



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

Adriano Guimarães Santos

Investigação de tipos e origem celular neurogênicos em áreas
diversas do Sistema Nervoso Central da espécie *Cebus apella*

BELÉM
2015

Adriano Guimarães Santos

Investigação de tipo e origem celular neurogênicos em áreas
diversas do Sistema Nervoso Central da espécie *Cebus apella*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará
como requisito para obtenção do grau de Doutor.
Área de concentração: Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.
Coorientador: Prof. Moyses Hamoy

BELÉM
2015

Guimarães Santos, Adriano

Investigação de tipo e origem celular neurogênicos em áreas diversas do Sistema Nervoso Central da espécie *Cebus apella*. / Adriano Guimarães Santos; Orientação de Wallace Gomes Leal – Belém, 2015.

50 f.: il.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

1. Neurociências. 2. Biologia da Neurogênese. 3. Primatas. 4. *Cebus apella*. I. Leal, Wallace Gomes, Orient. II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD 616.856

Adriano Guimarães Santos

Investigação de tipo e origem celular neurogênicos em áreas
diversas do Sistema Nervoso Central da espécie *Cebus apella*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará
como requisito para obtenção do grau de Doutor.
Área de concentração: Neurociências
Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.
Coorientador: Prof. Moyses Hamoy

Data de aprovação:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Orientador

Prof. Dr. Moysés Hamoy

Coorientador

Prof. Dr. Ênio Mauricio Nery Dos Santos

Prof. Dr. Ademir Ferreira da Silva Jr

Profa. Dra. Vânia Castro Correa

BELÉM
2015

RESUMO

A identificação de populações de precursores neuronais, e células-tronco geradas pelo próprio Sistema Nervoso Central tem sustentado debates sobre seu possível uso na reparação de danos causados por desordens agudas do Sistema Nervoso Central. Contudo, no caso do cérebro mamífero adulto, tal geração é considerada evolutivamente restrita a duas áreas: a zona subgranular do giro denteado do hipocampo, e as paredes dos ventrículos laterais onde novos neurônios são continuamente gerados. Utilizamos 6 primatas não-humanos, adultos, machos, da espécie *Cebus apella* (Macaco-prego, 10 anos de idade), com pesos entre 2,1 e 2,8 Kg (média 2,5 Kg) pré-tratados com BrdU que após sacrifício e devido processamento histológico, tiveram seus tecidos analisados em imunohistoquímica para análises por meio de anti-BrdU, Anti-Nestina, anti-sox2 e DCX em diversas áreas do Sistema Nervoso Central. As paredes ventriculares apresentaram presença de neuroblastos similar àquela já observada em trabalhos anteriores, porém resultados inesperados também foram observadas em áreas como o córtex frontal.

Palavras Chave: Neurogênese, *Cebus apella*, primata, neuroblasto, Zona subventricular.

ABSTRACT

Identifying populations of neuronal precursors and stem cells generated by own central nervous system has held discussions on its possible use in the repair of damage caused by acute disorders of the central nervous system. However, in the case of adult mammalian brain, such generation is considered evolutionarily restricted to two areas: subgranular zone of the dentate gyrus of the hippocampus, and the walls of the lateral ventricles where new neurons are continuously generated. We used 6 non-human primates, adults, males of the species *Cebus* (capuchin monkey, 10 years old), weighing between 2.1 and 2.8 kg (mean 2.5 kg) pretreated with BrdU that after sacrifice and because histological processing, their tissues were analyzed for immunohistochemical analysis using anti-BrdU anti-Nestin, and Sox2 anti-DCX in diverse areas of the Central Nervous System. The ventricular walls showed the presence of neuroblasts similar to that observed in previous studies, but unexpected results were also observed in areas such as the frontal cortex.

Keywords: Neurogenesis, *Cebus*, primate, neuroblast, subventricular zone.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
LISTA DE SÍMBOLOS	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 ÁREAS NEUROGÊNICAS	12
1.2 NOVOS NEURÔNIOS DE REGIÕES NÃO NEUROGÊNICAS.....	16
1.3 A BIOLOGIA DA NEUROGÊNESE	19
1.3.1 O Ciclo Celular na Neurogênese.....	20
1.4 NEUROGÊNESE NO CÉREBRO DE PRIMATAS ADULTOS	22
1.5 HIPÓTESE E PARADIGMA EXPERIMENTAL	23
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS:.....	25
3.1 GERAL.....	25
3.2 ESPECÍFICOS	25
4 MÉTODOS EXPERIMENTAIS	26
4.1 ANIMAIS	26
4.2 TRATAMENTO COM 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA (BrdU).....	26
4.3 PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA	27
4.4 ESTUDOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	28
4.5.1 BrdU	28
4.5.2 Neuroblastos	28
4.5.3 Precursores neurais.....	28
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA.....	29
5 Resultados.....	30
5.1 Violeta de cresila	30
5.2 DCX.....	32
5.3 BrdU.....	33
5.4 SOX2.....	34
5.5 Nestina	35
6 Discussão	37
6.1 DCX.....	37
6.2 BrDU	38
6.3 Sox2	38

6.4 Nestina	40
7 Conclusão.....	41
REFERÊNCIA.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrdU	Bromo-deoxi-Uridina
Dil	Perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3'-tetrametil-indocarbocianina
MCAo	Oclusão da Artéria Cerebral Média
EGFP	Amplificador de Proteína Fluorescente Verde
AVEnc	Acidente Vascular Encefálico
CEPAE-UFPA	Comitê de Ética para Pesquisas com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
M	Motor
PSA-NCAM	PolySialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule
SOX	Sex determining region Y-box
DCX	Doublecortin-X
INM	Interkinect Nuclear Migration

LISTA DE SÍMBOLOS

μ Mícron

1 INTRODUÇÃO

A identificação de populações de precursores neuronais, e células-tronco geradas pelo próprio Sistema Nervoso Central tem sustentado debates sobre seu possível uso na reparação de danos causados por desordens agudas do Sistema Nervoso Central. Contudo, no caso do cérebro mamífero adulto, tal geração é considerada evolutivamente restrita a duas áreas: a zona subgranular do giro denteado do hipocampo, e as paredes dos ventrículos laterais onde novos neurônios são continuamente gerados (DOETSCH et al., 1999, GAGE, 2000). Essa produção, chamada Neurogênese, pode aumentar em conformidade com um amplo espectro de fatores, como enriquecimento ambiental, exercícios físicos, gravidez e, até mesmo, episódios isquêmicos intensos (KEMPERMANN et al., 1997, PARENT; LOWENSTEIN, 2002, PARENT et al., 1997, SHINGO et al., 2003, VAN PRAAG, 2008), enquanto que depressão e envelhecimento podem causar sua redução (KEMPERMANN; KRONENBERG, 2003, KUHN et al., 1996).

O estímulo promovido pela isquemia cerebral à proliferação de novas células nas paredes dos ventrículos laterais já foi bastante demonstrado, incluindo o tropismo migratório de neuroblastos para a área lesada (ARVIDSSON et al., 2002), porém o que é ainda bastante discutido é se um precursor neural é capaz de funcionalmente substituir um neurônio perdido durante a isquemia.

Magavi et al. (2000) demonstrou não só a capacidade de diferenciação de uma célula recém-formada como também sua integração funcional quando células BrdU positivas presentes na área VI do córtex anterior mostraram marcação por um neurotraçador retrógrado aplicado após a lesão. Contudo, a origem celular desse neurônio recém-formado não pôde ser rastreada, o modelo patológico é pouco verossímil, considerando que lesa células selecionadas por sua projeção em correspondência com e não um tecido de modo geral, nem características imunohistoquímicas do maquinário proteico responsável pelas sinapses químicas foram avaliadas (MAGAVI et al., 2000).

1.1 ÁREAS NEUROGÊNICAS

Muita atenção tem sido dedicada às paredes dos ventrículos laterais em busca de uma definição sobre onde dali se localizariam as células germinativas capazes de se reproduzir continuamente mesmo na fase adulta, essas pesquisas se estenderam às mais diversas espécies como camundongos, ratos, canárias, coelhos, macacos e até humanos (DANILOV et al., 2009, DOETSCH et al., 1997, GIL-PEROTIN et al., 2009, QUIÑONES-HINOJOSA et al., 2006).

No início, houve certa firmeza nas opiniões quanto atribuir esse papel à Zona Subventricular (DOETSCH et al., 1999, DOETSCH et al., 1997), contudo posteriormente surgiram evidências sugerindo que essa função seria realizada pelo epêndima (JOHANSSON et al., 1999), e também propostas mais conciliativas para uma transição morfológica entre as duas faixas candidatas a tecido germinativo do SNC, uma delas reforçando a habilidade da SVZ para gerar novas células, e sugerindo deslocamentos celulares e/ou protoplasmáticos de lá para dentro do epêndima (DOETSCH, 2003); enquanto a outra ideia, bem mais recente, corrobora também a função germinativa da SVZ, contudo atribuindo uma função similar ao epêndima, porém apenas em condições específicas (CARLÉN et al., 2009). A maioria destes trabalhos utilizou *Mus musculus*.

Em *Rattus norvegicus*, observações iniciais como a migração estriatal de neuroblastos e da posição mais estratégica da SVZ para essa migração, assomando-se a ideias como a suposta senescência do epêndima maduro, sugeriram, ainda que de forma prematura, que somente a SVZ fosse o extrato proliferativo das paredes dos ventrículos laterais (ARVIDSSON et al., 2002) e com o aumento de estudos morfológicos e de antigenicidade surgiram evidências corroborativas quanto a posição da zona subventricular na neurogênese (DANILOV et al., 2009).

Alvarez-Buylla et al. (1997) mostrou diversas caracterizações de astrócitos diferenciados que apresentavam potencial proliferativo, assumindo assim o papel de células B, e constituindo, desta forma, um dos elementos da composição tridimensional da zona subventricular, sendo os outros as células C que possuem uma função contraditória em camundongos, e não foram encontradas, até hoje, nas outras espécies estudadas, porém que foram propostas como precursores diretos

dos neuroblastos que compõem as chamadas células A, curiosamente também se propôs naquele trabalho que as células C poderiam também acelerar diferenciação e produção de neuroblastos (DOETSCH et al., 1997). O mesmo grupo novaiorquino, nos meados de 1999, publicou outro artigo similar ao de 1997, porém com maior riqueza de dados e excluindo completamente qualquer possibilidade de participação ativa do epêndima na geração de novas células, utilizando injeções intraventriculares de Dil, microsferas de rodamina, e marcadores virais. Porém a quantidade de neuroesferas impregnadas pelo Dil foi considerada insuficiente, e causada possivelmente pela contaminação durante o processo de dissociação da parede ventricular; e tanto a marcação com microsferas quanto com o vírus apenas geraram neuroesferas em pequenas quantidades e no hemisfério ipsolateral, corroborando a suposição dos autores que supostas evidências de marcação de células endimárias, nada mais eram do que artefatos da contaminação acidental da zona subventricular, mas dessa vez pelo percurso da cânula usada para injeção dos marcadores (DOETSCH et al., 1999). Finalmente, em 2003, Fiona Doetsch (já trabalhando em Harvard, e assinando sozinha pela autoria do artigo) apresenta um dado impressionante que mudou vários aspectos do que parecia já bem estabelecido dentro dos estudos sobre neurogênese, que era uma similaridade das células B com as células endimárias devida a uma inesperada presença de cílios presentes em um amplo citoplasma localizado na linha do epêndima. Contudo, ainda reforçando que a antigenicidade das células B era mais similar à de células gliais e evidenciando também diferenças morfológicas daqueles cílios, como a unicidade, menor comprimento, e Imobilidade (DOETSCH, 2003).

Porém o grupo de Jonas Frisén do instituto Karolinska de Estocolmo no começo do ano de 1999, curiosamente menos de um semestre antes da publicação de Doetsch et al. (1999) que rejeitaria absolutamente a função germinativa do epêndima, propôs a identificação das células endimárias como as potenciais células tronco neurais. Entre os dados obtidos pelo grupo holmiense constou notavelmente a geração de neuroesferas de ratos a partir de células ciliadas impregnadas com Dil, morfológicamente similares às endimárias. Além deste resultado, também foi observada na camada endimária do canal central marcação de nestina em células aparentemente em divisão, e também a formação de fusos mitóticos quando foi provocada lesão mecânica do funículo dorsal na direção

transversal em T2. Excluindo assim a zona subventricular como o leito original das células-tronco neurais (JOHANSSON et al., 1999).

Contudo Alvarez-Buylla, em 2005, apresentou mais uma evidência considerada contundente contra a proposta de Johanson et al. (1999), onde além de mais uma vez rejeitar a fertilidade endimária por meio do BrdU, ainda reportava a incapacidade de sua equipe e de diversas outras em repetir os resultados dos suecos (SPASSKY et al., 2005). Mas apesar disso, o marco para o aparente extinção da ideia sobre o papel do epêndima na contínua reorganização do bulbo olfatório veio meia década depois, paradoxalmente, do próprio grupo holmiense que finalizou o debate abrindo mão da causa em favor da hipótese de Alvarez-Buylla e Doetsch, assumindo que seus dados de 1999, com ratos, podem ter se dado por algum erro na estratégia de aplicação do Dil, levando a uma marcação errônea da zona subventricular, ou então devido a alguma diferença na função das células endimárias de ratos em relação ao epêndima murino já que o novo teste com infecção viral nos ventrículos de camundongos não havia repetido o resultado de 1999 em animais também ilesos, contudo nesse mesmo trabalho também havia dados de marcação viral em camundongos que corroboravam os resultados com Dil (CARLÉN et al., 2009).

Estudos mais descritivos das paredes ventriculares de ratos mostram células gliais ciliadas presentes no epêndima, o que pode justificar a já mencionada presença de células Dil⁺ no bulbo olfatório de ratos) e também deslocadas para a zona subventricular, algumas posicionadas mais estriatalmente, outras para o sentido mais luminal (DANILOV et al., 2009), enquanto que a investigação em *Macaca fascicularis* mostra diferenças ainda mais drásticas, propondo uma faixa germinativa muito menos considerável do que aquela observada em roedores, e uma tendência ainda mais forte para considerar a senescência do epêndima (GIL-PEROTIN et al., 2009).

Logo, propor que o epêndima fosse o verdadeiro nicho neurogênico do SNC pareceu uma sugestão ousada demais para 1999, comprovado pelo certo abolicionamento da citada hipótese nos trabalhos que se seguiram (DOETSCH et al., 2002, LICHTENWALNER; PARENT, 2006, SANAI et al., 2004, YAMASHITA et al., 2006). Porém, o mesmo artigo que faz *mea culpa* pelo suposto lapso de Johanson et al. (1999), simultaneamente, refuta, outra vez, a senescência do epêndima e

propõe uma capacidade proliferativa que é dependente de estímulos específicos, como aqueles presentes na isquemia (CARLÉN et al., 2009).

Um dos primeiros indícios da sensibilidade das células endimárias ao estímulo derivado de lesões foi apresentado também por Johansson et al. (1999), quando demonstrou que o epêndima do canal central podia apresentar células em divisão em resposta à lesão mecânica do tecido nervoso adjacente. Porém, talvez esse resultado tenha sido ofuscado pela nebulosidade dos outros dados presentes na mesma publicação, pois somente em 2008 surgiu um estudo que considerava o possível condicionamento das células endimárias a estímulos causados por morbidades. No caso, 6-hidroxidopamina que simula os danos causados pela síndrome de Parkinson, resultando em divisão celular com capacidade de diferenciação para células de outros estratos do sistema nervoso (GLEASON et al., 2008). E no mesmo ano, outro pesquisador, utilizando o modelo da MCAo em ratos, obteve resultados que confirmavam a qualidade neurogênica da camada de células endimárias utilizando não apenas Dil, como também infecção por cepas virais amplificadoras da expressão de de GFP, ambos injetados intraventricularmente, obtendo como resultado a presença tanto de células Dil⁺, quanto EGFP⁺ assumindo a morfologia de terminais sinápticos no corpo estriado (HOU et al., 2008).

Assim o grupo de Frisén reapresentou, em 2009, investigações sobre as habilidades multiplicativas das células endimárias, contudo já considerando inexistente a capacidade germinativa do epêndima em situação normal. Desta forma, gerando um ambiente isquêmico, por meio do modelo da oclusão da artéria cerebral média, pôde observar que efetivamente as células endimárias podem comportar-se como células-tronco, contudo somente em resposta a determinados estímulos, e também de forma autolimitada devido à divisão aparentar ser estritamente assimétrica, isto é, células endimárias em divisão não geram novas células endimárias, impedindo a autorrenovação do tecido e levando à exaustão quase que completa das áreas vicinais às grandes lesões isquêmicas (CARLÉN et al., 2009).

O conjunto dos dados deve sugerir realmente um papel mais relevante da SVZ em relação ao epêndima, contudo ainda faltam estudos que demonstrem mais substancialmente a integração dessas novas células ao sistema nervoso. E caso, tal integração seja verificada, falta ainda a demonstração da origem dessas

células. Assim como de se realizar tais demonstrações em espécies superiores como primatas não-humanos e humanos.

1.2 NOVOS NEURÔNIOS DE REGIÕES NÃO NEUROGÊNICAS.

A geração de novos neurônios em áreas corticais, principalmente em primatas, tem levantado não apenas amplos debates voltados à veracidade do fenômeno, como também suspeição quanto às interpretações de dados consideradas “mais exóticas”. Frequentemente àquelas que tendem a confirmação da presença de nichos neurogênicos em áreas relativamente distantes das supostamente habituais.

Os primeiros dados sobre neurônios pós-natais formados, ou apenas presentes, fora dos ventrículos e hipocampo em encéfalos adultos ilesos foram obtidos autoradiograficamente de gatos e ratos injetados com timidina tritiada ainda na década de 60. O experimento aparentemente permitiu observar uma marcação nuclear neuronal localizada nas linhas médias corticais bilateralmente em ambas as espécies testadas. Contudo a principal interpretação do autor para os achados autoradiográficos voltou-se para a comprovada gliogênese que poderia, assim, contribuir para a geração de novos neurônios (ALTMAN, 1963).

Em 1981, foram apresentadas novas evidências para neurônios em regiões diferentes dos ventrículos e do hipocampo. Por meio de técnicas que misturavam microscopia óptica e eletrônica, também utilizando autorradiografia, Kaplan (1981) demonstrou provável marcação de $^3\text{H-dT}$, em células supostamente neuronais na camada IV do córtex visual de ratos adultos.

Contudo, o grande marco para o início de manifestações contra a presença de novas áreas neurogênicas parece ter sido a publicação de Elizabeth Gould, em 1999. Contrariando as conclusões gerais obtidas após o projeto encabeçado por Rakic (1985), pois Gould et al. (1999) apresentou evidências que não apenas contradisseram as bases da imutabilidade neuronal adulta como também promoveu confrontação entre as técnicas de marcação mitótica utilizando a $^3\text{H-dT}$ e o então inovador BrdU, alegando grandes fluxos de neuroblastos dentro do neocórtex. Logo em seguida, diversos trabalhos surgiram tentando repetir sem sucesso os resultados encontrados em Gould et al. (1999) (RAKIC, 1985).

O advento do uso BrdU na neurobiologia completava cerca de um ano quando foi utilizado na publicação de Gould gerando profundas alterações em alguns dogmas até então firmados na neurociência. A refutação a diversos trabalhos dedicados a neurogênese em primatas, dentre eles os de Pasko Rakic, levou à repetição dos seus experimentos da década de 70 em primatas, porém dessa vez trocando a 3H-dT pelo até então recente BrdU.

Os resultados obtidos com BrdU por Rakic serviram apenas para confirmar o que já fora constatado anteriormente com o próprio 3H-dT. Devido ao impacto dos resultados de Gould, outros pesquisadores, na mesma época, adotaram iniciativas similares às de Rakic e igualmente observaram resultados discrepantes aos de Gould, dentre eles o próprio introdutor do BrdU nos estudos do sistema nervoso, Nowakowski (MILLER; NOWAKOWSKI, 1988, NOWAKOVSKI; HAYES, 2000).

As evidências anteriores ao trabalho de Gould eram provenientes de estudos iniciados na metade dos anos 70 que envolveram mais de 26 pesquisadores de 7 países que buscavam examinar por meio do exame autorradiográfico de 127 espécimes de macacos expostos a 3H-dT o tempo de origem de neurônios em primatas não humanos. Segundo, Rakic (2002) os mais de 25 trabalhos produzidos durante o projeto tinham como conclusão consensual que o macaco adulto possui grandes limitações para uma neurogênese contínua, e mesmo ponderando antecipadamente os possíveis problemas naturais à limitação da técnica, considerou que as putativas populações de novas células seriam muito pequenas quando comparadas com os resultados observados em pássaros e roedores.

As contraposições encontradas em Nowakowski e Hayes (2000), publicadas em periódico científico de elevado renome, aparentaram não apenas objetivar o descrédito à metodologia adotada em Gould et al. (1999), como também ironizar suas interpretações, conforme se observa no título da publicação: “New Neurons: Extraordinary Evidence or Extraordinary Conclusion?” (Em livre tradução para o português. Novos neurônios: Evidência extraordinária, ou conclusão extraordinária?). O modo de utilização do BrdU é um dos principais fatores criticados, inicialmente pela suposta nebulosidade funcional do precoce uso da ferramenta em animais adultos, tanto primatas quanto outras espécies; em seguida considerou elevadas as doses em comparação com aquelas usadas originalmente, em cérebros murinos em desenvolvimento ou fetos símios, conforme Nowakowski;

Lewin e Miller (1989), Takahashi; Nowakowski e Caviness (1995), Hayes e Nowakowski (2000) e finalmente Kornack e Rakic (1998).

Nowakowsky e Hayes (2000) também considerou pouco usual a velocidade migratória das células BrdU+ calculada em 8 a 14 vezes maior que dos neuroblastos migrando neocorticalmente observados por ele em primatas em desenvolvimento (NOWAKOWSKI; RAKIC, 1981), ponderando sobre uma maior dificuldade de migração para aqueles neuroblastos, uma vez que estariam se deslocando por um tecido mais complexo. Logo, por reputar especificidade insuficiente aos anticorpos usados para comprovar a transformação das células BrdU+, associando isso à contestada velocidade migratória que seria mais próxima daquela já verificada em células gliais (KAKITA; GOLDMAN, 1999), concluiu que tal fenômeno nada mais seria que resultado de gliogênese adulta (NOWAKOWSKY; HAYES, 2000).

O comentário técnico de Nowakowsky e Hayes foi recebido pela Science Magazine em 3 de dezembro de 1999, porém só aceito no final de março do ano seguinte, antecedendo pouco menos de 1 mês ao recebimento da resposta de Gould et al. àquelas contundentes contestações pela mesma revista (NOWAKOWSKY; HAYES, 2000).

Na resposta, Gould et al. (1999) avaliou que tanto as considerações de Nowakowski e Hayes (2000) eram imprecisas quanto as críticas dos mesmos às conclusões contidas no trabalho dela não eram substancializadas por lógica, dados ou literatura.

Dentre as críticas rechaçadas por Gould constava, por exemplo, de Nowakowsky renegar um possível fenótipo neuronal com velocidades migratórias supostamente tão elevadas, alegando que a presença da maioria daquelas células ainda encontrava-se na substância branca em uma semana, logo levando mais tempo do que aquilo sugerido por Nowakowski e Hayes (2000), além da existência de trabalhos anteriores afirmando que alguns tipos neuronais podem migrar dentro da faixa de velocidade proposta (GOULD et al., 1999).

Quanto a assertiva de pouca especificidade dos anticorpos usados em Gould et al. (1999), a autora considerou pouco provável que, mesmo ocorrendo possível reação cruzada, os três marcadores fenotípicos pudessem oferecer resultados similares sem que, de fato, as células marcadas fossem neuronais (NOWAKOWSKI; HAYES, 2000).

Contudo, algumas questões levantadas pelo comentário técnico de Nowakowski e Hayes permaneceram sem resposta como a padronização da dose de BrdU em amostras adultas.

A despeito das críticas, Elizabeth Gould deu continuidade às suas pesquisas com neurogênese adulta, publicando em 2002 uma continuidade a Gould et al (1999) comparando a produção e a sobrevivência tanto de células neuronais quanto gliais nas áreas do giro denteado, e dos córtices pré-frontal e temporal inferior. Os novos resultados passaram a destacar o hipocampo em detrimento das outras áreas corticais tanto quanto à produção de células BrdU+ quanto às de fenótipo definido. O que acabou por desmentir suas próprias conclusões anteriores quando não somente a afirmou a presença de um “considerável número de novas células no neocórtex possivelmente neuronais” como também sugeriu uma provável quantidade real muito superior devido ao curto tempo de absorção do BrdU (NOWAKOWSKI; LEWIN; MILLER, 1989, GOULD; GROSS, 2002).

Outros estudos foram realizados em espécies do novo mundo e de porte menor que dos espécimes analisados por Rakic e Gould, utilizando também o BrdU conjuntamente com marcadores fenotípicos. A descrição do autor demonstra um mitótico e neurogênico similar àquele observado em roedores quando se avalia zona subventricular e faixa migratória rostral (BEDARD et al, 2002, DOESTCH, 1999). Do panorama hipocampal, estresse por enfrentamento - coping - pode gerar aumento da produção neurogênica (LYONS et al., 2009).

1.3 A BIOLOGIA DA NEUROGÊNESE

Neurogênese, de modo geral, constitui-se na geração de neurônios a partir de células progenitoras e que deverão se integrar funcionalmente ao sistema nervoso (RAMON Y CAJAL 1913). As células neuroepiteliais são as progenitoras primordiais originárias diretamente do tubo neural e que produzem os primeiros neurônios e astrócitos do telencéfalo embrionário, além de outras duas populações de progenitores: A glia radial, e as células progenitoras basais (GUILHERMOT, 2005).

Porém tudo é antecedido pelo momento em que o mesoderma dorsal na porção média anteroposterior inicia a neurulação ao sinalizar às células do ectoderma adjacente que se alonguem no sentido dorsoventral gerando a região

espassada conhecida como placa neural que se distinguirá nitidamente da região pré-epidérmica marginal do ectoderma que apresentará, naquele momento, células achatadas (SMITH; SCHOENWOLF, 1989, KELLER et al., 1992, GILBERT, 2000).

O neuroepitélio primitivo que será a fonte original para os precursores neurais, neurônios, neuroglia e células endimárias se constitui a partir desse alongamento polarizado das células da placa neural que contudo precisará dos dobramentos longitudinais necessário para os envaginamentos laterais no nível da crista neural no sentido ventrodorsal, e um envaginamento central no eixo anteroposterior que além de gerar o folheto de formato cilíndrico conhecido como tubo neural internalizará a porção dorsal para o lúmen do mesmo tubo (MOREST; SILVER 2003, GILBERT, 2000).

O tubo neural, logo após o fechamento, vai apresentar no lúmen um epitélio rudimentar de camada simples que será, porém, a principal zona proliferativa para células-tronco neurais, e marco inicial da neurogênese (HINDS; RUFFETT, 1970). Esse neuroepitélio pseudo-estratificado composto por células-tronco foi nomeado pelo Boulder Committee (1970) como Zona Ventricular.

Logo, as primeiras células-tronco do Sistema Nervoso Central são as células Neuroepiteliais que em conformidade com o desenvolvimento embrionário irão gerar células-tronco adicionais (Expansão) para então produzirem ou progenitores pré-direcionados ou células já diferenciadas (Diferenciação) (SALOMONI; CALEGARI, 2010).

A morfologia pseudoestratificada da Zona Ventricular é devida ao fenômeno conhecido como Migração Nuclear Intercinética (INM) onde o núcleo celular transita entre a superfície apical e a parte basal do tecido epitelial polarizado em sincronia com o ciclo celular (KOSODO, 2012). Um mecanismo molecular proposto para a sincronia entre o deslocamento nuclear e o ciclo celular sugere que o acúmulo no processo apical de uma proteína associada a microtúbulos chamada, Tpx2, permite sua ligação a microtúbulos promovendo a migração nuclear de G2 (KOSODO et al., 2011).

1.3.1 O Ciclo Celular na Neurogênese

A INM pode ser um marcador acurado das fases do ciclo celular na Zona

Ventricular apresentando como características um movimento oscilatório do núcleo restrito ao eixo basoapical e o comprometimento desse movimento nuclear com o momento da progressão do ciclo celular.

Após a divisão celular (Fase M), o núcleo pode ser observado na superfície apical de onde migrará para o lado basal durante a fase G1, permanecendo lá durante a fase S, já o percurso de retorno do núcleo à face apical é o momento em que a célula se encontra na fase G2, às portas da fase M. Contudo a transição do momento em que o tecido germinativo se expande para aquele em que suas células passam a se diferenciar parece ter seu suporte fundamental na fase G1 (SALOMONI; CALEGARI, 2010).

Dentre os controladores da progressão do ciclo celular, ilustrada pela INM, os complexos Quinases Dependentes de Ciclinas (CDK)/Ciclina e seus inibidores são os que apresentam maior destaque e melhor caracterização (OHNUMA; HARRIS, 2003, BALLY-CUIF; HAMMERSCHMIDT, 2003, DEHAY; KENNEDY, 2007, BLOMEN; BOONSTRA, 2007).

As CDK possuem um nível quantitativo estável, enquanto o nível de ciclinas varia em conformidade com a fase do ciclo celular, logo considerando a necessidade da firme associação das CDKs à forma correspondente de ciclina, assim serão regulados o início e o fim de cada estágio cíclico celular (ALBERTS et al., 2004). De tal forma, assim como a posição nuclear na INM a expressão e degradação das ciclinas também acompanham momentos específicos do ciclo celular, sendo que os inibidores de CDK vão promover o controle da velocidade do ciclo, assim como a própria quiescência celular que é determinada durante G1 (KENNEDY, 2007, BLOMEN; BOONSTRA, 2007). Tal função justifica que mesmo neurônios adultos continuem a expressar inibidores de CDK, possivelmente para garantir que a célula nervosa permaneça em estado pós-mitótico (HERRUP; YANG, 2007)

A manipulação de Ciclinas como a D de modo a reduzir o tempo da fase G1 leva supostamente à expansão dos precursores neurais (LANGE et al. 2009, PILAZ et al. 2009).

1.4 NEUROGÊNESE NO CÉREBRO DE PRIMATAS ADULTOS

Há uma concepção tradicional de que o neocórtex de primatas adultos é estruturalmente estável e que a neurogênese e a formação de sinapses ocorre somente durante o desenvolvimento (RAKIC, 1985, BOURGEOIS; GOLDMAN-RAKIC; RAKIC, 1994). Em primatas, os córtices pré-frontal, temporal inferior e parietal posterior são importantes para a função cognitiva. Alguns estudos sugerem que, em macacos adultos, novos neurônios são adicionados a estas áreas de associação neocortical, mas não em áreas sensoriais primárias como o córtex estriado. Os novos neurônios aparecem inicialmente na SVZ e migram através da substância branca em direção ao neocórtex (GOULD et al., 1999).

Atualmente existe uma grande discussão à cerca da existência de neurogênese no neocórtex de primatas adultos, principalmente entre dois grandes grupos de pesquisas, liderados por Elizabeth Gould e Pasko Rakic. O primeiro grupo relata, em seus estudos com primatas, que os novos neurônios migram a partir da SVZ, passando pela substância branca cortical, em direção ao sulco principal do córtex pré-frontal (GOULD et al., 1999, GOULD et al, 2001). Rakic e colaboradores, por sua vez, sugerem que pode ocorrer proliferação celular no neocórtex de primatas adultos, porém sem neurogênese (KORNACK; RAKIC, 2001). Estes autores questionam os dados de Gould e colaboradores, sugerindo que a suposta corrente de células migratórias seria, na verdade, vasos sanguíneos ou células endoteliais e oligodentrócitos. Além disso, este grupo acredita que os estudos que obtiveram dados que sugerem a existência de neurogênese cortical não utilizaram marcadores celulares específicos, permitindo possível enviesamento dos resultados obtidos (RAKIC, 1985).

1.5 HIPÓTESE E PARADIGMA EXPERIMENTAL

Como relatado anteriormente, existe grande polêmica quanto à existência de neurogênese no neocórtex de primatas adultos não patológicos (RAKIC, 1985, RAKIC, 2002, GOULD et al., 1999, KORNACK; RAKIC, 2001, GOULD et al., 2001).

A investigação deste fenômeno em primatas não-humanos é de relevância científica, considerando a proximidade filogenética com seres humanos. A existência de neurogênese no neocórtex adulto pode indicar que os circuitos neurais desta região podem ser remodelados e, até mesmo, substituídos em condições patológicas. Além disso, a estrutura das regiões sabidamente neurogênicas (SVZ e SGZ) foram pouco estudadas no cérebro de primatas. Estudos detalhados da composição celular e características ultraestruturais das regiões neurogênicas em primatas similares àqueles realizados em camundongos e ratos (DOETSCH, 1997, DANILOV, 2008) são inexistentes. Na presente tese de doutorado, investigamos a organização das regiões neurogênicas do encéfalo adulto do primata amazônico: *O Cebus apella*. Inexistem estudos sobre os padrões de neurogênese endógena neste animal. Além disso, investigamos as regiões ditas não neurogênicas no sistema nervoso central deste animal, incluindo o prosencéfalo. No que concerne a esta última etapa da investigação, investigamos a hipótese de que possa ocorrer neurogênese nas regiões corticais de maior importância para o estilo de vida da espécie em questão. Uma área de eleição para esta fase de investigação será o córtex visual, considerando que primatas obtêm maior parte da informação sensorial através da visão. Além disso, o córtex visual de primatas é uma área com peculiaridades estruturais inexistentes nas outras regiões corticais (RAKIC, 1985).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade de novas abordagens terapêuticas visando amenizar os danos causados pelo AVEnc, e por outras doenças neurodegenerativas que tornam a proliferação celular mais ativa em níveis ventriculares, decidimos investigar a capacidade neurogênica de uma espécie que apresentasse juntamente maior simplicidade taxonômica com maior complexidade girencefálica, no caso um primata do novo mundo que ainda não apresentasse estudos voltados para fisiologia neurogênica especificamente.

A espécie escolhida foi a *C. apella* por sua acessibilidade amostral dentro da região amazônica e apresentar porte de médio a grande; além de sofisticada capacidade cognitiva (GALVÃO et al., 2002) o que sugere considerável desenvolvimento neocortical; e finalmente por ser uma espécie de primata regional de fisiologia geral mais estudada (LARSSON et al., 1999, LARSSON et al., 1997) assim como já ter conhecidos alguns aspectos morfológicos de interesse para este projeto, como a superfície luminal do plexo coroide (TAMEGA et al., 2000).

3 OBJETIVOS:

3.1 GERAL

Investigar a migração, o amadurecimento, e finalmente a origem de neurônios recém gerados, presentes em áreas possivelmente mais ativas do encéfalo do *Cebus apella*.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Identificação de corpos celulares de possível natureza neurogênica em diferentes cortes existente nas paredes dos ventrículos laterais por violeta de cresila.
- b) Verificar a presença de fenótipos de natureza neurogênica em diferentes cortes coronais do polo occipital ao frontal por meio de imunohistoquímica utilizando os marcadores Anti-DCX, Anti-nestina, e Antisox2.
- c) Verificar padrões proliferativos usando diferentes cortes coronais do polo occipital ao frontal por meio de imuno-histoquímica utilizando os marcadores anti-KI67 e anti-BrdU.
- d) Comparar os padrões neurogênicos e proliferativos procurando pela possível associação entre ambos.

4 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

4.1 ANIMAIS

Utilizamos 6 primatas não-humanos, adultos, machos, da espécie *Cebus apella* (Macaco-prego, 10 anos de idade), com pesos entre 2,1 e 2,8 Kg (média 2,5 Kg). Os animais vieram do Biotério Central da Universidade Federal do Pará.

Os primatas foram mantidos em gaiolas-viveiro individualizadas, em temperatura ambiente em torno de 25 °C, com ciclos de 12 h claro/12 h escuro, com comida e água *ad libitum*, além do controle de ecto e endoparasitas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência as normas sugeridas pela *Society for Neuroscience* (SfN, USA), *National Institute of Health* (NIH, USA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA, PARÁ, BRASIL).

4.2 TRATAMENTO COM 5-BROMO-2'-DEOXIURIDINA (BRDU)

Atualmente, considera-se que injeções intraperitoneais, com subsequente marcação imuno-histoquímica, do análogo da timidina, BrdU, são um método de eleição para identificação de células mitóticas no SNC adulto (ARVIDSSON et al, 2002 ; THORED et al, 2007; DANILOV et al, 2008).

Neste projeto, os animais (N= 6) receberão uma injeção diária por via intraperitoneal (i.p) de BrdU (SIGMA, 150 mg/kg dissolvidos em PBS a 0,1 M; pH 7,4; está dose será usada em todos os experimentos) durante 7 dias, sendo que foram mantidos os mesmos horários para todas as aplicações do análogo da timidina. Após o tratamento com BrdU, os animais foram sacrificados 30 dias após

o último tratamento, em conformidade com Thored (2007).

Avaliamos a presença de neuroblastos migratórios (neurônios imaturos) positivos para DCX (do inglês, doublecortin) e BrdU para avaliação de neuroblastos recém-gerados nas diversas regiões do SNC do *Cebus apella*.

4.3 PERFUSÃO, CRANIOTOMIA E MICROTOMIA

Os animais foram anestesiados profundamente com pentobarbital sódico (60 mg/Kg, CRISTÁLIA). Antes de qualquer processo cirúrgico, foram testados os reflexos corneano e o de resposta a estímulos motores. Os animais só foram manipulados após a abolição completa destes reflexos. A perfusão iniciará com uma toracotomia ampla, até a completa exposição do coração e dos grandes vasos. A seguir, será injetado diretamente no ventrículo esquerdo 0,5 ml de solução de heparina sódica (5.000 UI / ml, LIQUEMINE, ROCHE), a fim de evitar a coagulação do sangue. A perfusão será feita por meio de uma cânula inserida diretamente no ventrículo esquerdo do animal, através da qual se injetará 500 a 1000 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, seguidos de 1.000 a 2000 ml de paraformaldeído a 4% diluídos em tampão fosfato 0,1M (pH 7,2 – 7,4).

Após a perfusão, foi realizada a craniotomia e os encéfalos foram removidos da caixa craniana. Para garantir fixação adequada, os encéfalos foram pós-fixados por imersão, no mesmo fixador utilizado na perfusão por um período de 24h.

Após a fixação, os encéfalos foram imersos em soluções crescentes de uma mistura de sacarose e glicerol, diluída em tampão fosfato 0,05M para a crioproteção tecidual. Em seguida, blocos dos encéfalos foram imersos no meio de inclusão Tissue-Tek OCT 4583 (SAKURA), congelados e cortados coronalmente em criostato (ZEISS-MICRON, HM 505 E) à espessura de 20 e 40 μ m. Os cortes de 20 μ m serão

montados em lâminas gelatinizadas e acondicionadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os cortes de $40\text{ }\mu\text{m}$ foram acondicionados em solução anti-congelante na geladeira.

4.4 ESTUDOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Para identificarmos os diversos componentes celulares das regiões neurogênicas e não neurogênicas do SNC do *Cebus apella* realizamos uma série de estudos imuno-histoquímicos utilizando os seguintes anticorpos:

4.5.1 BrdU

O BrdU injetado intraperitonealmente para a marcação de células mitóticas no cérebro adulto foi visualizado através de imuno-histoquímica com o anticorpo anti-BrdU (1:100, NOVOCASTRA, UK) (THORED et al., 2007).

4.5.2 Neuroblastos

Neuroblastos migratórios foram marcados com o anticorpo anti-DCX (1:400, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) (THORED et al., 2007) e anticorpos anti-PSA-NCAM (PolySialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule) (1:500, CHEMICON) (DANILOV, 2008).

4.5.3 Precusores neurais

Antisox2 se liga a fatores de transcrição da família de proteínas SOX, estando relacionado a manutenção da identidade do progenitor neural, de modo que as células positivas para esta marcação podem permitir a identificação de possíveis células neurais pluripotentes (SUH et al., 2007)

Antinestina deve manter ligação com uma proteína codificada pelo gene NES que está presente em axônios em crescimento.

TABELA 1. ANTICORPOS UTILIZADOS PARA O ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO.

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Finalidade
AntiBrdU	Novocastra	1:100	BrdU
AntiDCX	Sta. Cruz	1:400	Neuroblastos migratórios
Antisox-2	ABCAM	1:200	Precursos neurais
Antinestina	ABCAM	1:100	Precursos neurais

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos imuno-histoquímicos foram analisadas em microscópio óptico (NIKON, Eclipse i50) Imagens de secções contendo os campos mais ilustrativos foram adquiridas com o uso de uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico e ao sistema computacional *Stereoinvestigator* (MOTICAM, CAN).

5 RESULTADOS

5.1 VIOLETA DE CRESILA

O estudo citoarquitético ao longos dos eixos rostro-caudal em cortes coronais corados por violeta de cresila demonstrou maior presença de células nas paredes ventriculares da região frontal, em conformidade com a figura 2, e uma densidade qualitativa similar entre as regiões superior e inferior do ventrículo lateral, como pode ser visto na figura 3.

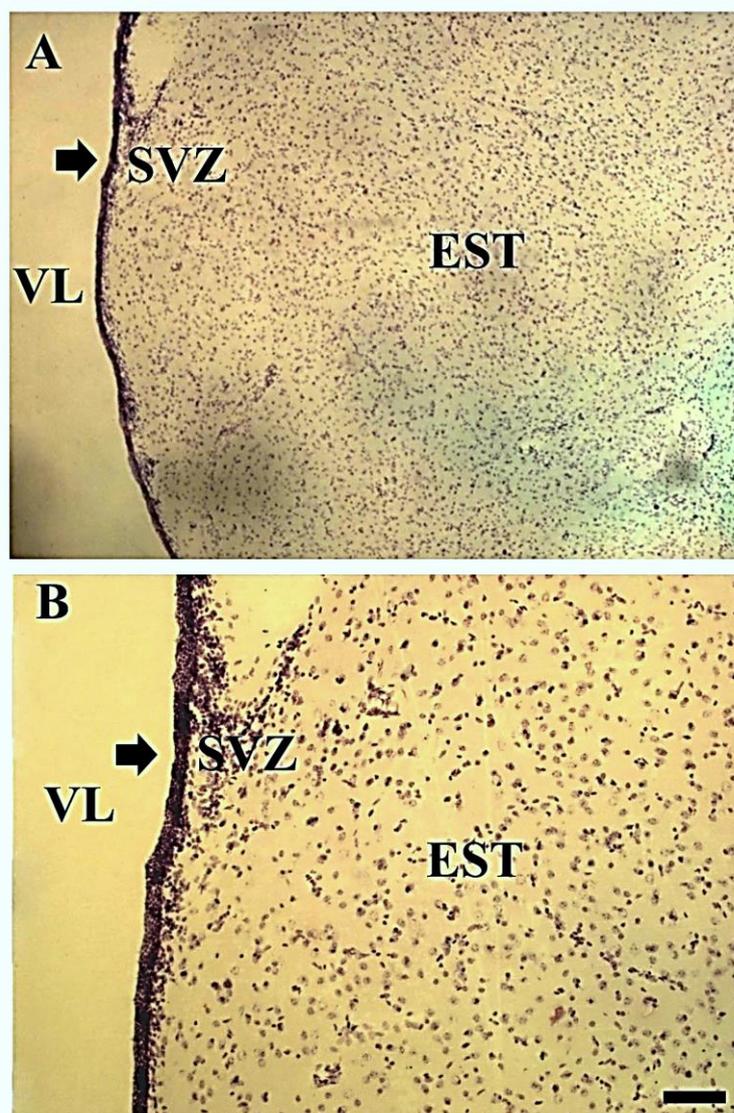


Figura 1. Paredes dos ventrículos laterais do macaco *Cebus apella* corado por violeta de cresila. (A) 4X, (B) 10X. SVZ: Zona Subventricular, VL: Ventrículo Lateral, EST: Estriado, Setas: corpos celulares. escala: 50 μ m.

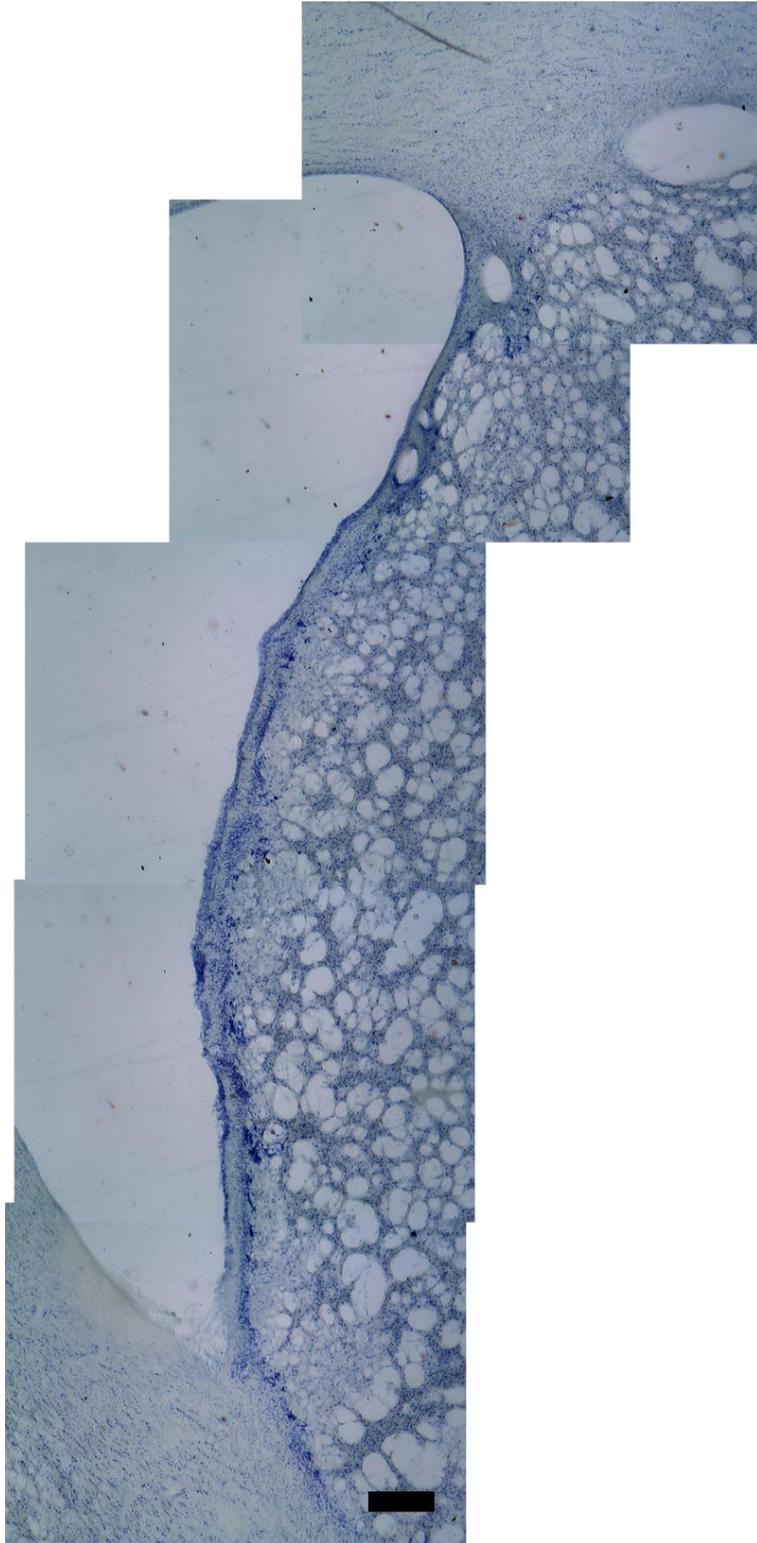


Figura 2. Comparação visual da presença de células entre a zona subventricular e o a região próxima ao vértice inferior do ventrículo lateral. Escala: 300 μ m.

5.2 DCX

Poucos neuroblastos foram encontrados, sendo a maioria identificada no lobo frontal conforme figura 4 e 5A, com alguns registros no Polo Occipital (Figura 5B) e no corpo caloso também na região do lobo frontal, resultado compatível com a fase etária adulta do animal, que sugere menor produção de neuroblastos.

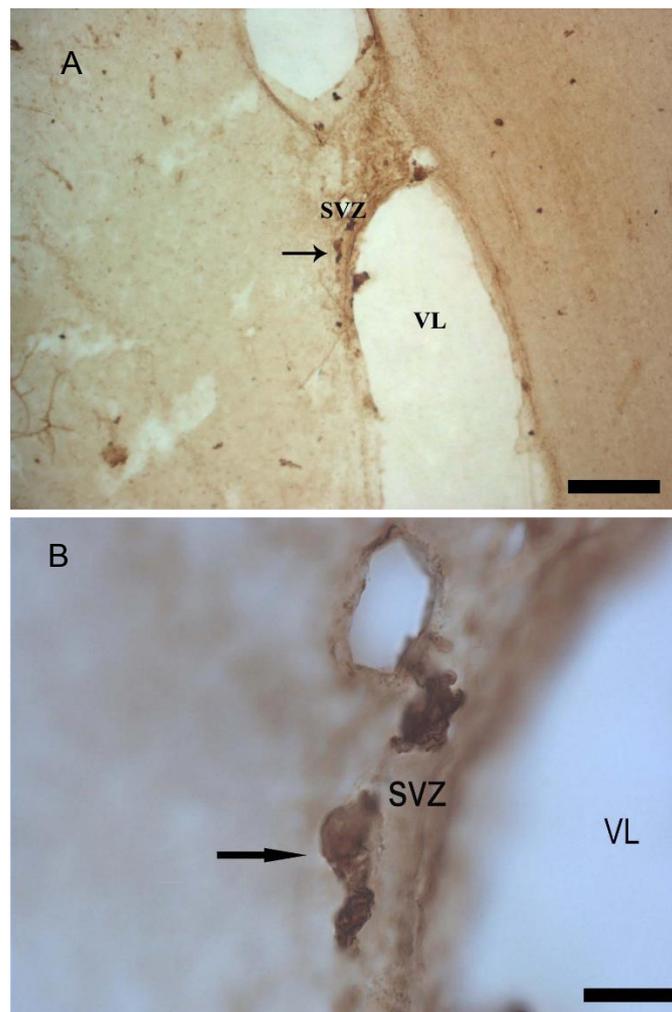


Figura 3. Presença de células DCX+ no ventrículo lateral do macaco Cebus apela. (A) 10X e (B) 40X SVZ: Zona Subventricular, VL: Ventrículo Lateral, Setas: neuroblastos. Escalas: A=50 μ m, B= 10 μ m

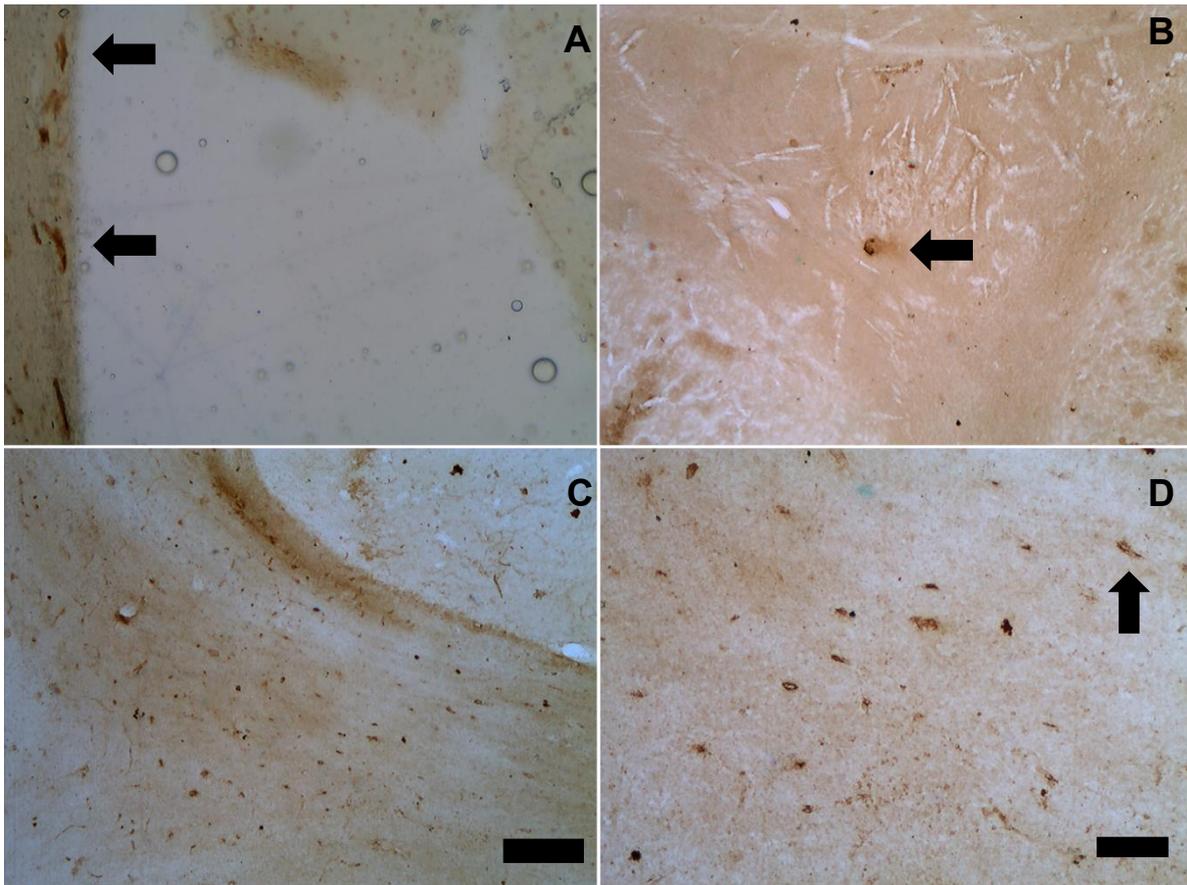


Figura 4. Marcação em DCX de ventrículo e diversas áreas. (A) Outra representação de células DCX+ em formato alongado na parede do ventrículo lateral. (B) Célula DCX+ localizada no polo occipital. (C) Marcações DCX+ no corpo caloso em aumento maior e (D) menor aumento. Setas: Neuroblastos. Escalas A, B e D= 50 μ m, C=300 μ .

5.3 BRDU

Possíveis células recém geradas foram também de pouca presença com algumas observações em áreas excepcionais como no Polo Occipital (Figura 6). Dado concernente com a área considerada estabilizada e infértil para a geração de novos neurônios.

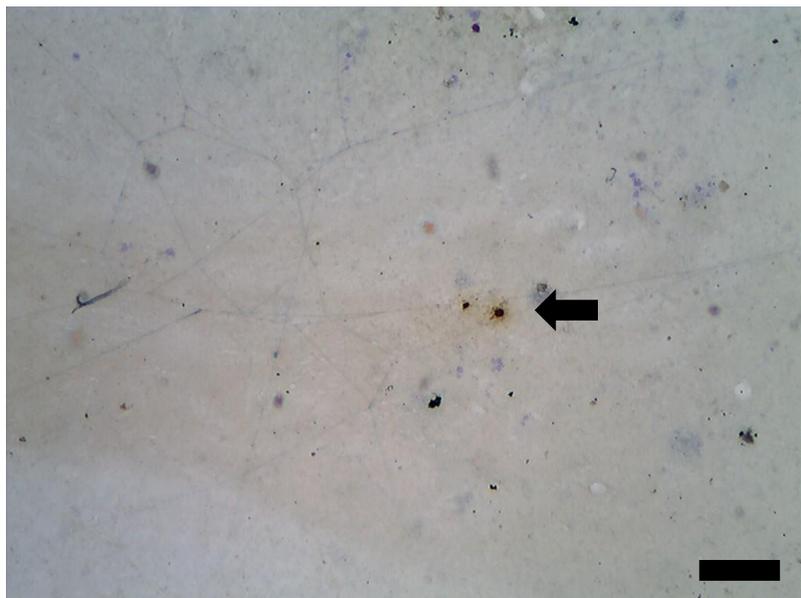


Figura 5. Célula BrdU+ encontrada no polo occipital do macaco *Cebus apella*. Setas: aponta para célula BrdU+. Escala: 300 μ m.

5.4 SOX2

Dentre as evidências de possíveis precursores neurais foi observada no lobo frontal uma marcação positiva para Sox2 (Figura 7). O que permite sugerir que mesmo em atual estágio senescente, em condições patológicas possa ser possível uma ativação de algumas células para possíveis ativações neurogênicas em virtude da possível presença de um progenitor neural

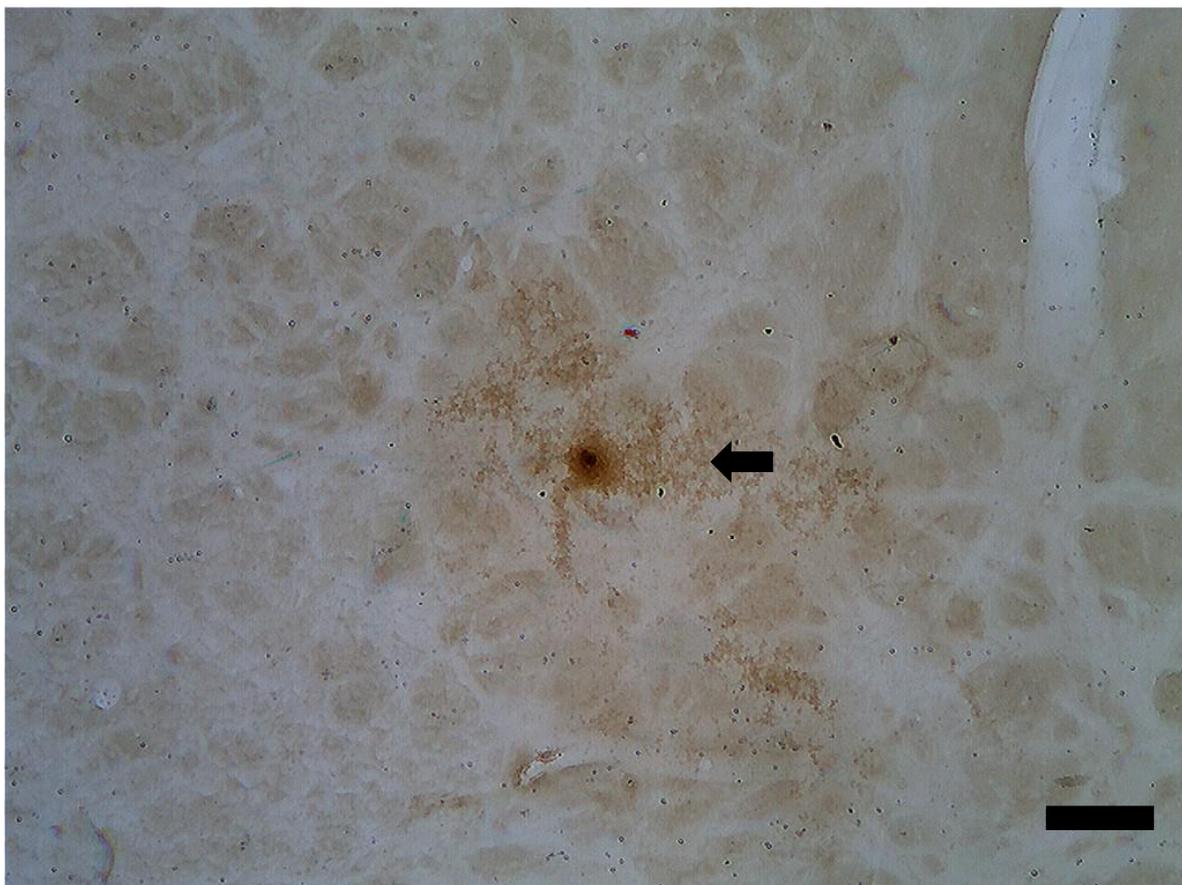


Figura 6. Demonstração de marcação positiva para SOX2, seta aponta para célula SOX2+. Escala: 50 μ m

5.5 NESTINA

Possíveis neurônios gerando novas projeções foram observados no córtex frontal em conformidade com o que é visto na figura 8. Podemos sugerir possível presença de neuroplasticidade no córtex frontal, considerando a comunicação que esse lobo apresenta com as outras áreas cerebrais.

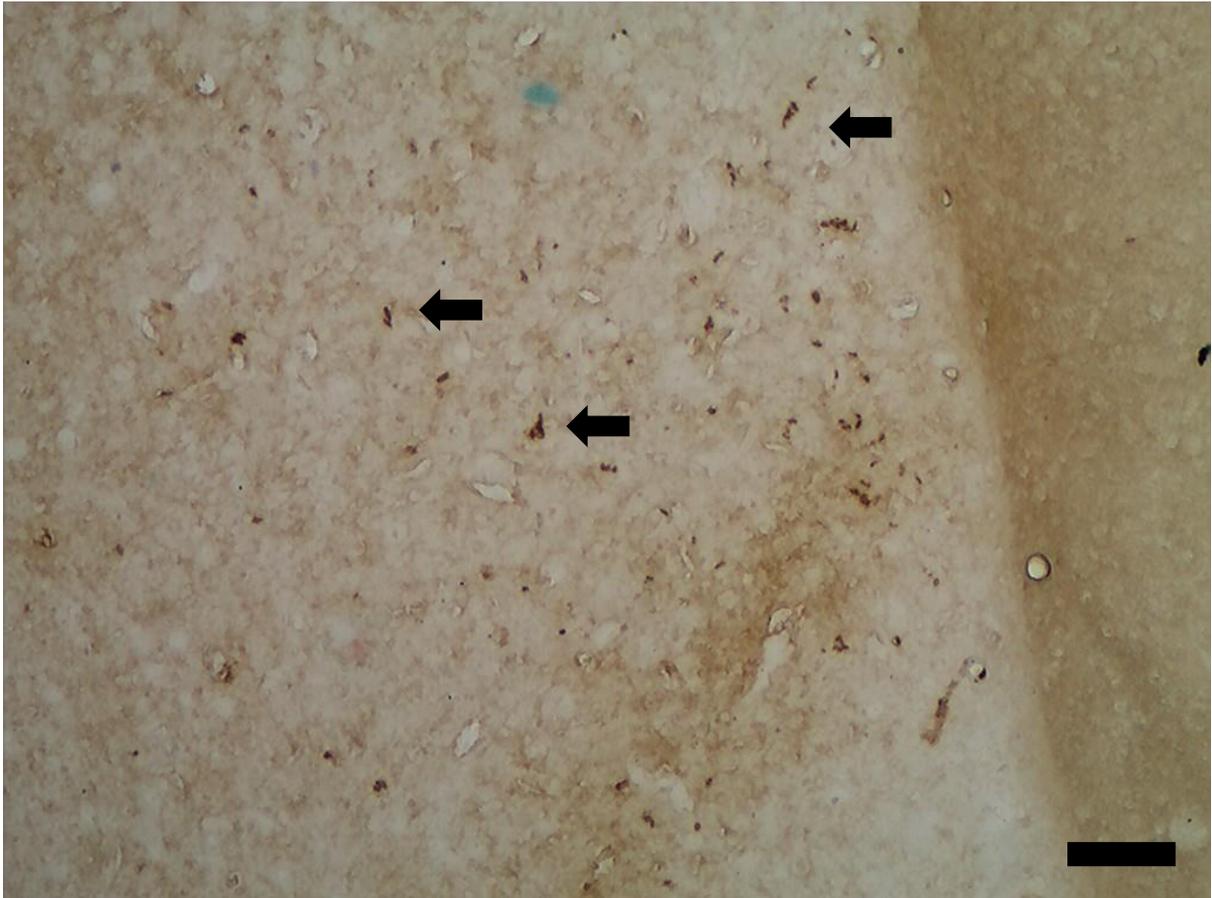


Figura 7. Células positivas para Nestina no lobo frontal, sendo algumas indicadas por setas. Escala: 300 μ m.

6 DISCUSSÃO

Observações com Violeta de Cresila demonstraram a presença de numerosos corpos celulares nas paredes ventriculares, o que pode suscitar investigações por uma sugerível capacidade neurogênica. Contudo, devido às restrições técnicas derivadas da Violeta de Cresila, a mesma indicação relacionada a outras áreas como corpo estriado e os lobos torna-se impossibilitada.

6.1 DCX

A observação da presença normal de células DCX positivas nas paredes ventriculares do *Cebus apella* é compatível com os achados em Wang et al., (2011) que demonstram a presença contínua de neuroblastos nas paredes ventriculares de macacos Rhesus com células apresentando morfologia migratória porém com aparentemente pobres características proliferativas, contudo diferindo em alguns aspectos como a ausência de uma bem caracterizada faixa migratória rostral, assim como nenhuma presença de neuroblastos nas regiões corticais mais anteriores do *Cebus apella*.

Tal ausência de neuroblastos nas regiões prosencefálicas mais anteriores bem como a relativamente baixa presença das mesmas células nas paredes ventriculares no *Cebus apella* vem a corroborar o comentário técnico de Sanai et al. (2008) refutando a considerada alta proliferação de neuroblastos observada em humanos por Curtis et al. (2007). Sanai et al. (2008) concebeu que as alegações de Curtis et al. (2007) eram pouco substanciais como na assertiva sobre a presença de dezenas de milhares de neuroblastos nas paredes do corno ventricular anterior utilizando um marcador, segundo Sanai et al. (2008), possivelmente inadequado para tal investigação em tecidos humanos. De tal forma, os dados obtidos neste trabalho com marcadores anti-DCX parecem concernentes com aqueles encontrados em humanos assim como em macacos de maior porte como o Rhesus.

6.2 BRDU

Em uma região aparentemente dentro da área 17 de Brodmann encontramos uma provável marcação positiva para o BrDU, o que pode sugerir a presença de algum tipo celular de natureza proliferativa dentro da área visual primária, resultado que a grosso modo se compatibiliza com aquele encontrado por Kaplan e Bell (1981), que alegou ter encontrado na camada 4 do córtex estriado células com morfologia similar à de neurônios, porém com marcação positiva para timidina tritiada, dado que o autor ponderou como válido para afirmar que encontrara novos neurônios em uma região não neurogênica.

Porém, nossos dados não reforçam aqueles de Gould et al. (1999) que prioriza a geração cortical de novos neurônios para as funções associativas, justificando, dessa forma, ausência de marcação positiva para BrDU no córtex estriado em seus dados.

Contudo, a presença de possível proliferação celular não produz evidência insofismável de neurogênese, pois o BrDU se insere em células pós-mitóticas de forma geral, independente do fenótipo que a mesma assumirá após a maturação (MILLER; NOWAKOWSKI, 1988).

6.3 SOX2

A presença de *sox2*, característica tanto para células tronco indiferenciadas quanto progenitores neurais, numa região do córtex frontal corrobora com o trabalho de Gould et al. (1999) que encontrou, segundo a própria autora, grandes fluxos celulares em áreas associativas. Pois, células positivas para *Sox2* no tecido nervoso apresentam dois tipos populacionais com potencial mitótico para a produção tanto de neurônios e células gliais quanto de outras células *sox2+* (HOONKYO et al., 2007). Embora inicialmente confronte com as conclusões de Rakic (2002) e de Nowakowski e Hayes (2000), é necessário realçar que neuroblastos não foram encontrados nas regiões mais anteriores do córtex, destacando uma característica paradoxalmente senescente em uma célula com putativas potenciais características proliferativas.

Apesar de que no trabalho posterior de Gould e Gross (2002) os mesmos terem afirmado que as quantificações de novos neurônios eram bem mais discretas que aquelas observadas em Gould et al. (1999) as declarações sobre a presença de novas células corticais não cessaram. Ainda na publicação de 1999, a zona subventricular foi considerada a fonte original de neuroblastos compatível com aquilo observado com *dcx* em nossos trabalhos, contudo não foi encontrado recurso que permitisse de qualquer maneira haver nichos neurogênicos nas regiões corticais associativas, onde os dados de Gould et al. (1999) acabam por se conflitar com os nossos pois a presença de células marcadas com *sox-2* podem oferecer uma nova opção de fontes de neuroblastos, mesmo não se demonstrando a presença de neuroblastos próximos, o que leva a indicação de uma característica senescente ao possível nicho neurogênico, fenômeno similar ao observado na camada de células ependimárias (Carlén et al., 2009).

Nossos dados não refutam, nem se conflitam com Rakic (2002, 2002b) nem com Kornack e Rakic (1998) pois apesar de apresentamos uma possível evidência de uma classe celular capaz não apenas de produzir novas células como também de aumentar a própria capacidade proliferativa do nicho por meio de auto-replicação, a ausência de células com marcação positiva para *DCX* ratifica, a priori, as alegações sobre a imutabilidade cerebral postuladas por Cajal e defendidas por Rakic. Não obstante, em condições patológicas, como o AVEnc, tecidos considerados senescentes têm demonstrado adquirir status proliferativo (CARLÉN et al, 2009). Vale ressaltar que não apenas condições de morbidez podem apresentar estímulos à neurogênese, outros fatores podem também desencadear o aumento da produção de novos neurônios assim como os exercícios físicos, e a aprendizagem (VAN PRAAG et al., 1999, GOULD et al., 1999b).

A possível descoberta de uma célula *SOX2+*, mesmo que única, pode levantar especulações quanto como às condições padrão para o alojamento dos primatas pode interferir nos resultados de uma investigação sobre neurogênese, inclusive nas conclusões de Rakic (2002) e de Kornak (1998). Pois se os espécimes nos citados trabalhos ao invés de uma cela, fossem mantidos em ambiente espaçoso e enriquecido, não poderiam apresentar uma quantidade massiva de neuroblastos como aqueles observados em Gould (1999)? E quanto a nossos resultados com *Cebus* poderiam apresentar além dos neuroblastos ausentes, também uma quantidade maior de progenitores neurais auto-replicativos?

6.4 NESTINA

O mesmo progenitor pode ser marcado tanto por Nestina quanto por Sox2 (SUH et al. 2007, STRECKFUSS-BÖMEKE et al.,2009). Logo, a marcação de Nestina no córtex indica uma revalidação da coloramento por Sox2.

A presença de marcação positiva para Nestina também foi observada em outras publicações para células ependimárias assim como diversos outros fenótipos celulares como as células tipo A, B e C (DOETSCH et al., 1997). Contudo, não se pode esquecer que mesmo expressando elevados níveis de Nestina, células ependimárias são consideradas terminalmente diferenciadas (BRUNI et al., 1985), porém os dados de Carlén et al. (2009) precisam ser rememorados para não se negligenciar as habilidades de algumas células do sistema nervoso central consideradas senescentes de novamente expressar características neurogênicas.

Possivelmente ambos os achados no córtex frontal do *Cebus apella* podem permitir sugerir estudos vindouros com dupla marcação, diferentes estágios etários e níveis de enriquecimento ambiental para observar melhor que tipo celular pode estar sendo abrigado nesta camada cortical.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o cérebro de *C. apella* mostrou-se uma boa alternativa às espécies de macaco de maior porte e manutenção mais dificultosa por apresentar não apenas menores porte, necessidade de espaço, e alta complexidade cortical, assim como os humanos. Quanto aos achados imuno-histoquímicos, encontramos uma zona subventricular muito similar àquela observada em humanos no que concerne à células DCX+. Quanto à presença de células positivas para DCX, encontramos marcação inesperada na porção medial do corpo caloso. Progenitores neurais foram também encontrados em áreas consideradas não-neurogênicas, no caso, córtex frontal em marcações tanto para *sox2* quanto para *nestina*, porém em uma quantidade bastante pequena.

REFERÊNCIA

AIMONE, J. B., JESSBERGER, S., GAGE, F. H. **Adult Neurogenesis**. Scholarpedia, p. 8739. 2007

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **The Anatomical Record**. v. 145, p. 573-591, 1963.

ARVIDSSON, A.; COLLIN, T.; KIRIK, D.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nature Medicine**, v. 8, p. 963-970, set. 2002.

BALLY-CUIF, L. AND HAMMERSCHMIDT, M. Induction And Patterning Of Neuronal Development And Its Connection To Cell Cycle Control. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 13, p. 16–25. 2003

BEDARD, A.; LEVESQUE, M.; BERNIER, P. J. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. **Eur J Neurosci**. v. 16:1917–1924. 2002

BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Cell Fate Determination During G1 Phase Progression. **Cell Mol. Life Sci.** v. 64, p. 3084–3104. 2007

BOURGEOIS, J. P.; GOLDMAN-RAKIC, P. S.; RAKIC, P. Synaptogenesis in the prefrontal cortex of rhesus monkeys. **Cereb Cortex**. 4 p. 78-96. jan1994

BRUNI, J. E.; DEL BIGIO, M. R.; CLATTENBURG, R. E. Ependyma: normal and pathological. A review of the literature. v. 9, p. 1–19, abr. 1985

BRUSHART, T. M.; MESULAM, MM. Transganglionic demonstration of central sensory projections from skin and muscle with hrp-lectin conjugates. **Neuroscience Letters**, v. 17, p. 1-6, abr. 1980.

BÜTTNER-ENNEVER, J. A.; GROB, P.; AKERT, K.; BIZZINI, B. Transsynaptic retrograde labeling in the oculomotor system of the monkey with [125i]tetanus toxin biib fragment. **Neuroscience Letters**, v. 26, p. 233-238, nov. 1981.

CARLÉN, M.; MELETIS, K.; GÖRITZ, C.; DARSALIA, V.; EVERGREN, E.; TANIGAKI, K.; AMENDOLA, M.; BARNABÉ-HEIDER, F.; YEUNG, M. S. Y.; NALDINI, L.; HONJO, T.; KOKAIA, Z.; SHUPLIAKOV, O.; CASSIDY, R. M.; LINDVALL, O.; FRISÉN, J. Forebrain ependymal cells are notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. **Nature Neuroscience**, v. 12, p. 259-267,

Mar. 2009.

CRUZ-RIZZOLO, R. J.; DEROGIS, A.; LORENZATO, F. Estudo comparativo de diferentes conjugados de hrp no estudo das vias neurais das estruturas bucofaciais. **Rev. Odontol**, v. 26, p. 461-470. 1997.

DANILOV, A. I.; GOMES-LEAL, W.; AHLENIUS, H.; KOKAIA, Z.; CARLEMALM, E.; LINDVALL, O. Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. **Glia**, v. 57, p. 136-152, Jan. 2009.

DEHAY, C. AND KENNEDY, H. Cell-Cycle Control And Cortical Development. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 8, p. 438–450. 2007

DOETSCH, F.. The glial identity of neural stem cells. **Nature Neuroscience**, Londres, v. 6, p. 1127-1134, nov. 2003.

DOETSCH, F.; CAILLÉ, I.; LIM, D. A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell**, The Rockefeller University, New York, New York 10021, USA., v. 97, p. 703-716, Jun. 1999.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, New York, USA., v. 17, p. 5046-5061, Jul. 1997.

DOETSCH, F.; PETREANU, L.; CAILLE, I.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Egf converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. **Neuron**, Cambridge, v. 36, p. 1021-1034, Dec. 2002.

GAGE, F. H.. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433-1438, Feb. 2000.

GALVÃO, O. D. F.; BARROS, R. D. S.; ROCHA, A. C.; MENDONÇA, M. B.; GOULART, PRK. Escola experimental de primatas. **Estudos de Psicologia**, v. 7, p. 361-370. 2002.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 6 ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2000.

GIL-PEROTIN, S.; DURAN-MORENO, M.; BELZUNEGUI, S.; LUQUIN, M. R.; GARCIA-VERDUGO, JM. Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. **The Journal of**

Comparative Neurology, v. 514, p. 533-554, Jun. 2009.

GILMAN, S.. Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. **Experimental Neurology**, v. 199, p. 28-36, 05. 2006.

GLEASON, D.; FALLON, J. H.; GUERRA, M.; LIU, J.; BRYANT, PJ. Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury. **Neuroscience**, v. 156, p. 81-88, Sep. 2008.

GONATAS, N. K.; HARPER, C.; MIZUTANI, T.; GONATAS, JO. Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 27, p. 728-734, Mar. 1979.

GOULD, E.; BEYLIN, A.; TANAPAT, P.; REEVES, A.; SHORS, T. J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, n. 2, p. 260 - 265 .1999

GOULD, E.; VAIL, N.; WAGERS, M.; GROSS, C. G. Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p.10910–10917. 2001

GOULD, E.; GROSS, C. G. Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. **The Journal of Neuroscience**, n. 22, v. 3, p. 619–623, Fev. 2002.

GOTZ, M. HUTTNER, W. B. The cell biology of neurogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 6, p. 777–788. 2005

GROB, P.; BÜTTNER-ENNEVER, J.; LANG, W.; AKERT, K.; FÄH, A. A comparison of the retrograde tracer properties of [¹²⁵i] wheat germ agglutinin (wga) with hrp after injection into the corpus callosum. **Brain Research**, v. 236, p. 193-198, Mar. 1982.

GUILLEMOT. Cellular and molecular control of neurogenesis in the mammalian telencephalon. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 639–647, 2005

HAYES, N. L.; NOWAKOWSKI R. S;. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. **Dev. Neurosci.** v.22, p. 44-55, 2000.

HENRIETTE VAN PRAAG, BRIAN R. CHRISTIE, TERRENCE J. SEJNOWSKI, FRED H. GAGE. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **PNAS**. v. 96, n. 23, p. 13427–13431, jul. 1999.

HERRUP, K.; YANG, Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? **Nat. Rev. Neurosci.** v. 8, p. 368–378, 2007

HOU, S.; WANG, Y.; XU, M.; SHEN, D.; WANG, J.; HUANG, F.; YU, Z.; SUN, F. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 39, p. 2837-2844, Oct. 2008.

IBGE. Síntese de indicadores sociais. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2006.

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

KAPLAN, M. S.; BELL, D. H. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent — radioautographic study of granule cells in the hippocampus. **Experimental Brain Research**, v. 52, p 1-5, set, 1983

KEMPERMANN, G.; KRONENBERG, G. Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 54, p. 499-503, Sep. 2003.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, p. 493-495, Apr. 1997.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P. Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 95, p. 1242-1246. 1998.

KORNACK, D. R.; RAKIC, P.; Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. **Science**. v. 7, p. 2127-2130. Dez. 2001

KOSODO, Y. Interkinetic nuclear migration: beyond a hallmark of neurogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 2727–2738, 2012

KRIEGSTEIN, A. ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 32, 149–184. 2009

KUHN, H. G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, p. 2027-2033, Mar. 1996.

LARSSON, M. H. M. A.; BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; LAZARETTI, P.; FEDULLO, J. D. L.; LARSSON, C. E.; MOLINA, SR. Hematological values of *cebus apella* anesthetized with ketamine. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, p. 1999.

LARSSON, M. H. M. A.; LUCAS, S. R. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; LAZARETTI, P.; FEDULHO, J. D. L.; GUIMARÃES, M. A. B. V. Valores de referência das provas de funções hepática, renal e de alguns eletrólitos em *Cebus apella*, anestesiados com cetamina. **Ciência Rural**, v. 27, p. 257-262. 1997.

LEES, K. R.; DAWSON, J. Advances in emerging therapies 2006. **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, Glasgow, v. 38, p. 219-221, fev. 2007.

LICHTENWALNER, R. J.; PARENT, JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, v. 26, p. 1-20, jan. 2006.

LOTUFO, P. A.. Stroke in brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, p. 3-4. 2005.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, IM. Improving who steps stroke in brazil. **Lancet Neurology**, v. 6, p. 387-8; author reply 388, May. 2007.

MAGAVI, S. S.; LEAVITT, B. R.; MACKLIS, JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. **Nature**, v. 405, p. 951-955, Jun. 2000.

MEDINA, M. C. G.; SAIRASSU, M. M.; GOLDFEDER, MC. **Das incapacidades e do acidente vascular cerebral. envelhecimento com dependência**. Educ, 1998.

MILLER, M. W.; NOWAKOWSKI, R. S. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. **Brain Res**. v. 457, p. 44-52. 1988

NOWAKOWSKI, R. S.; LEWIN, S. B.; MILLER, M. W. J. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. **Neurocytol**. 18, 311 (1989).

NOWAKOWSKI, R. S.; RAKIC, P. The site of origin and route and rate of migration of neurons to the hippocampal region of the rhesus monkey. **J. Comp. Neurol**. v. 196, p. 129-154. 1981.

NOWAKOWSKI, R. S.; HAYES, N. L. New Neurons: Extraordinary Evidence or

Extraordinary Conclusion?. **Science**, v. 288, n. 5467 p. 771. Mai 2000.

OHNUMA, S. AND HARRIS, W.A. Neurogenesis And The Cell Cycle. **Neuron** 40, 199–208. 2003

PARENT, J. M.; LOWENSTEIN, DH. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?. **Progress in Brain Research**, Department of Neurology, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, MI 48104-1687, USA. parent@umich.edu, v. 135, p. 121-131. 2002.

PARENT, J. M.; YU, T. W.; LEIBOWITZ, R. T.; GESCHWIND, D. H.; SLOVITER, R. S.; LOWENSTEIN, DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, p. 3727-3738, May. 1997.

QUIÑONES-HINOJOSA, A.; SANAI, N.; SORIANO-NAVARRO, M.; GONZALEZ-PEREZ, O.; MIRZADEH, Z.; GIL-PEROTIN, S.; ROMERO-RODRIGUEZ, R.; BERGER, M. S.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 494, p. 415-434, Jan. 2006.

RAKIC, P. Limits of neurogenesis in primates. **Science**, v. 227, p.1054–1056. 1985

RAKIC, P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. **Nature reviews neuroscience**, v. 3, jan. 2002.

RAKIC, P. Adult Neurogenesis in Mammals: An Identity Crisis. **The Journal of Neuroscience**, v. 3, n. 22, p. 614–618, fev. 2002b

SANAI, N.; MITCHEL S. BERGER, JOSE MANUEL GARCIA-VERDUGO, ARTURO ALVAREZ-BUYLLA. Comment on “Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension”. **Science**. v. 318, p. 393. 2007.

SANAI, N.; TRAMONTIN, A. D.; QUIÑONES-HINOJOSA, A.; BARBARO, N. M.; GUPTA, N.; KUNWAR, S.; LAWTON, M. T.; MCDERMOTT, M. W.; PARSA, A. T.; MANUEL-GARCÍA VERDUGO, J.; BERGER, M. S.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. **Nature**, v. 427, p. 740-744, fev. 2004.

SASAKI, M.; HONMOU, O.; RADTKE, C.; KOCSIS, JD. Development of a middle cerebral artery occlusion model in the nonhuman primate and a safety study of i.v. infusion of human mesenchymal stem cells. **PLoS ONE**, , v. 6, p. e26577. 2011.

SHINGO, T.; GREGG, C.; ENWERE, E.; FUJIKAWA, H.; HASSAM, R.; GEARY, C.; CROSS, J. C.; WEISS, S. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. **Science**, v. 299, p. 117-120, Jan. 2003.

SPASSKY, N.; MERKLE, F. T.; FLAMES, N.; TRAMONTIN, A. D.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, San Francisco, v. 25, p. 10-18, jan. 2005.

STRECKFUSS-BÖMEKE, K.; VLASOV, A.; HÜLSMANN, S.; YIN, D.; NAYERNIA, K.; ENGEL, W.; HASENFUSS, G.; GUAN, K.. Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germ-line stem cells. **Stem Cell Research**. v. 2, p. 139–154. 2009

SUH, H.; CONSIGLIO, A.; RAY, J.; SAWAI, T.; D'AMOUR, K. A.; GAGE, F. H. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. **Cell Stem Cell**. v. 5, n. 1, p. 515–528. nov. 2007

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R. S.; CAVINESS Jr, V. S. The cell cycle of the pseudostratified ventricular epithelium of the embryonic murine cerebral wall. **J. Neurosci**. v. 15, p. 6046. 1995.

TAMEGA, O. J.; TIRAPELLI, L. F.; PETRONI, S. Scanning electron microscopy study of the choroid plexus in the monkey (*cebus apella apella*). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, p. 820-825, Sep. 2000.

THORED, P.; WOOD, J.; ARVIDSSON, A.; CAMMENGA, J.; KOKAIA, Z.; LINDVALL O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. **Stroke**. v. 38, 3032-3039. set. 27. 2007

VAN PRAAG, H.. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Medicine**, Baltimore, v. 10, p. 128-140. 2008.

WANG C. LIU, F.; LIU, Y.-Y.; ZHAO, C.-H.; YOU, Y.; WANG, L.; ZHANG, J.; WEI, B.; MA, T.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; CHEN, R.; SONG, H.; YANG, Z. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. **Cell Research**. v. 21, p. 1534–1550. 2011

YAMAGUCHI, M.; SAITO, H., SUZUKI, M.; MORI, K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. **Neuroreport**, v. 11, p. 1991–1996. 2000

YAMASHITA, T.; NINOMIYA, M.; HERNÁNDEZ ACOSTA, P.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; SUNABORI, T.; SAKAGUCHI, M.; ADACHI, K.; KOJIMA, T.; HIROTA, Y.; KAWASE, T.; ARAKI, N.; ABE, K.; OKANO, H.; SAWAMOTO, K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. **The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, p. 6627-6636, jun. 2006.