.4.3	Reabilitação	22
1.4.4	Terapia Celular	23
1.4.4.1	Células-Tronco Embrionárias	23
1.4.4.2	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas	24
1.4.4.3	Células Mononucleares da Medula Óssea	24
1.5	VIAS DE ENTREGA, BIODISTRIBUIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS	25
1.5.1	Principais Vias de Transplante	25
1.5.2	Biodistribuição Celular	26
1.5.3	Sobrevivência e Destino das Células Transplantadas	27
1.5.4	Efeitos das Células Mononucleares na Isquemia Encefálica	27
2.5.4.1	Proteção do Tecido Nervoso Peri-isquêmico	28
1.5.4.2	Diferenciação em Células Residentes	28
1.5.4.3	Secreção de Fatores Tróficos	28
1.6	JUSTIFICATIVA	31
1.7	OBJETIVOS	32

1.7.1	Geral	32
2.7.2	Específicos	32
2	MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	33
2.2	PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS, CIRÚRGICOS E PÓS-CIRÚRGICOS	33
2.2.1	Procedimentos pré-cirúrgicos	33
2.2.2	Procedimentos cirúrgicos	34
2.2.3	Procedimentos pós-cirúrgicos	34
2.3	TESTES COMPORTAMENTAIS	35
2.3.1	Teste de Remoção do Adesivo	35
2.3.2	Teste do Cilindro	36
2.4	TRATAMENTO	36
2.4.1	Terapia celular	36
2.4.1.1	Impregnação das CMN-MO com Nanocristais (QDort. <i>Qtracker® Labeling celular</i>)	37
2.4.1.2	Transplante Intracerebral de CMN-MO	37
2.5	IMUNOISTOQUÍMICA E HISTOPATOLÓGICO	38
2.5.1	Histopatológico	38
2.5.2	Imunoistoquímica	38
2.6	MÉTODO DE ANÁLISE DOS DADOS	39
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
3	RESULTADOS	40
3.1	A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EVIDENCIA A PRESENÇA DE DENSO INFILTRADA CELULAR NOS ANIMAIS TRATADOS E EXTENSO PALOR TECIDUAL NOS ANIMAIS CONTROLE	40
3.2	CMN-MO MODULAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SÃO A PROVÁVEL CAUSA DO FORTE INFILTRADO CELULAR	41
3.3	O MICROAMBIENTE ISQUÊMICO PROVOCA AMPLA DISTRIBUIÇÃO DAS CMN-MO, E SUA REDUÇÃO NO TECIDO AO LONGO DO TEMPO	43
3.4	OS TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO EVIDENCIAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS	44
3.4.1	Teste do Cilindro	44

3.4.2	Teste de Remoção do Adesivo	
4	DISCUSSÃO	46
4.1	VISÃO GERAL	46
4.2	ANIMAIS DO GRUPO TRATADO APRESENTARAM MAIOR INFILTRADO CELULAR EM QUALQUER TEMPO DE SOBREVIDA	47
4.3	A AMPLA DISSEMINAÇÃO DAS CMN-MO É CAUSADA PELA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO RECEPTOR À LESÃO ISQUÊMICA	48
4.4	O MICROAMBIENTE DELETÉRIO DA LESÃO ISQUÊMICA FAVORECE O DECAIMENTO DAS CMN-MO	49
4.5	OS TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO FORAM SENSÍVEIS PARA ATESTAR DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS	49
5	CONCLUSÃO	51
6	BIBLIOGRAFIA	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: DEFINIÇÃO E PROBLEMÁTICA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define acidente vascular encefálico (AVE) como o surgimento súbito focal ou global de déficits da função neurológica de duração superior a 24 horas ou que leve à morte, cuja única causa reside na origem vascular (WOLFE, 2000). A redução abrupta do suprimento sanguíneo à regiões do sistema nervoso pode ser causada por ocorrência isquêmica ou hemorrágica.

Nas últimas décadas, a população de idosos vem aumentando sensivelmente em todo o mundo (SINGHAL e KHADILKAR, 2014). O aumento na estimativa de vida também vem acompanhado do crescimento da incidência de doenças crônicas e suas complicações, entre as quais está o acidente vascular encefálico (AVE) (GARRITANO et al., 2012; SINGHAL e KHADILKAR, 2014). Buscando reduzir os crescentes casos de AVE, campanhas educativas e de orientações que alertam e esclarecem a população sobre os fatores de riscos predisponentes do AVE, aliado a rapidez do atendimento e o avanço no diagnóstico desta patologia, principalmente por neuroimagem (ARSAVA, 2012; KUNST e SCHAEFER, 2011) vem reduzindo os índices de mortalidade causadas por esta moléstia (BEJOT et al., 2007). Isso resulta no aumento de sobreviventes com as mais variadas sequelas neurológicas, dentre as quais estão as disfunções motoras (ZOROWITZ et al., 2013).

Até o presente, há restrita opção terapêutica para minimizar as complicações neurológicas causadas pelo desencadeamento fisiopatológico do AVE (SILVER, 2014). Mesmo em unidades hospitalares especializadas, o tempo e a extensão da lesão isquêmica podem ser determinantes para se definir a gravidade das sequelas instaladas e assim direcionar as necessidades de tratamento dos sobreviventes nas unidades de reabilitação (BRAININ e ZOROWITZ, 2013; BREWER et al., 2013).

Acredita-se que parte da gravidade e da complexidade das disfunções neurológicas adquiridas tenha um componente temporal importante, pela demora e/ou qualidade do pronto atendimento (HEUSCHLING et al., 2013). Esta situação parece recorrente em países em desenvolvimento em função da deficiência no diagnóstico e/ou atendimento do AVE como emergência médica (MACKINTOSH et al., 2012), possibilitando o agravamento das sequelas em decorrência, por exemplo, da progressão do centro isquêmico para área de penumbra (KNEIPP et al., 2014).

No atendimento de emergência, a terapêutica imediata do AVE é centrada na busca da revascularização da região isquêmica (DORADO et al., 2014), o salvamento do território secundariamente acometido pelo evento isquêmico, contudo, em muitos aspectos vem sendo estudado como promessa de tratamento para minimizar os efeitos devastadores sobre as funções neurológicas acometidas (KILLER et al., 2010). Desponta nesta temática o uso experimental de linhagens celulares que garantam estes efeitos (KALLADKA e MUIR, 2014; KASAHARA et al., 2013), entre várias outras possibilidades terapêuticas em estudos experimentais ou clínicos.

1.2 MORTALIDADE, DISFUNÇÕES E CUSTOS

Os crescentes casos de AVE classificam esta doença como a segunda causa de morte e o principal agente de instalação de disfunções neurológicas adquiridas no mundo (FEIGIN et al., 2014). Dependendo do tipo de AVE a taxa de mortalidade pode alcançar 50% dos casos, cerca de 10% do total não chegam ao hospital e 25% dos que recebem atendimento, morrem nas primeiras 24 horas (STROKEASSOCIATION, 2013). No início deste século, nos Estados Unidos foram gastos em um ano valores superiores à 51 bilhões de dólares, com o custo de tratamento desde a entrada no sistema de emergência hospitalar à alta (LEWANDOWSKI e BARSAN, 2001).

No Brasil, os dados epidemiológicos e de hospitalização de pacientes que sofreram AVE não são claros, mas informações isoladas existentes enquadram as doenças vasculares encefálicas como um grande problema de saúde pública, com elevadas taxas de mortalidade (COPSTEIN et al., 2013). Dados oficiais apontam o AVE como a principal causa de morte no Brasil (FERNANDES et al., 2012; GOULART et al., 2012; LOTUFO, 2005). Aqui, o índice de mortalidade causado por complicações de doenças cerebrovasculares é superior a países desenvolvidos desde o final dos anos de 1980 (LOTUFO e BENSENOR, 2009).

Por isso, tanto no Brasil quanto no mundo, faz-se necessário o investimento em pesquisas para buscar opções terapêuticas para reduzir as taxas de mortalidade e reduzir o tempo de permanência do paciente em tratamento de reabilitação, aumentando a eficiência deste (BOGOUSSLAVSKY e PACIARONI, 2009).

1.3 FISIOPATOLOGIA

A fisiopatologia do AVE tem várias vias e mecanismos complexos que o tornam uma doença heterogênea (Fig 01). Conhecer os meandros da fisiopatologia do AVE parece ser essencial para se chegar à propostas terapêuticas eficientes que minimamente minimizem o dano neuronal após um evento isquêmico encefálico. No AVE isquêmico, o mais comum dos acometimentos cerebrovasculares, o fluxo sanguíneo de algum território neurofuncional passa a ser significativamente insuficiente ou totalmente interrompido, gerando modificações celulares e moleculares drasticamente danosas (KALOGERIS et al., 2012; MERGENTHALER e MEISEL, 2012).

Em uma concepção macroscópica, a extensão da área que sofre a isquemia e o tempo de duração são fatores primordiais que denotam a gravidade do comprometimento tecidual e celular e, conseqüentemente, direcionam a magnitude das disfunções neurológicas adquiridas. Torna-se necessário, por isso, a restauração do fluxo sanguíneo tão logo quanto possível. Contudo, a reperfusão, mesmo vital como meta terapêutica, parece ser também prejudicial, podendo exacerbar a lesão isquêmica em regiões que vão além da área primariamente acometida (KLEIKERS et al., 2012). Há, portanto, duas áreas diferenciadas pela evolução temporal, extensão e gravidade da redução do fluxo sanguíneo regional: o centro e a penumbra isquêmica.

1.3.1 Centro Isquêmico e penumbra isquêmica

Em evolução temporal, diversos mecanismos são desencadeados pelo evento isquêmico cerebrovascular que culminam com dano ao tecido nervoso. Nos primeiros minutos, a redução abrupta de glicose e oxigênio leva a morte celular, principalmente, por necrose (BROUNS e DE DEYN, 2009), delimitando o centro isquêmico. Enquanto que a periferia da lesão sofre conseqüências moderadas (KAUFMANN et al., 1999), a área de penumbra isquêmica. Nesta última, em poucas horas, contudo, a morte celular programada pode promover o avanço da lesão primária para as áreas secundárias (DOYLE et al., 2008). Dias após o início da lesão, o centro isquêmico pode continuar avançando sobre a penumbra mediada por outros mecanismos que induzem a morte celular, como o processo inflamatório, a ruptura da barreira hemato-encefálica e a excitotoxicidade (BROUNS e DE DEYN, 2009), magnificando as sequelas adquiridas, se não levarem o indivíduo à morte.

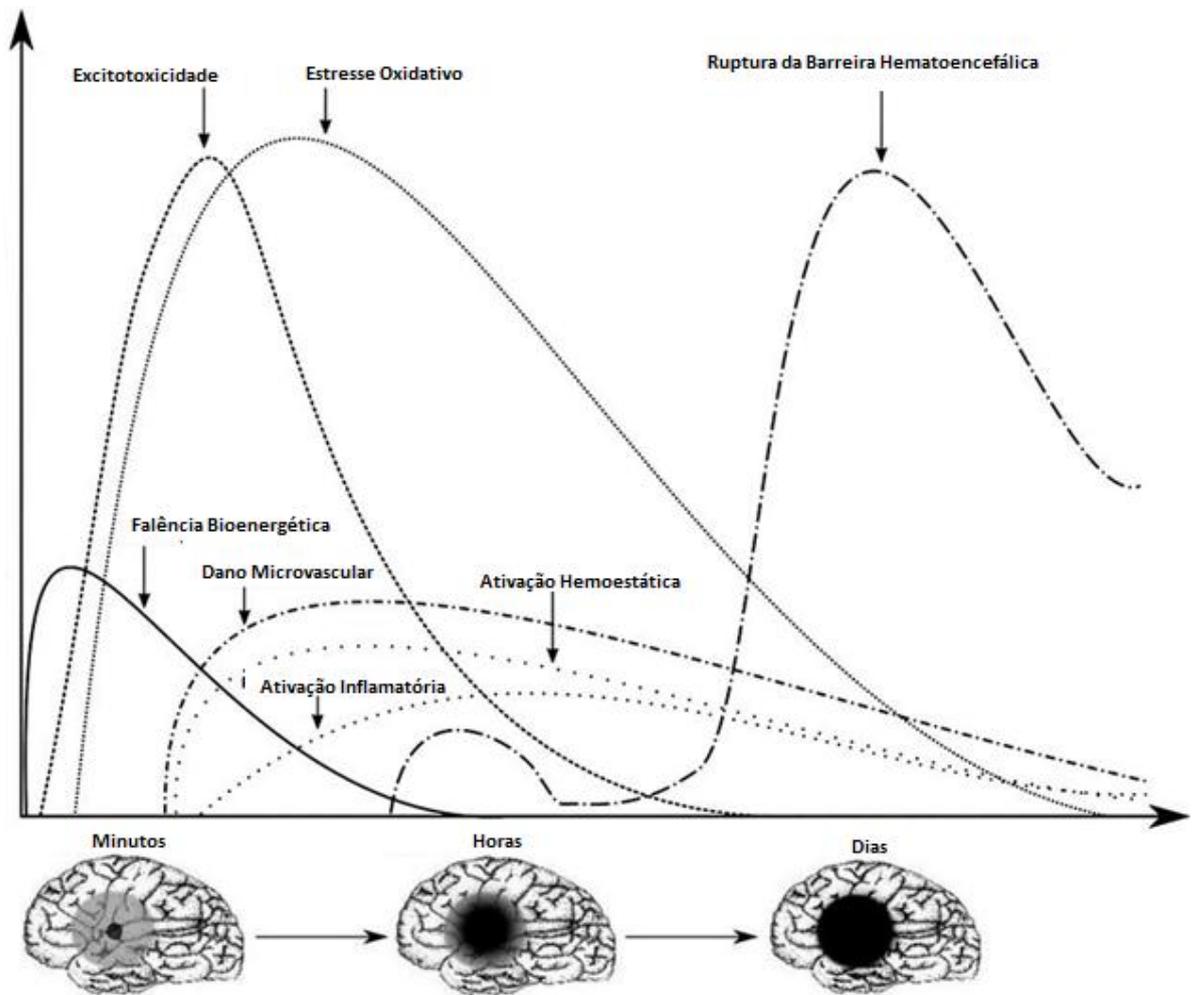


FIGURA 01. Esquema dos principais eventos fisiopatológicos desencadeados pelo AVE isquêmico. Modificado de Brouns e De Deyn, 2009.

1.3.2 Mecanismos Moleculares e Células Inflamatórias

O prejuízo tecidual por exacerbação da resposta inflamatória é parte do mecanismo de lesão secundária após um evento isquêmico encefálico (JIN et al., 2013). Diversos modelos experimentais evidenciam o peso do processo inflamatório da extensão da lesão isquêmica primária sobre as áreas secundárias (VOGELGESANG et al., 2014). O processo isquêmico, portanto, promove alterações moleculares nas paredes vasculares que exacerbam a resposta inflamatória, principalmente pelo aumento da expressão de moléculas de adesão tais como ICAMs, E-selectina e P-selectina, que se ligam aos leucócitos em circulação e facilitam a migração destas células para o sistema nervoso central (ROSSI et al., 2011). Observar esquema da figura 02. Uma vez que no tecido nervoso, aquelas células sanguíneas periféricas colaboram na produção de moléculas citotóxicas que favorecem a morte celular (JIN et al., 2010). Entre os leucócitos com potencial deletério ao tecido nervoso

estão os monócitos/ macrófagos, linfócitos e neutrófilos (GRONBERG et al., 2013). A microglia, neste contexto, surge como célula residente manifestando tanto ação prejudicial, facilitando a morte de neurônios que poderiam se recuperar; quanto benéfica, fagocitando restos celulares e retirando do sistema moléculas prejudiciais (GOMES-LEAL, 2012).

1.3.2.1 Neutrófilos

Em até meia hora após a isquemia encefálica, neutrófilos são recrutados aos sítios de lesão (DOYLE et al., 2008). No tecido nervoso, estima-se que o pico neutrofílico é alcançado nas primeiras 24 horas (GRONBERG et al., 2013). O acúmulo de neutrófilos no sítio isquêmico é considerado prejudicial ao tecido pela quantidade de radicais livres, enzimas proteolíticas e citocinas inflamatórias liberadas. Entre os reagentes mais prejudiciais ao tecido está a ação proteolítica da elastase, uma enzima que degrada componentes da matriz extracelular e da junção neurovascular, provocando o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos próximos à lesão (HENRIKSEN, 2014).

1.3.2.2 Linfócitos

Populações de linfócitos medeiam a participação da resposta imune adaptativa no AVE, levando a respostas específicas a diferentes antígenos produzidos no tecido perilesionado (CHAMORRO et al., 2012) pela interação com células apresentadoras de antígenos.

O papel dos linfócitos nas fases iniciais parece bem deletério, exercendo ação citotóxica pela produção e liberação de citocinas inflamatórias como: IL-1, IL-2, Interferon-gama e TNF-alfa. Contudo, outras citocinas, predominantemente presentes nas fases tardias da lesão isquêmica, atuam de modo divergente, resolvendo o mecanismo inflamatório, tal qual acontece, por exemplo, com a IL-10 (ARUMUGAM et al., 2005). Portanto, ao que parece, as evidências demonstram um papel dual na ação inflamatória dos linfócitos (XU et al., 2013).

1.3.2.3 Macrófagos/ Monócitos

No contexto da resposta imune inata, os maiores representantes são os macrófagos, células fagocitárias envolvidas na apresentação de antígenos e expressão de moléculas do sistema complemento (BLAYLOCK, 2013). Apesar do conceito relativo ao

privilégio imunológico do tecido nervoso, há evidências fortes de apontam o trânsito relativamente livre de células pelo sistema de barreiras do encéfalo, particularmente de macrófagos (BLAYLOCK, 2013).

A reatividade imunológica dos macrófagos pode definir o grau de prejuízo ao tecido pela exacerbação inflamatória ou ajudar na resolução da inflamação. Nos últimos anos, os estudos vêm apresentando fenótipos macrofágicos antagônicos que também podem ser encontrados no tecido nervoso, o fenótico clássico, citotóxico, M1; e o alternativo, anti-inflamatório, M2 (SHECHTER e SCHWARTZ, 2013). Ao que parece, os fenótipos macrofágicos demonstram especialização na distribuição durante o evento inflamatório. O fenótipo citotóxico, M1, é mais evidente nas fases iniciais do processo inflamatório; e o tipo M2, alternativo, é de apresentação mais tardia na área prejudicada, justamente quando os mecanismos imunes se atenuam (MILLS, 2012).

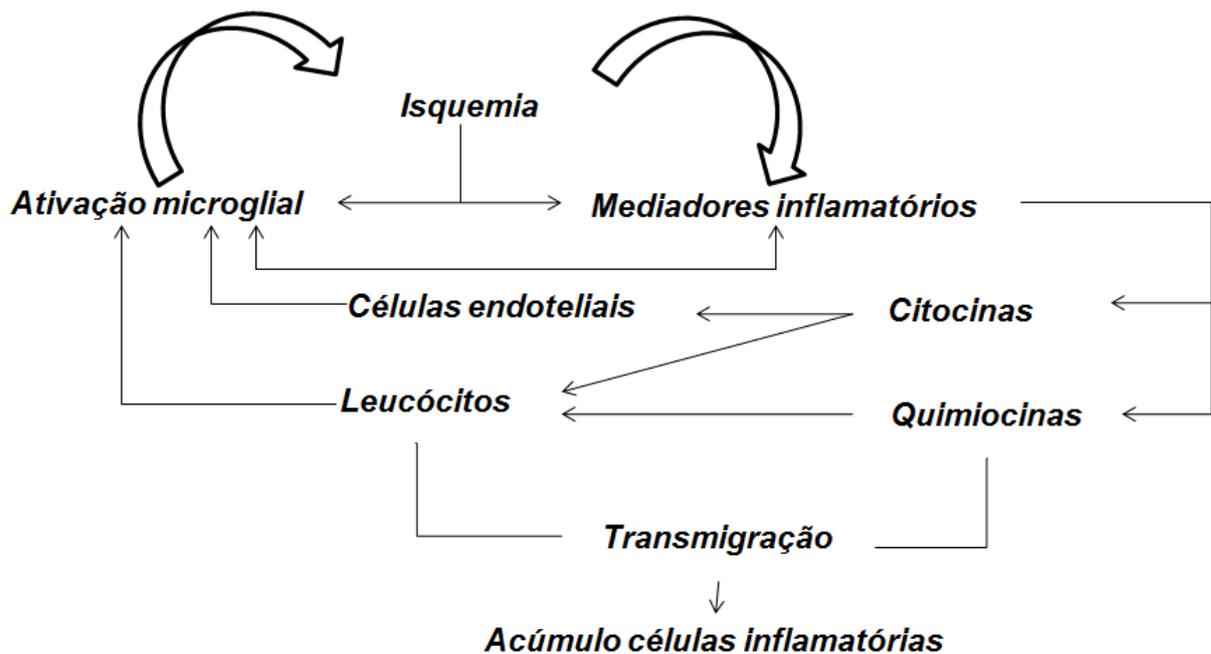


FIGURA 02. Esquema dos principais eventos inflamatórios desencadeados pelo AVE isquêmico.

1.3.2.4 Microglia

Acredita-se que a origem da microglia residente do tecido nervoso veio de monócitos periféricos durante o desenvolvimento embrionário (GOMEZ PERDIGUERO et al., 2013).

A microglia, no estado de repouso, é uma célula em constante monitoramento do tecido nervoso. Em condições patológicas, o estado de ativação microglial muda rapidamente, favorecendo a proliferação e o recrutamento desta célula aos sítios de lesão regulado pela

expressão de diferentes moléculas como o MHC, antígenos, receptores do complemento e citocinas, com destaque a IL-1, TGF-beta e TNF-alfa (GEHRMANN et al., 1995).

A microglia participa da imunidade inata e adquirida. A resposta imune inata é mediada pelos receptores semelhantes a Toll (TLR) na superfície celular, que estão envolvidos no reconhecimento e fagocitose de patógenos e detritos celulares, com liberação de citocinas pró-inflamatórias e da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (NAPOLI e NEUMANN, 2009). A participação da microglia na resposta imune adquirida é mediada pela interação com os linfócitos T recrutados ao tecido, para os quais exerce papel de apresentador de antígenos associados à molécula de MHC-II (BECKER, 2006). A microglia ativa os linfócitos que se tornam reativos pelos antígenos apresentados, que por sua vez potencializam a capacidade fagocitária e resposta deletéria da microglia, levando-a a produzir e liberar maiores quantidades de espécies reativas ao oxigênio e óxido nítrico, citocinas e quimiocinas (LEHNARDT et al., 2008).

A atuação neuropatológica da microglia em diferentes modelos de acometimentos ao sistema nervoso parece contraditória. Todas estas informações experimentais sugerem que o papel microglial depende do estado de ativação e fenótipo funcional na qual esta célula é encontrada no tecido nervoso (EKDAHL et al., 2009). O maior contribuinte para a homeostase no parênquima nervoso mediado pela microglia é o seu potencial fagocítico e de monitoramento do microambiente (NAPOLI e NEUMANN, 2009).

Tal qual acontece com seu primo, na rede vascular periférica, estudos recentemente levantam a possibilidade de polaridade fenotípica com a própria célula microglial (GOMES-LEAL, 2012). Se confirmada, teriam no escopo da isquemia encefálica as representantes citotóxicas e alternativas da microglia para se discutir o melhor encaminhamento para o controle ou o uso destas células como intervenção terapêutica complementar do AVE.

1.3.3 Ruptura da Barreira Hematoencefálica

Os componentes celulares básicos da barreira hematoencefálica (BHE) são constituídos por células endoteliais, pericitos e prolongamentos terminais dos astrócitos (Fig 01). As características morfo-fisiológicas inerentes destas células controlam de modo seletivo a homeostase do tecido nervoso encefálico, separando-a da circulação periférica (NICO e RIBATTI, 2012).

Danos à BHE são eventos que ocorrem na evolução fisiopatológica de várias doenças do SNC, incluindo lesões desmielinizantes, no decurso da esclerose múltipla, distrofia muscular de Duchenne, TCE, insultos neurológicos, encefalopatia séptico, tumores cerebrais, isquemia permanente ou isquemia transitória seguida por reperfusão. Na maioria dos casos, estas condições patológicas estão associadas com um aumento da permeabilidade microvascular, edema vasogênico, e inchaço dos prolongamentos astrocitários (NICO e RIBATTI, 2012). A instabilidade desses componentes desfaz os limites de seletividade entre a circulação encefálica da periférica, favorecendo trocas celulares e moleculares (BAETEN e AKASSOGLU, 2011).

A principal molécula atuante na ruptura da BHE é a ativação da matriz metaloproteinase (MMP), em particular a MMP-9 (SEO et al., 2012). A MMP é uma enzima proteolítica que degrada a laminina e fibras colágenas da lâmina basal. Esta protease prejudica a coesão entre as células endoteliais que aumenta a permeabilidade local e favorece o extravasamento de plasma, transmigração de leucócitos e eventual entrada de hemácias (hemorragias), quando severamente comprometida (LAKHAN et al., 2013).

1.3.4 Excitotoxicidade

Excitotoxicidade é o processo patológico em que as células do tecido nervoso são danificadas e mortas por estimulação excessiva, principalmente, mediada pelo neurotransmissor glutamato (Fig 01). Tal morte neuronal excitotóxica tem sido implicada em lesões do sistema nervoso, incluindo o acidente vascular encefálico (MEHTA et al., 2013).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do tecido nervoso, e desempenha um papel importante na excitabilidade neuronal. Vários gatilhos anormais, tais como deficiência de energia, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, sobrecarga de cálcio, entre outros, podem levar à falência o processo de sinalização neuronal. Tais alterações na sinalização e no metabolismo bioenergético levam a efeitos deletérios aos neurônios, conduzindo-os à morte (MEHTA et al., 2013).

O acúmulo de glutamato aciona o processo fisiopatológico da excitotoxicidade, incluindo a elevação de íons sódio e cálcio intracelular. O primeiro tem como principal efeito o edema celular, levando a ruptura e morte da célula neuronal e disfunção da barreira hematoencefálica. O cálcio intracelular, por sua vez, conduz a disfunção mitocondrial, ativação de proteases, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e liberação de óxido nítrico

(KOSTANDY, 2012). Estas vias metabólicas são prejudiciais tanto à célula neuronal quanto ao tecido nervoso.

1.4 INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS

A busca por terapêuticas eficazes para o AVE é objeto de intensas pesquisas. A produção científica sobre a temática tem evidenciado a melhora funcional substancial aos sobreviventes que podem ser alcançados pela intervenção clínica emergencial coerente, farmacológica e de reabilitação e, mais recentemente, o uso de terapêutica celular (CHEN, J. et al., 2014; JAKALA e JOLKKONEN, 2012).

1.4.1 Intervenção Clínica, Emergência Médica.

As variáveis de acidentes vasculares encefálicos, incluindo os subtipos: isquêmicos, hemorrágicos ou ataques isquêmicos transitórios, são todas modalidades que requerem atenção de emergência médica para as quais se faz necessário rápida avaliação e diagnóstico, isolar a causa, fornecer o tratamento agudo, e prevenir complicações (UCHIYAMA, 2014). Apesar de o AVE depender de um diagnóstico clínico sustentado na história de acometimento abrupto de sintomas neurológicos, que incluem fraqueza unilateral ou perda sensorial, disfasia, hemianopsia, desatenção, e redução da coordenação motora, entre outros sinais e sintomas (RODGERS, 2013). Os exames de imagens são, portanto, relevantes e indispensáveis para distinguir, por exemplo, um infarto encefálico de um hemorrágico e assim garantir a melhor intervenção terapêutica para o caso (SIKET e EDLOW, 2012).

Durante a hospitalização dos sobreviventes de um AVE, o cuidado multidisciplinar deve acompanhar os procedimentos médicos e medicamentosos o mais breve possível, incluindo atenção às complicações motoras, psicológicas e sociais (RODGERS, 2013). Alcançando a estabilidade do paciente, a alta deve ser planejada cuidadosamente e logo que possível deve ser conversado com o paciente o seu encaminhamento para reabilitação ambulatorial (SENE DIOUF e NDIAYE, 2008).

1.4.2 Terapêutica Medicamentosa/ Farmacológica

As restritas opções terapêuticas disponíveis para os pacientes após o AVE torna crítica a busca por alternativas de tratamento mais eficazes. Estratégias de intervenção

farmacêutica para esta doença incluem a revascularização do tecido, como protocolo inicial (SMADJA, 2012), tal qual são mediados por anticoagulantes e antiagregantes plaquetários. Estudos evidenciam que a maioria dos pacientes sobreviventes de AVE tem uma evolução lenta de lesão cerebral que ocorre ao longo de horas a dias (BROUNS e DE DEYN, 2009). Nestes casos, o objetivo medicamentoso é interromper a evolução fisiopatológica da lesão isquêmica encefálica reduzindo o agravamento das complicações neurológicas adquiridas (OCZKOWSKI, 2013), estes efeitos podem ser favorecidos por trombolíticos e drogas neuroprotetoras. Até o presente, o único tratamento medicamentoso aprovado usa o ativador plasminogênico tecidual recombinante (rtPA).

1.4.2.1 Ativador Plasminogênico Tecidual Recombinante – rtPA.

Como opção farmacológica para o tratamento do AVE, o rtPA (Alteplase), tem sérias limitações no uso clínico (GREEN, 2008). O primeiro deles é a estreita janela temporal para administração, em torno de 3 horas pós-início do acometimento neurovascular (GREEN, 2008), seguido da baixa eficácia (BENTLEY e SHARMA, 2005) e instabilidade deste tratamento, mediante ocorrências hemorrágicas secundárias (FUGATE e RABINSTEIN, 2014).

Contudo, apesar da extensa literatura que busca novas opções farmacológicas, nenhum até o presente foi mais eficiente que o rtPA (FUGATE e RABINSTEIN, 2014).

1.4.3 Reabilitação

Após o AVE, a principal sequela manifestada pelos sobreviventes são as desordens físicas, mesmo quando há outras complicações associadas, a principal queixa dos pacientes continua a ser os déficits motores adquiridos (BANSIL et al., 2012; HANDLEY et al., 2009). Por isso, boa parte da literatura foca na recuperação motora como parâmetro de resposta funcional positiva durante o processo de reabilitação dos sobreviventes de eventos cerebrovasculares (WAHL e SCHWAB, 2014).

Entre os procedimentos de reabilitação tanto para as complicações físicas quanto para outras funções neurológicas a terapêutica tradicional evoca a importância da equipe multiprofissional (RODGERS, 2013), destacando a Fisioterapia, a Terapia Ocupacional, a Fonoaudiologia e a Psicologia (MOMSEN et al., 2012). No âmbito da reabilitação, diversos métodos e técnicas podem ser aplicados isoladamente ou de modo ponderativo umas com as

outras, incluindo: estimulação elétrica somatosensorial transcutânea (VELDMAN et al., 2014), estimulação magnética transcraniana (PINTER e BRAININ, 2013), aplicação de preceitos relativos a interface cérebro-máquina e o uso da robótica (FORRESTER et al., 2013; KJAER e SORENSEN, 2013), preceitos ligados a observação da ação, fundamentado na função dos neurônios espelhos e da imagética motora a ser recuperada (DE VRIES e MULDER, 2007; MALOUIN e RICHARDS, 2010; SALE e FRANCESCHINI, 2012; SMALL et al., 2012).

1.4.4 Terapia Celular

Quase 15 anos depois do final da década do cérebro, a realidade evidenciada ainda hoje é que os resultados dos estudos voltados para a busca de terapêuticas para o AVE foram pouco consistentes. No atual contexto, as limitadas estratégias farmacológicas abrem caminhos para outras possibilidades, incluindo o uso terapêutico de diferentes linhagens celulares (SANBERG et al., 2012). Uma variedade de células-tronco vem sendo explorados experimentalmente como opção terapêutica para o tratamento de muitas doenças neurológicas, incluindo as complicações cerebrovasculares (YOO et al., 2013).

O AVE é uma doença heterogênea nas suas causas e nos mecanismos fisiopatológicos (MERGENTHALER et al., 2004). Para tanto, necessita de múltipla intervenção terapêutica, e os ensaios com as células-tronco possibilitam esta diversidade (HESS e BORLONGAN, 2008; KALLADKA e MUIR, 2014; ZHANG e CHOPP, 2013). Contudo, há várias questões que carecem de respostas para refinar este recurso como método de terapia efetiva, algumas são: qual é a melhor linhagem celular? Qual é o quantitativo ótimo de células a ser infundido? Qual é a melhor janela terapêutica? Quais são os mecanismos de atuação das células transplantadas tanto no tecido prejudicado quanto no saudável? Como as células se comportam no tecido? Biodistribuição? Sobrevida? Qual é a via de entrega mais eficiente destas células?

1.4.4.1 Células-Tronco Embrionárias

As linhagens de células-tronco são tipificadas de acordo com a fonte de onde são extraídas. A origem dos estudos com as células-tronco, datam da década de 1960, foi iniciada com as células-tronco embrionárias, linhagem de células totipotentes extraídas da massa interna do blastocisto (ABDELALIM, 2013). O grau de indiferenciação destas células as

tornariam a melhor opção para o tratamento de danos aos diferentes tecidos e órgãos do corpo. Contudo, esta linhagem celular forma facilmente teratocarcinomas, um efeito indesejado do poder proliferativo e do grau de indiferenciação destas células (HERBERTS et al., 2011). Este risco, portanto, desclassifica as células-tronco embrionárias como opção terapêutica imediata para eventos isquêmicos encefálicos.

1.4.4.2 Células-Tronco Pluripotentes Induzidas

Fruto da bioengenharia, as células-tronco pluripotentes induzidas é uma classe celular capaz de se diferenciar em células de qualquer tecido (ZHAO et al., 2013), e pode se tornar uma opção ao efeito adverso das células-tronco embrionárias. A origem das células-tronco pluripotentes induzidas é diversificada e podem vir, por exemplo, de células epiteliais ou de células de sangue (WELTNER et al., 2014). Apesar da forte promessa terapêutica, esta linhagem celular necessita ser submetida a mais experimentação para qualificar seu grau de segurança e de sua biologia no tratamento de diferentes doenças (OKANO et al., 2013).

Neste contexto, até o presente momento poucos são os ensaios realizados com células-tronco pluripotentes induzidas em modelos de isquemia encefálica. Destes, sete estudos apontam resultados positivos (CHEN, S. J. et al., 2010; JENSEN et al., 2013; LIU et al., 2014; OKI et al., 2012; POLENTES et al., 2012; QIN et al., 2013; TATARISHVILI et al., 2014) e, apenas um (KAWAI et al., 2010), evidenciou a formação de teratoma, um efeito indesejável que compromete a escolha eletiva desta linhagem celular por uma taxa superior de 14% de chance de tumoração (YU, F. et al., 2013).

1.4.4.3 Células Mononucleares da Medula Óssea

Ainda na linha da terapia celular, as células da fração mononuclear da medula óssea (CMN-MO) são uma alternativa promissora ao tratamento das complicações do AVE. Estas são uma linhagem celular de fácil obtenção, não estão envolvidas com questões éticas ou religiosas, apresentam pluri ou multipotência no organismo receptor (GIRALDI-GUIMARDES et al., 2009) e tem baixo risco oncogênico (HATZISTERGOS et al., 2011).

Estima-se que a quantidade de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea é da ordem de 0,05% - 0,5% (GUNSILIUS et al., 2001), o percentual restante são de células diferenciadas e progenitoras comprometidas com o tecido ósseo (GIRALDI-GUIMARDES et al., 2009). Mesmo nesta proporção, estudos apontam resultados positivos com uso de CMN-

MO para o tratamento de diversas patologias, incluindo ocorrências cerebrovasculares (DHARMASAROJA, 2009). Além disso, recentemente se demonstrou experimentalmente que os efeitos neuroprotetores e de recuperação funcional com o uso de CMN-MO são comparáveis aos obtidos com as células tronco isoladas (BRENNEMAN et al., 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010).

Contudo, o mecanismo de atuação das CMN-MO no AVE ainda não está totalmente claro. Estudos sugerem que as células-tronco transplantadas no receptor migram aos sítios de lesão e assumem fenótipos de células residentes, como: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (CHEN, J. R. et al., 2008), o que resulta em melhora da função neurológica. Para outros estudos, todavia, em função da reduzida quantidade de CMN-MO que alcança o parênquima nervoso, da ordem de 0,02% do montante transplantado (SCHWARTING et al., 2008), existe a premissa que fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias são liberados pelas células-tronco transplantadas e ativam o sistema de reparo endógeno (SAVITZ, 2011). Além destas possibilidades, as células-tronco também podem promover a indução de neurogênese, angiogênese e sinaptogênese; neuroproteção e; regulação do fluxo sanguíneo e manutenção da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, ou seja, as células-tronco parecem modular amplamente do microambiente isquêmico (ENGLAND et al., 2009).

1.5 VIAS DE ENTREGA, BIODISTRIBUIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS TRANSPLANTADAS.

Nos estudos experimentais em modelos animais de isquemia encefálica que usam como método de tratamento a terapia celular, diversas perguntas estão sendo respondidas e abrem caminho para outras questões e hipóteses. Uma das indagações em amplo estudo trata da melhor via de transplante celular. As rotas mais estudadas são por infusão intravenosa (i.v.) e a intra-arterial (i.a.) (VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2012; YANG et al., 2013).

Outras rotas são menos eletivas, principalmente por suas fortes características invasivas, entre as quais estão: a entrega direta no parênquima encefálico e pela circulação ventricular (MISRA et al., 2012).

1.5.1 Principais Vias de Transplante.

A entrega intravascular de células é a rota menos invasiva e com resultados experimentais promissores no tratamento do AVE (MISRA et al., 2012). Como possível

efeito adverso por esta forma de infusão pode ser citado a reduzida taxa de chegada celular ao tecido alvo e a possibilidade de obstrução microvascular (MISRA et al., 2012).

Na administração intravenosa, as células se dispersam pela rede vascular, algumas são atraídas aos sítios de lesão por elementos quiotáxicos, enquanto que a maioria é sequestrada pelos órgãos periféricos (MISRA et al., 2012). Do montante celular quantificado no encéfalo, em modelo de isquemia cerebral, e em quatro órgãos de excreção, estima-se que na primeira hora, 20% das células contadas estão no encéfalo e, as demais, estão sendo degradadas no baço (48%), ou ficaram presas nos pulmões (16%) ou no fígado (12%) ou então em processo contínuo de excreção pelo rim (4%) (YANG et al., 2011).

Ao final da primeira semana, partindo-se da contagem das células transplantadas no órgão alvo e aqueles de expurgo corporal, pode-se inferir que o quantitativo absoluto de células quantificadas cai significativamente, mas o perfil de distribuição relativo não se altera substancialmente comparado à primeira hora entre o: encéfalo (15%), baço (35%), pulmões (25%), fígado (20%) e rim (5%) (YANG et al., 2011).

No transplante por via intra-arterial, há evidências que demonstram taxas mais elevadas de chegada celular às áreas de lesão quando comparada à via intravenosa (MISRA et al., 2012). Contudo, por motivos ainda não esclarecidos, rotas diferentes de entrega celular não parecem influenciar nos resultados morfológicos e de recuperação funcional aferidos (YANG et al., 2013). Estes resultados, portanto, parecem consistentemente similares.

1.5.2 Biodistribuição Celular

Tanto em modelos animais quanto em humanos, independente da via de entrega, se i.a. ou i.v., os resultados de dispersão das células infundidas são consistentemente semelhantes. Em animais de experimentação, além do órgão alvo, outros órgãos também recebem grandes quantidades do montante celular que, por algum motivo, não conseguiu chegar aos sítios de lesão. Os órgãos que mais se destacam são o fígado, baço, pulmões, rins e a bexiga urinária (BARBOSA DA FONSECA et al., 2010; CORREA et al., 2007; YANG et al., 2011). Todos estes últimos podem ser considerados órgãos de excreção.

Em ensaios clínicos, resultados de dispersão semelhante também foram encontrados, tanto na infusão intravenosa quanto intra-arterial (ROSADO-DE-CASTRO et al., 2013).

1.5.3 Sobrevivência e Destino das Células Transplantadas

Resultados experimentais demonstram que parte do montante celular infundido é encontrado precocemente em vasos sanguíneos e no parênquima encefálico às proximidades da área de lesão (GIRALDI-GUIMARDES et al., 2009). Estima-se que este evento migratório inicie até 3 horas após o transplante (BRENNEMAN et al., 2010) e o pico máximo é atingido entre as 48h e 72h depois da infusão (SCHWARTING et al., 2008).

O número de células que chegam ao tecido alvo não é preciso, e estima-se que a migração média é da ordem de apenas 0,02% do total celular transplantado (SCHWARTING et al., 2008). O maciço celular restante, portanto, é expelido pouco a pouco por órgãos periféricos na seguinte ordem de aprisionamento celular: baço, pulmões, fígado e rins (YANG et al., 2011). Dependendo da via eleita para o transplante há diferença no tropismo de eliminação. Se as células forem infundidas por via intra-arterial são sequestradas mais pelo baço, fígado e pulmões; se a via for intravenosa, o órgão de maior excreção são os pulmões (BRENNEMAN et al., 2010).

Com relação ao destino das células que chegam ao tecido afetado, há dados experimentais que evidenciam a quantidade insignificante que se transdiferencia em células residentes do tecido nervoso (GIRALDI-GUIMARDES et al., 2009), como: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Além disso, não há evidências que comprovem a instalação permanente destas células, que não sobrevivem por muito tempo no tecido alvo, morrendo momentos após da chegada (BRENNEMAN et al., 2010). Isso reforça que o mecanismo benéfico das células transplantadas ao tecido danificado é mais importante pela liberação de fatores tróficos e várias outras citocinas (DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010; GIRALDI-GUIMARDES et al., 2009).

1.5.4 Efeitos das Células Mononucleares na Isquemia Encefálica

Na última década, resultados de estudos experimentais e clínicos apresentaram evidências que parte do montante celular transplantado por via intravascular consegue chegar aos sítios de lesão no tecido nervoso danificado pelo evento isquêmico (KALLADKA e MUIR, 2011), estas células se estabelecem no tecido e sobrevivem e ainda, eventualmente, podem se diferenciar em células residentes do tecido, como neurônios ou glia (KALLADKA e MUIR, 2011). Como benefícios são recorrentemente citados: proteção do tecido e recuperação funcional (KALLADKA e MUIR, 2011).

1.5.4.1 Proteção do Tecido Nervoso Peri-isquêmico

A aplicação de células mononucleares da medula óssea é fonte de intensas pesquisas em modelos de isquemia encefálica. A literatura traz evidências que estas células conseguem proteger a área de penumbra isquêmica minimizando a progressão de eventos fisiopatológicos como, por exemplo, a apoptose (CHEN, J. et al., 2003). Este mecanismo de morte celular é um processo ativo que depende da ativação de cascatas metabólicas sinalizadas pela própria célula ou por dano à membrana mitocondrial (CHEN, S. D. et al., 2011).

Como evento motriz da apoptose está a inflamação. Evidências experimentais também demonstram a ação moduladora que as CMN-MO exercem sobre o processo inflamatório, reduzindo seus efeitos deletérios (CARDOSO et al., 2013).

1.5.4.2 Diferenciação em Células Residentes

Talvez este seja o ponto mais controverso nos estudos da terapia celular com CMO-MO para o AVE. Ensaios experimentais enfatizam a possibilidade das células que conseguem chegar ao tecido alvo, receberem a influencia do microambiente e se diferencia em células residentes do tecido nervoso (CHEN, J. et al., 2000; CHEN, J. R. et al., 2008; KALLADKA e MUIR, 2011). Por outro lado, nem sempre este achado é replicado, no qual não são encontradas evidências que sustentem a transdiferenciação (WEI et al., 2007).

Acreditando no poder de diferenciação das células infundidas, o próximo desafio será confirmar ou induzir a integração do novo componente celular ao circuito perdido de modo amplamente funcional (THWAITES et al., 2012).

1.5.4.3 Secreção de Fatores Tróficos

O número de células que chega ao tecido alvo por meio de transplantes intravasculares é insignificante (DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010), deste montante, a quantidade que se diferencia em células residentes ainda não é um consenso e grande parte delas não se instalam no tecido do receptor, morrendo logo após a chegada devido ao microambiente deletério (BRENNEMAN et al., 2010). Por isso, sozinhos estes eventos não conseguem explicar os benefícios encontrados com a aplicação de células-tronco em doenças cerebrovasculares. Assim, cresce o reconhecimento da importância da secreção

de diferentes fatores solúveis bioativos por estas células que podem atuar em muitas vias celulares sobre receptores específicos presentes em células do órgão alvo, incluindo o sistema nervoso (DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010; RIBEIRO-RESENDE et al., 2012). Estas moléculas, portanto, possibilitam a atuação pleitrópica das células transplantadas sobre o tecido prejudicado, promovendo, por exemplo, a estimulação de vias de reparo endógeno e a imunomodulação do mecanismo inflamatório (KALLADKA e MUIR, 2014).

Entre os fatores tróficos mais citados na literatura secretados pelas células-tronco estão: Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF), Fator Neurotrófico derivado da Glia (GDNF), Fator de Crescimento Nervoso (NGF), Fator-1 de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-1), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), além de induzir a produção e a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como: Interleucina-10 (IL-10), Fator-Beta de Crescimento Transformador (TGF-Beta) e Fator Estimulante de Formação de Colônia/Granulócitos (G-CSF).

Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo – BDNF é uma neurotrofina (NT) que promove a proliferação, sobrevivência e diferenciação de neurônios (ZHENG et al., 2012). Embora seja uma molécula típica do tecido nervo, o BDNF deriva de diferentes fontes periféricas, incluindo células sanguíneas (SULIMAN et al., 2013).

Fator Neurotrófico Derivado da Glia – GDNF é uma molécula neurotrófica crucial para o desenvolvimento e manutenção tanto de neurônios centrais quanto periféricos, promove a sobrevivência e a diferenciação neuronal e previne a morte por apoptose após dano ao tecido nervoso (AIRAKSINEN e SAARMA, 2002).

Fator de Crescimento Nervoso – NGF é uma molécula bioativa que promove a sobrevivência, diferenciação de neurônios e atua tanto no encéfalo em desenvolvimento quanto maturo, influenciando neurônios e células gliais. Há evidências que o NGF promove sinalização endógena de ação neuroprotetora e de reparação tecidual (SOFRONIEW et al., 2001).

Fator-1 de Crescimento Semelhante à Insulina – IGF-1 é um peptídeo com ação endócrina na maioria dos tecidos, produzido em uma ampla variedade de órgãos. O IGF-1 aciona cascatas de sinalização com implicações sobre a sobrevivência celular, síntese de proteínas e utilização de energia (LLORENS-MARTIN et al., 2009; RENEHAN et al., 2004).

Fator de Crescimento Endotelial Vascular – VEGF é um fator de crescimento que ajuda na manutenção da permeabilidade vascular e no crescimento de células endoteliais. Atua, portanto, como fator promotor de angiogênese. Em áreas teciduais danificadas, esta

molécula favorece a sobrevivência celular e promove a revascularização, condição necessária para a recuperação do tecido e cicatrização (BYRNE et al., 2005; HOEBEN et al., 2004).

1.6 JUSTIFICATIVA

Apesar dos grandes esforços, ainda não foi encontrado um tratamento eficaz ao AVE que fosse substituível ou complementar à única opção até o momento aprovada, os antitrombolíticos (FUGATE e RABINSTEIN, 2014). Este fato abre possibilidade aos estudos de propostas promissoras, entre as quais emerge as pesquisas com células-tronco (KIM e DE VELLIS, 2009).

Reconhecendo a grande heterogeneidade da fisiopatologia do AVE, a literatura traz evidências contundentes da ação pleiotrópica das células-tronco no que diz respeito ao amplo espectro de fatores tróficos e citocinas liberadas, responsabilizadas pelos efeitos estruturais benéficos e de recuperação funcional alcançados nos resultados das pesquisas experimentais (KALLADKA e MUIR, 2014).

Mesmo com todos os achados publicados, ainda não se tem certeza do comportamento geral destas células quando chegam ao tecido nervoso após a lesão isquêmica. Temos dados preliminares que demonstram os resultados promissores de CMN-MO em modelos de isquemia cerebral no controle da inflamação e na recuperação neurocomportamental (CARDOSO et al., 2013; FRANCO et al., 2012). A dinâmica de dispersão e de sobrevivência das CMN-MO no tecido nervoso isquêmico e saudável, portanto, é o ponto de originalidade deste estudo.

Há estudos que apresentam evidências de distribuição das células transplantadas ao longo do corpo. Para rastreá-las, atualmente são utilizadas diferentes técnicas como, por exemplo, imagem por ressonância magnética (WEN et al., 2014) ou a aplicação de moléculas com propriedade fluorescente para isolá-las nos tecidos do receptor (VANDEPUTTE et al., 2014). Com estas técnicas, percebe-se que grande parte dos estudos focam na dispersão das células infundidas pelos órgãos periféricos como baço, fígado, pulmões e rins (CHEN, L. et al., 2014; MISRA et al., 2012) e ou para constatação para a baixa taxa de chegada ao tecido nervoso (SCHWARTING et al., 2008).

Mesmo com todos esses achados, persiste a necessidade de formular mais conhecimentos básicos sobre a biologia das CMN-MO no que tange a janela de sobrevivência, migração e integração no microambiente encefálico danificado (LI et al., 2010). Portanto, o esclarecimento do comportamento das células transplantadas que chegam ao tecido nervoso pode corroborar com a fundamentação de ensaios translacionais e projetar de forma mais contundente o uso de CMO-MO como opção terapêutica eficaz ao AVE com uso desta linhagem celular.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Geral

Investigar o comportamento das células mononucleares da medula óssea no tecido nervoso descrevendo sua biodistribuição no tecido sadio e isquêmico, assim como a janela de sobrevivência celular ao longo do tempo.

1.7.2 Específicos

- a) Analisar o decaimento das células transplantadas ao longo dos períodos de sobrevida de 01 a 28 dias;
- b) Discriminar características terapêuticas das CMN-MO na proteção tecidual;
- c) Descrever o comportamento das CMN-MO no tecido sadio ao longo da janela de estudo de 01 a 28 dias;
- d) Analisar a evolução histopatológica da isquemia experimental no estriado ao longo das janelas de sobrevida de até quatro semanas;
- e) Comparar a resposta inflamatória entre a primeira e a quarta semana após isquemia; e
- f) Apontar a influência das CMN-MO sobre a recuperação neurocomportamental ao longo do tempo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos, pesando entre 250-300g. Todos alojados em gaiolas contendo entre 4-5 animais, com água e comida *ad libitum*. Os procedimentos foram executados conforme aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE/UFGPA), segundo protocolo CEPAE nº 073-12. Todos os esforços foram feitos para se evitar o sofrimento e o estado de ansiedade nos animais.

Para o proposto estudo foram planejados três grupos experimentais igualmente organizados entre os quatro tempos de sobrevivência de 01, 03, 07 e 28 dias, conforme disposto na tabela 01.

Tabela 01. Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais/ grupo.

Grupos	Descrição	Número
IST	Animais Isquêmicos Sem Tratamento (IST) receberam todos os procedimentos cirúrgicos e de indução de isquemia com endotelina-1 (ET-1). Contudo, o conteúdo de tratamento ministrado foi apenas salina estéril ou veículo. A via de tratamento foi intracerebral (i.c.).	3
ITCM	Animais Isquêmicos Tratados com Células Mononucleares (ITCM) receberam todos os procedimentos cirúrgicos com indução isquêmica por ET-1 e infusão intracerebral (i.c.) única de 5×10^5 células mononucleares da medula óssea (CMN-MO), 24 horas após injeção de endotelina-1.	5
FO	Animais Falso Operado (FO) receberam todos os procedimentos cirúrgicos de indução isquêmica sem aplicação de ET-1 e, receberam infusão intracerebral (i.c.) única de 5×10^5 CMN-MO, 24 horas após injeção de salina estéril ou veículo.	5

2.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS, CIRÚRGICOS E PÓS-CIRÚRGICOS

2.2.1 Procedimentos pré-cirúrgicos

Os animais foram adquiridos com pelo menos três semanas de antecedência da data prevista para cirurgia. Durante este período foram ambientados e manipulados para reduzir reações de ansiedade e de estresse.

No dia anterior à cirurgia, objetivando registrar as linhas de base dos animais, estes realizaram os testes comportamentais que foram posteriormente executados em dias específicos após a cirurgia (item 2.3).

2.2.2 Procedimentos cirúrgicos

No dia da cirurgia de indução isquêmica, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg), uma vez abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os animais foram colocados em aparelho estereotáxico, sob a proteção de manta térmica, para localização das coordenadas cirúrgicas em relação ao ponto bregma: +3,0mm, lateral; e 0,0mm, anterior; em relação à superfície cortical, -3,5mm, ventral. Para tanto, uma incisão longitudinal foi feita com bisturi para exposição da calota craniana e no ponto cirúrgico encontrado foi feita a craniotomia com auxílio de uma broca cirúrgica. Neste ponto, segundo a coordenada esterotáxica, foram injetados 80pmol de ET-1 (Sigma), diluídos em 1µl salina estéril com auxílio de uma micropipeta de vidro difundido no *Striatum* do animal ao longo de um minuto. Os animais do grupo FO receberam apenas salina estéril. Depois da cirurgia, os animais foram aleatoriamente distribuídos entre os grupos ITCM e IST com posterior realojamento nas respectivas gaiolas com a sobrevida predefinida entre 01, 03, 07 e 28 dias, apenas saindo delas para realizar os testes comportamentais e, por fim, o sacrifício.

2.2.3 Procedimentos pós-cirúrgicos

Estes consistiram em testes comportamentais a serem realizados 01, 03, 07 e 28 dias pós-indução isquêmica (item 2.3), nos tratamentos propostos (item 2.4) e sacrifício dos animais.

No dia do sacrifício, concluídos os testes comportamentais do dia, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg), abolidos os reflexos de retirada e corneano, foram perfundidos intracardicamente, com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 250-300 ml de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Depois da retirada do encéfalo, este foi pós-fixado por 24h na mesma solução de paraformaldeído, o qual seguiu por bateria de crioproteção, em soluções

de concentrações crescentes de sacarose diluídos em mistura de glicerina com PB (0,05M; pH 7,2 – 7,4).

Completada a crioproteção, os encéfalos foram cortados em criostato (Mícron, HM505E), pós-incluídos em Tissue-Tek[®] (Sakura) e secções montadas em lâminas histológicas gelatinizadas com cortes de 20µm ou de 50µm, organizadas em estojo laminário próprio e conservadas em refrigerador -20°C. Os cortes mais finos foram utilizados para a realização de imunistoquímica básica (item 2.5.2) e os mais espessos para análise histopatológica (item 2.5.1).

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

A recuperação funcional dos animais foi aferida pelos seguintes testes comportamentais: Teste Modificado de Remoção do Adesivo e o Teste do Cilindro.

2.3.1 Teste de Remoção do Adesivo

Foi utilizado o Teste Modificado de Remoção do Adesivo proposto por Sughrue e colaboradores (2006). O qual foi adaptado nas quantidades de tentativas propostas, de três para cinco. Das quais o melhor e pior desempenho foram excluídos para se ter menores desvios nos testes por animal.

O teste em si consiste em envolver o punho do animal com um adesivo (3,5cm de comprimento; por 1,0 cm de largura) em tentativas de 30s cada, alternadas entre as patas, controlado por um cronometro em contagem regressiva. Com auxílio de um segundo cronometro, todo e qualquer movimento esboçado pelo animal de retirada do adesivo será registrado no momento que for iniciado e parado no instante que for cessado (SUGHRUE et al., 2006). Trata-se, portanto, de um teste sensorio motor que faz a razão do tempo que o animal emprega em responder ao apelo de retirada do adesivo pelo tempo total do teste (30s) em cada pata (razão = tempo de retirada/ 30s).

Todos os dados foram tabulados e organizados entre os grupos e sobrevidas para se inferir os resultados.

2.3.2 Teste do Cilindro

O teste do cilindro foi aplicado para evidenciar o aspecto (as)simétrico de uso das patas na exploração vertical das paredes de um cilindro de vidro com 20cm de diâmetro uniforme por 40cm de altura (SCHALLERT et al., 2000) nos dias de avaliação.

Individualmente cada animal foi colocado no fundo de um cilindro de vidro transparente. Por trás do cilindro foi posicionado um par de espelhos perpendiculares um ao outro para favorecer a visualização de todas as faces do aparato durante o registro do teste. Cada animal teve seu desempenho filmado ao longo de 10 minutos ou vinte toques no cilindro.

Dados do teste do cilindro foram tabulados e analisados como descrito na literatura (SCHALLERT et al., 2000).

2.4 TRATAMENTO

2.4.1 Terapia celular

Foi utilizada a via de transplante intracerebral de 5×10^5 CMN-MO. Estas células foram extraídas da medula óssea de um animal doador da mesma ninhada dos animais receptores. Protocolo adaptado de Giraldo-Guimarães et al (2009). O animal doador foi anestesiado com mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg), abolidos os reflexos de retirada e corneano, foi sacrificado com deslocamento cervical. Em ambiente estéril, o fêmur e a tíbia de cada pata foram dissecados e imersos em salina estéril. Na câmara de fluxo laminar (Veco, Clean Plus), as epífises dos ossos foram cortadas e a medula óssea extraída em um tubo cônico (14ml) em jatos de DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, D8900-10X1L) com auxílio de uma seringa (10ml), cuidadosamente inserida no canal da medula óssea. No tubo cônico, a medula óssea foi mecanicamente dissociada e centrifugada por 5 minutos, centrifuga (Centribio, 80-2B). Depois, o sobrenadante foi descartado e a mistura de células foi ressuspendida em 2ml de DMEM-F12 e transferida para outro tubo cônico contendo 2ml de Histopaque® (108, 31-6X100XL) e centrifugada por 30 minutos. Deste último, as células da fração mononucleares da medula óssea (CMN-MO) foram extraídas do meio limite entre o Histopaque® e o DMEM-F12. Em um terceiro tubo cônico, as células foram lavadas em três tempos com salina estéril

por 5 minutos cada. As lavagens foram feitas em 3ml de salina estéril com ressuspensão das CMN-MO entre uma lavagem e outra (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009).

Depois da última lavagem, passou-se a contagem das células. O sobrenadante foi descartado e às células no tubo adicionado 0,180ml (180µl) de DMEM-F12 e 0,020ml (20 µl) de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich). Após a ressuspensão, uma alíquota foi retirada desta última solução para contagem das células mononucleadas na Câmara de Neubauer, tomando-se por base, inicialmente, o fator de diluição igual a 10 (dez). O volume contendo 5×10^5 células, determinado por regra de três simples, foi injetado intracerebralmente na mesma coordenada esteotática de indução isquêmica, após pré-impregnação com nanocristais (*Qtracker*®. QDort – Life, Brasil).

2.4.1.1 Impregnação das CMN-MO com Nanocristais (QDort. *Qtracker*® *Labeling celular*).

Foi utilizado *Qtracker*® *Labeling celular Protocol Kit* para células em suspensão (Nanocristais, QDort – Life, Brasil).

O preparo da solução de trabalho inicia com a mistura, em tubo cônico de 1,5ml, de 2µl do reagente A com 2µl do reagente B do kit (*Qtracker*® *Labeling celular*). Deixando-se descansar por 5 minutos. Finalizado o descanso, ao tubo cônico com os reagentes foram adicionados 200µl do meio de cultura completo (DMEM-F12+soro fetal bovino) e agitados em vórtex por 30 segundos. Seguida a agitação, ao tubo com a solução de trabalho foi adicionada a solução com 200µl com CMN-MO, passando para incubação à temperatura de 37°C por 45-60 minutos.

Depois da incubação, foram realizadas duas lavagens com o meio de crescimento completo (DMEM-F12+soro fetal bovino). Ao final, (res)suspendeu-se as CMN-MO ao volume com concentração de interesse, da ordem de 125mil células/µl, para infusão intracerebral.

2.4.1.2 Transplante Intracerebral de CMN-MO

No dia da cirurgia para infusão das CMN-MO (24h após a indução isquêmica – item 2.2.2), os animais foram anestesiados com mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König. 9mg/kg), uma vez abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os animais foram colocados em aparelho estereotáxico, sob a proteção de manta térmica, os pontos da sutura foram higienizados e

rebatidos, a calota craniana foi reexposta e a ferida recebeu assepsia local. As mesmas coordenadas cirúrgicas (+3,0mm, lateral; 0,0mm, anterior; e -3,5mm, ventral) foram usadas para o transplante de 5×10^5 CMN-MO. Para tanto, este montante celular foi diluído à $4 \mu\text{l}$ de solução (125mil células/ μl) e infundido intraestriatalmente ao longo de 5 minutos, por meio de uma seringa Hamilton. Por outros cinco minutos, a agulha da seringa Hamilton foi mantida estacionária no mesmo local de infusão para evitar o refluxo da solução.

Finalizado o transplante, o escalpe do animal foi suturado, higienizado e, após recuperação da anestesia, o animal foi realojado na respectiva gaiola.

2.5 HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

A análise histopatológica foi realizada com coloração de violeta de cresila nos cortes de $50 \mu\text{m}$. Enquanto que a imunistoquímica foi realizada nos cortes de $20 \mu\text{m}$ com dois anticorpos específicos para identificação de microglia/macrófagos. Todos os protocolos usados estão descritos em estudos anteriores do nosso laboratório (CARDOSO et al., 2013; FRANCO et al., 2012).

2.5.1 Histopatológico

A coloração com Violeta de Cresila foi aplicada para tingir, inespecificamente, o tecido e evidenciar, na área de lesão, eventos relativos ao infiltrado celular e/ou ao palor tecidual, nos animais injetados com ET-1. Nos animais aplicados apenas salina estéril, a Violeta de Cresila serve para orientar o sítio de injeção.

2.5.2 Imunoistoquímica

A presença de microglia/macrófagos ativados e geral foram identificadas, respectivamente, pela marcação com ED-1 (1:200; Sorotec, mouse anti-rat CD68) e IBA1 (1:1.000, Wako Chemicals - USA).

Lâminas montadas armazenadas em congelador (Consul, Freezer 300) -20°C , foram secadas na estufa (BrasDonto, BrClave[®]) à 40°C por 30 minutos. Depois os cortes delimitados com caneta hidrofóbica e lavados em PBS por 3 minutos seguido de pré-tratamento em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C , por

25 minutos e outros 20 minutos de esfriamento à temperatura ambiente. Nova lavagem em PBS por 3 minutos e posterior imersão em solução metanol (QEEL), 1,0% de peróxido de hidrogênio (30%; Merck) sob agitação constante. Seguido de três tempos de lavagem (3 minutos cada) em solução PBS/Tween[®] (0,05%; Sigma-Aldrich) e posterior incubação, por 1h, em soro normal de cavalo (anticorpo ED-1/CD68) e em soro normal de cabra (IBA1) diluídos em PBS (1:9), em câmara úmida. Passando à noite incubados nos respectivos anticorpos primários, seguem para três tempos de lavagem (3 minutos cada) em PBS/Tween[®], os cortes foram incubados por 2h em anticorpo secundário: anti-camundongo feito em cavalo (1:100; Vector) para ED-1/CD68 e anti-coelho feito em cabra (1:100; Vector) para IBA1. Lavagem em três tempos (3 minutos cada) em PBS/Tween e incubação em Complexo Avidina-Biotina peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain[®]) por 2h e posterior lavagem em PBS/Tween (4 tempos, 3 minutos cada) seguido para revelação. Esta foi realizada em diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich), solução pré-montada (125mg DAB; 250ml de PB 0,1M, pH 7,2 – 7,4 e; 130 µl de H₂O₂). Após reação, os cortes foram lavados em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4), secos em estufa, desidratados em bateria de álcool/ xileno para montagem em Entellan[®] (Merck).

2.6 MÉTODO DE ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados qualitativamente. As lâminas histológicas marcadas por métodos de imunoistoquímica, Nissl e por fluorescência foram analisadas, respectivamente, em microscópio de luz (Bioval) e fotografados em foto-microscópio (Olympus Evolt E-330); e imagens obtidas em fotomicroscopia com fluorescência para destacar as CMN-MO impregnadas com nanocristais das demais células do tecido pelo sistema de microscopia Zeiss, Axio Scope A1, com câmera embutida (AxioCam HRc, Zeiss) ligada a um computador.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por Análise de Variância, um critério e teste de correção de Bonferroni e Teste t de *Student* com índice de significância estipulados para $p < 0,05$. Os resultados são apresentados em gráficos de colunas (média \pm desvio padrão).

3 RESULTADOS

3.1 A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EVIDENCIA A PRESENÇA DE DENSO INFILTRADO CELULAR NOS ANIMAIS TRATADOS E EXTENSO PALOR TECIDUAL NOS ANIMAIS CONTROLE

Os achados histopatológicos foram analisados nos grupos ITCM e IST entre o início da 2ª semana após a indução isquêmica, momento em que a população microglial atinge seu ápice; e o término na 4ª semana, quando ocorre a resolução da resposta inflamatória mediada pela microglia. No primeiro instante, afere-se a eficácia do modelo de indução isquêmica local. Tanto na **figura 3A** quanto **3B** percebe-se o massivo infiltrado celular e, no entorno, a rarefação celular – o palor tecidual. Esta configuração pode ser observada ainda nas **figuras 3C** e **3D**. Contudo, notam-se os maiores grumos celulares nos animais dos grupos ITCM de 07 e 28 dias (**fig.03 – A** e **C**) quando comparados a seus respectivos controles. Ao final da quarta semana, os animais do grupo IST demonstram menor infiltrado celular com o palor tecidual ainda bastante evidente (**fig.03 – D**). Isso é claramente o oposto daquilo observado nos animais do grupo ITCM com a mesma sobrevida (**fig.03 – C**).

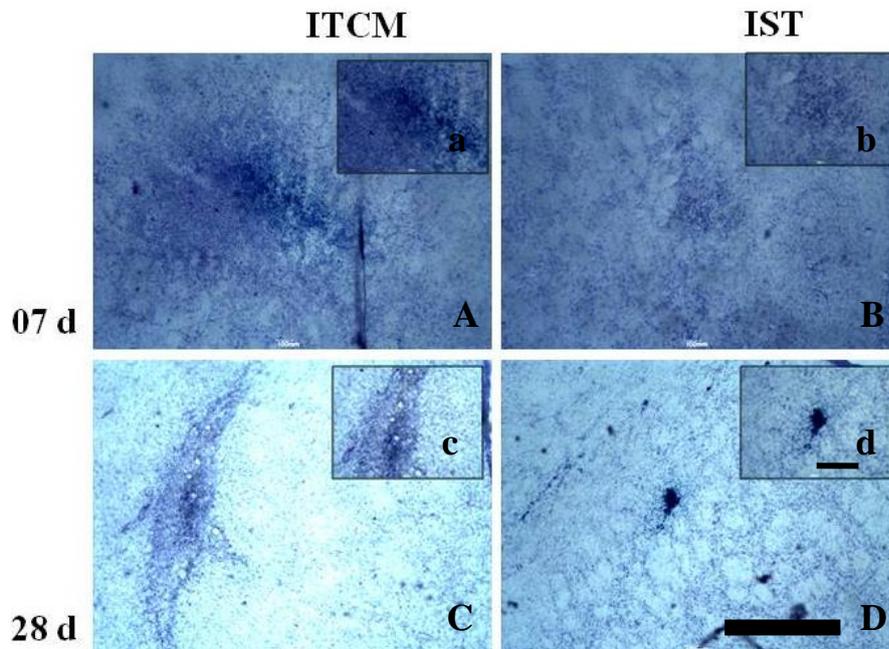


FIGURA. 03 – Histopatologia, coloração com Violeta de Cresila. Objetiva 4x (A, B, C e D); objetiva 10x (a, b, c e d). Barra maior: 200µm; barra menor: 150µm.

Desses achados infere-se que a indução isquêmica por ET1 consegue provocar eventos fisiopatológicos semelhantes àqueles descritos no AVE em humanos, como: o dano tecidual e a quimiotaxia de células do sistema imunológico para o sítio de lesão. A infusão de CMN-MO no sítio de lesão promove preservação tecidual tardiamente e a maior concentração de células infiltradas nos grupos de tratamento pode se dar pela presença das CMN-MO tanto na fase subaguda quanto crônica do AVE experimental.

3.2 CMN-MO MODULAM A RESPOSTA INFLAMATÓRIA E SÃO A PROVÁVEL CAUSA DO FORTE INFILTRADO CELULAR

Os procedimentos de imunistoquímica básica para os anticorpos ED1 (**fig.04**) e IBA1 (**fig.03**) seguiram o mesmo desenho daquele apresentado na análise histopatológica (**fig.03**). Células ED1+ foram densamente encontradas aos sete dias nos animais do grupo IST (**fig.04 – B**) e em menor proporção nos animais tratados com CMN-MO em qualquer sobrevivência (**fig.04 – A e C**). Na quarta semana, tanto o grupo ITCM (**fig.04 – C**) quanto do grupo IST (**fig.04 – D**) apresentavam significativa marcação de células ED1+, contudo, com perfil de distribuição diferente. Nos animais ITCM de 28 dias, as células ED1+ concentram-se no sítio de transplante (**fig.04 – C**); já, nos animais-controle de 28 dias, a dispersão das células ED1+ ainda é bem ampla (**fig.04 – D**).

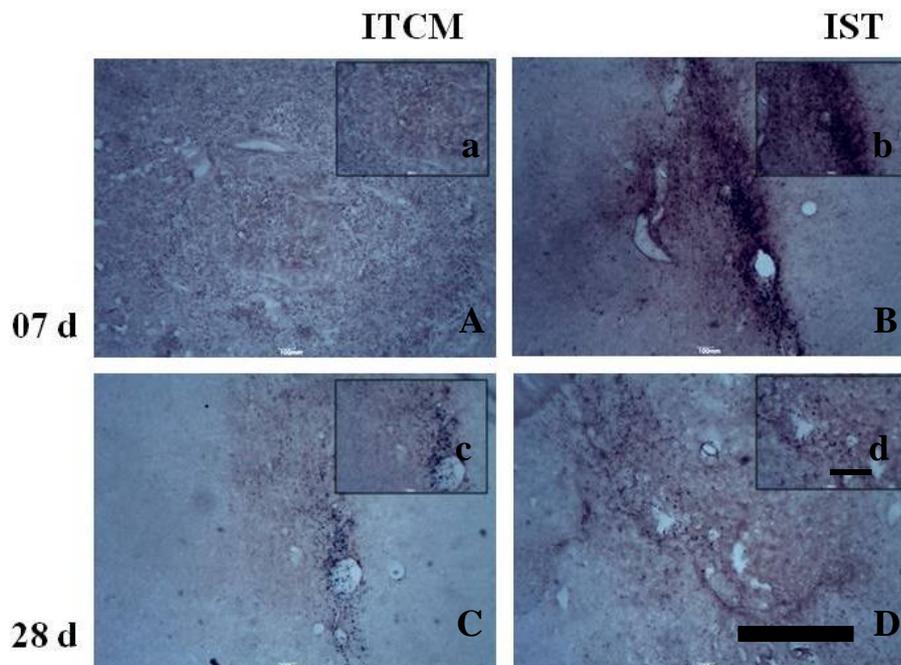


FIGURA. 04 – Imunistoquímica, ED1. Objetiva 4x (A, B, C e D); objetiva 10x (a, b, c e d). Barra maior: 200µm; barra menor: 150µm.

Todavia, a imunistoquímica para as células IBA1+ evidencia forte impregnação no tecido aos sete dias, tanto nos animais do grupo tratado (**fig.05 – A**) quanto no controle (**fig.05 – B**). E, aos 28dias, animais do grupo ITCM têm menor marcação de células IBA1+ (**fig.05 – C**) quando comparado aos animais do grupo IST, que ainda manifestam densa marcação para células IBA1+ (**fig.05 – D**).

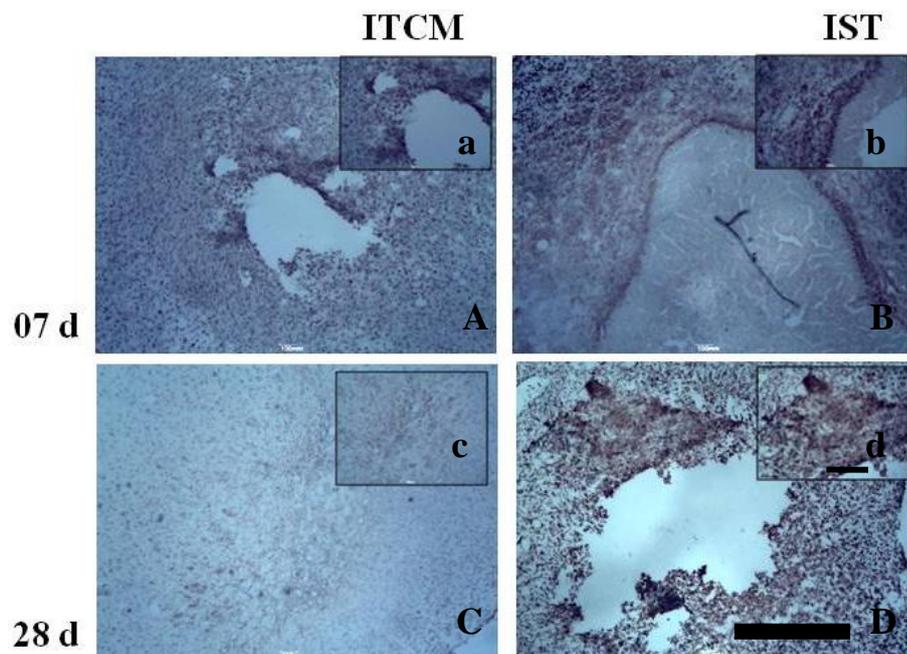


FIGURA. 05 – Imunistoquímica, IBA1. Objetiva 4x (A, B, C e D); objetiva 10x (a, b, c e d). Barra maior: 200 μ m; barra menor: 150 μ m.

As revelações da imunistoquímica para ED1 e IBA1 ponderam significativa presença de microglia/macrófagos ativados (**fig.04**) principalmente nos animais do grupo controle (**fig.04 – B e D**), e de migroglia/macrófagos gerais (**fig03**) com marcação mais tênue nos animais do grupo ITCM de 28dias (**fig.05 – C**) quando comparado a qualquer outro grupo e sobrevida (**fig.05 – A, B e D**). Esses achados concluem que a terapêutica CMN-MO além de favorecer o controle da resposta imunológica, ainda pode ser a resposta à massiva presença células infiltradas, descrita na análise histopatológica da figura 03 (item 3.1). Isso quer dizer que grande parte das células ali presentes não era proveniente da resposta imunológica do tecido e sim, provavelmente, a disseminação das células transplantadas ainda vivas entre a 2^a e a 4^a semana de transplante.

3.3 O MICROAMBIENTE ISQUÊMICO PROVOCA AMPLA DISTRIBUIÇÃO DAS CMN-MO, E SUA REDUÇÃO NO TECIDO AO LONGO DO TEMPO

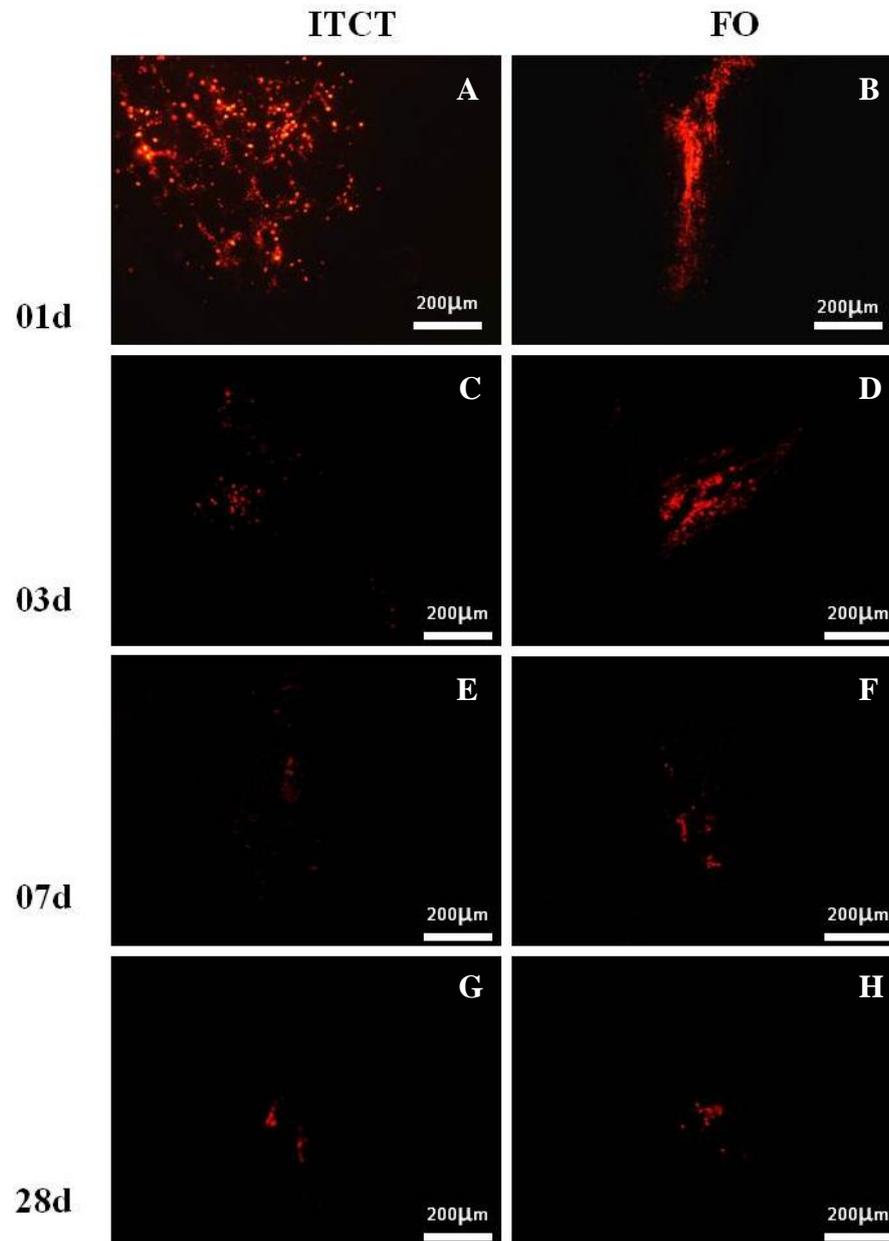


FIGURA. 06 – Microscopia com fluorescência, Nanocristais (Qdot). Células mononucleares da medula óssea (CMN-MO). Objetiva 10X. Barra: 200µm.

Os dados das imagens da figura 06 apresentam forte evidência de ampla disseminação das CMN-MO em todos os tempos de sobrevivência nos animais do grupo ITCT (**fig.06 – A, C, E e G**), destacadamente em 01 a 07 dias. Nos animais do grupo FO, percebe-se tênue dispersão das CMN-MO, ficando mais concentradas às proximidades do sítio de transplante (**fig.06 – B, D, F e H**). Outro dado relevante é o decaimento da população de

CMN-MO com perfil semelhante entre os grupos ITCM e FO (**fig.06**). Todavia, esta redução parece ser mais intensa no montante celular dos animais do grupo ITCM, quando comparado àquele observado no grupo FO (**fig.06**).

Dos achados, consegue-se inferir que as CMN-MO são perdidas ao longo dos tempos de sobrevivência e apresentam maior biodistribuição nos animais que sofreram isquemia (**fig.06**). Ao que parece, no tecido nervoso sadio, não há estímulos provocadores que determinem a distribuição das CMN-MO pelo microambiente.

3.4 OS TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO EVIDENCIAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS

Os testes comportamentais aplicados neste estudo não discriminaram a evolução neurofuncional entre os grupos montados nos tempos de sobrevivência analisados (**fig.07** e **fig.08**).

3.4.1 Teste do Cilindro

A análise quantitativa dos dados do teste do cilindro não evidencia diferenças significativas de recuperação funcional entre os animais dos grupos IST e ITCM. Percebe-se com isso que ocorre uma resposta de restabelecimento do uso das patas de forma similar entre os grupos ao longo de 28 dias de observação (**fig.07**). Ao que parece, a terapêutica com CMN-MO não manifestou resultados destacados no grupo ITCM, onde os animais apresentaram recuperação espontânea, equivalente ao grupo controle IST.

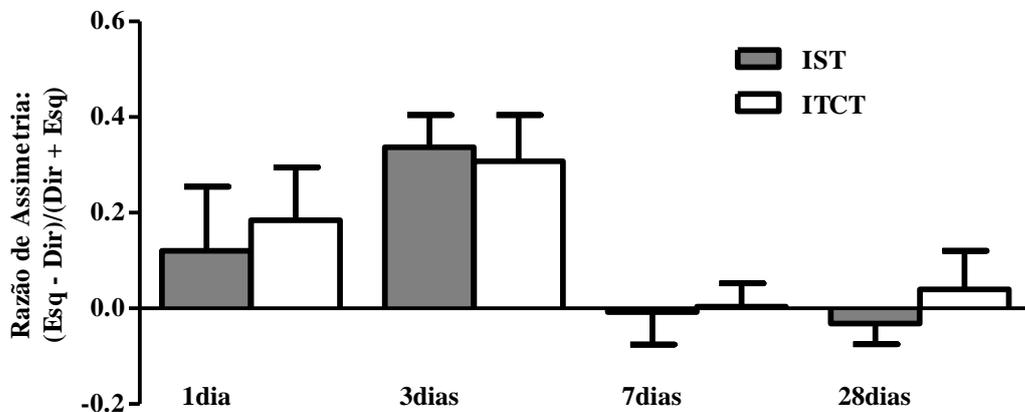


FIGURA. 07 – Teste do Cilindro. Avaliação realizada ao longo das sobrevivências de 1 a 28 dias. Quanto mais próximo do 0 (zero) maior a simetria entre as patas. Colunas para o lado (+) indicam assimetria com maior uso da pata esquerda. Colunas (-), maior uso da pata direita.

Contudo, infere-se dos dados a eficácia da indução isquêmica entre os grupos. Do 1º ao 3º dias os níveis de assimetria são altos, tendenciando à simetria entre as patas, a partir do 7º dia.

3.4.2 Teste de Remoção do Adesivo

Estes resultados evidenciam a assimetria prolongada do grupo IST até o 7º dia, tornando-se simétrico no 28º dia. No 3º dia, o grupo FO recupera a simetria que evolui até o final da 4ª semana.

No 7º dia, os grupos que sofreram indução isquêmica manifestam acentuada assimetria. Este resultado se apresenta inesperado no 28º dia, no qual o grupo IST recupera a simetria e o grupo ITCM permanece assimétrico.

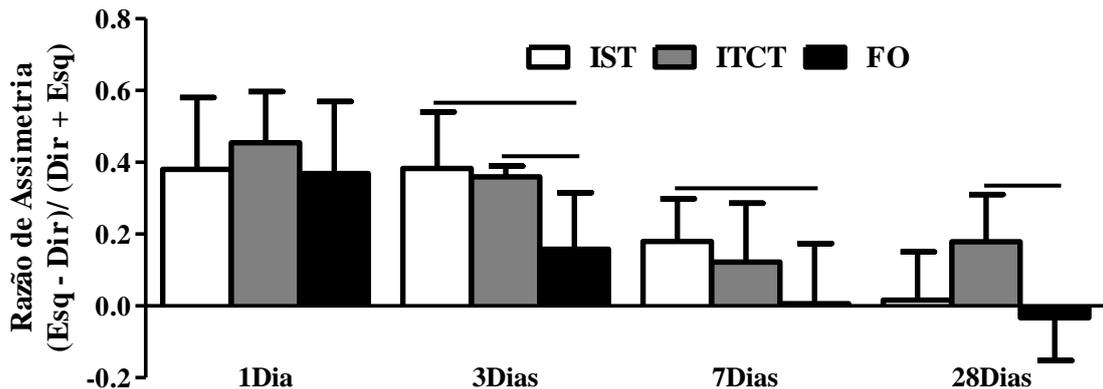


FIGURA. 08 – Teste Modificado de Remoção do Adesivo. Avaliação realizada ao longo das sobrevivências de 1 a 28 dias. Quanto mais próximo do 0 (zero) maior a simetria entre as patas. Colunas para o lado (+) indicam assimetria com maior uso da pata esquerda. Colunas (-), maior uso da pata direita.

Os dados de ambos os testes comportamentais não corroboram com os achados teciduais evidenciados pelas CMN-MO nas análises de imunohistoquímica e histopatológicas descritos nos itens 3.1 e 3.2.

4 DISCUSSÃO

4.1 VISÃO GERAL

O modelo experimental utilizado foi bem sucedido para induzir isquemia no estriado dorso lateral de ratos pela aplicação de microinjeções de ET1 (NGUEMENI et al., 2015; ROOME et al., 2014). Os achados aqui descritos foram consistentes com os principais eventos histopatológicos evidenciados na clínica do AVE, entre os quais estão: a perda tecidual progressiva e resposta inflamatória (JUNG et al., 2013; KAWABORI e YENARI, 2015). Este resultado também é congruente com achados experimentais já realizados em nosso grupo (CARDOSO et al., 2013; FRANCO et al., 2012) e semelhante aquele descrito na literatura sobre a temática que aplicaram ET1 para induzir lesões isquêmicas focais em roedores (LIVINGSTON-THOMAS et al., 2013; ROOME et al., 2014).

A escolha do estriado dorso lateral para o sítio de indução isquêmica experimental e, posterior transplante de CMN-MO, foi baseado em estudos experimentais clássicos que evidenciam a participação desta estrutura neuroanatomofuncional no controle motor das patas anteriores de ratos (BROWN et al., 1987; KELLY et al., 1982). Este conhecimento sustenta a seleção dos testes comportamentais usados neste ensaio cuja essência avaliativa pondera sobre os índices de (as)simetria entre as patas em atividades exploratórias e espontâneas natas de cunho sensoriomotor. No que tange ao respaldo da seleção de uma estrutura subcortical como o estriado, para execução do presente estudo experimental, é a manifestação clínica dos eventos de AVEs. Dados epidemiológicos estimam que 25% das doenças cerebrovasculares ocorrem em estruturas profundas (ARBOIX et al., 2014; NORRVING, 2008), nutridas pela rede vascular perfurante, tal quais os núcleos da base. Estas formações nucleares participam de diversas funções, entre as quais está o controle motor, a principal queixa de prejuízo após eventos isquêmicos encefálicos (HANDLEY et al., 2009; POLLOCK et al., 2014; SINISCALCHI et al., 2012).

Neste mesmo pensamento, a eleição do protocolo de entrega intracerebral das CMN-MO foi feito neste estudo por favorecer o mimetismo da chegada de uma população de células transplantadas ao sítio da lesão isquêmica e ainda possibilitar o controle de algumas variáveis que seriam difíceis de serem mantidas na infusão intravenosa (p. ex.), a saber: a quantidade de células que chegam ao tecido, o instante temporal estimado de entrada no tecido e a distribuição ao longo da área de lesão isquêmica. Reconhece-se, contudo, que clinicamente, o transplante celular intracerebral não é um procedimento recente e não é a

primeira opção entre os profissionais (BENCHOUA e ONTENIENTE, 2011; FISHER e GAGE, 1994; YASUHARA e DATE, 2007). Este método tem o pró de ser de entrega precisa no tecido alvo das células transplantadas, mas o forte contra de ser um procedimento com características cirúrgicas ainda mais invasiva que a infusão celular por via intravascular (MISRA et al., 2012). Contudo, manteve-se o interesse neste protocolo por, junto com o modelo de isquemia e os testes comportamentais apresentados, consolidar o delineamento da resposta à pergunta experimental e no alcance dos objetivos traçados.

Neste contexto, destacam-se os resultados deste estudo que apontam a significativa dispersão das CMN-MO no tecido nervoso isquêmico, assim como a maior taxa de perda das células transplantadas no grupo ITCM comparado ao FO. Os dados histopatológicos e imunoistoquímicos juntos evidenciam que a massa de células infiltradas observadas, até na quarta semana de sobrevida, no grupo ITCM é em grande parte oriunda da permanência das células transplantadas no tecido, quando comparado ao grupo IST. O refinamento dos procedimentos para infusão das CMN-MO intracerebral parece ser fator chave para se apurar dados nos testes comportamentais que discriminem com mais sensibilidade os grupos e, assim, evidenciar resultados que corroborem com os achados histológicos encontrados.

4.2 ANIMAIS DO GRUPO TRATADO APRESENTARAM MAIOR INFILTRADO CELULAR EM QUALQUER TEMPO DE SOBREVIDA

A massa de células infiltradas na área de lesão após isquemia é em essência oriunda da resposta imunológica, em particular, microglia, astrócitos, linfócitos e macrófagos (DUCRUET et al., 2011; JIN et al., 2010). Em nossos resultados, observa-se intensa concentração celular no sítio de isquemia evidenciado pela análise histopatológica por coloração com Viotela de Cresila. Contudo, inesperadamente, a maior intensidade da coloração está nos animais do grupo ITCM (**fig.03**). Isso gerou a hipótese que a infusão intracerebral de CMN-MO tenha exacerbado a resposta imunológica do tecido (COYNE et al., 2006; IRONS et al., 2004).

Este achado apesar de consistente não é completamente respaldado pela literatura que afirma a baixa imunogenicidade da linhagem celular utilizada neste ensaio (MA et al., 2012). A hipótese, então, foi testada para se verificar a possível carga imunológica ativada com a presença das células transplantadas com marcadores de microglia/macrófagos nos tempos de sobrevida com o maior índice dessas células e no momento de sua resolução (**figs.**

04 e 05). Os resultados de imunistoquímica para ED1 (**fig.04**) e IBA1 (**fig.05**) refutaram a hipótese lançada, por ter sido observado que de fato, o transplante de CMN-MO reduziu sensivelmente a quantidade de microglia/macrófagos no tecido. Esses dados são coincidentes com a literatura (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2012) e reproduzidos em estudos anteriores no nosso grupo (CARDOSO et al., 2013; FRANCO et al., 2012).

Este delineamento, por fim, evidencia que o infiltrado celular discutido é em ampla parte constituído pelas CMN-MO infundidas no tecido, e que permanecem ali mesmo na sobrevivida mais tardia.

4.3 A AMPLA DISSEMINAÇÃO DAS CMN-MO É CAUSADA PELA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO RECEPTOR À LESÃO ISQUÊMICA

Aferida a baixa imunogenicidade da linhagem celular derivada da medula óssea (DEUSE et al., 2011; GEBLER et al., 2012; SOLEYMANINEJADIAN et al., 2012), torna-se praticamente zerada a possibilidade de inferências que pontuem a resposta inflamatória e fatores deletérios locais, provocados pelo enxerto celular, tenham desencadeado a considerável dispersão das CMN-MO observada em nossos resultados de fluorescência (**item 3.3**). Toda via, reconhece-se que associado à isquemia cerebral estão eventos que configuram a fisiopatologia do AVE, entre os quais, descreve-se a resposta inflamatória (TOTH et al., 2015). Por isso, estabelece-se a hipótese de que eventos fisiopatológicos inflamatórios endógenos podem ser os responsáveis pela migração das CMN-MO infundidas.

Este pensamento é sustentado em estudos experimentais que trazem evidências do poder migratório que certas linhagens celulares apresentam no tecido do hospedeiro após transplante (PRAET et al., 2012; SHAMLOO et al., 2015). Este fenômeno vem pouco a pouco sendo respaldado pela exposição da cascata molecular que subsidia a efetivação deste evento biológico. Algumas são moléculas gerais: Fator-1alfa Derivado do Estroma (SDF-1), quimiocinas e ATP (GUO et al., 2015; LAUPHEIMER et al., 2014; YU, Q. et al., 2015); outras são fatores tróficos específicos: Fator de Crescimento Nervoso (SHAMLOO et al., 2015); e ainda há aquelas de mediadas pela resposta inflamatória: receptor de manose (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2012; STURGE et al., 2007). Apesar o microambiente isquêmico ser propício à expressão de sinalizadores inflamatórios, qualquer uma das moléculas citadas pode está presente, em menor ou maior concentração, em qualquer fase da resposta imunológica e, assim, favorecendo o processo de biodistribuição das CMN-MO observadas neste estudo.

4.4 O MICROAMBIENTE DELETÉRIO DA LESÃO ISQUÊMICA FAVORECE O DECAIMENTO DAS CMN-MO

Nossos resultados sugerem que há significativo decaimento das CMN-MO transplantadas nos animais do grupo ITCM, comparado ao grupo FO. Este achado confere com estudos experimentais clássicos que evidenciam o comprometimento da viabilidade das células enxertadas por componentes da resposta inflamatória local (COYNE et al., 2006; MOLCANYI et al., 2007). Mais recentemente, abordagens clínicas em fase I e II corroboram com nossos resultados no sentido de afirmar que há massiva morte do montante celular transplantado ao longo do tempo e que fatores intrínsecos do tecido do receptor contem a chave desse fenômeno (PHILIPPE et al., 2010). O interesse neste assunto não recente e ensaios experimentais testam que o pré-condicionamento do enxerto celular antes do transplante melhora a viabilidade celular e realça os efeitos das células infundidas no tecido receptor (HERRMANN et al., 2010; LUO et al., 2012; MIAS et al., 2008).

Com relação à permanência no tecido ao longo do tempo, Brenneman et al., (2010) no mesmo estudo que evidencia a ação imunomoduladora de células mononucleares da medula óssea, também discute o rápido decaimento dessas células sítio de lesão, até sete dias, com entrega intra-arterial (BRENNEMAN et al., 2010). Em nosso modelo de transplante intracerebral, podemos assumir que o perfil de decaimento é semelhante àquele descrito.

4.5 OS TESTES COMPORTAMENTAIS NÃO FORAM SENSÍVEIS PARA ATESTAR DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS

Os testes comportamentais usados neste estudo objetivavam aferir o grau de (as)simetria entre as patas, no teste do cilindro (SCHALLERT et al., 2000), e a disfunção sensoriomotora, no teste de remoção do adesivo (SUGHRUE et al., 2006), adquirida entre os animais que sofreram lesão isquêmica no estriado dorso lateral e, ainda, destacar diferenças evolutivas em resposta ao tratamento com CMN-MO. Contudo, nossos resultados não atestam esta expectativa. Resultados inesperados semelhantes são encontrados na literatura (CLARKE et al., 2007; JENSEN et al., 2013) e são apresentados com diferentes argumentos.

Em nosso resultado, suspeita-se que a sensibilidade dos testes tenha sido afetada pelos procedimentos de transplante das CMN-MO. De modo geral, todo o aparato para execução do transplante intracerebral foi cuidadosamente analisado para reduzir ao mínimo os danos mecânicos ao tecido com uso de uma seringa Hamilton. Talvez as dimensões da agulha

e/ou a dinâmica de infusão tenham favorecido este resultado. Em experimentos semelhantes, são usados métodos e técnicas refinados e automatizados (JENSEN et al., 2013; LEVEQUE et al., 2015; WANG et al., 2011). Em estudos posteriores estes instrumentos podem ser melhorados para aumentar a confiança dos resultados.

5 CONCLUSÃO

- As coordenadas estereotáxicas foram precisas para atingir o estriado dorsolateral, local estimado para indução isquêmica e transplante celular;
- 80pMol de Endotelina-1 foram eficientes para prover isquemia no estriado dorsolateral com alterações histopatológicas e comportamentais reproduzível;
- O tratamento com 5×10^5 CMN-MO no sítio da lesão isquêmica demonstrou-se eficaz na modulação da resposta inflamatória;
- A maior concentração de infiltrado celular nos animais do grupo tratado aferia a presença das células transplantadas, mesmo em sobrevida tardia, sem significado inflamatório;
- Tanto os animais do grupo ITCM quanto FO demonstraram o mesmo perfil de decaimento ao longo das sobrevidas das CMN-MO transplantadas. A maior perda esteve entre os animais do grupo ITCM, evidenciando que o microambiente é determinante sobre a viabilidade celular;
- Os testes comportamentais evidenciaram os déficits sensoriomotores e de assimetria adquiridos entre os animais que sofreram indução isquêmica. Contudo, não foram sensíveis para evidenciar diferenças evolutivas entre o grupo de tratamento e o controle. Isso pondera refinamento nos procedimentos cirúrgicos de infusão celular intracerebral;
- Nossos achados corroboram com a literatura traçando o perfil de perda celular após o infusão intracerebral com destaque ao decaimento gradativo na primeira semana e acentuada até a quarta semana de observação.
- Outros testes imunistoquímicos podem ser realizados para analisar a influência que CMN-MO, transplantadas intracerebralmente, manifestam sobre o perfil da microglia (M1 e M2); sobre a dinâmica da astrogliose no sítio de infusão; a taxa de transdiferenciação em células natas do tecido nervoso, se ocorrer; e analisar prováveis modificações na expressão de citocinas inflamatórias.

5 BIBLIOGRAFIA

ABDELALIM, E. M. Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 9, n. 6, p. 764-773, Dec, 2013.

AIRAKSINEN, M. S.SAARMA, M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 5, p. 383-394, May, 2002.

ARBOIX, A.; BLANCO-ROJAS, L.MARTI-VILALTA, J. L. Advancements in understanding the mechanisms of symptomatic lacunar ischemic stroke: translation of knowledge to prevention strategies. **Expert Rev Neurother**, v. 14, n. 3, p. 261-276, Mar, 2014.

ARSAVA, E. M. The role of MRI as a prognostic tool in ischemic stroke. **J Neurochem**, v. 123 Suppl 2, n. p. 22-28, Nov, 2012.

ARUMUGAM, T. V.; GRANGER, D. N.MATTSON, M. P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 3, p. 229-242, 2005.

BAETEN, K. M.AKASSOGLU, K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. **Dev Neurobiol**, v. 71, n. 11, p. 1018-1039, Nov, 2011.

BANSIL, S.; PRAKASH, N.; KAYE, J.; WRIGLEY, S.; MANATA, C.; STEVENS-HAAS, C.KURLAN, R. Movement disorders after stroke in adults: a review. **Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)**, v. 2, n. p. 2012.

BARBOSA DA FONSECA, L. M.; GUTFILEN, B.; ROSADO DE CASTRO, P. H.; BATTISTELLA, V.; GOLDENBERG, R. C.; KASAI-BRUNSWICK, T.; CHAGAS, C. L.; WAJNBERG, E.; MAIOLINO, A.; SALLES XAVIER, S.; ANDRE, C.; MENDEZ-OTERO, R.DE FREITAS, G. R. Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. **Exp Neurol**, v. 221, n. 1, p. 122-128, Jan, 2010.

BECKER, K. J. Innate and adaptive immune responses in CNS disease. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 1, p. 227-236, 2006.

BEJOT, Y.; CAILLIER, M.; ROUAUD, O.; BENATRU, I.; MAUGRAS, C.; OSSEBY, G. V.GIROUD, M. [Epidemiology of strokes. Impact on the treatment decision]. **Presse Med**, v. 36, n. 1 Pt 2, p. 117-127, Jan, 2007.

BENCHOUA, A.ONTENIENTE, B. Intracerebral transplantation for neurological disorders. Lessons from developmental, experimental, and clinical studies. **Front Cell Neurosci**, v. 6, n. p. 2, Jan, 2011.

BENTLEY, P.SHARMA, P. Pharmacological treatment of ischemic stroke. **Pharmacol Ther**, v. 108, n. 3, p. 334-352, Dec, 2005.

BLAYLOCK, R. L. Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. **Surg Neurol Int**, v. 4, n. p. 118, 2013.

BOGOUSLAVSKY, J.PACIARONI, M. The economics of treating stroke as an acute brain attack. **BMC Med**, v. 7, n. p. 51, 2009.

BRAININ, M.ZOROWITZ, R. D. Advances in stroke: recovery and rehabilitation. **Stroke**, v. 44, n. 2, p. 311-313, Feb, 2013.

- BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C. S., JR.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J. C. SAVITZ, S. I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 1, p. 140-149, Jan, 2010.
- BREWER, L.; HORGAN, F.; HICKEY, A. WILLIAMS, D. Stroke rehabilitation: recent advances and future therapies. **QJM**, v. 106, n. 1, p. 11-25, Jan, 2013.
- BROUNS, R. DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 111, n. 6, p. 483-495, Jul, 2009.
- BROWN, L. L.; WOLFSON, L. I. FELDMAN, S. M. Functional neuroanatomic mapping of the rat striatum: regional differences in glucose utilization in normal controls and after treatment with apomorphine. **Brain Res**, v. 411, n. 1, p. 65-71, May 12, 1987.
- BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J. HARMEY, J. H. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med**, v. 9, n. 4, p. 777-794, Oct-Dec, 2005.
- CARDOSO, M. M.; FRANCO, E. C.; DE SOUZA, C. C.; DA SILVA, M. C.; GOUVEIA, A. GOMES-LEAL, W. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 197-205, Feb, 2013.
- CHAMORRO, A.; MEISEL, A.; PLANAS, A. M.; URRRA, X.; VAN DE BEEK, D. VELTKAMP, R. The immunology of acute stroke. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 7, p. 401-410, Jul, 2012.
- CHEN, J.; LI, Y. CHOPP, M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 711-716, Mar 3, 2000.
- CHEN, J.; LI, Y.; KATAKOWSKI, M.; CHEN, X.; WANG, L.; LU, D.; LU, M.; GAUTAM, S. C. CHOPP, M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. **J Neurosci Res**, v. 73, n. 6, p. 778-786, Sep 15, 2003.
- CHEN, J.; VENKAT, P.; ZACHAREK, A. CHOPP, M. Neurorestorative therapy for stroke. **Front Hum Neurosci**, v. 8, n. p. 382, 2014.
- CHEN, J. R.; CHENG, G. Y.; SHEU, C. C.; TSENG, G. F.; WANG, T. J. HUANG, Y. S. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. **J Anat**, v. 213, n. 3, p. 249-258, Sep, 2008.
- CHEN, L.; QIU, R. XU, Q. Stem cell therapy for ischemic stroke. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 14, n. 1, p. 976-982, Jan, 2014.
- CHEN, S. D.; YANG, D. I.; LIN, T. K.; SHAW, F. Z.; LIOU, C. W. CHUANG, Y. C. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 10, p. 7199-7215, 2011.
- CHEN, S. J.; CHANG, C. M.; TSAI, S. K.; CHANG, Y. L.; CHOU, S. J.; HUANG, S. S.; TAI, L. K.; CHEN, Y. C.; KU, H. H.; LI, H. Y. CHIOU, S. H. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 11, p. 1757-1767, Nov, 2010.
- CLARKE, J.; PLOUGHMAN, M. CORBETT, D. A qualitative and quantitative analysis of skilled forelimb reaching impairment following intracerebral hemorrhage in rats. **Brain Res**, v. 1145, n. p. 204-212, May 11, 2007.

COPSTEIN, L.; FERNANDES, J. G.BASTOS, G. A. Prevalence and risk factors for stroke in a population of Southern Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 71, n. 5, p. 294-300, May, 2013.

CORREA, P. L.; MESQUITA, C. T.; FELIX, R. M.; AZEVEDO, J. C.; BARBIRATO, G. B.; FALCAO, C. H.; GONZALEZ, C.; MENDONCA, M. L.; MANFRIM, A.; DE FREITAS, G.; OLIVEIRA, C. C.; SILVA, D.; AVILA, D.; BOROJEVIC, R.; ALVES, S.; OLIVEIRA, A. C., JR.DOHMANN, H. F. 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. 839-841, Nov, 2007.

COYNE, T. M.; MARCUS, A. J.; WOODBURY, D.BLACK, I. B. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. **Stem Cells**, v. 24, n. 11, p. 2483-2492, Nov, 2006.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A.; DA COSTA REIS, J.; DIAZ PAREDES, B.; MORAES, L.; JASMIN; GIRALDI-GUIMARAES, A.MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Res**, v. 1306, n. p. 149-158, Jan 8, 2010.

DE VRIES, S.MULDER, T. Motor imagery and stroke rehabilitation: a critical discussion. **J Rehabil Med**, v. 39, n. 1, p. 5-13, Jan, 2007.

DEUSE, T.; STUBBENDORFF, M.; TANG-QUAN, K.; PHILLIPS, N.; KAY, M. A.; EIERMANN, T.; PHAN, T. T.; VOLK, H. D.; REICHENSPURNER, H.; ROBBINS, R. C.SCHREPFER, S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. **Cell Transplant**, v. 20, n. 5, p. 655-667, 2011.

DHARMASAROJA, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. **J Clin Neurosci**, v. 16, n. 1, p. 12-20, Jan, 2009.

DORADO, L.; MILLAN, M.DAVALOS, A. Reperfusion therapies for acute ischemic stroke: an update. **Curr Cardiol Rev**, v. 10, n. 4, p. 327-335, 2014.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, Sep, 2008.

DUCRUET, A. F.; SOSUNOV, S. A.; VISOVATTI, S. H.; PETROVIC-DJERGOVIC, D.; MACK, W. J.; CONNOLLY, E. S., JR.PINSKY, D. J. Paradoxical exacerbation of neuronal injury in reperfused stroke despite improved blood flow and reduced inflammation in early growth response-1 gene-deleted mice. **Neurol Res**, v. 33, n. 7, p. 717-725, Sep, 2011.

EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1021-1029, Feb 6, 2009.

ENGLAND, T.; MARTIN, P.BATH, P. M. Stem cells for enhancing recovery after stroke: a review. **Int J Stroke**, v. 4, n. 2, p. 101-110, Apr, 2009.

FEIGIN, V. L.; FOROUZANFAR, M. H.; KRISHNAMURTHI, R.; MENSAH, G. A.; CONNOR, M.; BENNETT, D. A.; MORAN, A. E.; SACCO, R. L.; ANDERSON, L.; TRUELSEN, T.; O'DONNELL, M.; VENKETASUBRAMANIAN, N.; BARKER-COLLO, S.; LAWES, C. M.; WANG, W.; SHINOHARA, Y.; WITT, E.; EZZATI, M.; NAGHAVI, M.MURRAY, C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 383, n. 9913, p. 245-254, Jan 18, 2014.

FERNANDES, T. G.; GOULART, A. C.; CAMPOS, T. F.; LUCENA, N. M.; FREITAS, K. L.; TREVISAN, C. M.; BENSENOR, I. M. LOTUFO, P. A. Early stroke case-fatality rates in three hospital registries in the Northeast and Southeast of Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 11, p. 869-873, Nov, 2012.

FISHER, L. J. GAGE, F. H. Intracerebral transplantation: basic and clinical applications to the neostriatum. **FASEB J**, v. 8, n. 8, p. 489-496, May, 1994.

FORRESTER, L. W.; ROY, A.; GOODMAN, R. N.; RIETSCHER, J.; BARTON, J. E.; KREBS, H. I. MACKO, R. F. Clinical application of a modular ankle robot for stroke rehabilitation. **NeuroRehabilitation**, v. 33, n. 1, p. 85-97, 2013.

FRANCO, E. C.; CARDOSO, M. M.; GOUVEIA, A.; PEREIRA, A. GOMES-LEAL, W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 122-132, Jun, 2012.

FUGATE, J. E. RABINSTEIN, A. A. Update on Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. **Mayo Clin Proc**, v. 89, n. 7, p. 960-972, Jul, 2014.

GARRITANO, C. R.; LUZ, P. M.; PIRES, M. L.; BARBOSA, M. T. BATISTA, K. M. Analysis of the mortality trend due to cerebrovascular accident in Brazil in the XXI century. **Arq Bras Cardiol**, v. 98, n. 6, p. 519-527, Jun, 2012.

GBLER, A.; ZABEL, O. SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 2, p. 128-134, Feb, 2012.

GEHRMANN, J.; BANATI, R. B.; WIESSNER, C.; HOSSMANN, K. A. KREUTZBERG, G. W. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 21, n. 4, p. 277-289, Aug, 1995.

GIRALDI-GUIMARAES, A.; DE FREITAS, H. T.; COELHO BDE, P.; MACEDO-RAMOS, H.; MENDEZ-OTERO, R.; CAVALCANTE, L. A. BAETAS-DA-CRUZ, W. Bone marrow mononuclear cells and mannose receptor expression in focal cortical ischemia. **Brain Res**, v. 1452, n. p. 173-184, May 3, 2012.

GIRALDI-GUIMARAES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F. P. MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Res**, v. n. p. Feb 9, 2009.

GIRALDI-GUIMARDES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F. P. MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Res**, v. 1266, n. p. 108-120, Apr 17, 2009.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-356, May, 2012.

GOMEZ PERDIGUERO, E.; SCHULZ, C. GEISSMANN, F. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 112-120, Jan, 2013.

GOULART, A. C.; BENSENOR, I. M.; FERNANDES, T. G.; ALENCAR, A. P.; FEDELI, L. M. LOTUFO, P. A. Early and one-year stroke case fatality in Sao Paulo, Brazil: applying the World Health Organization's stroke STEPS. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 21, n. 8, p. 832-838, Nov, 2012.

- GREEN, A. R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. **Br J Pharmacol**, v. 153 Suppl 1, n. p. S325-338, Mar, 2008.
- GRONBERG, N. V.; JOHANSEN, F. F.; KRISTIANSEN, U.HASSELDAM, H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. **J Neuroinflammation**, v. 10, n. p. 115, 2013.
- GUNSILIUS, E.; GASTL, G.PETZER, A. L. Hematopoietic stem cells. **Biomed Pharmacother**, v. 55, n. 4, p. 186-194, May, 2001.
- GUO, R.; CHAI, L.; CHEN, L.; CHEN, W.; GE, L.; LI, X.; LI, H.; LI, S.CAO, C. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) accelerated skin wound healing by promoting the migration and proliferation of epidermal stem cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. n. p. Jan 31, 2015.
- HANDLEY, A.; MEDCALF, P.; HELLIER, K.DUTTA, D. Movement disorders after stroke. **Ageing**, v. 38, n. 3, p. 260-266, May, 2009.
- HATZISTERGOS, K. E.; BLUM, A.; INCE, T.; GRICHNIK, J. M.HARE, J. M. What is the oncologic risk of stem cell treatment for heart disease? **Circ Res**, v. 108, n. 11, p. 1300-1303, May 27, 2011.
- HENRIKSEN, P. A. The potential of neutrophil elastase inhibitors as anti-inflammatory therapies. **Curr Opin Hematol**, v. 21, n. 1, p. 23-28, Jan, 2014.
- HERBERTS, C. A.; KWA, M. S.HERMSEN, H. P. Risk factors in the development of stem cell therapy. **J Transl Med**, v. 9, n. p. 29, 2011.
- HERRMANN, J. L.; WANG, Y.; ABARBANELL, A. M.; WEIL, B. R.; TAN, J.MELDRUM, D. R. Preconditioning mesenchymal stem cells with transforming growth factor-alpha improves mesenchymal stem cell-mediated cardioprotection. **Shock**, v. 33, n. 1, p. 24-30, Jan, 2010.
- HESS, D. C.BORLONGAN, C. V. Cell-based therapy in ischemic stroke. **Expert Rev Neurother**, v. 8, n. 8, p. 1193-1201, Aug, 2008.
- HEUSCHLING, A.; GAZAGNES, M. D.HATEM, S. M. [Stroke: from primary care to rehabilitation]. **Rev Med Brux**, v. 34, n. 4, p. 205-210, Sep, 2013.
- HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A. T.DE BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 4, p. 549-580, Dec, 2004.
- IRONS, H.; LIND, J. G.; WAKADE, C. G.; YU, G.; HADMAN, M.; CARROLL, J.; HESS, D. C.BORLONGAN, C. V. Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. **Cell Transplant**, v. 13, n. 3, p. 283-294, 2004.
- JAKALA, P.JOLKKONEN, J. Time for a neurorestorative therapy in stroke. **Expert Opin Biol Ther**, v. 12, n. 3, p. 267-270, Mar, 2012.
- JENSEN, M. B.; YAN, H.; KRISHNANEY-DAVISON, R.; AL SAWAF, A.ZHANG, S. C. Survival and differentiation of transplanted neural stem cells derived from human induced pluripotent stem cells in a rat stroke model. **J Stroke Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 4, p. 304-308, May, 2013.
- JIN, R.; LIU, L.; ZHANG, S.; NANDA, A.LI, G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. **J Cardiovasc Transl Res**, v. 6, n. 5, p. 834-851, Oct, 2013.

JIN, R.; YANG, G.LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J Leukoc Biol**, v. 87, n. 5, p. 779-789, May, 2010.

JUNG, S.; GILGEN, M.; SLOTBOOM, J.; EL-KOUSSY, M.; ZUBLER, C.; KIEFER, C.; LUEDI, R.; MONO, M. L.; HELDNER, M. R.; WECK, A.; MORDASINI, P.; SCHROTH, G.; MATTLE, H. P.; ARNOLD, M.; GRALLA, J.FISCHER, U. Factors that determine penumbral tissue loss in acute ischaemic stroke. **Brain**, v. 136, n. Pt 12, p. 3554-3560, Dec, 2013.

KALLADKA, D.MUIR, K. W. Brain repair: cell therapy in stroke. **Stem Cells Cloning**, v. 7, n. p. 31-44, 2014.

KALLADKA, D.MUIR, K. W. Stem cell therapy in stroke: designing clinical trials. **Neurochem Int**, v. 59, n. 3, p. 367-370, Sep, 2011.

KALOGERIS, T.; BAINES, C. P.; KRENZ, M.KORTHUIS, R. J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 298, n. p. 229-317, 2012.

KASAHARA, Y.; IHARA, M.TAGUCHI, A. Experimental evidence and early translational steps using bone marrow derived stem cells after human stroke. **Front Neurol Neurosci**, v. 32, n. p. 69-75, 2013.

KAUFMANN, A. M.; FIRLIK, A. D.; FUKUI, M. B.; WECHSLER, L. R.; JUNGRIES, C. A.YONAS, H. Ischemic core and penumbra in human stroke. **Stroke**, v. 30, n. 1, p. 93-99, Jan, 1999.

KAWABORI, M.YENARI, M. A. Inflammatory responses in Brain Ischemia. **Curr Med Chem**, v. n. p. Feb 9, 2015.

KAWAI, H.; YAMASHITA, T.; OHTA, Y.; DEGUCHI, K.; NAGOTANI, S.; ZHANG, X.; IKEDA, Y.; MATSUURA, T.ABE, K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 30, n. 8, p. 1487-1493, Aug, 2010.

KELLY, P. A.; GRAHAM, D. I.MCCULLOCH, J. Specific alterations in local cerebral glucose utilization following striatal lesions. **Brain Res**, v. 233, n. 1, p. 157-172, Feb 4, 1982.

KILLER, M.; LADURNER, G.; KUNZ, A. B.KRAUS, J. Current endovascular treatment of acute stroke and future aspects. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 15-16, p. 640-647, Aug, 2010.

KIM, S. U.DE VELLIS, J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 10, p. 2183-2200, Aug 1, 2009.

KJAER, T. W.SORENSEN, H. B. A brain-computer interface to support functional recovery. **Front Neurol Neurosci**, v. 32, n. p. 95-100, 2013.

KLEIKERS, P. W.; WINGLER, K.; HERMANS, J. J.; DIEBOLD, I.; ALTENHOFER, S.; RADERMACHER, K. A.; JANSSEN, B.; GORLACH, A.SCHMIDT, H. H. NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. **J Mol Med (Berl)**, v. 90, n. 12, p. 1391-1406, Dec, 2012.

KNEIPP, M.; TURNER, J.; HAMBAUER, S.; KRIEG, S. M.; LEHMBERG, J.; LINDAUER, U.RAZANSKY, D. Functional real-time optoacoustic imaging of middle cerebral artery occlusion in mice. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e96118, 2014.

KOSTANDY, B. B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurol Sci**, v. 33, n. 2, p. 223-237, Apr, 2012.

- KUNST, M. M.SCHAEFER, P. W. Ischemic stroke. **Radiol Clin North Am**, v. 49, n. 1, p. 1-26, Jan, 2011.
- LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A.; TEPPER, D.LEONARD, A. Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. **Front Neurol**, v. 4, n. p. 32, 2013.
- LAUPHEIMER, M.; SKORSKA, A.; GROSSE, J.; TIEDEMANN, G.; STEINHOFF, G.; DAVID, R.LUX, C. A. Selective Migration of Subpopulations of Bone Marrow Cells along an SDF-1alpha and ATP Gradient. **Bone Marrow Res**, v. 2014, n. p. 182645, 2014.
- LEHNARDT, S.; SCHOTT, E.; TRIMBUCH, T.; LAUBISCH, D.; KRUEGER, C.; WULCZYN, G.; NITSCH, R.WEBER, J. R. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. **J Neurosci**, v. 28, n. 10, p. 2320-2331, Mar 5, 2008.
- LEVEQUE, X.; MATHIEUX, E.; NERRIERE-DAGUIN, V.; THINARD, R.; KERMARREC, L.; DURAND, T.; HAUDEBOURG, T.; VANHOVE, B.; LESCAUDRON, L.; NEVEU, I.NAVEILHAN, P. Local control of the host immune response performed with mesenchymal stem cells: perspectives for functional intracerebral xenotransplantation. **J Cell Mol Med**, v. 19, n. 1, p. 124-134, Jan, 2015.
- LEWANDOWSKI, C.BARSAN, W. Treatment of acute ischemic stroke. **Ann Emerg Med**, v. 37, n. 2, p. 202-216, Feb, 2001.
- LI, S. C.; TACHIKI, L. M.; LUO, J.; DETHLEFS, B. A.; CHEN, Z.LOUDON, W. G. A biological global positioning system: considerations for tracking stem cell behaviors in the whole body. **Stem Cell Rev**, v. 6, n. 2, p. 317-333, Jun, 2010.
- LIU, S. P.; FU, R. H.; WU, D. C.; HSU, C. Y.; CHANG, C. H.; LEE, W.; LEE, Y. D.; LIU, C. H.; CHIEN, Y. J.; LIN, S. Z.SHYU, W. C. Mouse-induced pluripotent stem cells generated under hypoxic conditions in the absence of viral infection and oncogenic factors and used for ischemic stroke therapy. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 4, p. 421-433, Feb 15, 2014.
- LIVINGSTON-THOMAS, J. M.; HUME, A. W.; DOUCETTE, T. A.TASKER, R. A. A novel approach to induction and rehabilitation of deficits in forelimb function in a rat model of ischemic stroke. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34, n. 1, p. 104-112, Jan, 2013.
- LLORENS-MARTIN, M.; TORRES-ALEMAN, I.TREJO, J. L. Mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. **Neuroscientist**, v. 15, n. 2, p. 134-148, Apr, 2009.
- LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p. 3-4, Jan 2, 2005.
- LOTUFO, P. A.BENSENOR, I. M. Stroke mortality in Brazil: one example of delayed epidemiological cardiovascular transition. **Int J Stroke**, v. 4, n. 1, p. 40-41, Feb, 2009.
- LUO, Y.; WANG, Y.; POYNTER, J. A.; MANUKYAN, M. C.; HERRMANN, J. L.; ABARBANELL, A. M.; WEIL, B. R.MELDRUM, D. R. Pretreating mesenchymal stem cells with interleukin-1beta and transforming growth factor-beta synergistically increases vascular endothelial growth factor production and improves mesenchymal stem cell-mediated myocardial protection after acute ischemia. **Surgery**, v. 151, n. 3, p. 353-363, Mar, 2012.
- MA, L.; ZHOU, Z.; ZHANG, D.; YANG, S.; WANG, J.; XUE, F.; YANG, Y.YANG, R. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients. **Thromb Haemost**, v. 107, n. 5, p. 937-950, May, 2012.

- MACKINTOSH, J. E.; MURTAGH, M. J.; RODGERS, H.; THOMSON, R. G.; FORD, G. A. WHITE, M. Why people do, or do not, immediately contact emergency medical services following the onset of acute stroke: qualitative interview study. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46124, 2012.
- MALOUIN, F. RICHARDS, C. L. Mental practice for relearning locomotor skills. **Phys Ther**, v. 90, n. 2, p. 240-251, Feb, 2010.
- MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. SHARMA, P. L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, Jan 5, 2013.
- MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U. MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, Dec, 2004.
- MERGENTHALER, P. MEISEL, A. Do stroke models model stroke? **Dis Model Mech**, v. 5, n. 6, p. 718-725, Nov, 2012.
- MIAS, C.; TROUCHE, E.; SEGUELAS, M. H.; CALCAGNO, F.; DIGNAT-GEORGE, F.; SABATIER, F.; PIERCECCHI-MARTI, M. D.; DANIEL, L.; BIANCHI, P.; CALISE, D.; BOURIN, P.; PARINI, A. CUSSAC, D. Ex vivo pretreatment with melatonin improves survival, proangiogenic/mitogenic activity, and efficiency of mesenchymal stem cells injected into ischemic kidney. **Stem Cells**, v. 26, n. 7, p. 1749-1757, Jul, 2008.
- MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit Rev Immunol**, v. 32, n. 6, p. 463-488, 2012.
- MISRA, V.; RITCHIE, M. M.; STONE, L. L.; LOW, W. C. JANARDHAN, V. Stem cell therapy in ischemic stroke: role of IV and intra-arterial therapy. **Neurology**, v. 79, n. 13 Suppl 1, p. S207-212, Sep 25, 2012.
- MOLCANYI, M.; RIESS, P.; BENTZ, K.; MAEGELE, M.; HESCHELER, J.; SCHAFKE, B.; TRAPP, T.; NEUGEBAUER, E.; KLUG, N. SCHAFFER, U. Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain. **J Neurotrauma**, v. 24, n. 4, p. 625-637, Apr, 2007.
- MOMSEN, A. M.; RASMUSSEN, J. O.; NIELSEN, C. V.; IVERSEN, M. D. LUND, H. Multidisciplinary team care in rehabilitation: an overview of reviews. **J Rehabil Med**, v. 44, n. 11, p. 901-912, Nov 5, 2012.
- NAPOLI, I. NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1030-1038, Feb 6, 2009.
- NGUEMENI, C.; GOMEZ-SMITH, M.; JEFFERS, M. S.; SCHUCH, C. P. CORBETT, D. Time course of neuronal death following endothelin-1 induced focal ischemia in rats. **J Neurosci Methods**, v. 242C, n. p. 72-76, Jan 10, 2015.
- NICO, B. RIBATTI, D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. **Curr Drug Metab**, v. 13, n. 1, p. 50-60, Jan, 2012.
- NORRVING, B. Lacunar infarcts: no black holes in the brain are benign. **Pract Neurol**, v. 8, n. 4, p. 222-228, Aug, 2008.
- OCZKOWSKI, W. Pharmacological therapies to enhance motor recovery and walking after stroke: emerging strategies. **Expert Rev Neurother**, v. 13, n. 8, p. 903-909, Aug, 2013.

OKANO, H.; NAKAMURA, M.; YOSHIDA, K.; OKADA, Y.; TSUJI, O.; NORI, S.; IKEDA, E.; YAMANAKA, S. MIURA, K. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. **Circ Res**, v. 112, n. 3, p. 523-533, Feb 1, 2013.

OKI, K.; TATARISHVILI, J.; WOOD, J.; KOCH, P.; WATTANANIT, S.; MINE, Y.; MONNI, E.; TORNERO, D.; AHLENIUS, H.; LADEWIG, J.; BRUSTLE, O.; LINDVALL, O. KOKAIA, Z. Human-induced pluripotent stem cells form functional neurons and improve recovery after grafting in stroke-damaged brain. **Stem Cells**, v. 30, n. 6, p. 1120-1133, Jun, 2012.

PHILIPPE, B.; LUC, S.; VALERIE, P. B.; JEROME, R.; ALESSANDRA, B. R. LOUIS, C. Culture and Use of Mesenchymal Stromal Cells in Phase I and II Clinical Trials. **Stem Cells Int**, v. 2010, n. p. 503593, 2010.

PINTER, M. M. BRAININ, M. Role of repetitive transcranial magnetic stimulation in stroke rehabilitation. **Front Neurol Neurosci**, v. 32, n. p. 112-121, 2013.

POLENTES, J.; JENDELOVA, P.; CAILLERET, M.; BRAUN, H.; ROMANYUK, N.; TROPEL, P.; BRENOT, M.; ITIER, V.; SEMINATORE, C.; BALDAUF, K.; TURNOVCOVA, K.; JIRAK, D.; TELETIN, M.; COME, J.; TOURNOIS, J.; REYMANN, K.; SYKOVA, E.; VIVILLE, S. ONTENIENTE, B. Human induced pluripotent stem cells improve stroke outcome and reduce secondary degeneration in the recipient brain. **Cell Transplant**, v. 21, n. 12, p. 2587-2602, 2012.

POLLOCK, A.; FARMER, S. E.; BRADY, M. C.; LANGHORNE, P.; MEAD, G. E.; MEHRHOLZ, J. VAN WIJCK, F. Interventions for improving upper limb function after stroke. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, n. p. CD010820, 2014.

PRAET, J.; REEKMANS, K.; LIN, D.; DE VOCHT, N.; BERGWERF, I.; TAMBUIZER, B.; DAANS, J.; HENS, N.; GOOSSENS, H.; PAUWELS, P.; BERNEMAN, Z.; VAN DER LINDEN, A. PONSARTS, P. Cell type-associated differences in migration, survival, and immunogenicity following grafting in CNS tissue. **Cell Transplant**, v. 21, n. 9, p. 1867-1881, 2012.

QIN, J.; GONG, G.; SUN, S.; QI, J.; ZHANG, H.; WANG, Y.; WANG, N.; WANG, Q. M.; JI, Y.; GAO, Y.; SHI, C.; YANG, B.; ZHANG, Y.; SONG, B. XU, Y. Functional recovery after transplantation of induced pluripotent stem cells in a rat hemorrhagic stroke model. **Neurosci Lett**, v. 554, n. p. 70-75, Oct 25, 2013.

RENEHAN, A. G.; ZWAHLEN, M.; MINDER, C.; O'DWYER, S. T.; SHALET, S. M. EGGER, M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. **Lancet**, v. 363, n. 9418, p. 1346-1353, Apr 24, 2004.

RIBEIRO-RESENDE, V. T.; CARRIER-RUIZ, A.; LEMES, R. M.; REIS, R. A. MENDEZ-OTERO, R. Bone marrow-derived fibroblast growth factor-2 induces glial cell proliferation in the regenerating peripheral nervous system. **Mol Neurodegener**, v. 7, n. p. 34, 2012.

RODGERS, H. Stroke. **Handb Clin Neurol**, v. 110, n. p. 427-433, 2013.

ROOME, R. B.; BARTLETT, R. F.; JEFFERS, M.; XIONG, J.; CORBETT, D. VANDERLUIT, J. L. A reproducible Endothelin-1 model of forelimb motor cortex stroke in the mouse. **J Neurosci Methods**, v. 233, n. p. 34-44, Aug 15, 2014.

ROSADO-DE-CASTRO, P. H.; SCHMIDT FDA, R.; BATTISTELLA, V.; LOPES DE SOUZA, S. A.; GUTFILEN, B.; GOLDENBERG, R. C.; KASAI-BRUNSWICK, T. H.; VAIRO, L.; SILVA, R. M.; WAJNBERG, E.; ALVARENGA AMERICANO DO BRASIL, P. E.; GASPARETTO, E. L.; MAIOLINO, A.; ALVES-LEON, S. V.; ANDRE, C.; MENDEZ-OTERO, R.; RODRIGUEZ DE

- FREITAS, G.BARBOSA DA FONSECA, L. M. Biodistribution of bone marrow mononuclear cells after intra-arterial or intravenous transplantation in subacute stroke patients. **Regen Med**, v. 8, n. 2, p. 145-155, Mar, 2013.
- ROSSI, B.; ANGIARI, S.; ZENARO, E.; BUDUI, S. L.CONSTANTIN, G. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 4, p. 539-556, Apr, 2011.
- SALE, P.FRANCESCHINI, M. Action observation and mirror neuron network: a tool for motor stroke rehabilitation. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 48, n. 2, p. 313-318, Jun, 2012.
- SANBERG, P. R.; EVE, D. J.; METCALF, C.BORLONGAN, C. V. Advantages and challenges of alternative sources of adult-derived stem cells for brain repair in stroke. **Prog Brain Res**, v. 201, n. p. 99-117, 2012.
- SAVITZ, S. I. Cell therapy: exploring new approaches to identify potential stroke treatments. **Transl Stroke Res**, v. 2, n. 3, p. 239-240, Sep, 2011.
- SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.BLAND, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777-787, Mar 3, 2000.
- SCHWARTING, S.; LITWAK, S.; HAO, W.; BAHR, M.; WEISE, J.NEUMANN, H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. **Stroke**, v. 39, n. 10, p. 2867-2875, Oct, 2008.
- SENE DIOUF, F.NDIAYE, M. M. [The management of cerebrovascular events]. **Dakar Med**, v. 53, n. 1, p. 7-19, 2008.
- SEO, J. H.; GUO, S.; LOK, J.; NAVARATNA, D.; WHALEN, M. J.; KIM, K. W.LO, E. H. Neurovascular matrix metalloproteinases and the blood-brain barrier. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 25, p. 3645-3648, 2012.
- SHAMLOO, A.; HEIBATOLLAHI, M.MOFRAD, M. R. Directional migration and differentiation of neural stem cells within three-dimensional microenvironments. **Integr Biol (Camb)**, v. n. p. Jan 30, 2015.
- SHECHTER, R.SCHWARTZ, M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. **J Pathol**, v. 229, n. 2, p. 332-346, Jan, 2013.
- SIKET, M. S.EDLOW, J. A. Transient ischemic attack: reviewing the evolution of the definition, diagnosis, risk stratification, and management for the emergency physician. **Emerg Med Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 745-770, Aug, 2012.
- SILVER, B. Advances in Stroke Over the Past Decade. **R I Med J (2013)**, v. 96, n. 3, p. 27-30, 2014.
- SINGHAL, B. S.KHADILKAR, S. V. Neurology in the developing world. **Handb Clin Neurol**, v. 121, n. p. 1773-1782, 2014.
- SINISCALCHI, A.; GALLELLI, L.; LABATE, A.; Malferrari, G.; PALLERIA, C.SARRO, G. D. Post-stroke Movement Disorders: Clinical Manifestations and Pharmacological Management. **Curr Neuropharmacol**, v. 10, n. 3, p. 254-262, Sep, 2012.

SMADJA, D. Pharmacological revascularization of acute ischaemic stroke: focus on challenges and novel strategies. **CNS Drugs**, v. 26, n. 4, p. 309-318, Apr 1, 2012.

SMALL, S. L.; BUCCINO, G. SOLODKIN, A. The mirror neuron system and treatment of stroke. **Dev Psychobiol**, v. 54, n. 3, p. 293-310, Apr, 2012.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L. MOBLEY, W. C. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, n. p. 1217-1281, 2001.

SOLEYMANINEJADIAN, E.; PRAMANIK, K. SAMADIAN, E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. **Am J Reprod Immunol**, v. 67, n. 1, p. 1-8, Jan, 2012.

STROKEASSOCIATION. Stroke statistics. **Stroke statistics**, v. n. 13, p. 2013.

STURGE, J.; TODD, S. K.; KOGIANNI, G.; MCCARTHY, A. ISACKE, C. M. Mannose receptor regulation of macrophage cell migration. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 3, p. 585-593, Sep, 2007.

SUGHRUE, M. E.; MOCCO, J.; KOMOTAR, R. J.; MEHRA, A.; D'AMBROSIO, A. L.; GROBELNY, B. T.; PENN, D. L. CONNOLLY, E. S., JR. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. **J Neurosci Methods**, v. 151, n. 2, p. 83-89, Mar 15, 2006.

SULIMAN, S.; HEMMING, S. M. SEEDAT, S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. **Front Integr Neurosci**, v. 7, n. p. 55, 2013.

TATARISHVILI, J.; OKI, K.; MONNI, E.; KOCH, P.; MEMANISHVILI, T.; BUGA, A. M.; VERMA, V.; POPA-WAGNER, A.; BRUSTLE, O.; LINDVALL, O. KOKAIA, Z. Human induced pluripotent stem cells improve recovery in stroke-injured aged rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 32, n. 4, p. 547-558, Jan 1, 2014.

THWAITES, J. W.; REEBYE, V.; MINTZ, P.; LEVICAR, N. HABIB, N. Cellular replacement and regenerative medicine therapies in ischemic stroke. **Regen Med**, v. 7, n. 3, p. 387-395, May, 2012.

TOTH, M.; LITTLE, P.; ARNBERG, F.; HAGGKVIST, J.; MULDER, J.; HALLDIN, C.; GULYAS, B. HOLMIN, S. Acute neuroinflammation in a clinically relevant focal cortical ischemic stroke model in rat: longitudinal positron emission tomography and immunofluorescent tracking. **Brain Struct Funct**, v. n. p. Jan 20, 2015.

UCHIYAMA, S. The concept of acute cerebrovascular syndrome. **Front Neurol Neurosci**, v. 33, n. p. 11-18, 2014.

VANDEPUTTE, C.; REUMERS, V.; AELVOET, S. A.; THIRY, I.; DE SWAEF, S.; VAN DEN HAUTE, C.; PASCUAL-BRAZO, J.; FARR, T. D.; VANDE VELDE, G.; HOEHN, M.; HIMMELREICH, U.; VAN LAERE, K.; DEBYSER, Z.; GIJSBERS, R. BAEKELANDT, V. Bioluminescence imaging of stroke-induced endogenous neural stem cell response. **Neurobiol Dis**, v. 69, n. p. 144-155, Sep, 2014.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A.; ROSADO-DE-CASTRO, P. H.; LOPES DE SOUZA, S. A.; DA COSTA SILVA, J.; RAMOS, A. B.; RODRIGUEZ DE FREITAS, G.; BARBOSA DA FONSECA, L. M.; GUTFILEN, B. MENDEZ-OTERO, R. Intravenous and intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells after focal cerebral ischemia: Is there a difference in biodistribution and efficacy? **Stem Cell Res**, v. 9, n. 1, p. 1-8, Jul, 2012.

- VELDMAN, M. P.; MAFFIULETTI, N. A.; HALLETT, M.; ZIJDEWIND, I.HORTOBAGYI, T. Direct and crossed effects of somatosensory stimulation on neuronal excitability and motor performance in humans. **Neurosci Biobehav Rev**, v. n. p. Jul 23, 2014.
- VOGELGESANG, A.; BECKER, K. J.DRESSEL, A. Immunological consequences of ischemic stroke. **Acta Neurol Scand**, v. 129, n. 1, p. 1-12, Jan, 2014.
- WAHL, A. S.SCHWAB, M. E. Finding an optimal rehabilitation paradigm after stroke: enhancing fiber growth and training of the brain at the right moment. **Front Hum Neurosci**, v. 8, n. p. 381, 2014.
- WANG, Z.; CUI, C.; LI, Q.; ZHOU, S.; FU, J.; WANG, X.ZHUGE, Q. Intracerebral transplantation of foetal neural stem cells improves brain dysfunction induced by intracerebral haemorrhage stroke in mice. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 12, p. 2624-2633, Dec, 2011.
- WEI, J. J.; ZENG, L. F.; FAN, X. T.; WANG, Y.; MA, W. B.; LI, G. L.; DOU, W. C.; ZHANG, Z. X.; LI, S. F.; FENG, M.; HAN, Q.; LI, Z. J.; ZHANG, Z. H.; KANG, J.; KONG, Y. G.; WANG, R. Z.ZHAO, C. H. [Treatment of stroke in rats with bone marrow mesenchymal stem cells]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 87, n. 3, p. 184-189, Jan 16, 2007.
- WELTNER, J.; TROKOVIC, R.OTONKOSKI, T. [Induced pluripotent stem cells (iPS) in medical research]. **Duodecim**, v. 130, n. 8, p. 785-792, 2014.
- WEN, X.; WANG, Y.; ZHANG, F.; ZHANG, X.; LU, L.; SHUAI, X.SHEN, J. In vivo monitoring of neural stem cells after transplantation in acute cerebral infarction with dual-modal MR imaging and optical imaging. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4627-4635, May, 2014.
- WOLFE, C. D. The impact of stroke. **Br Med Bull**, v. 56, n. 2, p. 275-286, 2000.
- XU, X.; LI, M.JIANG, Y. The paradox role of regulatory T cells in ischemic stroke. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, n. p. 174373, 2013.
- YANG, B.; MIGLIATI, E.; PARSHA, K.; SCHAAR, K.; XI, X.; ARONOWSKI, J.SAVITZ, S. I. Intra-arterial delivery is not superior to intravenous delivery of autologous bone marrow mononuclear cells in acute ischemic stroke. **Stroke**, v. 44, n. 12, p. 3463-3472, Dec, 2013.
- YANG, B.; STRONG, R.; SHARMA, S.; BRENNEMAN, M.; MALLIKARJUNARAO, K.; XI, X.; GROTTA, J. C.; ARONOWSKI, J.SAVITZ, S. I. Therapeutic time window and dose response of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 6, p. 833-839, Jun, 2011.
- YASUHARA, T.DATE, I. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. **Cell Transplant**, v. 16, n. 2, p. 125-132, 2007.
- YOO, J.; KIM, H. S.HWANG, D. Y. Stem cells as promising therapeutic options for neurological disorders. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 4, p. 743-753, Apr, 2013.
- YU, F.; LI, Y.MORSHEAD, C. M. Induced pluripotent stem cells for the treatment of stroke: the potential and the pitfalls. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 8, n. 5, p. 407-414, Sep, 2013.
- YU, Q.; LIU, L.; LIN, J.; WANG, Y.; XUAN, X.; GUO, Y.HU, S. SDF-1alpha/CXCR4 Axis Mediates The Migration of Mesenchymal Stem Cells to The Hypoxic-Ischemic Brain Lesion in A Rat Model. **Cell J**, v. 16, n. 4, p. 440-447, Winter, 2015.
- ZHANG, J.CHOPP, M. Cell-based therapy for ischemic stroke. **Expert Opin Biol Ther**, v. 13, n. 9, p. 1229-1240, Sep, 2013.

ZHAO, J.; JIANG, W. J.; SUN, C.; HOU, C. Z.; YANG, X. M.GAO, J. G. Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 14, n. 12, p. 1059-1069, Dec, 2013.

ZHENG, F.; ZHOU, X.; MOON, C.WANG, H. Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 188-200, 2012.

ZOROWITZ, R. D.; GILLARD, P. J.BRAININ, M. Poststroke spasticity: sequelae and burden on stroke survivors and caregivers. **Neurology**, v. 80, n. 3 Suppl 2, p. S45-52, Jan 15, 2013.