



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

**Mário Santos Barbosa Junior**

**ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS EM CÓRTEX ISQUÊMICO DE  
ANIMAIS TRATADOS COM TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**

**Belém-PA  
2015**

**Mário Santos Barbosa Junior**

**ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS EM CÓRTEX ISQUÊMICO  
DE ANIMAIS TRATADOS COM TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como critério parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Terapia celular, Neuropreservação, Modulação Inflamatória, Neuroplasticidade.

Orientador:

Prof<sup>o</sup> Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Co-Orientador:

Prof<sup>o</sup> Dr. Antônio Pereira Júnior

**BELÉM – PA  
2015**

**Mário Santos Barbosa Junior**

**ALTERAÇÕES MORFO-FUNCIONAIS EM CÓRTEX ISQUÊMICO  
DE ANIMAIS TRATADOS COM TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como critério parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Linha de Pesquisa: Terapia celular, Neuropreservação, Modulação Inflamatória, Neuroplasticidade.

Aprovado em: 08 de Outubro de 2015

BANCA EXAMINADORA:

---

Orientador e Presidente da Banca  
Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Pará

---

Co-orientador  
Prof. Dr. Antônio Pereira Júnior  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof. Dr. Marcelo Marques Cardoso - Membro Titular  
Instituto de Ciências da Saúde/ Universidade Federal do Pará

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Vania Castro Corrêa – Membro Titular  
Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Pará

**BELÉM – PA  
2015**

“...e que esta seja uma prova de que EU viví! ”

***Máriu Sans***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu sábio orientador Prof. Carlomagno Bahia, por me confiar o desenvolvimento deste estudo e por compartilhar projetos e ideais científicos. Por ser exemplo de dedicação e imediatismo sem qualquer comodismo acreditando sempre no desenvolvimento e divulgação do saber.

Aos órgãos de fomento acadêmico e científico, em especial à FAPESPA e à CAPES pelo apoio para o avanço da ciência no Brasil, e para a realização deste trabalho.

À todos os membros do Laboratório de Neuroplasticidade na UFPA. Lembrando aqui, a importância dos Doutorandos, Mestrandos e IC's e eventuais colaboradores com quem compartilhei saberes. Em especial aos que foram companheiros de frustrações, superações e conquistas científicas e acadêmicas, durante toda essa saga, e com quem muitos os tenho como amigos pessoais.

Ao Ministério da Educação, em nome do Governo Federal, Ao qual atribuo total amparo institucional, pela minha formação até hoje. Pois desde o “Prézinho” até este momento culminante, cursei escolaridade pública. Sendo Eu uma mostra de o que se pode fazer com o auxílio educacional público.

Aos meus amigos de toda a vida, pelos quais os levarei comigo, mesmo que não presencialmente, pois nem mesmo as inevitáveis desventuras da vida que nos levem ao afastamento físico, seriam capazes de levar o que possam ter representado para mim.

À minha família de sangue ou de coração, a quem devo (e podem contar com) minha eterna gratidão, por serem meu ponto de origem e de inspiração em especial a minhas Companheiras Sabrina e Azazel por estarem sempre lá comigo e por serem as mais lindas de todas.

À todos os, muitos, que gostariam de ter visto (merecidamente) seus nomes aqui, mas que não ousei listar, pois não existiram ordem de listagem em que eu ousasse citar os que sabem de parte de minhas histórias, e que partilharam e partilham algo delas comigo, merecem mais que ser um em uma multidão de nomes listados. Pois os tenho com parte do que EU fui, sou e conseguirei ser. Afinal, nem só de genes se constrói um humano com princípios.

## RESUMO

Dados estatísticos apontam AVE como a segunda maior causa de morte e primeira causa de incapacidade dentre todas as demais doenças no mundo. O AVE isquêmico (AVEi) é responsável por cerca de 87% de incidência dos casos de acidentes vasculares encefálicos. No curso isquêmico, a inflamação atua na contenção do infarto ocasionado pelo AVEi, e em contrapartida a intensidade da resposta inflamatória influencia na neurodegeneração e conseqüentemente na perda funcional. A terapia celular autóloga, com células mononucleares da medula óssea, promove modulação na neuroinflamação, sendo oportuna durante um evento isquêmico para diminuição de perda tecidual e funcional. No presente trabalho, utilizamos um modelo experimental de AVEi focal para avaliar os efeitos morfofuncionais do implante autólogo de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) sobre as alterações morfofuncionais relacionadas ao AVEi. Demonstramos, neste estudo, que os transplantes autólogos de CMMO em períodos agudo ou agudo e subagudo, de evento isquêmico, promoveram neuroproteção e modulação inflamatória capazes de repercutirem em preservação e recuperação funcional em atividades específicas. Demonstramos, também, que o tratamento reforçado em período subagudo, do evento isquêmico, foi capaz de promover aumento das melhoras morfofuncionais promovidas pelo transplante autólogo em período agudo.

**Palavras-Chave:** Terapia celular, Neuropreservação, Modulação Inflamatória, Neuroplasticidade.

## ABSTRACT

Statistical data show stroke as the second leading cause of death and leading cause of disability among all other diseases in the world. The ischemic stroke (ischemic stroke) accounts for about 87% of incidence of strokes. In ischemic stroke, inflammation acts in restraint of infarction caused by ischemic stroke, and on the other hand the intensity of the inflammatory response in neurodegeneration and consequently influence the functional loss. The autologous cell therapy, mononuclear bone marrow cells, promotes modulation in neuroinflammation, being timely during an ischemic event for reduction of tissue loss and functional. In the present study, we used an experimental model of focal ischemic stroke to assess morphological and functional effects of autologous implant mononuclear bone marrow cells (CMMOs) on the morphological and functional changes related to ischemic stroke. We demonstrate in this study that the autologous BM-MNC in acute or acute and subacute periods of ischemic event, promoted neuroprotection and inflammatory modulation able to rebound in preservation and functional recovery in specific activities. We also show that the treatment enhanced in subacute period, the ischemic event, was able to promote increase in morphological and functional improvements promoted by autologous transplantation in acute period.

**Keywords:** Cell therapy, neuroprotection, Inflammatory Modulation, Neuroplasticity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Fluxograma de sequência de eventos fisiopatológica após um acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi).....	18
FIGURA 2: Cronologia da sucessão dos eventos fisiopatológicos que ocorrem após lesão isquêmica no encéfalo.....	19
FIGURA 3: Organização laminar do Córtex cerebral de mamíferos. Representação do encéfalo de diferentes mamíferos.....	29
FIGURA 4: Organização em Colunar da superfície pial até a substância branca em diferentes áreas corticais.....	30
FIGURA 5: A organização topográfica do córtex motor em diferentes espécies de mamíferos.....	32
FIGURA 6: Organização cronológica dos procedimentos experimentais.....	41
FIGURA 7: Teste do cilindro.....	43
FIGURA 8: Desenho esquemático da escada horizontal.....	45
FIGURA 9: Qualidades de movimento no teste de escada horizontal.....	47
FIGURA 10: Desenho esquemático da craniotomia e da posição das microinjeção de ET-1.....	50
FIGURA 11: TESTE DO CILINDRO: Frequência Exploratória e Assimetria assimetria de uso da pata anterior .....	60
FIGURA 12: Análise de frequência média das qualidades de movimento.....	64
FIGURA 13: Análise histopatológica da área de lesão isquêmica.....	66
FIGURA 14: Biometria da área de lesão isquêmica.....	67
FIGURA 15: neuropreservação.....	68
FIGURA 16: Densidade Neuronal.....	69
FIGURA 17: Ativação Microglial.....	70
FIGURA 18: Ativação microglial.....	71
FIGURA 19: Astrogliose.....	72
FIGURA 20: Astrogliose.....	73
TABELA 1: Grupos experimentais.....	42
TABELA 2: Descrição qualitativa de movimentos.....	46



## LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

ADP	– Adenosina difosfato
AMPA	– Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
AP	– Anteroposterior
ATP	– Adenosina Trifosfato
AVE	– Acidente Vascular Encefálico
AVEh	– Acidente Vascular Encefálico hemorrágico
AVEi	– Acidente Vascular Encefálico isquêmico
BHE	– Barreira Hemato-Encefálica
Ca <sup>2+</sup>	–Íon Cálcio
CC	– Corpo Caloso
CEPAE	– UFPA Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará
CMMO	– Células Mononucleares da Medula Óssea
CRP	– Proteína C Reativa
CT	– Célula Tronco
CTH	– Hematopoiética
CTM	– Mesenquimal
DMEM F-12	– <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
ED-1	– Codificação de Tipificação de anticorpo Macrofagico/Microglial
ET-1	– Endotelina- 1
ETA	– Receptor tipo A de Endotelina
ETB	– Receptor tipo B de Endotelina
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio

FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
GC	– Grupo Controle
GDT	– Grupo Duplo Tratado
GFAP	– Proteína Fibrilar Astroglial
GLUR2	– Receptor 2 de Glutamato
GT	– Grupo Tratado
IL	– Inter Leucina
M1	– Córtex <u>Motor</u> Primário
MHC	– Complexo Principal de Histocompatibilidade
ML	– Médio-Lateral
Na <sup>+</sup>	– Íon Sódio
NEU-N	– Núcleo Neuronal
NMDA	– N-metil D-Aspartato
PBS	– <i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato-salino
S1/M1	– Córtex Sensório-Motor Primário
SNC	– Sistema Nervoso Central
TNF	– Fatores de necrose tumoral
tPA	– Ativador do Plasminogênio tecidual

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO AVE.....	14
1.2 ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS.....	15
1.3 FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUEMICO.....	16
1.3.1 <b>Metabolismo Celular do Tecido Nervoso Alterado por Isquemia</b> .....	20
1.3.2 <b>Excitotoxicidade Pós-isquemia no Tecido Nervoso</b> .....	20
1.3.3 <b>Estresse oxidativo induzido por AVC no Sistema Nervoso</b> .....	22
1.3.4 <b>Despolarização peri-infarto</b> .....	22
1.3.5 <b>Inflamação</b> .....	23
1.4 RESPOSTA CELULAR INFLAMATÓRIA AO AVEi .....	24
1.4.1 Monócitos.....	24
1.4.2 Macrófagos.....	25
1.4.3 A resposta microglial após AVE (Microglia).....	25
1.4.4 Astrócitos.....	27
1.5 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NO SNC APÓS O AVC.....	28
1.6 ORGANIZAÇÕES CORTICAIS CEREBRAIS DOS MAMÍFEROS E OS ALVOS MAIS FREQUENTES DE AVE.....	28
1.7 ESTRATÉGIAS CLÍNICAS PARA O TRATAMENTO DE CASOS DE AVEi.....	32
1.8 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE AVE.....	33
1.9 TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DE ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	35
1.9.1 A Terapia Celular no Tratamento do AVEi.....	37
1.10 JUSTIFICATIVA.....	38
<b>2 OBJETIVO</b> .....	40
2.1 GERAL.....	40
2.2 ESPECÍFICOS.....	40
<b>3 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	41
3.1 O MODELO EXPERIMENTAL.....	41
3.2 PROCEDIMENTOS BIOTERIAIS E CUIDADOS COM OS ANIMAIS.....	42
3.3 TESTE DE EXPLORAÇÃO VERTICAL (TESTE DO CILINDRO).....	43
3.4 AVALIAÇÃO DAS HABILIDADES LOCOMOTORAS .....	44
3.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS TESTES FUNCIONAIS DA PATA AFETADA POR AVEi.....	48
3.6 CRANIOTOMIA E INDUÇÃO ISQUÊMICA EXPERIMENTAL.....	49
3.7 TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CMMO.....	51
3.7.1 Aspiração da Medula Óssea.....	51
3.7.2 Separação das CMMO e Transplante autólogo.....	52
3.8 PROCEDIMENTOS PÓS-CIRÚRGICO.....	53
3.8.1 <b>Perfusão</b> .....	53
3.8.2 <b>Obtenção dos cortes histológicos</b> .....	54

3.9 PROCESSAMENTOS HISTOLÓGICOS.....	54
3.9.1 Área de lesão isquêmica.....	54
3.9.2 Densidade neuronal.....	54
3.9.3 Ativação microglial.....	55
3.9.4 Cicatriz Glial.....	55
3.10 Estereologia .....	55
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>4 RESULTADOS</b> .....	57
4.1 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL EXPERIMENTAL EM S1/M1 NÃO DEMONSTRAM ALTERAÇÕES DE PADRÃO DE FREQUÊNCIA EXPLORATÓRIA.....	57
4.2 ANIMAIS SUBMETIDOS A LESÃO ISQUÊMICA FOCAL EM S1/M1 E TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CMMO DEMONSTRAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO PARCIAL DE PADRÃO DE ASSIMETRIA EXPLORATÓRIA.....	58
4.3 ANIMAIS SUBMETIDOS A TRANSPLANTES AUTOLOGO SUPLEMENTAR DE CMMO NÃO DEMONSTRAM ALTERAÇÃO DOS PADRÕES DE PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO PARCIAL DE PADRÃO DE ASSIMETRIA DO USO DA PATA AFETADA.....	59
4.4 ANIMAIS TRATADOS COM CMMO DEMONSTRARAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA DA PARA ANTERIOR (AFETADA POR AVEi) EM TESTE DA ESCADA HORIZONTAL.....	61
4.5 ANIMAIS SUBMETIDOS A TRATAMENTO AUTÓLOGO SUPLEMENTAR COM CMMO DEMONSTRARAM MELHORA DA RECUPERAÇÃO DE PADRÃO MOTOR EM ESCADA HORIZONTAL.....	62
4.6 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM PRESERVAÇÃO TECIDUAL EM S1/M1 EM PERIODO CRÔNICO .....	65
4.7 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM NEUROPRESERVAÇÃO EM S1/M1 EM PERIODO CRÔNICO.....	67
4.8 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM INIBIÇÃO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM S1/M1 EM PERIODO CRÔNICO.....	70
4.9 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM DIMINUIÇÃO DE DENCIDADE DE CICATRIZ GLIAL EM S1/M1 EM PERIODO CRÔNICO.....	72
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	74
5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	74

5.2	MODELO DE LESÃO ISQUÊMICA FOCAL E TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO NÃO PROMOVERAM ALTERAÇÕES DE INTENSIDADE EXPLORATÓRIA .....	74
5.3	TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM PRESERVAÇÃO PARCIAL DE PARAMETROS DE ATIVIDADE EXPLORATÓRIA.....	75
5.4	TRANSPLANTES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO PARCIAL DE PADRÃO DE ATIVIDADE SENSÓRIOMOTORA EXPECIFICA.....	76
5.5	TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM NEUROPRESERVAÇÃO QUE SE EXPRESSA EM PRESERVAÇÃO FUNCIONAL.....	77
5.6	TRANSPLETES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAMr MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL PERMICIVEL A PRESERVAÇÃO TECIDUAL SUSCEPTÍVEL A PRESERVAÇÃO FUNCIONAL.....	78
5.7	TRANSPLETES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM MODULAÇÕES INFLAMATÓRIAS PERMICIVEIS A PRESERVAÇÃO TECIDUAL SUSEPTIVEIL A PRESERVAÇÃO FUNCIONAL.....	79
	<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	81
	<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	82
	<b>8 ANEXO</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças de cunho neurodegenerativo, em geral, apresentam-se com ampla incidência e variações na espécie humana, sendo que as de caráter agudo têm notório índice de ocorrência distribuído em todo o mundo (*AMERICAN HEART ASSOCIATION*, 2015). Neste contexto, os distúrbios cerebrovasculares são foco de grande atenção, consumindo esforço mundial para o desenvolvimento de políticas de prevenção e reabilitação (*AMERICAN HEART ASSOCIATION*, 2015), principalmente no combate aos fatores de riscos que podem provocar acidente vascular encefálico (AVE).

AVE é a alteração neurológica ocasionada por privação regional de sangue (AVE isquêmico), de caráter transitório ou permanente (LO *et al.*, 2003), ou ainda por extravasamento de sangue (AVE hemorrágico) a partir da ruptura endotelial (DOYLE *et al.*, 2008). AVE isquêmico pode ser provocado por redução focal do fluxo sanguíneo em uma região restrita ou ainda pode ser global, ocasionado pela diminuição generalizada do fluxo de sangue para o encéfalo (DOYLE *et al.*, 2008; LO *et al.*, 2003).

No presente trabalho, testamos terapia com células mononucleares da medula óssea (CMMO) em modelo experimental de AVE isquêmico como alternativa terapêutica para promover neuroproteção e recuperação funcional de membro afetado após isquemia focal do córtex sensório-motor.

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO AVE

Dados estatísticos apontam AVE como a segunda maior causa de morte e primeira causa de incapacidade física dentre todas as demais doenças no mundo, com mortalidade anual atingindo cerca de 6.000.000 pessoas em todo o planeta (JI *et al.*, 2010; WOODRUFF *et al.*, 2011). No Brasil, dados recentes do Ministério da Saúde apontam o AVE como a principal causa de morte, fazendo o Brasil ocupar a quarta posição entre os países Latino-americanos (LAVADOS

*et al.*, 2007) e a sexta posição mundial dentre os países com maior incidência de morte por doença cerebrovascular. Quanto à ocorrência entre os gêneros, foi demonstrado que 40% dos casos de AVE acometeram homens e 60% mulheres (LOTUFO e BENSENOR, 2009).

O AVE isquêmico (AVEi) é responsável por cerca de 87% dos casos de acidentes vasculares encefálicos, onde a oclusão dos vasos sanguíneos do encéfalo pode ocorrer como consequência à trombose local (ou por embolia), gerando isquemia e consequente lesão do tecido nervoso e, com isso, provocando a perda de função neuronal (DOYLE *et al.*, 2008). As demais causas de AVE incluem 10% de hemorragia intracerebral e 3% AVE hemorrágico subaracnóide (NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, 2006). Levando-se em consideração que a maior parte dos indivíduos acometidos por AVE tenha idade superior a 65 anos e que a expectativa de vida continua crescendo em todo o mundo, o número absoluto de pessoas com incapacidade física que foram acometidas por AVE poderá aumentar ainda mais no futuro (LAKHAN *et al.*, 2009).

## 1.2 ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS

Somente em 2010 os americanos gastaram cerca de 73,7 bilhões de dólares em tratamentos medicamentosos e reabilitação física de pacientes acometidos por AVE (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2011). No primeiro ano de tratamento, o custo fica acima dos 25 mil dólares por paciente (MAHLER *et al.*, 2008). Em países da Europa, a hospitalização dos sobreviventes pós-AVE pode representar quase 4 mil Euros por paciente/ano (EPSTEIN *et al.*, 2008). Podem acontecer variações nos valores gastos por paciente, dependendo tipo de política de saúde pública adotada (SEKIMOTO *et al.*, 2008), da gravidade do quadro clínico e dos serviços de saúde disponibilizados ou requeridos (FLYNN *et al.*, 2008; MAHLER *et al.*, 2008).

A reabilitação funcional é uma parte crítica da recuperação para muitos dos sobreviventes de AVE. As consequências da doença podem causar mudanças severas nas atividades de vida diária dos pacientes, provocando a necessidade de reaprendizado e redefinição de como viver. Além do mais, a

reabilitação não reverte totalmente os efeitos das sequelas funcionais de um AVE, mas promovem principalmente fortalecimento, capacitação para a nova condição física limitada e aumento da confiança dos pacientes que poderão continuar suas atividades de vida diária mesmo com as limitações impostas pela doença (*AMERICAN HEART ASSOCIATION*, 2015).

Nas últimas décadas, tentou-se muitas abordagens preventivas em relação aos fatores de riscos que podem levar ao desencadeamento de um AVE, a fim de diminuir sua incidência e a mortalidade das pessoas acometidas por esta doença e de proporcionar melhor qualidade de vida aos indivíduos que sobreviveram à ela. Esforços para a diminuição da mortalidade dos pacientes acometidos pela doença tangem a evolução na assistência hospitalar, nos estudos a respeito do curso da patologia e no combate aos fatores de riscos para o desenvolvimento/geração de AVE. Dentre os principais fatores de riscos cerebrovasculares, segundo a *American Heart Association* (2015), podemos mencionar o tabagismo, obesidade, dislipidemias, estresse, sedentarismo, diabetes, doenças cardiovasculares, hipertensão arterial e ainda as enfermidades tropicais endêmicas como a Doença de Chagas e a Malária (*CAMARGO et al.*, 2005).

Uma vez que o AVEi é uma doença de alto impacto socioeconômico, torna-se importante o desenvolvimento de estratégias clínicas que atuem na prevenção, combate e remediação dos malefícios ocasionados pela fisiopatologia da doença, para que assim se amenize as sequelas físicas provocadas pela doença, melhore a qualidade de vida dos pacientes e diminua os impactos socioeconômicos.

### 1.3 FISIOPATOLOGIA DO AVE ISQUEMICO

AVE é a alteração neurológica ocasionada por privação do fornecimento de oxigênio ao tecido nervoso. Essa alteração pode ser decorrente de privação regional de sangue por AVEi (*LO et al.*, 2003) ou decorrente de extravasamento de sangue por um AVEh (*DOYLE et al.*, 2008).



O AVE hemorrágico (AVEh) se dá por extravasamento de sangue devido à ruptura de vaso sanguíneo do encéfalo, causando suprimento anômalo em regiões encefálicas, ocasionando disfunções fisiopatológicas malélicas nas regiões acometidas que pode ocorrer, basicamente, de três modos: hemorragia intraparenquimatosa, hemorragia subaracnóidea ou hemorragia subdural (*NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE*, 2006). Dentre os fatores que podem provocar o início de uma hemorragia no encéfalo, podemos mencionar hipertensão arterial (como fator mais expressivo), malformação arteriovenosa, aneurisma intracraniano, angioma venoso, trombose de seio venoso cerebral, neoplasia intra-craniana, coagulopatia, vasculite, uso de substâncias psicoativas ou traumas físicos (QURESHI *et al*, 2001).

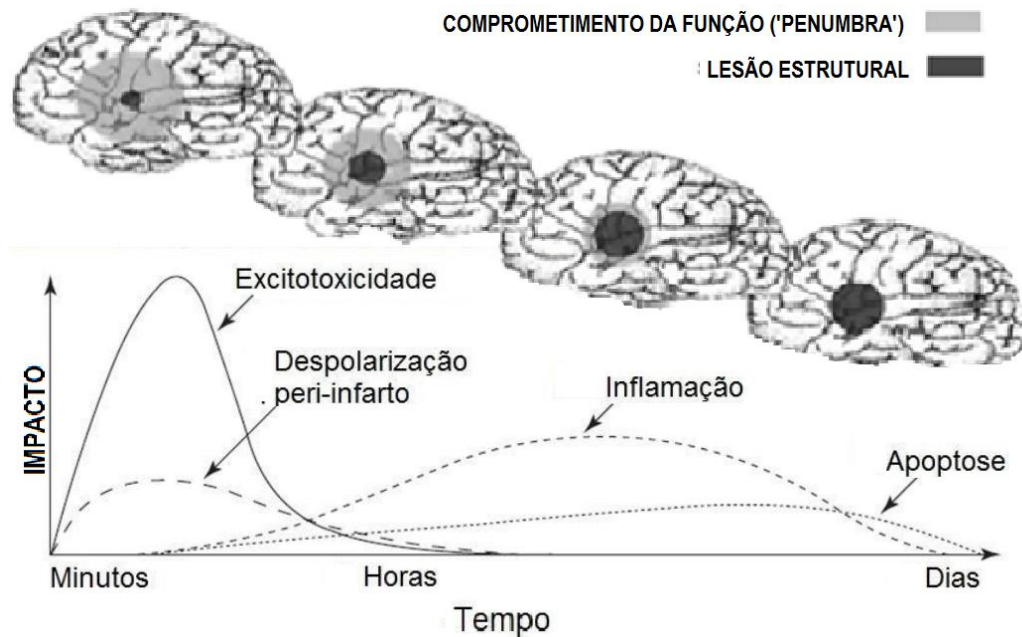
O AVE isquêmico (AVEi) diferencia-se do AVEh em aspectos de causa, ocorrência e danos provocado ao tecido nervoso. Na isquemia focal, uma artéria (ou veia) é ocluída por embolia ou tromboembolismo, provocando a redução do fluxo sanguíneo para a região afetada, privação de oxigênio e consequente morte celular no território isquêmico (BACIGALUPPI *et al*, 2010, YENARI *et al.*, 2010). Dependendo da localização, da extensão e da duração do evento isquêmico, o mesmo pode ocasionar perda da funcionalidade atribuída à região de ocorrência do AVE devido a morte tecidual desencadeada por mecanismos celulares envolvidos com a fisiopatologia do AVEi, tais como excitotoxicidade, estresse oxidativo e nitrosativo, ruptura da barreira hematoencefálica e resposta inflamatória (FIGURA 1) (LAKHAN, *et al.*,2009).



**FIGURA 1-** Fluxograma da sequência de eventos fisiopatológica após um acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi).

Fonte: Adaptado de LAKHAN, *et al.*, 2009.

A perda funcional relaciona-se diretamente à área encefálica acometida pelo evento isquêmico e pode se expressar em deficiência de memória, aprendizagem, linguagem, dificuldade de locomoção e até mesmo dos sentidos básicos como visão, tato, etc (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005, 2015). Os eventos fisiopatológicos relacionados ao AVEi são dotados de uma notória complexidade de interações de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que se iniciam instantaneamente à isquemia e podem persistir por dias ou semanas pós-isquemia (FIGURA 2).



**FIGURA 2- Cronologia da sucessão dos eventos fisiopatológicos que ocorrem após lesão isquêmica no cérebro.**

Fonte: Adaptado de Dirnagl *et al* 1999.

O acidente vascular isquêmico é caracterizado por colapso metabólico resultante de hipoperfusão sanguínea, provocando excitotoxicidade, estresse oxidativo, distúrbio da barreira hemato-encefálica, lesão microvascular, inflamação pós-isquêmica que resulta em morte de células neuronais, gliais e endoteliais. A cascata de alterações pós-isquemia mostra-se como um conjunto complexo de eventos com delimitações temporais e associações, tendo duração de horas ou dias, mesmo após reperfusão (BROUNS & DEYN, 2009; CUI *et al.*, 2009; LO *et al.*, 2003) (FIGURA 1).

A extensão da lesão isquêmica pode ser diretamente relacionada à duração e a localização da isquemia; já a gravidade da lesão está relacionada com a região encefálica acometida e com existência de circulação colateral (DIRNAGL *et al*, 1999). O acidente isquêmico no cérebro gera duas regiões distintas, sendo o centro isquêmico, considerado a região do parênquima do tecido nervoso onde ocorre imediatamente morte celular, e a área periférica ao centro isquêmico que é denominada de penumbra isquêmica, caracterizada por desenvolvimento de lesão branda com potencial chance de recuperação das células em sofrimento ( DHAWAN *et al.*, 2010; MATTSON, 2007).

### 1.3.1 Metabolismo Celular do Tecido Nervoso Alterado por Isquemia

A alta taxa metabólica e o conseqüente alto consumo extremo de oxigênio e glicose pelas células do tecido nervoso o tornam extremamente vulnerável à situações de hipoperfusão sanguínea, onde uma discreta alteração no aporte sanguíneo para uma dada região do sistema nervoso resulta na falha dos processos homeostáticos de produção de energia (especificamente geração de adenosina trifosfato: ATP). A falha na produção energética ativa uma cascata de eventos fisiopatológicos que culmina na morte celular por necrose ou apoptose, dependendo do momento de ocorrência e/ou da cascata fisiopatológica ativada a exemplo da ativação de vias intrínsecas ou extrínsecas de morte celular. (DHAWAN *et al.*, 2010; DOYLE *et al.*, 2008; LOANE & BYRNES, 2010).

Assim, o infarto do tecido nervoso ocorre devido ao colapso metabólico inicial, resultando em alterações nas enzimas ATPases e também em canais iônicos da membrana plasmática de neurônios, do acúmulo de aminoácidos excitatórios, influxo excessivo de íons sódio (Na<sup>+</sup>) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>), ativação de proteases, formação excessiva de radicais livres e inflamação do tecido nervoso culminando em morte neuronal, morte glial e perda tecidual (MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Excitotoxicidade Pós-isquemia no Tecido Nervoso

Imediatamente após a ocorrência do AVEi, há alteração nas concentrações extra e intracelulares de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato e o aspartato, que são excessivamente liberados na área infartada do tecido nervoso (DIRNAGL *et al.*, 1999, SONG *et al* 2012). O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios e é essencial aos eventos de plasticidade neuronal, como na maturação das células granulares hipocâmpais durante a integralização dos novos neurônios (SONG *et al* 2012). Entretanto, sua liberação e conseqüente alta concentração no meio extracelular das áreas isquêmicas promove excitação pós-sináptica por ativação excessiva de receptores dos tipos *N*-Metil-*D*-Aspartato (NMDA), Amino-3-hidroxi-5-metil-4-propionato (AMPA) e kainato (SZYDLOWSKA & TYMIANSKI, 2010). Os

receptores NMDA induzem a abertura de canais iônicos seletivos ao íon cálcio, portanto sua abertura desencadeia despolarização adicional da membrana plasmática de neurônios devido ao maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , exacerbando a quantidade intracelular deste íon e, assim, caracterizando a excitotoxicidade (SZYDLOWSKA & TYMIANSKI, 2010). Já os receptores AMPA não ativam, normalmente, canais iônicos seletivos ao  $\text{Ca}^{2+}$  em virtude de sua subunidade GluR2, contudo esta subunidade tem sua carga elétrica reduzida após isquemia, alterando a permeabilidade dos canais iônicos ativados por estes receptores e seletivos para  $\text{Ca}^{2+}$ , fazendo com que os receptores AMPA contribuam com a morte celular cálcio-dependente (DEB *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2006). Assim, o acúmulo de glutamato promove o influxo excessivo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  para o interior da célula que, por sua vez, resulta em ativação de várias vias metabólicas de indução de morte celular (BIEGON *et al.*, 2004; LO, 2008).

Como consequência à despolarização da membrana plasmática e o acúmulo de íons  $\text{Na}^+$  no interior das células durante a isquemia, há inversão do fluxo de glutamato realizado pelos transportadores de membrana para este neurotransmissor, elevando sua saída das células ao longo da membrana plasmática dos neurônios, pelos transportadores de glutamato sódio-dependentes, tanto nas membranas pré quanto nas pós-sinápticas. (BIEGON *et al.*, 2004; DOYLE *et al.*, 2008).

Concomitante com o influxo iônico ocorre também influxo passivo de água, resultando em edema citotóxico e elevação intracelular do  $\text{Ca}^{+2}$  agindo como segundo mensageiro, desencadeando geração e liberação de radicais livres e ativação de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , como enzimas proteolíticas, tais como a fosfolipase A2, a calpaína, as endonucleases, a adenosina trifosfatase, a cicloxagenase e a óxido nítrico sintase tipo I, que promovem lise de proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular (SZYDLOWSKA & TYMIANSKI, 2010). Essa ativação enzimática provoca extensos danos celulares que resultam em morte celular aguda por necrose e, em período crônico da lesão isquêmica, promovem eventos moleculares que resultam em ativação de mecanismos apoptóticos, provocando o aumento da expansão da lesão isquêmica (BROUNS & DEYN, 2009; FONTANA, 2015; SZYDLOWSKA & TYMIANSKI, 2010).

### 1.3.3 Estresse oxidativo induzido por AVE no Sistema Nervoso

Quando a produção de radicais livres se desequilibra da capacidade endógena das defesas anti-oxidantes celulares, ocorre estresse oxidativo (DEB *et al.*, 2010). Altos níveis de íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e adenosina difosfato (ADP) induzem às mitocôndrias a produzirem níveis críticos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e como os neurônios possuem baixos níveis de antioxidantes intracelulares, estas células se tornam especialmente vulneráveis ao estresse oxidativo (BLOMGREN & HAGBERG, 2006). A elevação da produção de EROs provoca destruição de macromoléculas celulares e também participa da sinalização de mecanismos que promovem morte celular programada em período sub-agudo e crônico da lesão isquêmica (BLOMGREN & HAGBERG, 2006; DEB *et al.*, 2010).

### 1.3.4 Despolarização peri-infarto

A despolarização alastrante é um eventos caracterizado pela alteração intensa do transporte de íons através da membrana plasmática das células neuronais, elevando-se criticamente o tempo de despolarização dos neurônios sucedida por um processo de recuperação mais lento (CUI, *et al.*, 2014; DODICK & GARGUS, 2008). No AVEi, as ondas de despolarizações alastrantes assumem um caráter particular e são denominadas de despolarizações peri-infarto, por ocorrerem na periferia do centro isquêmico (KIDWELL *et al.*, 2015; TREGUB *et al.*, 2015).

Despolarizações peri-infarto são resultantes da liberação do íon potássio ( $\text{K}^+$ ) e aminoácidos excitatórios das células em sofrimento localizadas nas áreas próximas ao centro de lesão isquêmica. A principal diferença entre as duas ondas é que a despolarização alastrante geralmente não causa nenhum tipo de morte celular danosa ao tecido nervoso normal; já as despolarizações peri-infarto pós-isquemia estão associadas com a evolução espacial (aumento) do dano isquêmico (SASAKI *et al.*, 2009).

### 1.3.5 Inflamação do tecido nervoso pós-isquêmico

Na região do centro isquêmico ocorre excitotoxicidade e morte celular por necrose, fenômeno resultante de lipólise, proteólise, desagregação de microtúbulos e falha metabólica, culminando em perda da homeostase funcional da área do encéfalo afetada pelo AVEi (DIRNAGL *et al*, 1999; LIPTON, 1999). Na periferia da área isquêmica, a intensidade da isquemia no centro e o intervalo de tempo até a reperfusão sanguínea determinam a evolução da lesão total; já na área de penumbra, a morte celular ocorre em função da ativação de mecanismos apoptóticos e de atividade inflamatória (HOSSMANN, 2006; MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

O processo inflamatório do tecido nervoso pós-AVEi envolve vários mediadores como quimiocinas e as citocinas. As quimiocinas, um dos mais importantes fatores inflamatórios, atuam no mecanismo de quimioatração celular (ABBAS, 2003; BANCHEREAU, 2000). No Sistema Nervoso Central (SNC), quimiocinas estão envolvidas no recrutamento de células do sistema imune para o tecido nervoso. Entretanto, esses sinalizadores exercem papel ambíguo, pois ao agirem sobre a modulação da migração de células do sistema imunes para o tecido nervoso lesionado, o nível dessas quimiocinas na área de lesão é determinante para a intensidade da resposta inflamatória e influenciam diretamente na sobrevivência, ou não, dos neurônios em sofrimento (CONDUCTIER *et al.*, 2010; GOMES LEAL, 2012; MADRI, 2009; MOCCHETTI *et al*, 2013; SUZUMURA, 2013).

Citocinas, outros sinalizadores liberados durante processos inflamatórios, são polipeptídeos relacionados com a ativação imunológica, diferenciação celular e também morte celular (CHEN *et al*, 2010). No cenário isquêmico, citocinas são produzidas principalmente por macrófagos, monócitos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e plaquetas sendo que no SNC sua origem são as micróglia em atividade imune (micróglia ativadas) (CHEN *et al*, 2014; WANG *et al*, 2014). Citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (*tumoral necrosis factor* – TNF $\alpha$ ) e a interleucina 1 (IL–1) desencadeiam dano parenquimatoso, IL–10 e receptor antagonista de IL–1 apresentam função anti-inflamatória e neuroprotetora (DEB *et al.*, 2010; WANG *et al*, 2014).

As células inflamatórias do sistema imune, tais como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células NK (Natural Killer Cell) liberam outras citocinas, como a IL-6, associada à ativação de células endoteliais, estimulação da Proteína C reativa (CRP), e com síntese de fibrinogênio (CHEN *et al*, 2010; MARK *et al*, 2010; WANG *et al*, 2014). Elevadas concentrações de CRP e fibrinogênio produzem efeitos deletérios na ocorrência da inflamação (CHEN *et al*, 2010; LOANE & BYRNES, 2010; SHENHAR-TSARFATY *et al.*, 2008;).

## 1.4 RESPOSTA CELULAR INFLAMARÓRIA AO AVEI

### 1.4.1 Monócitos

Monócitos são células circulantes no sangue, medula óssea e baço; são células efetoras do sistema imune e não se proliferam em estado fisiológico normal. Na superfície de sua membrana plasmática, estas células possuem receptores de quimiocinas e receptores de adesão que medeiam sua migração a partir do sangue para os tecidos alvos durante a infecção. Os monócitos produzem citocinas inflamatórias e fagocitam células e moléculas tóxicas ao organismo, bem como podem se diferenciar em células dendríticas inflamatórias, ou em macrófagos, durante processos inflamatórios (VOGELGESANG, BECKER & DRESSEL, 2014). A migração para os tecidos e sua diferenciação em células dendríticas e macrófagos são determinadas pelo ambiente inflamatório e pelos receptores ativados durante o processo de reconhecimento de patógenos (ABBAS, 2003; VOGELGESANG, BECKER & DRESSEL, 2014). No AVE, a distinção entre monócitos e macrófagos/microglia é investigada para diferenciar a atuação da resposta inflamatória sistêmica ou local na evolução da lesão isquêmica, pois durante a fase aguda da lesão a atividade macrofágica é exercida tanto por microglia residente do tecido nervoso, quanto por monócitos oriundos do sangue periférico (ABBAS, 2003; BECKER, 2009). Devido à estas características, a compreensão do papel da linhagem monocítica no local de lesão isquêmica é imprescindível no desenvolvimento, eficiência e estabelecimento de novas abordagens terapêuticos que visam proteger e/ou



recuperar o tecido nervoso lesionado após AVEi (BECKER, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010; GUILLEMIN & BREW, 2004).

#### 1.4.2 Macrófagos

Macrófagos são células fagocíticas atuantes em tecidos linfóides e não-linfóides, envolvidos na homeostase por sua função fagocitária e produtora de fatores tróficos. Os macrófagos possuem ampla diversidade e quantidade de receptores para reconhecimento de patógenos e modulação positiva da produção de citocinas inflamatórias (BLAYLOCK, 2013; GEHRMANN *et al.*, 1995). As alterações citoquímicas que ocorrem após um evento isquêmico promove a ativação e a migração de macrófagos perivasculares e, concomitantemente, os monócitos/ macrófagos sanguíneos e linfócitos atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) rompida a fim de alcançarem a área de lesão (GEISSMANN *et al.*, 2010; LAKHAN *et al.*, 2013; SEO *et al.*, 2012; SCHROETER & JANDER, 2005).

#### 1.4.3 Microglia

Monócitos derivados do sangue ou da medula óssea, permeáveis a BHE, em condições fisiológicas, tem a capacidade de se fixar no parênquima do tecido nervoso como células da micróglia (GOMEZ PERDIGUERO *et al.*, 2013). Células micrógliais têm morfologia ramificada, quando apresentam o fenótipo de micróglia ativada possuem morfologia ameboide, expressam os mesmos marcadores de superfície de macrófagos e monócitos circulante (GOMES LEAL, 2012; GOMEZ PERDIGUERO *et al.*, 2013). A ativação microglial se dá no início da resposta inflamatória do SNC ao evento isquêmico, pode ser seguido de infiltração de monócitos circulantes, neutrófilos e células T do sistema imune, além de astrogliose (KELLER *et al.*, 2011; LEHNARDT *et al.*, 2008). As mudanças na morfologia microglial e na sua expressão gênica variam dependendo da natureza, da força e da duração do estímulo inflamatório (CUI & BENOWITZ; 2009; KELLER *et al.*, 2011; RANSOHOFF & PERRY, 2009).

As células microgliais possuem caráter proliferativo em respostas a um dano no SNC, induzindo alterações no nicho isquêmico neuronal. Células

micróglias ativadas produzem e liberam várias citocinas inflamatórias, radicais livres, óxido nítrico, metaloproteases e glutamato, atuantes na regeneração e são potencialmente neurotóxicos (GRAEBER & STREIT, 2010; JIANG *et al.*, 2011).

A presença de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* – MHC) e de moléculas co-estimuladoras fazem com que as células microgлияis ajam como células apresentadora de antígeno (ABBAS *et al.*, 2003). Todavia, a inflamação aguda (a resposta inflamatória iniciada imediatamente após o evento isquêmico), com atuação da ativação microgлияal em fenótipos distintos (fenótipos ativados e fenótipos não-ativados), pode prejudicar os neurônios que estão em sofrimento em consequência à baixa súbita na quantidade de ATP, mas ainda apresentam potencial recuperação e sobrevivência pós-isquêmica, e isto pode agravar o dano primário provocado pelo AVEi (aumento da área do centro isquêmico, cujas células irão inevitavelmente morrer) (ABBAS *et al.*, 2003; JIANG *et al.*, 2011). Perante isto, uma abordagem terapêutica potencialmente benéfica seria a inibição microgлияal como estratégia para diminuir a lesão isquêmica, bem como todas as suas repercussões morfo-funcionais.

Contudo, estudos sugerem que fenótipos de microgлияs/macrófagos e seus fatores secretados também possam proteger as células residentes do SNC (GOMES LEAL, 2012; MILLS, 2012; SHECHTER e SCHWARTZ, 2013). O fenótipo microgлияal está relacionado com o tipo de estímulo e com o receptor de ativação acionado, ou seja, a natureza das moléculas secretadas pelas microgлияs ativadas, relaciona-se estritamente ao tipo de estímulo acionador (DEIERBORG *et al.*, 2010; GOMES LEAL, 2012; NEUMANN *et al.*, 2006; RIBES *et al.*, 2010; ZANIER *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2005).

No presente trabalho, propomos analisar a resposta de mudança fenotípica das células microgлияis sob condição isquêmica focal experimental do córtex sensório-motor após tratamento com terapia celular usando transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea.

#### 1.4.4 Astrócitos

Num contexto de hipoperfusão sanguínea, isquemia e alterações fisiopatológicas pós-isquêmica, células astrocíticas são mais resistentes que os neurônios, realizam sua resposta celular e molecular através da produção de mediadores inflamatórios, como os radicais livres, as citocinas, as quimiocinas, proteases e mediadores vasoativos (ABBAS *et al* 2003; FITCH & SILVER, 2008). Astrócitos exercem função importante na captação fisiológica de glutamato livre no parênquima do tecido nervoso, entretanto ao serem afetados pelo ambiente isquêmico, os próprios astrócitos liberam glutamato para o espaço extracelular, agravando ainda mais a excitotoxicidade (KAWANO, *et al.*, 2012).

Após o AVEi, na região periférica à área de lesão, ocorre o aumento da densidade astrocítica e da expressão da proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP), caracterizando a astrogliose, cronicamente formando uma barreira física de contenção da área de lesão chamada de cicatriz glial, impedindo assim o crescimento da área lesionada (FITCH & SILVER, 2008; KAWANO, *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo que a cicatriz glial exerce papel fundamental na contenção da expansão da área de lesão no tecido nervoso causada pelo AVEi, ela se torna uma área contida e inacessível ao recrescimento axonal e dendrítico, anulando assim qualquer potencial capacidade de regeneração estrutural e funcional da referida área lesionada (KAWANO, *et al.*, 2012).

A astrogliose é estimulada, também, por citocinas secretadas das células microgлияis, portanto a modulação da intensidade de ativação microglial pode atuar na modulação da astrogliose e potencialmente ter ação na diminuição da progressão da neurodegeneração (SCHMID-BRUNCLIK *et al.*, 2008; STREIT *et al.*, 2009).

No presente trabalho, propomos analisar a resposta astrocítica e formação da cicatriz glial após isquemia focal experimental do córtex sensorio motor e tratamento com terapia celular usando transplante autólogo de células mononucleares da medula óssea.

## 1.5 ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NO SNC APÓS O AVC

As manifestações clínicas dos efeitos do AVE são variadas dependendo da região encefálica afetada (LO, *et al.*, 2003). Se o hemisfério acometido for o hemisfério direito, a lesão é evidenciada no funcionamento sensorial/motor do lado esquerdo do corpo (lado contralateral à lesão isquêmica), podendo determinar problemas de visão, perda somatossensorial do hemicorpo contralateral, alteração de marcha e perda de memória. Se o hemisfério esquerdo for o acometido pelo AVE, podem ocorrer manifestações funcionais como paralisia do lado direito do corpo, problemas cognitivos, perda somatossensorial do hemicorpo contralateral (*AMERICAN HEART ASSOCIATION*, 2011, 2015).

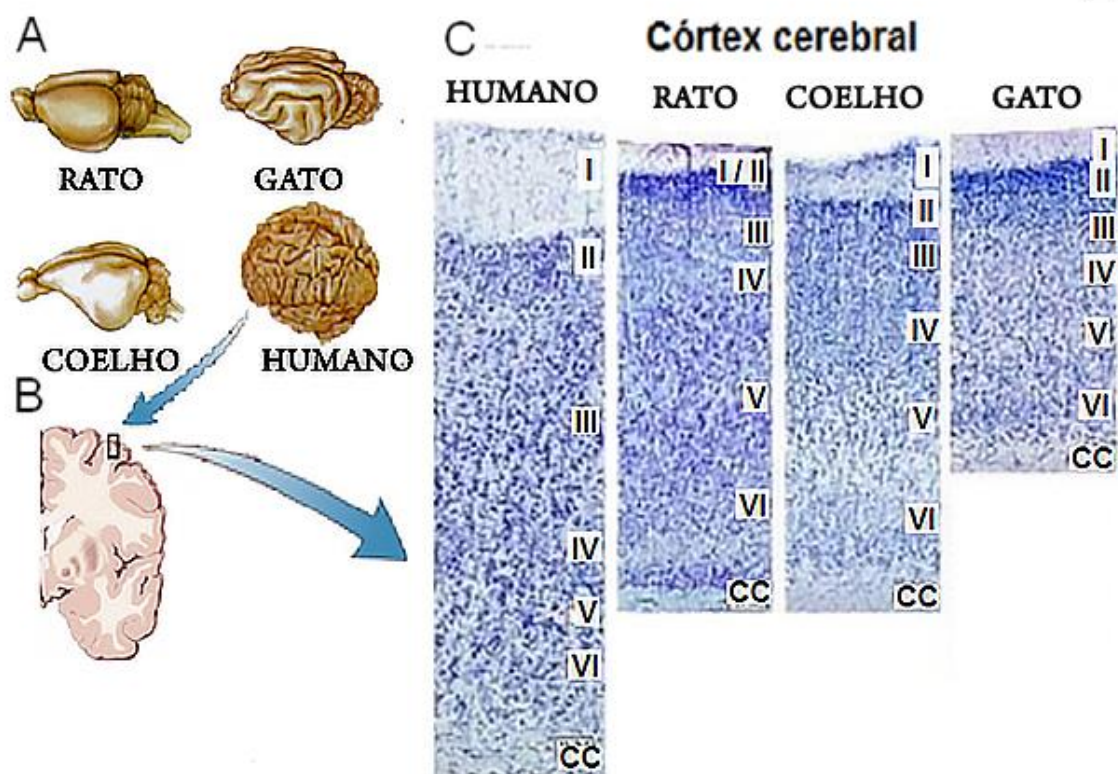
No córtex cerebral, as alterações funcionais se expressam respeitando a organização funcional da área afetada. No córtex motor primário (M1), por exemplo, um AVE em determinada parte desta área cortical pode se manifestar funcionalmente em comprometimento parcial ou total dos movimentos específicos referentes ao conjunto de músculos que a área afetada controlava. Ou seja, se o AVE ocorrer numa região de M1 que controla o membro superior (ou a face), então estas partes do corpo, contralateral à lesão isquêmica, deixarão de ter seus músculos contraídos (MCNEAL, *et al.*, 2010).

As perdas funcionais advindas de um evento isquêmico podem ter relativo reestabelecimento e esta recuperação vai depender diretamente da intensidade da lesão e de eventual intervenção terapêuticas. Esta recuperação funcional tem relação direta com a restauração da área lesionada, com o remodelamento da área peri-lesão e, minoritariamente, com hemisfério contralateral assumir o controle da função perdida (HERMANN & CHOPP, 2012; HOSP & LUFT, 2011).

## 1.6 ORGANIZAÇÕES CORTICAIS CEREBRAIS DOS MAMÍFEROS E OS ALVOS MAIS FREQUENTES DE AVE

A parte mais externa do encéfalo de mamíferos é denominada córtex cerebral (telencéfalo; FIGURA 3a, b). O córtex cerebral pode ser dividido em

alocórtex e isocórtex (ou neocórtex) (ZILLES & WREE, 1995). Teorias evolutivas consideram o neocórtex como a região filogeneticamente mais recente, organizado em pelo menos seis camadas conservadas entre todos os mamíferos (FIGURA 3 c). Cada camada contém neurônios com propriedades funcionais semelhantes e variando sua conformação dependendo do comprometimento funcional da área do córtex (FIGURA 4) (MOUNTCASTLE, 1997; SCHIEBER, 2001, BUXHOEVEDEN & CASANOVA, 2002). Em humanos adultos, a superfície do córtex cerebral é de aproximadamente 2600 cm<sup>2</sup>, com cerca de 28 milhões de neurônios e quantidade aproximada de célula da glia (KAAS, 1995; LENT, 2012; MOUNTCASTLE, 1997).

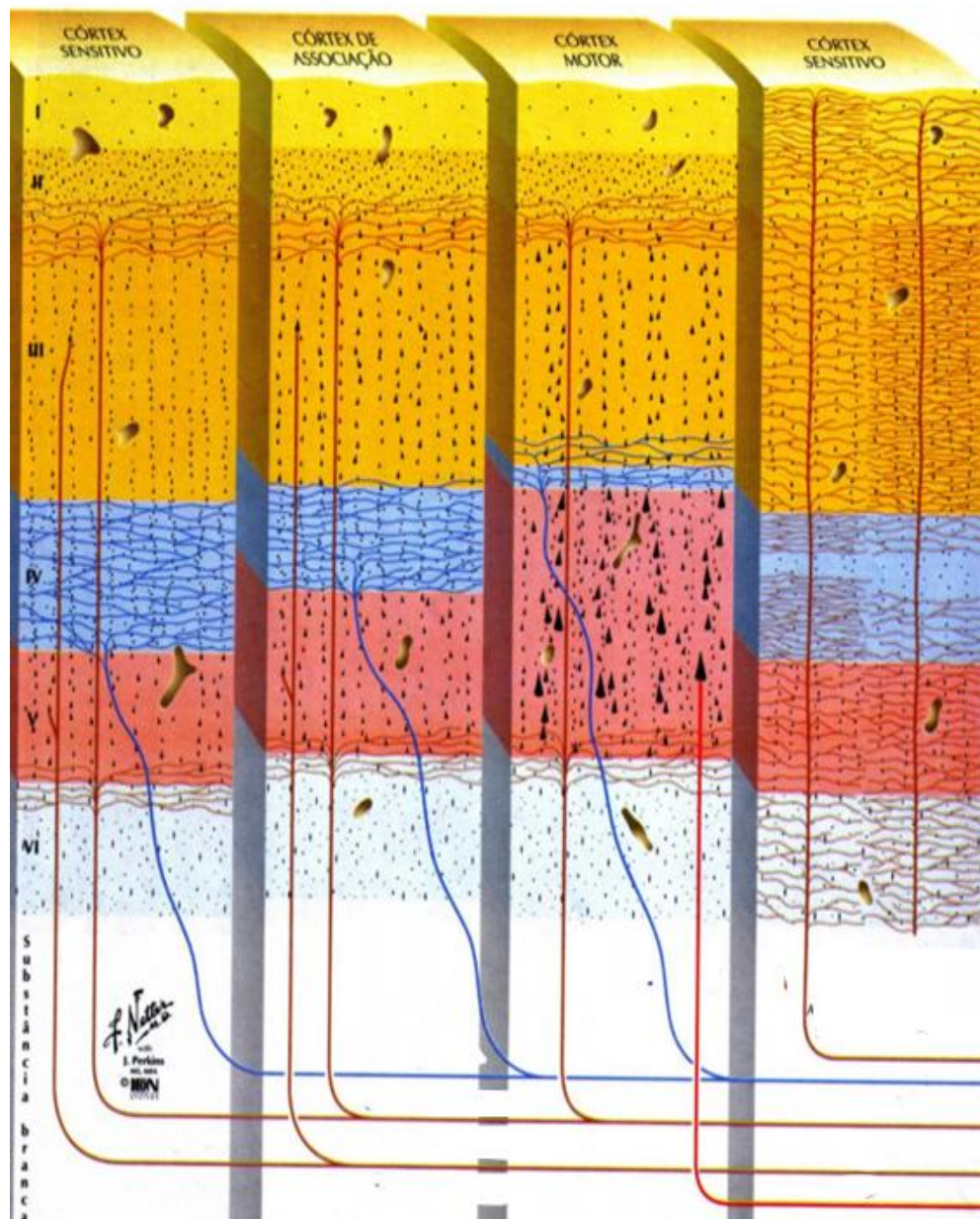


**FIGURA 3- Organização laminar do Córtex cerebral de mamíferos.** Representação do encéfalo de diferentes mamíferos (A). Desenhos esquemáticos de uma seção coronal do encéfalo cerebral humano demonstrando a região do córtex cerebral (B). Organização em camadas (laminar) corticais em mamíferos; camadas I a VI e corpo caloso (I, II, III, IV, V, VI e CC) em diferentes espécies de mamíferos

Fonte: Adaptado de DeFelipe, 2011.

O córtex cerebral recebe, processa e interpreta impulsos elétricos provenientes das vias ascendentes, cujos receptores sensoriais estão na

periferia do corpo captando estímulos do ambiente, e produz estímulos nervosos (na forma de potenciais de ação nos neurônios) ordenados e relacionados ao controle dos movimentos voluntários, fenômenos psíquicos e funções cognitivas tais como memória e linguagem (escrita, gestual e vocalizada), por vias descendentes (FIGURA 4) (MOUNTCASTLE, 1997).

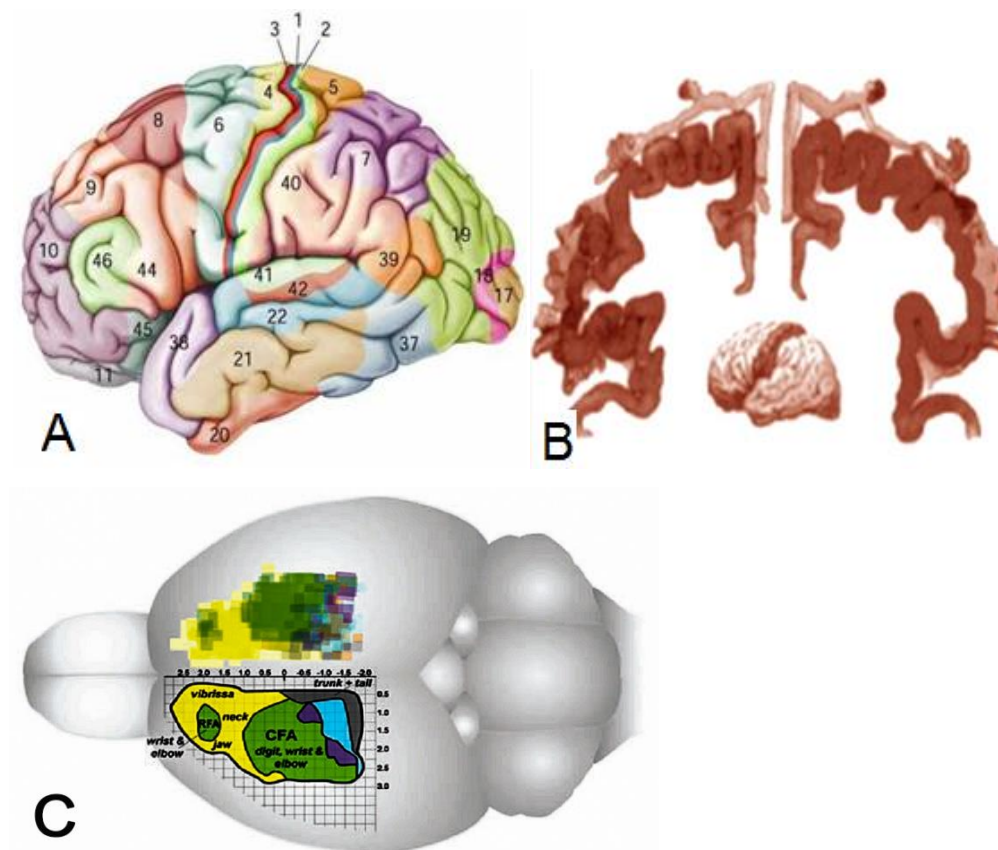


**FIGURA 4 – Organização Colunar, da superfície pial até a substância branca, da organização neural em diferentes áreas corticais.** Limitações de camadas corticais didaticamente representadas em cores.

Fonte: Adaptado de [Felten](#) & [Shetty](#), 2010.

Na região parietal-frontal do córtex cerebral encontra-se a área motora primária (M1), o ponto de origem do trato córtico-espinhal. Em humanos, esta área corresponde à área 4 de Brodmann e se localiza no giro pré-central do lobo parietal (FIGURA 5a) (GEYER, *et al.*, 2000). A área M1 possui representação topograficamente organizada dos músculos localizados nos correspondentes segmentos corporais e quanto mais refinado e complexo o movimento de um segmento corporal, maior será área de representação cortical deste segmento corporal em M1 (FIGURA 5b) (PENFIELD, 1947). A ocorrência de um episódio isquêmico no córtex motor provocará comprometimento das funções motoras, diretamente correspondente à área afetada e à extensão da lesão isquêmica (TENNANT *et al* 2011).

A área motora do córtex cerebral de outros animais também tem sua representação topográfica organizada (FIGURA 5c). O córtex sensório-motor de ratos é amplamente estudada, com representações motoras dos membros bastante conhecida na literatura e amplamente utilizada em trabalhos experimentais (TENNANT *et al* 2011). Esse fato é de grande importância para ciência experimental, pois favorece o desenvolvimento de estudos de ensaios pré-clínicos.



**FIGURA 5- A organização topográfica do córtex motor em diferentes espécies de mamíferos.** Ilustração das Áreas de Brodmann (A) e a representação topográfica da áreas motora primária (M1) em seres humanos (B). Mapa do córtex sensorio-motor de ratos (C).  
**Fonte:** A e B adaptado de Bear, 2008, e C adaptado de Tennant, *et al* 2011.

No presente trabalho utilizamos de modelos de isquemia focal em córtex sensorio-motor, para mimetizar alterações relacionadas ao AVEi e assim avaliar influência de transplante autólogo de CMMO nos parâmetros aqui propostos.

## 1.7 ESTRATÉGIAS CLÍNICAS PARA O TRATAMENTO DE CASOS DE AVEi

O AVE isquêmico apresenta janela temporal relativamente curta, quando se fala em avaliação, diagnóstico e tratamento (CUMBLER *et al.*, 2010). Clinicamente, as ações iniciais de tratamento do indivíduo acometido por AVEi envolvem intervenção imediata em comportamentos de risco tais como



tabagismo e alimentação rica em lipídeos, bem como intervenção farmacológica, utilizando agentes como antitrombolíticos, anti-hipertensivos e anticoagulantes (CAMARGO *et al.*, 2005). Atualmente, existem intervenções com limitação clínica, social, e/ou econômica, como a administração endovenosa do ativador do plasminogênio tecidual (tPA). O tPA atua na lise de trombos, sendo eficientemente atuante até nas 3 a 5 horas seguinte ao início do evento isquêmico. Esta é uma intervenção com janela terapêutica restrita para muitas das realidades regionais e/ou sociais e sua intervenção posterior a esta janela pode ocasionar distúrbios que agravam o evento isquêmico (DEWAR *et al.*, 1999; HEUSCHMANN *et al.*, 2003; LAKHAN *et al.*, 2009; PANDIAN, 2009; SACCO *et al.*, 2007).

Devido à sua relevância epidemiológica, clínica e econômico-social, torna-se imperativo o desenvolvimento de terapias alternativas às já existentes para serem empregadas em pacientes acometidos por AVEi. No presente trabalho, utilizaremos o transplante autólogo de CMMO como terapia para tratamento ao AVEi experimental.

## 1.8 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE AVE

Além da preocupação com o reestabelecimento e normalização da irrigação sanguínea para a área encefálica acometida por AVEi, as pesquisas concentram-se na modulação e normalização das funções celulares alteradas em decorrência do curso da doença ainda na fase aguda, com fim de preservação e regeneração da área afetada (CARDOSO *et al.* 2012; FRANCO *et al.* 2012; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013)

O papel ambíguo do processo inflamatório no curso do evento isquêmico vem sendo alvo de discussões e controvérsias, visto que o processo inflamatório apresenta papel fundamental na contenção do infarto ocasionado pelo AVEi (GOMES-LEAL, 2012). Por outro lado, a intensidade da resposta inflamatória é um fator limitante para sobrevivência de tecidos nervoso em sofrimento, bem como para o estabelecimento de células migratórias com fins

regenerativos, por interferir na sobrevivência dessas células e gerar um meio deletério para a integração celular ao tecido em regeneração devido a formação de barreiras físico-químicas como astrogliose e produção excessiva de matriz extracelular que, conseqüentemente diminuem a possibilidade de formação ou restabelecimento de novas sinapses para a recuperação funcional da área cerebral cortical afetada (SHARMA, *et al.*, 2012)

A modulação do processo inflamatório é potencialmente uma abordagem que propicia maior proteção e regeneração do tecido infartado. Estes efeitos podem ser expressos funcionalmente, dispondo melhora na qualidade de vida do indivíduo acometido pelo AVE. Algumas estratégias terapêuticas vêm sendo propostas e uma das mais promissoras envolve utilização de fármacos e terapia celular com efeitos anti-inflamatórios (CARDOSO *et al.*, 2012; FRANCO *et al.*, 2012).

A utilização de anti-inflamatórios como estratégia terapêutica tem sido utilizado em modelos experimentais de estudos de AVE . A ação desses fármacos se dá desde atuação gênica à proteica, interferindo na produção e/ou atuação de proteínas e conseqüentemente na resposta inflamatório pós-AVEi (NAM, *et al.* 2013; TURNER, *et al.* 2013; XIONG, *et al.* 2013). Entretanto, a resposta inflamatória no tecido nervoso provocada por AVEi é complexa e multifatorial, devido à ação de diferentes células que produzem diversos fatores pró-inflamatórios e/ou anti-inflamatórios.

Nesse contexto, é imprescindível o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias que possibilitem execução de estudos relacionados ao AVE, assim como terapias mais eficientes na proteção e recuperação do tecido nervoso em sofrimento após um AVEi, para que assim se possa compreender cada vez mais essa doença, gerando-se assim a oportunidade de desenvolver abordagens terapêuticas de cunho protetor e/ou regenerativo.

Os atuais modelos para estudos de AVE baseiam-se em comprometimento cerebrovascular produzido por cauterização ou oclusão transitória, ou permanente, de vasos sanguíneos que realizam a irrigações para o tecido nervoso (CARMICHAEL, 2005). Um modelo experimental que passou a ser amplamente utilizado é o de isquemia induzida por vasoconstrição provocado

por microinjeção intraparenquimatosa do peptídeo de Endotelina-1 (ET-1) (FUXE *et al.*, 1989).

ET-1 é um peptídeo descrito em 1988 por Yanagisawa e colaboradores como um potente vasoconstritor, age como mensageiro químico no organismo, fazendo comunicação com células dotadas de receptores ETA e ETB (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Tem sua síntese realizada em diferentes órgãos, como coração, pulmão, encéfalo, por células do sistema imune e células endoteliais dos vasos sanguíneos (MERGENTHALER *et al.*, 2004). Fisiologicamente, devido seu caráter vasoconstritor, ET-1 tem atuação mais evidente no controle do tônus vascular (DAVIE *et al.*, 2002), caráter este de principal importância em sua utilização em modelos experimentais de isquemia focal (HEWLETT & CORBETT 2006; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013; TENNANT & JONES 2009).

## 1.9 TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O TRATAMENTO DE AVE

Os protocolos primários de intervenção terapêutica para tratamento dos casos de AVEi, e de prevenção secundária, visam a modificação dos fatores de risco vasculares – a hipertensão, o tabagismo, a estenose carotídea, a fibrilação arterial, a inatividade física, a diabetes mellitus e a dislipidemia – com conscientização e utilização de medicamentos tais como os agentes antiplaquetários, as drogas anti-hipertensivas, os agentes que combatem as dislipidemias, e as medicações anticoagulantes (CAMARGO *et al.*, 2005; CUMBLER *et al.*, 2010).

O recurso medicamentoso mais recente foi a implementação da administração endovenosa do ativador do plasminogênio tecidual (tPA, *tissue plasminogen activator*) nos casos de isquemia cerebral aguda, porém sua eficácia pode ser limitada pela severidade da isquemia, pela idade avançada do paciente, por condição de hipertensão do paciente acometido, pelo tamanho da oclusão arterial, ocorrência de suprimento sanguíneo colateral, pelo período de tempo entre o evento isquêmico e o início do tratamento ou pela inflamação associada à reperfusão da área infartada (PANDIAN, 2009).

Apesar do uso ser aprovado há aproximadamente 10 anos pelo FDA (do acrônimo inglês *US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION*, órgão americano que controla a liberação de comida e remédios para consumo), a utilização do tPA para o tratamento da isquemia encefálica aguda ainda é incomum, tendo um alcance de apenas 3 a 5% dos pacientes em virtude da janela temporal de aplicabilidade reduzida para sua administração de forma segura (DENES *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2009). Além disso, outro fator complicador, que ocorre em países em desenvolvimento como o Brasil é a desinformação acerca do tPA e a reduzida disponibilidade do medicamento nos sistemas públicos de saúde. Isto evidencia uma falha no tratamento aos pacientes na janela terapêutica adequada e, consecutivamente, prejudica a chance de sobrevivência e a possibilidade de atenuação das complicações da doença (CUMBLER *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2009; SACCO *et al.*, 2007). Desta forma, observa-se que a terapia trombolítica está altamente relacionada ao tempo de resposta ao AVE e não somente limita às opções de tratamento, mas também pode representar piores prognósticos, devido ao prolongamento do tempo da isquemia (DENES *et al.*, 2010).

Por isso, muitos tratamentos experimentais tem sido testados em sua eficácia e segurança, principalmente visando a restauração da perfusão sanguínea para a área infartada, assim como a indução de Neuroproteção da área afetada (SACCO, 2007), dentre os quais se destaca o uso da hipotermia terapêutica (ALAM, 2011), que se consiste na estratégia de neuroproteção mais confiável atualmente, a administração de altas doses de albumina humana (GINSBERG *et al.*, 2004), a utilização de drogas anti-inflamatórias, como a minociclina (YRJÄNHEIKKI *et al.*, 1999), uso de drogas trombolíticas (HACKE *et al.*, 1995) e, mais recentemente, o transplante de células-tronco (OTERO-ORTEGA *et al.*, 2015; TARAWNEH & GALVIN, 2010) com o objetivo de induzir a reperfusão da área sob isquemia, modular a neuroinflamação, bloquear o avanço da lesão isquêmica e tentar recuperar as células da área de penumbra isquêmica.

### 1.9.1 A Terapia Celular no Tratamento do AVEi

O papel ambíguo do processo inflamatório no curso do evento isquêmico no tecido nervoso vem sendo alvo de discussões (BAJETTO *et al.*, 2001; CONDUCTIER *et al.*, 2010, GOMES-LEAL 2012), visto que o processo inflamatório apresenta papel fundamental na contenção do infarto ocasionado pelo AVEi, pois a intensidade da resposta inflamatória é um fator limitante para sobrevivência de tecido nervoso com potencial recuperação e preservação, principalmente das células que estão na área de penumbra isquêmica. A modulação do processo inflamatório é uma abordagem que possibilita maior proteção e regeneração do tecido infartado (FRANCO *et al* 2012), podendo esses efeitos serem expressos funcionalmente, promovendo melhora na qualidade de vida do indivíduo acometido pelo AVE. Algumas propostas terapêuticas vêm sendo estudadas e uma das principais abordagens envolve utilização de terapia celular.

A terapia celular, como tratamento para pacientes acometidos por AVEi, surge como uma intervenção com possibilidade modulatória a neuroinflamação, utilizando células tronco, suas funções tróficas, sua capacidade de liberação de fatores anti-inflamatórios e pró-regenerativos oportunos durante um evento isquêmico para diminuição de perda tecidual e de resposta inflamatória (BRENNEMAN *et al*, 2010; VASCONCELOS DOS SANTOS *et al*, 2010). Células-tronco (CT) são células não-diferenciadas, auto-renováveis, com caráter pluripotentes ou multipotentes, dependendo do tipo de tecido de origem, com proliferação intensa, possibilitando uma fonte ilimitada de células e podem até sofrer manipulação *in vitro* para originar uma grande variedade de tipos celulares (KEIRSTEAD, 2005; NAEGELE *et al*, 2010). São categorizadas em células-tronco embrionárias e somáticas.

As células mononucleares da medula óssea são células somáticas e podem ser divididas em dois tipos, células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM) devido se diferenciam em células de linhagem hematopoiética ou células de linhagem mesenquimal, respectivamente (SOO OH *et al*, 2010). As CTH dão origem às células sanguíneas, as CTM podem se diferenciar em vários tipos celulares incluindo osteócitos, condrócitos,

adipócitos e miócitos (KRABBE *et al*, 2005). Os dois grupos representam importantes fontes celulares que podem ser facilmente obtidas e isoladas de aspirados da medula óssea, possibilitando uma fonte autóloga de rápida obtenção (WRIGHT *et al*, 2010).

Alternativas terapêuticas experimentais têm sido alcançadas com sucesso usando células-tronco em diversas doenças neurológicas, incluindo o AVEi (BRENNERMAN., *et al*, 2010; GOGEL, S.; GUBERNATOR, M. & MINGER, S. L., 2011; HESS *et al.*, 2008). Entre as linhagens celulares utilizadas, a fração mononuclear de células da medula óssea (CMMO) desponta com resultados promissores, destacando-se como fonte alternativa à aquisição de células-tronco para transplante com fácil obtenção e não estão envolvidas em questões éticas ou religiosas, além de manifestarem pluripotência, ou seja, podem se diferenciar em células de diferentes tecidos (DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A., *et al.*, 2010, GIRALDI-GUIMARAES, A., *et al.*, 2009). O transplante autólogo emerge com benefício adicionais aos estudos experimentais tal qual a minimização de efeitos adversos relacionado à possíveis reações imunológicas relacionadas à terapia celular de linhagens heterólogas (BRENNERMAN., *et al*, 2010; KAN, MELAMED & OFFEN, 2007).

#### 1.10 JUSTIFICATIVA

Doenças cerebrovasculares são potencialmente fatais e incapacitantes (DONNAN, G. A., *et al.*, 2008). Com fisiopatologia complexa, quando não leva à morte, aos sobreviventes restam variados graus de debilidades físicas, cognitivas e/ou psíquicas (DOBKIN, B. H., 2005; LEGG, L. e LANGHORNE, P., 2004; WARD, A. B., 2012). Mesmo com toda gravidade e severidade em suas sequelas, ainda hoje a única opção terapêutica aprovada para o tratamento das complicações desta doença é o rTPA (ISHISHITA, Y.; KIMURA, T. e MORITA, A., 2012, MAKIHARA, N., *et al.*, 2012). Isso evidencia a necessidade de investimentos em mais estudos que possam ampliar o leque de opções terapêuticas para o AVE.

Alternativas terapêuticas experimentais têm sido alcançadas com sucesso no uso de células-tronco em diversas doenças neurológicas, incluindo o AVE (HESS *et al.*, 2008, GOGEL, GUBERNATOR & MINGER 2011). Entre as linhagens celulares, a fração mononuclear de células da medula óssea (CMMO) desponta com resultados promissores, destaque como fonte alternativa à aquisição de células-tronco para transplante e a fácil obtenção e não estarem envolvidas em questões éticas ou religiosas e manifestarem pluripotência no receptor (DE VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010, GIRALDI-GUIMARAES, A., *et al.*, 2009). Além disso, estudo recentes apontam os resultados benéficos do uso de células adultas da medula óssea no tratamento de desordens neurológicas (WISLET-GENDEBIEN, S., *et al.*, 2012). Neste sentido, o transplante autólogo emerge com benefício adicionais aos estudo experimentais tal qual a minimização de efeitos adversos relacionado à possíveis reações imunológicas relacionadas à terapia celular de linhagens heterólogas (KAN, I.; MELAMED, E. e OFFEN, D., 2007). Apesar do uso freqüente de CMMO para o tratamento de diferentes desordens neurológicas experimentais e da atual aplicação de linhagens autólogas em poucos destes experimentais, ainda se tem pouco domínio acerca dos efeitos do tratamento sobre alteração de resposta inflamatória e alteração funcional em tratamentos pós-isquêmicos.

No presente trabalho, utilizamos um modelo experimental de AVEi focal para avaliar os efeitos do implante autólogo de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) sobre isquemia focal da área S1/M1, bem como investigar as repercussões funcionais relacionados ao tratamento. Nossa estratégia de AVEi experimental apresenta a vantagem de ser restrito à área de interesse e, assim, permite avaliar as alterações funcionais específicas por testes comportamentais estabelecidos na literatura. Desta forma, a evolução funcional proporcionada pelo tratamento com CMMOs após o AVEi pode ser avaliada, assim como as alterações histopatológicas.

### 3 OBJETIVO

#### 2.1 GERAL

Avaliar os efeitos morfofuncionais de transplantes autólogos de células mononucleares da medula óssea (CMMO) em modelo experimental de isquemia focal no córtex cerebral.

#### 2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar alterações funcionais de intensidade exploratória em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO;

- Avaliar alterações funcionais de assimetria exploratória em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO;

-Analisar alterações funcionais de padrões locomotores em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO;

-Analisar a preservação tecidual em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO;

-Analisar a neuropreservação em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO;

- Analisar a resposta inflamatória crônica em modelo de lesão isquêmica focal da representação sensório-motora da pata anterior e tratamento com injeções intravenosas de CMMO.



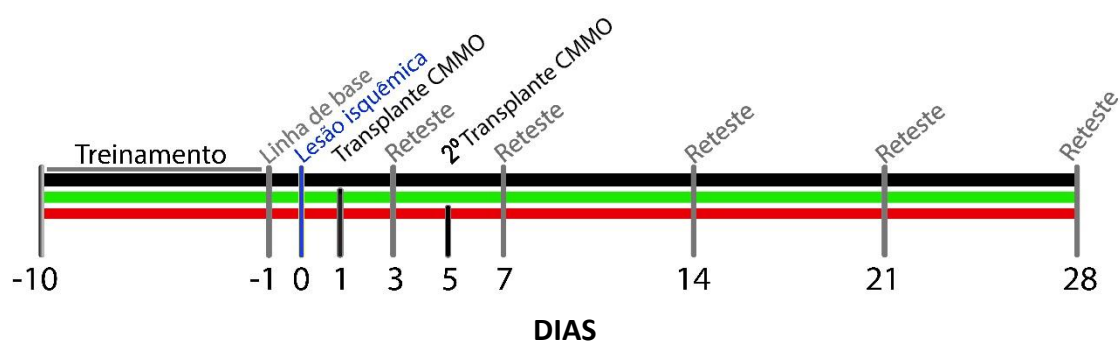
### 3 MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 O MODELO EXPERIMENTAL

Para se alcançar os objetivos deste trabalho, foram utilizados 15 *Ratus norvegicus* machos adultos, da linhagem *Wistar*, com massa corporal entre 250 e 300g e com faixa etária entre 3 e 5 meses.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neuroplasticidade e no Laboratório de Neuropatologia Experimental da Universidade Federal do Pará. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (204-14/CEPAE /UFPA ANEXO ÚNICO ).

Todos os animais foram submetidos à lesão isquêmica no córtex sensorio-motor primário (S1/M1), induzida por microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1, SIGMA). Os animais foram submetidos também aos procedimentos cirúrgicos de extração/coleta da medula óssea femoral/tibial e a testes comportamentais para avaliação funcional da pata anterior afetada pelo AVEi. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: grupo controle (não recebem transplante de CMMO), grupo tratado (recebem um transplante de CMMO) e grupo duplo-tratado (recebem dois transplante de CMMO) (FIGURA 6 e TABELA 1).



**FIGURA 6 - Organização cronológica dos procedimentos experimentais.** Os animais foram previamente habituados e treinados por 10 dias consecutivos antes da realização de tarefa específica durante a realização dos testes comportamentais. O dia 0 (zero) refere-se ao dia da indução isquêmica focal. Os dias 1 e 5 referem-se às sessões cirúrgicas de extração da medula óssea. As linhas verticais cinzas indicam o registro dos testes comportamentais em -1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias referentes ao dia de indução isquêmica. A linha horizontal de cor preta representa o grupo Controle, a linha de cor verde representa o grupo Tratado e, finalmente, a linha de cor vermelha representa o grupo Duplo-Tratado.

**Tabela 1: Grupos experimentais.**

<b>GRUPO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>N</b>
Controle (GC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Animais com lesão isquêmica em S1/M1;</li> <li>• Com medula óssea tibial coletada 1 dia após indução isquêmica e com medula óssea femoral coletada 5 dias após indução isquêmica;</li> <li>• Com injeções intravenosas de veículo 1 e 5 dias após a lesão isquêmica.</li> </ul>	5
Tratado (GT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Animais isquêmicos;</li> <li>• Com medula óssea tibial coletada e processada 1 dia após indução isquêmica e com medula óssea femoral coletada 5 dias após indução isquêmica;</li> <li>• Com injeções de CMMO 1 dia após lesão isquêmica e com injeções de veículo 5 dias após isquemia.</li> </ul>	5
Duplo Tratado (GDT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Animais isquêmicos;</li> <li>• Com medula óssea tibial coletada e processada 1 dia após indução isquêmica e com medula óssea femoral coletada e processada 5 dias após indução isquêmica;</li> <li>• Com injeções de CMMO 1 e 5 dias após a lesão isquêmica.</li> </ul>	5

### 3.2 PROCEDIMENTOS BIOTERIAIS E CUIDADOS COM OS ANIMAIS

Os animais foram mantidos em caixas coletivas, armazenadas em ambiente com temperatura mantida a  $\sim 25^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro (12-12h), com alimento e água *ad libitum*. Para evitar possíveis comportamentos de ansiedade, os animais foram habituados ao local de execução dos testes funcionais e à manipulação humana durante os 3 primeiros dias do período de treino (15 minutos por dia) para posterior execução dos testes comportamentais e obtenção dos dados funcionais.

### 3.3 TESTE DE EXPLORAÇÃO VERTICAL (TESTE DO CILINDRO).

O teste da exploração vertical (ou teste do cilindro) foi utilizado no presente trabalho para avaliar a assimetria motora da pata anterior (SCHALLERT *et al.*, 2000). Sendo um teste sensório-motor, é utilizado para avaliar o uso da pata anterior durante a exploração do ambiente, porém não avalia a realização de uma tarefa motora de maior complexidade, a exemplo da atividade apreensão de um sólido. Este teste também foi utilizado como parâmetro para análise de frequência exploratória que permite comparar a frequência de içadas para se determinar alterações da integridade das faculdades exploratórias motoras gerais do animal (SCHALLERT *et al.*, 2000).

Para a realização deste teste, utilizamos um aparato cilíndrico de vidro com 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura. O cilindro foi alinhado com um aparato composto de duas placas de vidro espelhado, com angulação de 90° entre as placas, de modo a permitir a visualização e captura de mais de um ângulo de visão do animal durante a realização do teste (FIGURA 7).



**FIGURA 7- Teste do cilindro.** Animal experimental sendo submetido à análise de exploração vertical no aparato de teste em situação de içada (A) e pouso (B).

Este teste apresenta a vantagem de não necessitar de quaisquer tipos de condicionamento, habituação ou de pré-treino dos animais no aparato de realização do experimento. Foram analisados cinco minutos de vídeo do animal, a partir do posicionamento do animal no solo do cilindro, em cada evento de teste. Na análise do vídeo, avaliamos a pata anterior (direita ou esquerda) que

primariamente é utilizada para apoio no cilindro ao fim dos eventos de içada e pouso do animal.

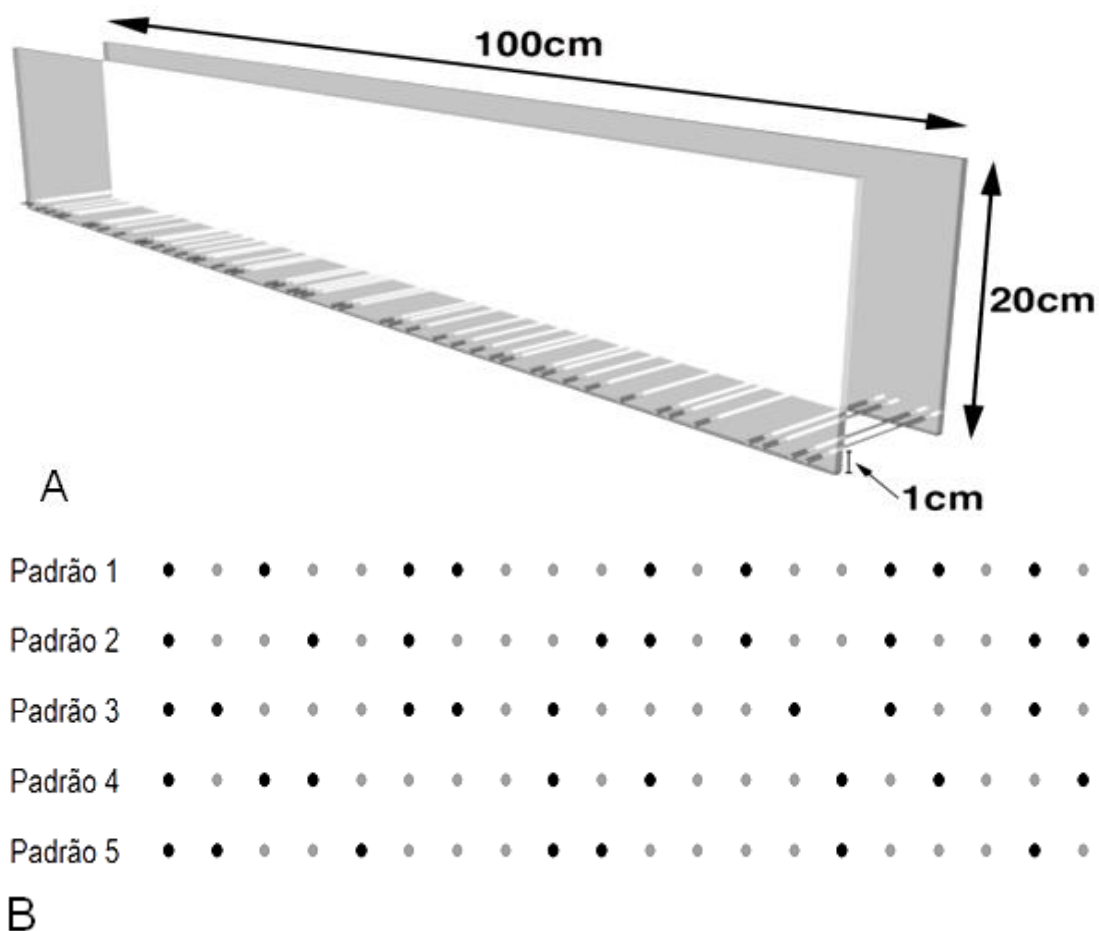
A quantificação do teste de assimetria se deu pelo registro do modo de utilização dos membros anteriores do animal em cada ciclo exploratório no cilindro, que compreende o comportamento entre a içada (quando o animal se projeta à postura bípede) do animal e o pouso ( quando o animal retorna ao posicionamento quadrúpede), com 2 variações de eventos:

- 1) Primeiro contato no solo ou na parede com a pata esquerda;
- 2) Primeiro contato no solo ou na parede com a pata direita.

Os dados quantitativos foram processados em valores percentuais a fim de representar assimetria, demonstrando porcentagem média de utilização da pata esquerda (afetada pela lesão cerebral).

#### 3.4 AVALIAÇÃO DAS HABILIDADES LOCOMOTORAS (TESTE DA ESCADA HORIZONTAL).

O teste da escada horizontal foi realizado em um aparato formado por duas placas acrílicas, tendo cada uma delas, dimensões de 100 cm de comprimento e 20 cm de altura que são interligadas por hastes removíveis de metal com 20 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro (FIGURA 8A). O aparato permite o ajuste da distância entre hastes, possibilitando a modificação da sequência de distribuição das mesmas, alterando a dificuldade de execução do teste (FIGURA 8B). Seguindo descrição de Metz & Whishaw (2009), as placas foram distanciadas, induzindo que o animal percorra o trajeto do aparato entre uma gaiola padrão e sua gaiola nativa de armazenamento em um único sentido, de modo que seja possível a visualizar a realização do teste da pata de interesse. Tem a finalidade de obter demonstração quantitativa da habilidade sensório-motora do membro do animal no momento da execução do teste.



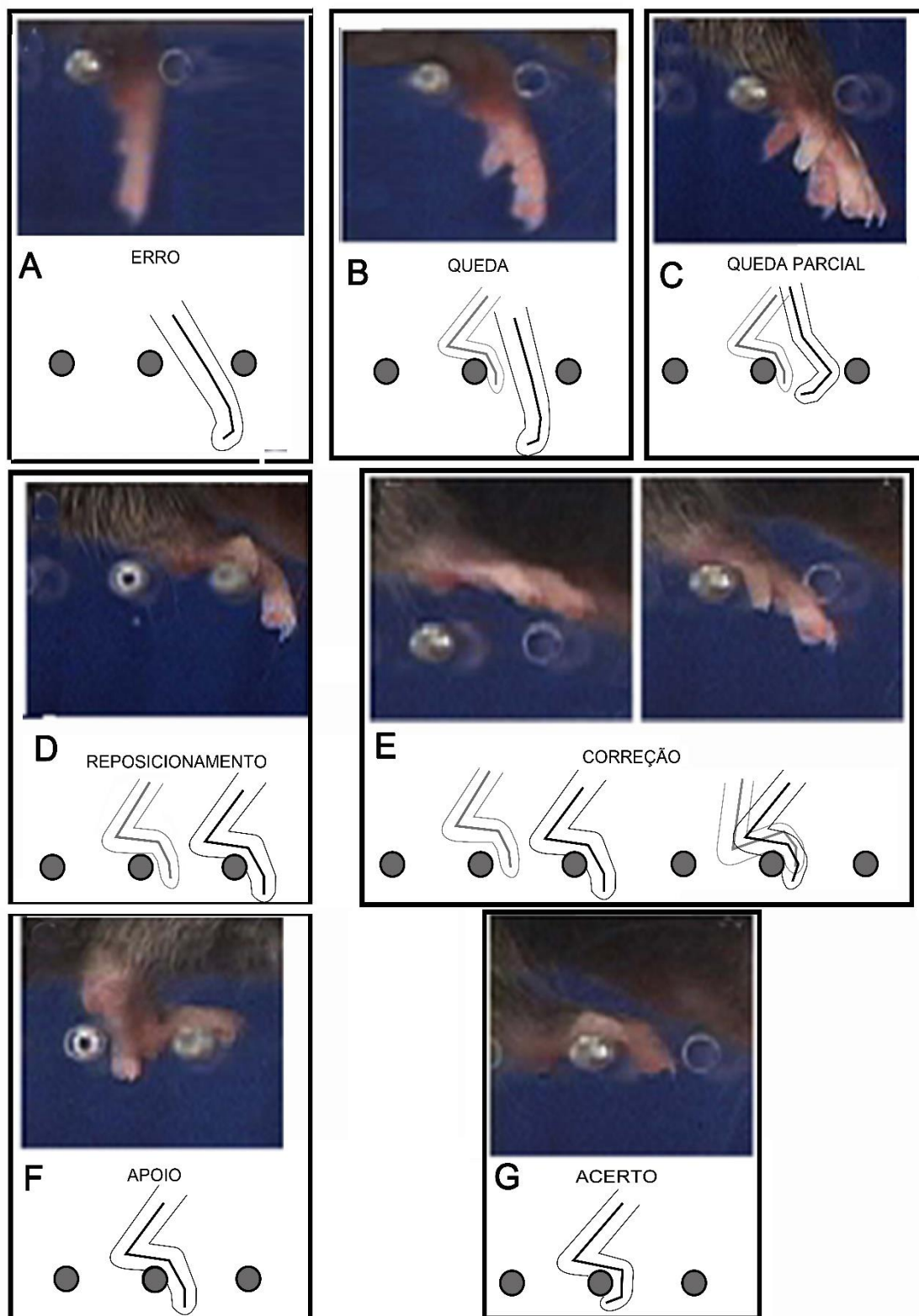
**FIGURA 8- Desenho esquemático da escada horizontal.** (A) Desenho esquemático do aparato. (B) Padrões alternados de distribuição das hastes utilizadas no teste da escada horizontal para todos os animais neste trabalho. Os pontos pretos e cinzas indicam os protocolos que utilizamos com a presença ou ausência das hastes, respectivamente. **Fonte:** (A) adaptado de Metz & Whishaw, 2009.

A análise do teste é realizada tanto de maneira qualitativa, investigando os eventos ocorrentes (TABELA 2), quanto de maneira quantitativa, quantificando a frequência de ocorrência das qualidades dos eventos de passadas do animal durante a realização do teste (FIGURA 9).

**TABELA 2:** Valores atribuídos aos eventos descritos para análise qualitativa do teste da escada horizontal (ver também FIGURA 9).

IDENTIFICAÇÃO	MOVIMENTO	DESCRIÇÃO
(0)	Erro	A pata não faz contato com nenhuma barra e ocorre queda do membro do animal, entre os degraus, perturbando a postura e equilíbrio do animal.
(I)	Queda	A pata exerce contato com a barra e quando ocorre a descarga do peso do animal, o membro escorrega e há a queda profundamente entre os degraus, perturbando a postura e equilíbrio do animal.
(II)	Queda parcial	A pata faz contato com uma barra e quando ocorre a descarga do peso do animal o membro escorrega, mas não há queda. O animal é capaz de manter o equilíbrio e continuar a marcha coordenada.
(III)	Reposicionamento	A pata faz contato com uma barra e antes de ocorrer a descarga do peso do animal e queda do membro, reposiciona em outra barra.
(IV)	Correção	A pata intencionado a fazer contato com uma barra, mas antes de qualquer contato reposiciona-se e faz contato com uma outra barra. A pata faz contato com a barra e reposiciona-se levemente sobre ela.
(V)	Apoio	A pata faz contato com uma barra, de forma parcial, ou seja, com um dedo ou punho e mesmo com a descarga de peso do animal não ocorre a queda.
(VI)	Acerto	A pata faz contato com a barra, com a palma do membro e os dedos fechados, não ocorre queda do membro após a descarga do peso do animal.

**Fonte:** Adaptado de Metz &Whishaw, 2009; Tennant& Jones, 2009).



**FIGURA 9 – Classificação dos movimento durante a realização do teste da escada horizontal.** Variação de eventos de posicionamento do membro anterior na escada horizontal considerados na avaliação. Nos diagramas: Posicionamento inicial da pata (em cinza), Posicionamento final da pata (em preto). **Fonte:** Adaptado de (FARR, *et al.*, 2006).

A análise quantitativa do teste da escada horizontal se deu a partir da frequência das qualidades de movimento: erros (0, I e II), compensações (III, IV e V) e acertos (VI), em cada tentativa.

Com o objetivo de atenuar reações de estresse e ansiedade para este teste, realizamos a habituação dos animais ao aparato em três etapas que ocorreram em dias consecutivos. Inicialmente, por três dias, os animais foram habituados ao toque humano. Em seguida, iniciou-se efetivamente o período de treino no aparato do teste. Os treinos se discorreram colocando o animal em uma gaiola limpa, em uma das extremidades da escada horizontal, e a gaiola nativa na outra extremidade da escada horizontal. A última etapa se deu com os animais já habituados executando o teste de modo similar ao treino nos dias de re-teste, já utilizando as variações de padrões de hastes.

### 3.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS RESULTADOS DOS TESTES FUNCIONAIS DA PATA AFETADA POR AVEi.

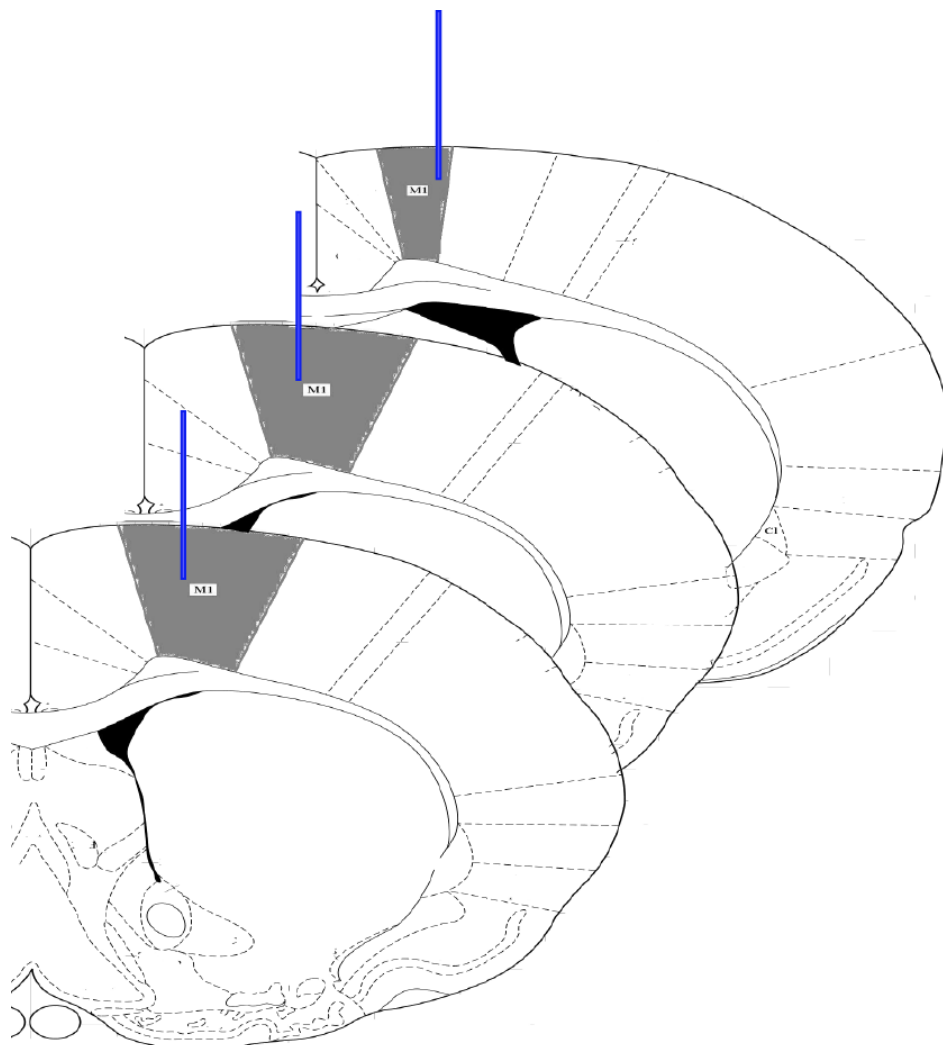
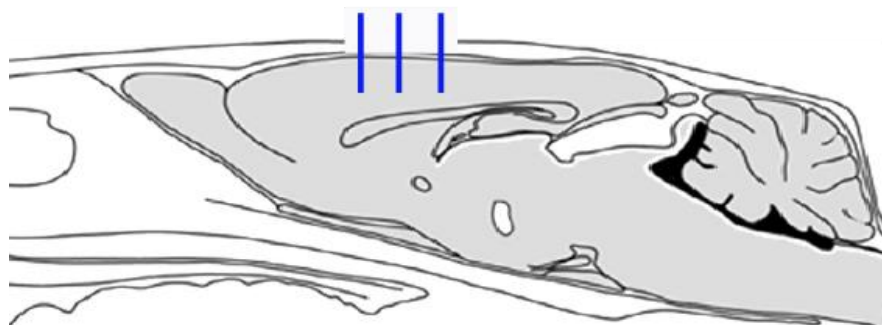
Os testes comportamentais que avaliam a habilidade de locomoção da pata anterior foram realizados nos dias -1, 3, 7, 14 e 27 após indução isquêmica (FIGURA 6), sempre no mesmo ambiente durante todo o período de experimento, com iluminação homogênea e minimização de odores e ruídos, com o objetivo de evitar a indução de estresse nos animais. Os testes comportamentais deste estudo são registrados com o auxílio de uma câmera filmadora digital Sony® (Handycam DCR-SR45) para serem analisados posteriormente. A reprodução dos registros de vídeo foi feita pelo programa de reprodução de mídias *VCL® media player* (Grupo VideoLAN), desacelerando a velocidade de reprodução original e/ou quadro a quadro. A análise dos vídeos se deu por análise *sega*, com identificação individual original oculta e as identificações originais foram resgatadas após a análise do vídeo.



### 3.6 CRANIOTOMIA E INDUÇÃO ISQUÊMICA EXPERIMENTAL

No dia 0 (ver FIGURA 6), foram executados procedimentos cirúrgicos objetivando reprodução de um modelo de lesão cortical isquêmica focal. Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol<sup>®</sup>, König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol<sup>®</sup>, König. 9mg/kg). Após a ausência dos reflexos de dor, a área de incisão foi tricotômizada e higienizadas com álcool iodado, em seguida os animais foram devidamente posicionados em aparelho estereotáxico (Insight<sup>®</sup>, EFF-336).

Utilizando broca cirúrgica odontológica (Carbide 1/2 de 25mm.) realizamos craniotomia para acesso à superfície cortical contendo área correspondente sensório-motora (S1/M1) em coordenadas correspondentes à representação da pata anterior. Com auxílio de micropipeta de vidro calibrada (SIGMA), foram realizadas três microinjeções de meio microlitro (0,5µl) de solução contendo quarenta picoMols (40 pMol) de endotelina-1 (ET-1 - Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) diluída em PBS contendo azul de colanil (pigmento biologicamente inerte - cobre ftalocianina AR-BR 0030). As microinjeções foram realizadas nas seguintes coordenadas estereotáxicas, todas referentes ao Bregma: (-3,0mm Médio-Lateral - ML, -0,5mm Antero-Posterior - AP), (-3,0mm ML, +0,5mm AP), e (-3,0mm ML, +1,5mm AP), respectivamente (FIGURA 10). Após o término das microinjeções, os animais tiveram a incisão cutânea suturada e devidamente higienizada. Após cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o fim da sedação.

**A****B**

**FIGURA 10- Desenho esquemático da craniotomia e da posição das microinjeção de ET-1. Representação de área de microinjeção de ET-1 em plano coronal (A) e em plano parasagittal (B). Fonte: Adaptado de Paxinos, 1982.**

### 3.7 TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CMMO

Nos primeiro e quinto dias pós-isquêmicos, todos os animais deste estudo passaram por cirurgia de extração da medula óssea tibial (1º dia) e femoral (5º dia), respectivamente. Para tanto, os animais lesionados foram anestesiados a partir do mesmo protocolo utilizado na intervenção cirúrgica anterior (ver item 3.6).

#### 3.7.1 Aspiração da Medula Óssea

Para obtenção da medula óssea tibial, os animais foram previamente anestesiados e após a remissão dos reflexos à dor, realizou-se tricotomia e assepsia na região lateral da pata posterior do animal. Com o auxílio de uma lamina de bisturi, realizamos uma incisão cutânea para formar um ponto de acesso à face lateral da tibia. Com uma broca cirúrgica odontológica (Carbide 1/2 de 25mm), fizemos um desgaste pontual entre a face frontal tibial e o músculo tibial anterior. Então, foi completado o acesso ao canal ósseo por inserção de uma agulha conectada à uma seringa de 5ml contendo heparina (20µl) e o meio de cultura DMEM F12 (2ml) (Sigma-Aldrich®, D-8900; 10X1l). A medula óssea da tibia foi aspirada lentamente. Esse procedimento foi realizado em ambas as patas posteriores do animal.

No quinto dia pós-indução isquêmica experimental, os animais foram novamente anestesiados (ver item 3.6) e submetidos a cirurgia para aspiração da medula óssea femoral. Após a remissão dos reflexos dolorosos, realizamos tricotomia e assepsia na região lateral da coxa do animal. Com o auxílio de uma lamina de bisturi, fizemos uma incisão cutânea formando um ponto de acesso ao fêmur entre os músculos glúteo médio e quadríceps femoral, de modo que as fibras musculares de ambos os músculos não fossem substancialmente lesionadas, para visualização da face lateral do fêmur, próximo ao forame nutrício. Então, a partir deste momento, são feitos o desgaste ósseo e aspiração da medula óssea femoral, aos modos de como anteriormente descrito na extração da medula óssea tibial.

### 3.7.2 Separação das CMMO e Transplante autólogo

Para a separação das células mononucleares, a medula óssea coletada foi diluída em solução total de 5ml de meio de cultura DMEM-F12 e soro fetal bovino (200µl - Sigma-Aldrich®) e dissociada mecanicamente até a homogeneização da solução. A seguir, essa solução foi adicionada, cuidadosamente, em um tubo Falcon de 15ml contendo 5 ml de Ficoll-Histopaque® (Sigma-Aldrich®, 10831-6X100XL), de modo que a solução não se misturasse ao Ficoll neste momento. Este preparado foi centrifugado por trinta minutos à 400 G. Após a centrifugação, a faixa intermediária entre o Ficoll e o meio DEMEM F12, a qual foram contidas as CMMOs, foi visualizada, aspirada e lavada em três séries em 2ml de solução DMEM F12 e soro fetal bovino (20µl) por 5 minutos à 2000 rpm, sempre descartando o sobrenadante e ressuspensando a massa restante no tubo, antes da lavagem seguinte.

Após as lavagens, para a avaliação da viabilidade celular, as células foram ressuspensas em solução composta de 180µl de DMEM-F12 e 20µl de soro fetal bovino. Posteriormente, uma alíquota de 50µl foi retirada desta última solução para contagem das células CMMOs, com o auxílio de Câmara de Neubauer (citômetro) para se quantifica as células viáveis, que são selecionadas pelo teste de não incorporação de azul de Tripán , onde as células viáveis foram diferenciadas das células inviáveis, uma vez que células viáveis não incorporam Azul de Tripán para seu citosol (BRENNEMAN *et al* 2010; CARDOSO *et al* 2012). Em seguida, um montante aproximado de  $10^7$  de CMMO, suspenso em PBS estéreo, foi reimplantado por via endovenosa (veia caudal) no animal de origem, atentando para injeção lenta e contínua no lume venoso, efetuando-se assim o tratamento com transplante autólogo de CMMO.

Os animais do grupo Controle não tiveram a medula óssea processada e transplanta, recebendo assim apenas injeção de PBS estéreo (veículo), nos dias de transplantes de CMMO correspondentes ao dos grupos tratados. Os animais do grupo Tratado não tiveram a medula óssea femoral processada e transplanta, recebendo assim apenas injeção de PBS estéreo (veículo) no 5º dia pós-isquêmico. Apenas os animais do grupo Duplo Tratado receberam 2

transplantes de CMMO (dia 1 e dia 5 pós-AVEi) e, conseqüentemente, somente neste grupo experimental a medula óssea femoral foi processada e transplanta nos animais.

### 3.8 PROCEDIMENTOS PÓS-CIRÚRGICO

Na primeira semana pós-cirúrgica, os animais têm, diariamente, suas suturas higienizadas com álcool iodado (Farmax<sup>®</sup>) e recebem aplicação de bactericida pomada de sulfato de neomicina (Medley<sup>®</sup>), sendo que nos dias de ocorrência de testes comportamentais, este procedimento é efetuado após a realização dos testes. Ao fim do tempo de sobrevivência, os animais são perfundidos, tendo seus encéfalos fixado por perfusão intracardicamente e crioprotetido a fim de realizar a microtimia e as análises histológicas.

#### 3.8.1 PERFUSÃO

No vigésimo oitavo dia pós-isquêmico, concluídos os testes comportamentais do dia, os animais foram anestesiados e após abolidos os reflexos de dor e corneano, foram perfundidos, via coração) com 300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparenizada (0,1ml/L), seguido de 300 ml de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Depois da retirada do encéfalo de cada animal, este foi pós-fixado por 24 horas em solução de paraformaldeído (4%) em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4), seguindo de protocolo de crioproteção em soluções de concentrações crescentes de sacarose diluída em mistura PB (0,1M; pH 7,2 – 7,4) c/ 10% de glicerina.

### 3.8.2 Obtenção dos cortes histológicos

Para obtenção de secções histológicas de plano coronal seriadas, os encéfalos crioprotetidos foram incluídos em gel (Tissue tek) e, após congelamento, foram cortados em orientação segundo o plano coronal à uma espessura de 50µm com o auxílio de criostato (Leica - CM1850). As secções foram coletadas em placas de cultura de 24 poços contendo PB 0,1M e foram conservadas em geladeira por tempo breve para posterior utilização em coloração histológica e ensaios imunistoquímico.

## 3.9 PROCESSAMENTOS HISTOLÓGICOS

### 3.9.1 Área de lesão isquêmica

Para se evidenciar a área da lesão isquêmica, utilizamos a técnica de coloração com Violeta de Cresila (coloração de Nissl) que permite a visualização dos corpos celulares de neurônios e células da glia. A região de microinjeção de ET-1 e conseqüentemente corresponde à região isquêmica, é determinada pela presença do corante azul de colanil, adicionado à solução de ET-1, pelo palor tecidual, e/ou pela descontinuidade tecidual (ausência de corpos celulares e/ou matriz extra-celular na área cortical de estudo) resultante do processo isquêmico. Esta área (área de lesão isquêmica) foi fotografada e sua área foi medida e comparada entre os diferentes grupos experimentais do presente trabalho.

### 3.9.2 Densidade neuronal

Os corpos neuronais foram marcados com anticorpo monoclonal anti-NeuN (NEUronal *Nuclei*; *clone* A60) Millipore® (1:100), que se liga a um epítipo no núcleo de neurônios maduros (MULLEN *et al.*, 1992). Desta forma, poderemos contar especificamente quantos neurônios estão presentes na área de interesse do presente estudo.

### 3.9.3 Ativação microglial

A presença de macrófagos e microglia ativados na área da lesão isquêmica e na área de penumbra isquêmica foi evidenciada com marcação do anticorpo monoclonal ED1 (*Anti-Macrophages/Monocytes Antibody, clone ED-1*) Millipore® (1: 100,), que reconhece um epítipo na membrana dos lisossomos de macrófagos ativados (ROBINSON *et al.*, 1986). Desta forma, poderemos quantificar a presença de micróglia ativadas e correlacionar estes resultados com a intensidade da neuroinflamação.

### 3.9.4 Cicatriz Glial

Para se investigar a densidade de astrócitos e cicatrização glial formada na área de lesão do tecido nervoso, realizamos imuno-histoquímica para o anticorpo monoclonal anti-GFAP (*glial fibrillary astrocytes protein*) Sigma® (1: 1000), que reconhece um epítipo da proteína fibrilar do astrocito. Assim, avaliamos o tamanho da cicatriz glial formada da área de lesão isquêmica (S1/M1) dos animais dos grupos controle, tratados e duplo tratados, assim como quantificamos a quantidade de astrócitos marcados na área de lesão isquêmica.

### 3.10 Estereologia

A visualização dos tecidos corados ou imuno-marcados foi feita com o auxílio de um microscópio (Nikon® labophot trinocular), acoplado a uma câmera fotoreceptora (Toshiba® ccd), ligada a uma unidade controladora (ik-cu44a - Thoshiba) e conectada a uma platina motorizada Prior® (OptiScan II) de modo a permitir a captura de imagens digitais e a localização exata dos pontos cartesianos dos registros visuais realizados na área de interesse do estudo.

Realizamos análise quantitativa da área de lesão, com o auxílio do programa de computação *ImageJ*®, a partir da reconstituição de imagens capturadas na magnificação de 100x em sistema de microscopia óptica supra citado

Também efetuamos análise quantitativa de neuroproteção, ativação micrógliar e astrócitose, onde com o auxílio de sistema ótico supracitado integrado ao Programa de computação Stereologer2000<sup>®</sup> foram quantificadas as células imuno-marcadas para as devidas análises (anti-Neu-N, Anti-ED1 e Anti-GFAP respectivamente). Após reação imunohistoquímica, as lâminas contendo as secções foram diafanizadas e inspecionadas.

As células com padrão positivo de imuno-marcação correspondente foram quantificadas seguindo parametros do Stereologer2000<sup>®</sup>, onde foram analisados 25 campos de contagem distribuídos na área de 2500 $\mu\text{m}^2$  a partir do centro isquêmico.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos obtidos foram tabulados em planilhas do programa Excel<sup>®</sup> (Microsoft<sup>®</sup>). Os achados numéricos das tipologias investigadas foram analisados e comparados estatisticamente utilizando o programa de computação *Graphpadprism*<sup>®</sup> 6.0 no qual foi feita análise de variância (ANOVA) para pareamento dos dados intergrupos e pós-teste de Bonferroni. A significância dos dados foi pré-estabelecida em 95% com  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

No presente estudo, induzimos AVE isquêmico focal, usando microinjeções do vasoconstritor ET-1, na área S1/M1 do hemisfério cerebral direito de ratos adultos com objetivo de causar alteração funcional no desempenho motor da pata anterior esquerda do animal para avaliar a eficiência do tratamentos com transplante autólogos CMMO na estrutura morfológica da área cortical cerebral afetada (investigando preservação tecidual, neuropreservação e alterações de sinais inflamatórios) bem como em alterações sensório-motora do animal através de testes comportamentais de tarefas exploratórias e de atividade motora específica.

### 4.1 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL EXPERIMENTAL EM S1/M1 NÃO DEMONSTRAM ALTERAÇÕES DE PADRÃO DE FREQUÊNCIA EXPLORATÓRIA

Investigamos, neste estudo, as alterações de desempenho de evento exploratório (içada) dos animais submetidos ao protocolo de lesão isquêmica focal de S1/M1 com o objetivo de avaliar a atividade motora global (comportamento de içadas) para determinarmos o grau de comprometimento motor dos animais após isquemia do córtex cerebral. Nenhum dos animais nos grupos estudados (GC, GT, GDT) demonstrou alterações na frequência de içadas, demonstrando que o modelo experimental de lesão focal isquêmica não influenciou negativamente, ou positivamente, sobre a frequência exploratória dos animais (tratados ou não com CMMO). Isto torna nosso modelo experimental mais sensível à resposta aos tratamentos experimentais com CMMO ( FIGURA 11 A).

#### 4.2 ANIMAIS SUBMETIDOS A LESÃO ISQUEMICA FOCAL EM S1/M1 E TRATADOS COM TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CMMO DEMONSTRAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO PARCIAL DE PADRÃO DE ASSIMETRIA EXPLORATÓRIA

Comparamos as alterações motoras manifestadas por animais submetidos ao modelo de lesão isquêmica focal da área cortical de representação da pata anterior em S1/M1 quando tratados, ou não, com transplantes autólogos de CMMO em estágio agudo do processo isquêmico, demonstrando a frequência média de utilização da pata afetada foi alterada em todos os grupos experimentais.

Os animais do grupo Tratado (1 transplante autólogo de CMMO) manifestaram alteração funcional de assimetria exploratória, menor do que os animais do grupo Controle (sem transplante de CMMO) apresentaram. Os animais do grupo Tratado (35,01%  $\pm$ 8,24) diminuí a frequência de utilização da pata afetada pelo AVEi, porém esta diminuição foi menos acentuada que do aconteceu com os animais do grupo Controle (21,32%; $\pm$  11,1) durante os testes realizados no 3º dia de sobrevivência, demonstrando que o tratamento recupera (ou preserva) a assimetria exploratória dos animais que receberam transplante autólogo de com CMMO (FIGURA 11).

Em análise do desempenho em assimetria exploratória em períodos sub-agudos e crônicos (ou seja, mais tardiamente após o AVEi), verificou-se que a partir do 7º dia pós-isquêmico, os animais do grupo Tratado (48,37%  $\pm$ 1,76) demonstraram recuperação parcial do padrão de assimetria exploratória, a qual se manteve significativamente diferentes em 14 (43,35%  $\pm$ 2,09), 21(48,25%  $\pm$ 3,13) e 28 (51,57%  $\pm$ 5,5) dias pós-isquêmico (FIGURA 11). Não houve diferença significativa de desempenho motor no teste de assimetria entre os grupos experimentais de animais que receberam 1 ou 2 transplantes de CMMO.

#### 4.3 ANIMAIS SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE AUTOLOGO SUPLEMENTAR DE CMMO NÃO DEMONSTRAM ALTERAÇÃO DOS PADRÕES DE ASSIMETRIA DO USO DA PATA AFETADA POR AVEi.

Comparamos, ainda, alterações manifestadas por animais submetidos a modelo de lesão isquêmica focal da área cortical de representação da pata anterior em S1/M1, quando tratados, ou não, com transplantes autólogos suplementar de CMMO em estágio sub-agudo do processo inflamatório isquêmico.

Os animais do grupo Duplo-Tratado manifestaram alteração funcional de assimetria exploratória menos intenso quando comparados com os animais do grupo Controle. Houve, no grupo Duplo-Tratado ( $35,05\% \pm 5,51$ ), diminuição da utilização da pata afetada significativamente menor quando comparado ao grupo Controle, já a partir do terceiro dia de sobrevivência.

Análise do desempenho em assimetria exploratória em períodos sub-agudos e crônicos, verificou-se que a partir do 7º dia pós-isquêmico, os animais do grupo Duplo-Tratado ( $43,68\% \pm 4,35$ ) demonstraram recuperação parcial do padrão de assimetria exploratória, a qual se manteve significativamente menor em 14 ( $48,66\% \pm 4,16$ ), 21 ( $45,49\% \pm 6,19$ ) e 28 ( $53,92\% \pm 1,58$ ) dias pós-isquêmico (FIGURA 11). Entretanto, os animais do grupo Duplo-Tratado (receberam 2 transplantes autólogos de CMMO) não demonstraram desempenho funcional melhor, no teste assimetria exploratória, do que os animais do grupo Tratado (apenas 1 transplante autólogo de CMMO) em todo o período pós-isquêmico estudado no presente trabalho (FIGURA 11).

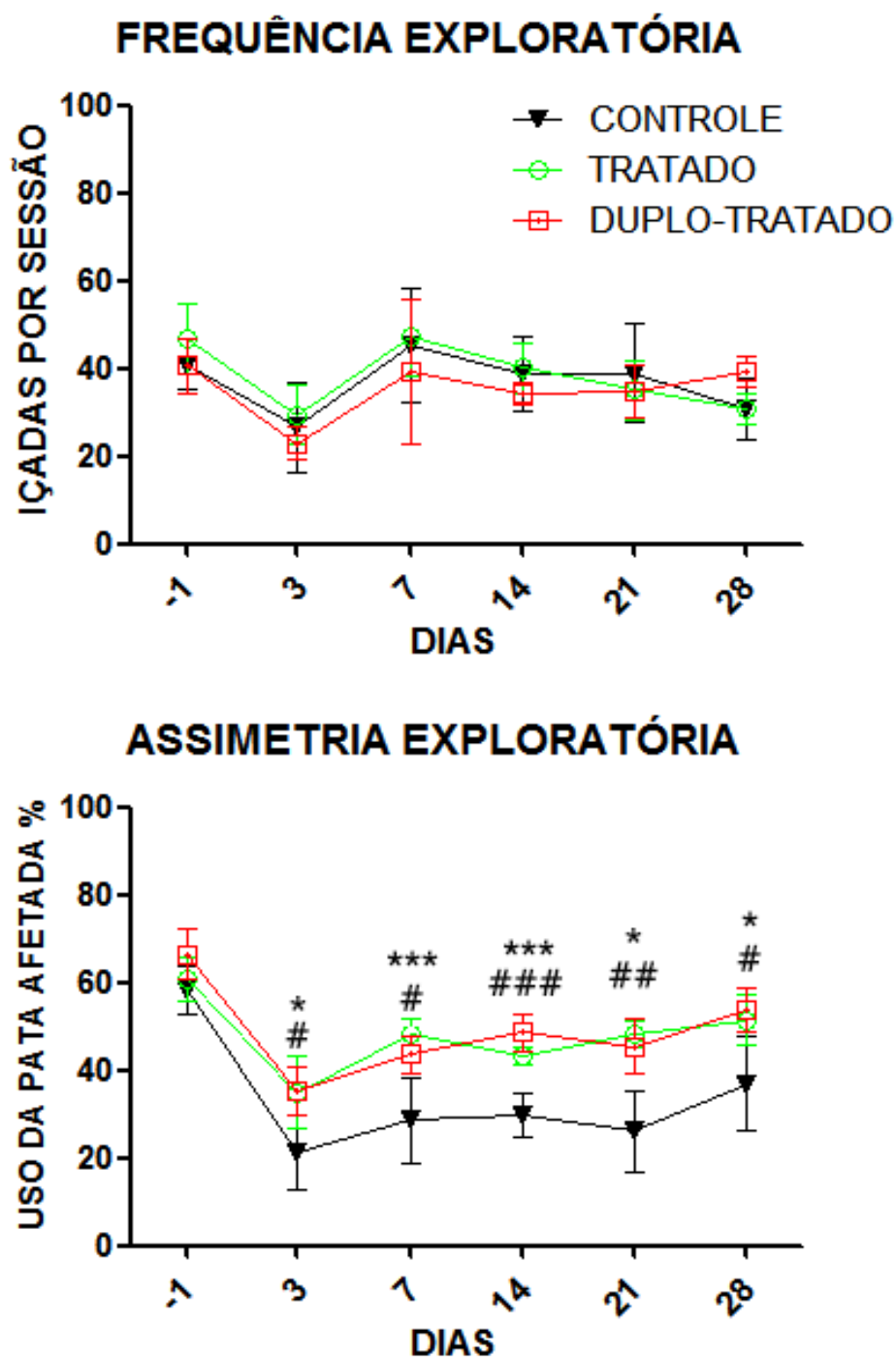


FIGURA 11 . TESTE DO CILINDRO: Frequência Exploratória e Assimetria de uso da pata anterior: Análise da frequência média de içadas por sessões de teste. Assimetria de uso da pata anterior: Análise de utilização da pata afetada em exploração do cilindro. Grupo Controle (Linha preta), Grupo Tratado (Linha Verde), Grupo Duplo-Tratado (linha vermelha). ANOVA, pós-teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  (comparação GC x GT), ### $p < 0,001$  ## $p < 0,01$  # $p < 0,05$  (comparação GC x GDT).

#### 4.4 ANIMAIS TRATADOS COM CMMO DEMONSTRARAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO DA FUNÇÃO MOTORA DA PATA ANTERIOR (AFETADA POR AVEi) EM TESTE DA ESCADA HORIZONTAL

Os animais deste estudo foram submetidos a um modelo de lesão isquêmica focal da área de representação da pata anterior em S1/M1 que manifesta alteração funcional específica da pata anterior contralateral ao hemisfério cerebral lesionado, demonstrada em avaliação de desempenho motor no teste funcional da escada horizontal (ver item 3.4). Os animais do grupo Controle manifestaram alteração funcionais significativa de desempenho da atividade motora no período de sobrevivência pós-isquêmico (ver FIGURA 12). Os padrões de movimento 0, I, II, III e IV sofreram alterações de desempenho motor que, mesmo quando significativos, foram reestabelecidos espontaneamente até o fim do período de sobrevivência, enquanto os padrões V e VI foram alterados significativamente demonstrado pela análise estatística intra-grupo, mostrando especificamente que ocorreu aumento do padrão de movimento V, enquanto que, conseqüentemente, houve diminuição do padrão de movimento VI. Isto significa que houve diminuição do movimento de apreensão total das hastes do aparato da escada horizontal durante a realização do teste no período pós AVEi ( FIGURA 12).

O desempenho dos movimentos dos animais do grupo Tratado, quando comparados com o dos animais do grupo Controle, manifestou-se sem diferença significativa ao fim do período de sobrevivência para as qualidades de movimento 0, I, II, III, IV e V, destacando-se a qualidade V que apresentou diminuição de frequência de ocorrência nos retestes em 7 ( $4,13 \pm 0,36$ ), 14 ( $4,3 \pm 0,58$ ) e 21 ( $4,83 \pm 0,67$ ) dias após indução isquêmica; não houve diferença significativa em 28 dias após isquemia (ver FIGURA 12).

A qualidade de movimento VI (Acerto) apresentou diferença significativa de frequência de ocorrência nos retestes pós-isquemia, entre os grupos Tratado e Controle. Quando comparado ao GC, o GT ( $3,56 \pm 0,34$ ) apresentou preservação da frequência média de acertos (IV) durante a fase aguda da lesão isquêmica do córtex S1/M1. Durante o período sub-agudo ( $4,66 \pm 0,56$ ) da lesão isquêmica, o GT demonstrou recuperação parcial dos padrões de frequência de movimento VI

que se manteve durante todo o período de sobrevida observado em 14 ( $4,36 \pm 0,32$ ), 21 ( $4,83 \pm 0,61$ ) e 28 ( $5,06 \pm 0,27$ ) dias pós-isquemia (FIGURA 12). Isto significa que o desempenho motor dos animais deste grupo se manteve melhor do que o desempenho motor dos animais do grupo controle.

#### 4.5 ANIMAIS SUBMETIDOS A TRATAMENTO AUTÓLOGO SUPLEMENTAR COM CMMO DEMONSTRARAM MELHORA DA RECUPERAÇÃO DE PADRÃO MOTOR EM ESCADA HORIZONTAL

Um dos objetivos do presente trabalho é avaliar se duplo transplante autólogo de CMMO em modelo experimental de AVEi promove recuperação do padrão de desempenho motor no teste da escada horizontal, a fim de avaliar alterações recorrentes de tratamento autólogo suplementar com CMMO em fase sub-aguda do curso da isquemia.

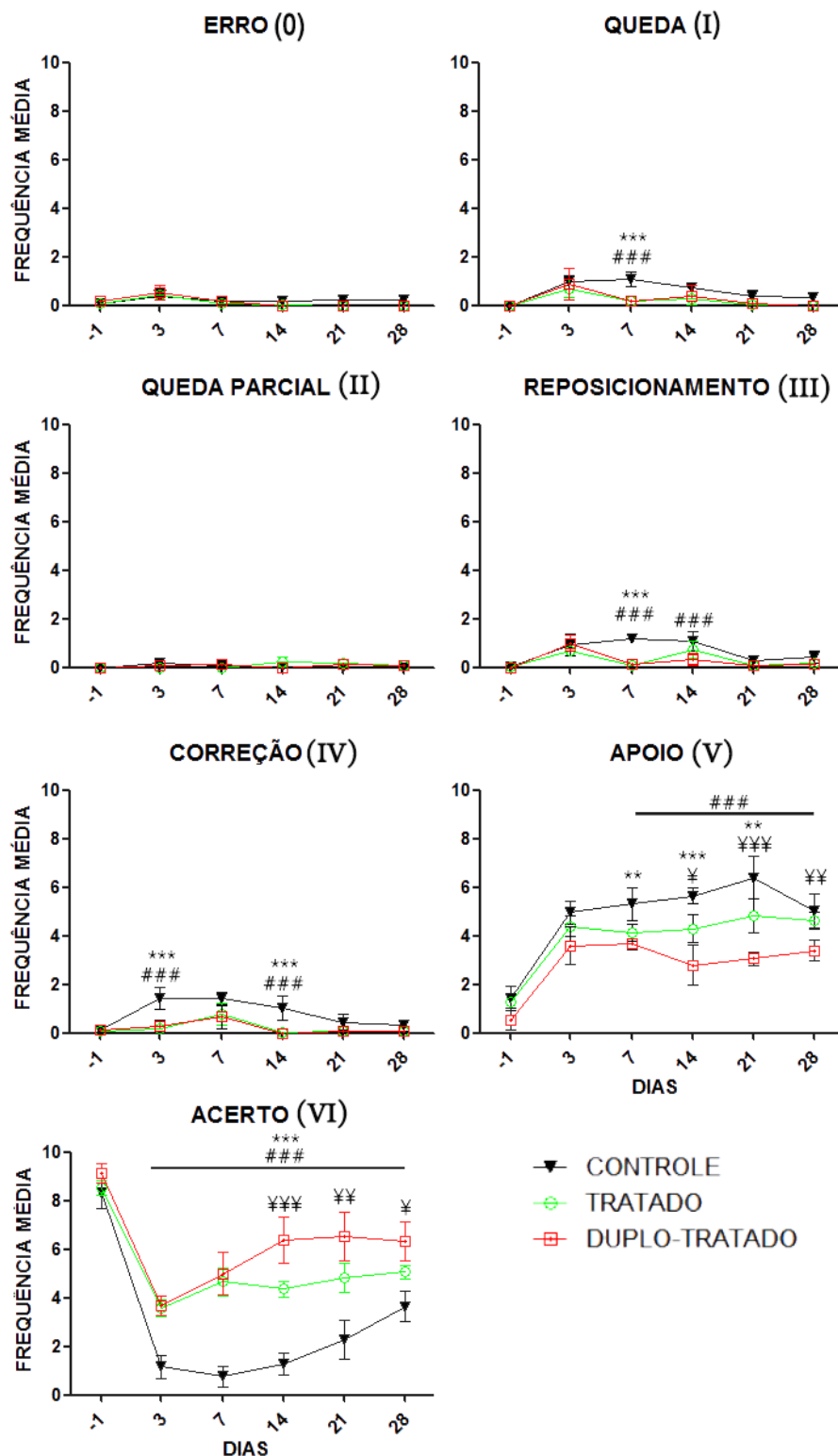
O desempenho dos animais do grupo Duplo-Tratado, quando comparados com o dos animais do grupo Controle, manifestou sem diferença significativa para as qualidades de movimento 0, I, II, III, IV em todos o período pós-AVEi avaliados. Destacamos que a qualidade do movimento V apresentou diminuição de frequência de ocorrência nos retestes em 7 ( $3,66 \pm 0,23$ ), 14 ( $2,80 \pm 0,83$ ), 21 ( $3,06 \pm 0,27$ ) e 28 ( $3,40 \pm 0,43$ ) dias após indução isquêmica (ver FIGURA 12).

Quando comparados com o grupo Tratado (animais que receberam apenas 1 transplante de CMMO), o Grupo Duplo-tratado se manifestou sem diferença significativa ao fim do período de sobrevida para as qualidades de movimento 0, I, II, III, IV. Destacamos que a qualidade do movimento V apresentou diferença significativa de frequência de ocorrência nos retestes em 14, 21 e 28 dias após indução isquêmica (FIGURA 12).

A qualidade de movimento VI apresentou diferença significativa de frequência de ocorrência nos retestes pós-isquemia entre os grupos Tratado e Controle. Quando comparamos ao GC, o GT ( $3,66 \pm 0,40$ ) apresentou preservação parcial da frequência média de acertos (IV) em fase aguda do curso

isquêmico com significância estatística. Em período sub-agudo ( $5,002 \pm 0,88$ ) do curso isquêmico, o GDT demonstrou recuperação parcial dos padrões de frequência de movimento VI que se manteve durante todo o período de sobrevivência observado em 14 ( $6,40 \pm 0,95$ ), 21 ( $6,53 \pm 0,98$ ) e 28 ( $6,33 \pm 0,80$ ) dias após indução isquêmica ( FIGURA 12).

A qualidade de movimento VI apresentou diferença estatística significativa de frequência de ocorrência nos retestes pós-isquêmicos entre GT e GDT. Quando comparado ao GT, o GDT apresentou melhora na recuperação parcial significativa (estatisticamente) da frequência média de acertos (IV) a partir do 14º dia pós-isquêmico, diferença esta que se manteve nos dias 21 e 28 pós-isquemia ( FIGURA 12). Isto significa que dois episódios de transplantes de CMMO, um no período agudo da lesão isquêmica e outro no período sub-agudo da lesão isquêmica, ou seja, 1 dia após a isquemia focal de S1/M1 e 5 dias após a isquemia focal de S1/M1, respectivamente, foram mais eficientes em promover recuperação funcional da atividade motora da pata anterior afetada pelo AVEi quando comparados aos resultados dos animais que receberam transplante autólogo de CMMO apenas na fase aguda e/ou não receberam nenhum tratamento.



**FIGURA 12- Análise de frequência média das qualidades de movimento.** Durante a janela temporal de erro (0), queda (I), queda parcial (II), reposicionamento (III), correção (IV), apoio (V), e acerto (VI). Grupo Controle (Linha preta), Grupo Tratado (Linha Verde), Grupo Duplo-Tratado (linha vermelha). ANOVA, pós-teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$  \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,05$  (comparação GC x GT), ### $p < 0,001$  ## $p < 0,01$  # $p < 0,05$  (comparação GC x GDT), ¥¥¥ $p < 0,001$  ¥¥ $p < 0,01$  ¥ $p < 0,05$  (comparação GT x GDT).



#### 4.6 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM PRESERVAÇÃO TECIDUAL DA ÁREA AFETADA

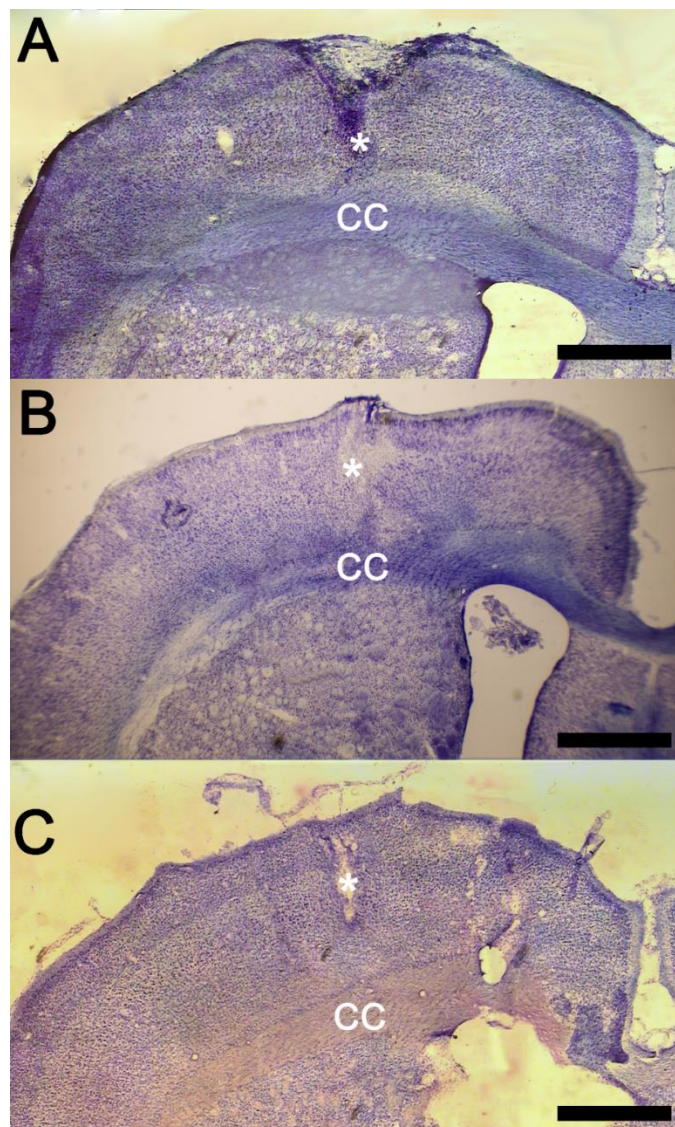
No presente estudo experimental, comparamos os efeitos do transplante autólogo de CMMO em período isquêmico inflamatório agudo, ou agudo e subagudo, sobre alterações morfológicas do córtex cerebral relacionadas com modelo de isquemia focal da área S1/M1 (FIGURA 13).

A lesão induzida por microinjeções de 40 pMol do vasoconstritor ET-1, na área de representação da pata anterior em S1/M1 de um dos hemisférios cerebral, foi visualizada nas secções coronais ao longo da extensão de S1/M1 após o tecido nervoso ser corado por violeta de cresila (ver FIGURA 13). A área de lesão provocada pelas microinjeções de ET-1 foi caracterizada pelo palor tecidual, perda tecidual, evidencias de infiltrado inflamatório e/ou descontinuidade de parênquima tecidual ao longo do córtex cerebral, evidencias características e/ou resultantes do processo fisiopatológico decorrente da isquemia.

Ao avaliar secções histológicas da área S1/M1 do hemisfério direito de animais do grupo Controle, observou-se características do processo fisiopatológico da isquemia, habitualmente observadas e estabelecida pela literatura para área de lesão isquêmica, tais como palor tecidual, perda tecidual, desorganização das camadas do córtex cerebral (FIGURA 13 A).

Em análise qualitativa de secções da área S1/M1 do hemisfério direito dos grupos Tratado e Duplo Tratado, observou-se preservação das características estruturais do tecido nervoso do córtex cerebral e notória diminuição dos sinais de processo fisiopatológico da isquemia. Os animais apresentaram palor tecidual pouco evidente ou ausente, pouca perda tecidual e preservação da organização das camadas do córtex cerebral, quando comparado ao grupo Controle (FIGURA 13 B e C).

Demonstramos que tanto os animais do grupo Tratado ( $746,5\mu\text{m}^2 \pm 137,35$ ) quanto os animais do grupo Duplo Tratado ( $701,19\mu\text{m}^2 \pm 104,96$ ) apresentaram área de lesão isquêmica menor, 28 dias após indução isquêmica, quando comparados com o grupo Controle ( $1928,1\mu\text{m}^2 \pm 153,01$ ) (FIGURA 14).



**FIGURA 13: Análise histopatológica da área de lesão isquêmica:** Lesões isquêmicas em S1/M1 em cortes coronais do encéfalo e corados com violeta de cresila. Grupo Controle (A); Grupo Tratado (B) e Grupo Duplo-Tratado (C). Corpo caloso (CC). \* Centro de lesão.

Os animais do grupo Duplo Tratado não apresentaram diferença estatística significativa da área de lesão quando comparados com os animais do grupo Tratado, demonstrando, assim, que o Tratamento adicional de CMMO em período Subagudo não promove alteração na preservação tecidual além da provocada pelo transplante de CMMO ainda no período agudo da inflamação provocada pelo AVEi.

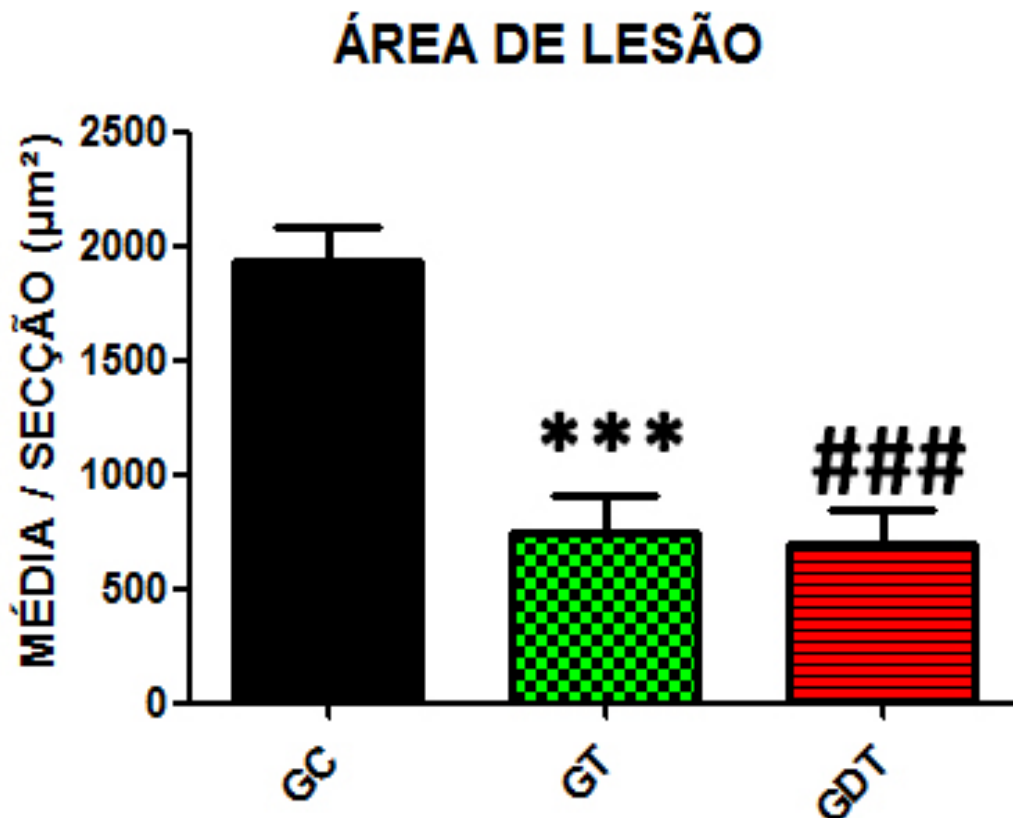


FIGURA 14: **Biometria da área de lesão isquêmica:** Demonstração quantitativa da média da área de lesão. Grupo Controle (GC) coluna em Preto, Grupo Tratado (GT) coluna em xadrez Verde e Preto, Grupo Duplo Tratado (GDT) coluna tracejada Vermelho e Preto. ANOVA, pós-teste de Bonferrone, \*\*\* $p < 0,001$  (comparação GC x GT), ### $p < 0,001$  (comparação GC x GDT), ¥ $p < 0,05$  (comparação GT x GDT).

#### 4.7 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM NEUROPRESERVAÇÃO EM S1/M1 EM PERÍODO CRÔNICO

Neste estudo, comparamos os efeitos neuroprotetores do transplante autólogo de CMMO em período isquêmico agudo ou agudo e subagudo (FIGURA 15). Observamos neurodegeneração relacionadas com o curso crônico de lesão isquêmica (FIGURA 15 A, a) no grupo Controle. Os grupos tratados apresentaram parcial preservação dos padrões de densidade e organização neuronal na área isquêmica (FIGURA 15 B, b e C, c)

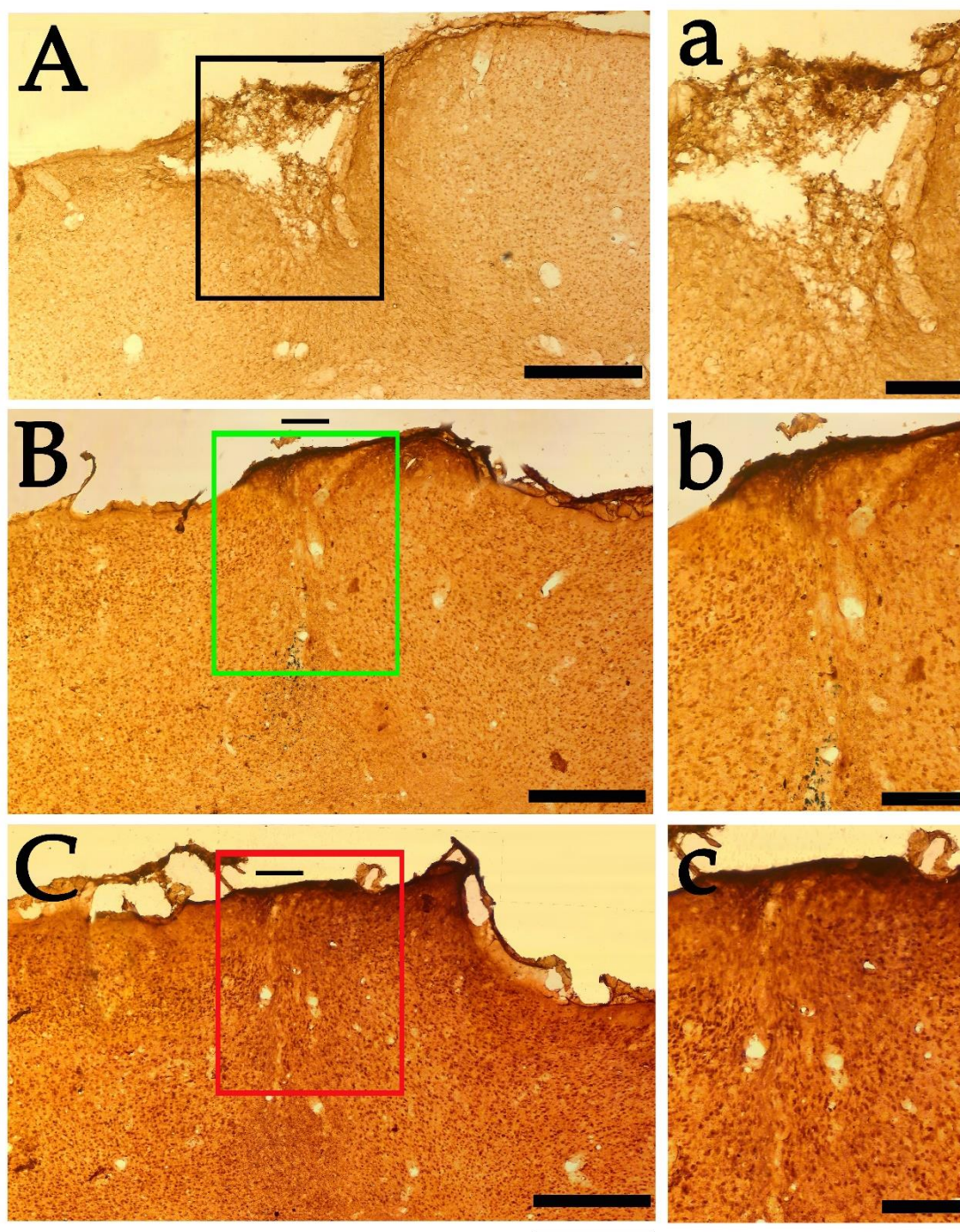


FIGURA 15: **NEUROPRESERVAÇÃO**: Secções com imunomarcção positiva para anti-Neu-N. Perda neuronal em A (GC). Parcial preservação de organização e densidade neuronal em B (GT) e C (GDT). Ampliação de centro isquêmico em a, b e c. Escala de 500um em A, B e C. Escala de 100um em a, b, e c.

Demonstramos que tanto o grupo Tratado ( $1161 \pm 46,07$ ) quanto o grupo Duplo Tratado ( $1279,2 \pm 53,168$ ) apresentaram maior densidade de células NEU-N+ na área investigada 28 dias após indução isquêmica, quando comparados com o grupo Controle ( $804,44 \pm 63,245$ ) (FIGURA 16).

Os animais do grupo Duplo Tratado apresentaram densidade neuronal significativamente maior quando comparados com os animais do grupo Tratado, demonstrando, assim, que o Tratamento adicional de CMMO em período Subagudo promove melhora na neuropreservação provocada pelo transplante em período agudo.

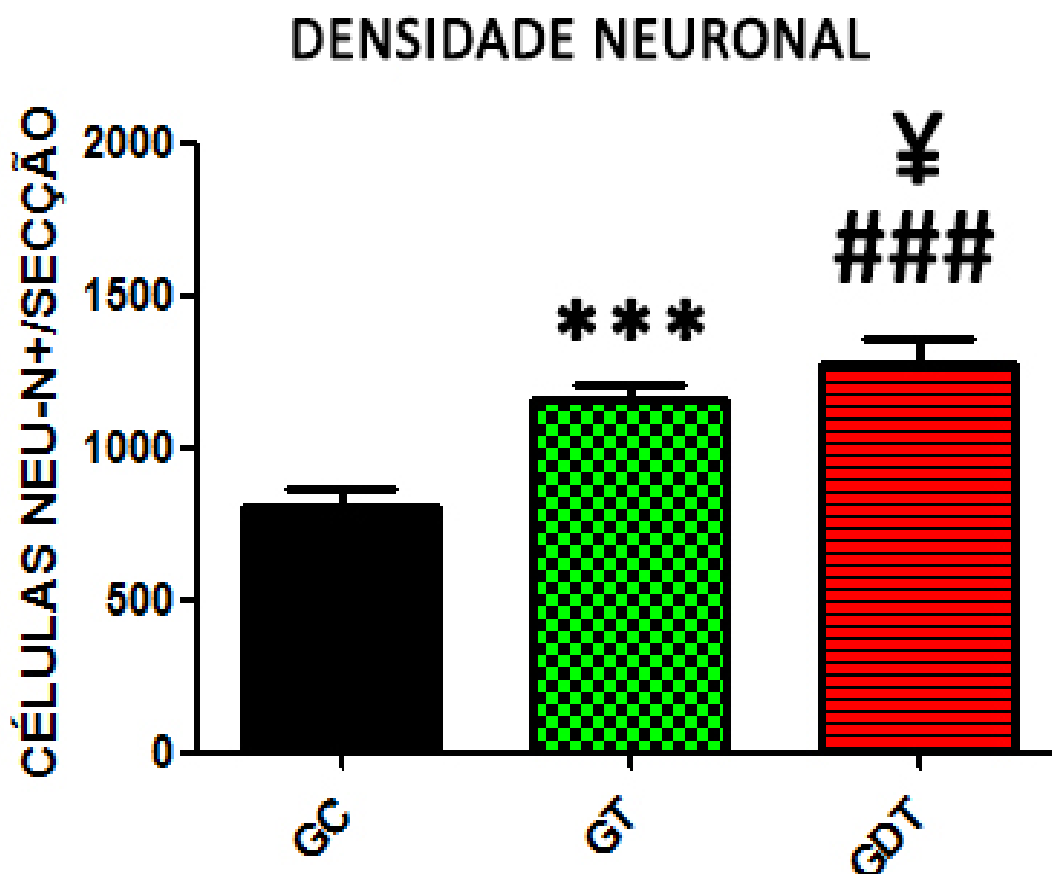


FIGURA 16: **Densidade Neuronal:** Demonstração quantitativa da média da densidade neuronal seccional. Grupo Controle (GC) coluna em Preto, Grupo Tratado (GT) coluna em xadrez Verde e Preto, Grupo Duplo Tratado (GDT) coluna tracejada Vermelho e Preto. ANOVA, pós-teste de Bonferrone, \*\*\* $p < 0,001$  (comparação GC x GT), ### $p < 0,001$  (comparação GC x GDT), ¥ $p < 0,05$  (comparação GT x GDT).

#### 4.8 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM INIBIÇÃO DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM S1/M1 EM PERÍODO CRÔNICO

Neste estudo, comparamos os efeitos moduladores do transplante autólogo de CMMO em período agudo ou agudo e subagudo sobre ativação microglial após isquemia focal cortical (FIGURA 17). Observamos ativação microglial relacionadas com o curso crônico de lesão isquêmica (FIGURA 17 A, a) no grupo Controle. Os grupos tratados apresentaram menor ativação microglial na área isquêmica (FIGURA 17 B,b e C,c), quando comparados com o grupo Controle.

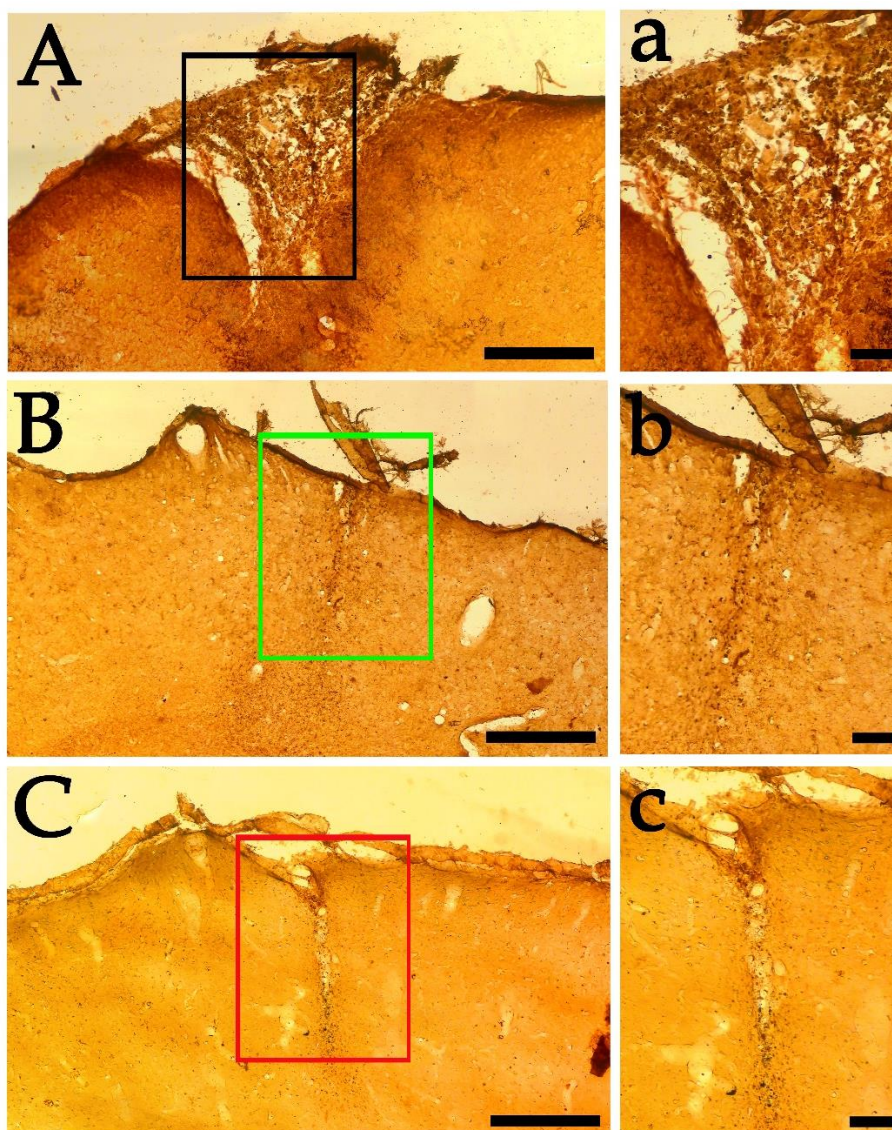


FIGURA 17: **Ativação Microglial:** Secções com imunomarcacão positiva para anti-ED1. Alta densidade microglial em A (GC). Baixa densidade microglial em B (GT) e C (GDT). Ampliação de centro isquêmico em a, b e c. Escala de 500um em A, B e C. Escala de 100um em a, b, e c

Observou-se que tanto o grupo Tratado ( $339,19 \pm 51,46$ ) quanto o grupo Duplo Tratado ( $268,05 \pm 63,304$ ) demonstraram redução do número de células ED1+ na área investigada 28 dias após indução isquêmica, quando comparados com o grupo Controle ( $717,75 \pm 99,557$ ) (FIGURA 18).

Os animais do grupo Duplo Tratado não apresentaram diferença significativa na densidade de Células ED1+ quando comparados com os animais do grupo Tratado, demonstrando, assim, que o Tratamento adicional de CMMO em período Subagudo não promove alteração na modulação inflamatória provocada pelo transplante em período agudo.

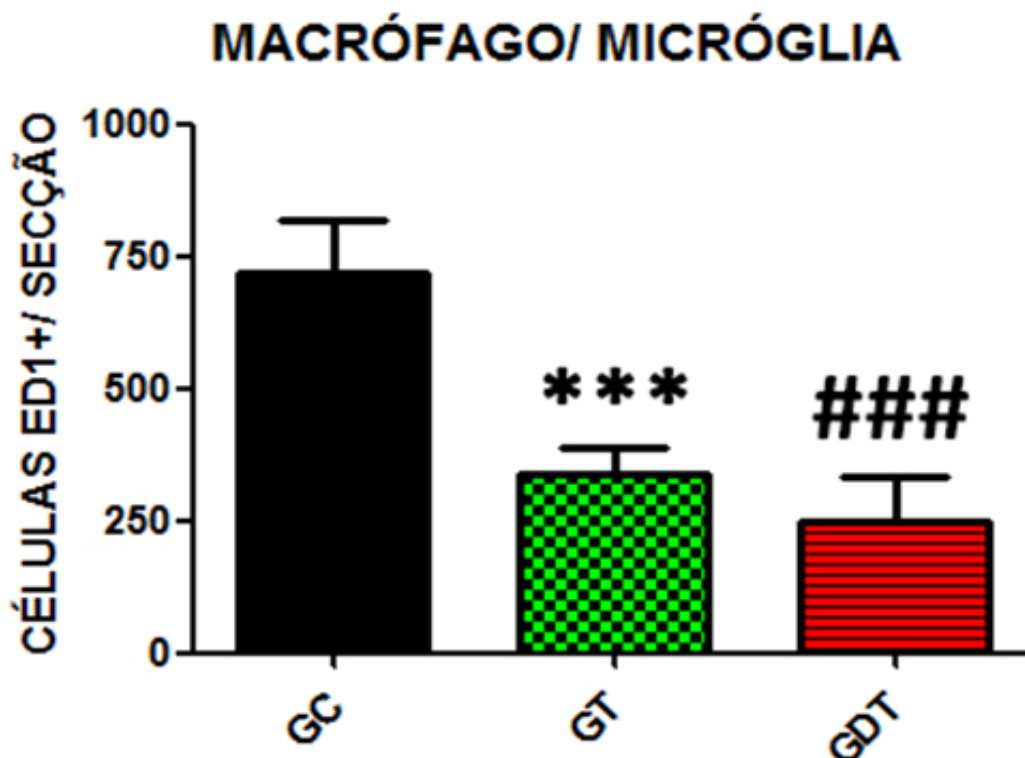


FIGURA 18: **Ativação microglial:** Demonstração quantitativa da densidade média de células ED1+ seccional. Grupo Controle (GC) coluna em Preto, Grupo Tratado (GT) coluna em xadrez Verde e Preto, Grupo Duplo Tratado (GDT) coluna tracejada Vermelho e Preto. ANOVA, pós-teste de Bonferrone, \*\*\* $p < 0,001$  (comparação GC x GT), ### $p < 0,001$   $\neq p < 0,05$  (comparação GT x GDT).

#### 4.9 ANIMAIS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUEMICA FOCAL E TRATADOS COM TRANSPLANTES AUTÓLOGOS DE CMMO APRESENTAM DIMINUIÇÃO DE DENSIDADE DE CICATRIZ GLIAL EM S1/M1 EM PERÍODO CRÔNICO

No presente estudo, comparamos os efeitos do transplante autólogo de CMMO em período agudo ou agudo e subagudo sobre a cicatrização glial após isquemia focal. Observamos densidade astrocitária característica da fisiopatologia de lesão isquêmica (FIGURA 19 A, a) no grupo Controle. Os grupos tratados apresentaram menor densidade astrocitária na área isquêmica (FIGURA 19 B,b e C,c), quando comparados com o grupo Controle. Atentando para concentração de células GFAP+ no centro isquêmico preservado (FIGURA B e C).

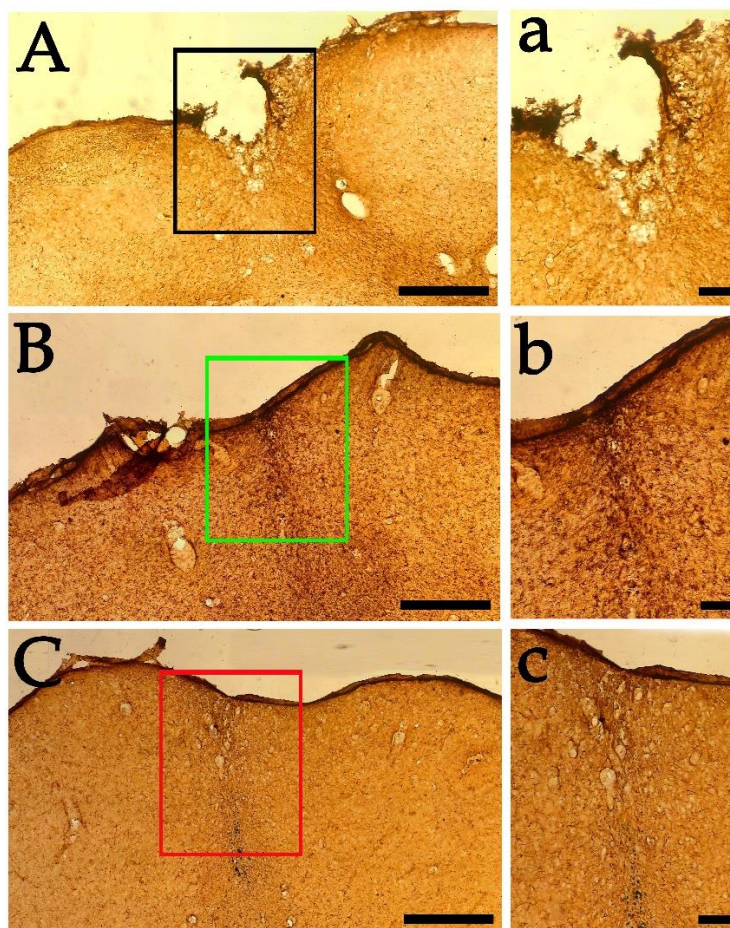


FIGURA 19: **Astrogliose:** Secções com imunomarcção positiva para anti-GFAP. Alta densidade periférica em A (GC). Densidade astrogliol menor em B (GT) e C (GDT). Ampliação de centro isquêmico em a, b e c. Escala de 500um em A, B e C. Escala de 100um em a, b, e c.



Observou-se que tanto o grupo Tratado ( $832,63 \pm 42,625$ ) quanto o grupo Duplo Tratado ( $706,94 \pm 54,771$ ) apresentaram redução do número de células GFAP+ na área investigada 28 dias após indução isquêmica, quando comparados com o grupo Controle ( $1117,7 \pm 85,084$ ) (FIGURA 20)

O grupo Duplo Tratado apresentou diminuição significativa na densidade de Células GFAP+ quando comparados com o grupo Tratado, demonstrando, assim, que o tratamento adicional de CMMO em período subagudo promove melhora da diminuição da densidade astrocitária provocada pelo transplante em período agudo, após surto isquêmico.

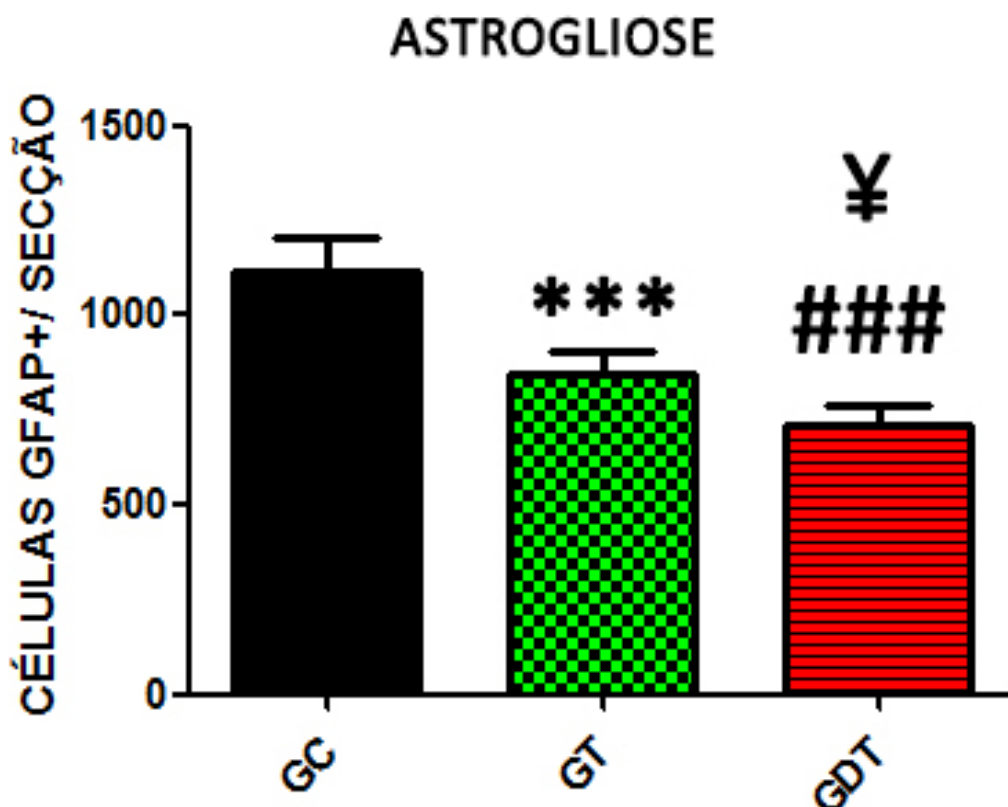


FIGURA 20: **Astroglíose**: Demonstração quantitativa da média da densidade astrocitária seccional. Grupo Controle (GC) coluna em Preto, Grupo Tratado (GT) coluna em xadrez Verde e Preto, Grupo Duplo Tratado (GDT) coluna tracejada Vermelho e Preto. ANOVA, pós-teste de Bonferroni, \*\*\*  $p < 0,001$  (comparação GC x GT), ###  $p < 0,001$  (comparação GC x GDT), ¥  $p < 0,05$  (comparação GT x GDT).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, utilizamos de um modelo de isquemia focal induzida por injeção de ET-1, amplamente utilizado para provocar lesão isquêmica focal (BIERNASKIE *et al.* 2005; TENNANT & JONES 2009; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013; CARDOSO, *et al.*, 2012; CORREA, *et al.*, 2012. Franco *et al.* 2012; ROOME *et al.*, 2014).

O modelo de isquemia com ET-1 em baixas concentrações utilizado pela primeira vez para provocar lesão isquêmica focal mostrou-se eficiente em provocar lesão no tecido nervoso e apresenta reprodutibilidade constante, quando comparado com outros modelos de lesão (por exemplo ver GILMOR *et al.*, 2004), e gera déficits sensório motores demonstráveis em testes comportamentais específicos e sensíveis para se avaliar atividade motora (ver TENNANT & JONES 2009; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013; CARDOSO, *et al.*, 2012). Estudos anteriores, utilizaram de concentrações elevadas de ET-1, para provocar lesão tecidual que se expressa em deficiência funcional severa usando injeções intraparenquimatosa de 80 à 320 pMol do peptídeo ( HSU & JONES 2005; HEWLETT&CORBETT 2006; TENNANT&JONESL 2009; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013). No presente trabalho, utilizamos injeções de 40pMol de ET-1, para mimetizar lesão isquêmica cortical .

A indução da isquemia focal feita por microinjeções de ET-1, na concentração e coordenadas esterotáxicas aqui utilizadas, mostraram-se eficazes para provocaram alterações funcionais motoras consistentemente associadas à danos na área sensório motora primária (S1/M1) (BEDERSON, *et al.*, 1986; CENCI, *et al.*, 2002), permitindo assim usarmos o modelo experimental para investigar alterações morfofuncionais, no curso inflamatório isquêmico, provocadas por intervenções terapêuticas como a utilização do transplantes autólogos endovenosos de CMMO em período agudo, ou agudo e subagudo.

## 5.2 MODELO DE LESÃO ISQUEMICA FOCAL E TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO NÃO PROMOVERAM ALTERAÇÕES DE INTENSIDADE EXPLORATÓRIA

Estudos demonstraram a utilização de ET-1 para mimetizar isquemia focal encefálica e provocar alterações funcionais utilizando faixas de concentração do vasoconstritor acima da utilizada no presente estudo ( HSU & JONES 2005; HEWLETT & CORBETT 2006; TENNANT & JONESL 2009; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013). Entretanto essas concentrações provocam alterações locomotoras severas. A baixa concentração de ET-1, utilizada no presente estudo, para mimetizar isquemia focal cortical não provocou alteração de intensidade exploratória nos animais, sendo essa uma funcionalidade sensório-motora afetada por lesões mais intensas do que a utilizada no presente estudo (item 4.6) (HEWLETT&CORBETT 2006; TENNANT&JONESL 2009; LIVINGSTON-THOMAS *et al.* 2013), e tendo o presente modelo provocado alterações funcionais motoras de assimetria exploratória e de atividade sensório-motora específica ( itens 4.4 e 4.5 ), podemos afirmar que o modelo de isquemia focal utilizado é elegível para se avaliar alterações funcionais específicas.

As abordagens de tratamento com CMMO utilizadas no presente estudo não promoveram alterações dos padrões comportamentais de intensidade exploratória normais, demonstrando que a metodologia empregada para o tratamento não afetou negativamente as funções motoras do modelo experimental (item 4.1 )

## 5.3 TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM PRESERVAÇÃO PARCIAL DE PARAMETROS DE ATIVIDADE EXPLORATÓRIA

Lesões isquêmicas são provocadas por morte celular inicialmente em resposta à hipóxia e, em seguida, ampliadas pela resposta inflamatória. No córtex motor, esse tipo de lesão provoca alterações motoras contralaterais com

déficits diretamente relacionados com a intensidade da lesão, esses déficits são diretamente relacionados com alterações de organização neural da área afetada. No presente trabalho utilizamos modelo de lesão isquêmica focal na área S1/M1 que provocaram desorganização neuronal (item 4.7) que repercutiram em alterações de padrões de assimetria exploratória (item 4.2).

A abordagem terapêutica com CMMO atuando com efeito de modulação inflamatória já é amplamente investigadas na problemática do curso isquêmico (KAN, I.; MELAMED, E. e OFFEN, D., 2007, BRENNERMAN., *et al*, 2010), entretanto ainda são poucos os trabalhos que demonstram investigações com abordagens de transplantes autólogos investigando alterações funcionais específicas. CMMOs apresentam trofismo por ambientes inflamatórios e em resposta a esses ambientes, liberara fatores tróficos que atuam na modulação da resposta inflamatória e promover proteção do ambiente potencialmente deletérios do SNC em sofrimento (BRENNERMAN., *et al*, 2010; FRANCO. *Et al.*, 2012), permitindo sobrevivência celular e preservação de organizações teciduais (item 4.6), bem como de suas funções (itens 4.1 a 4.5) ((BRENNERMAN., *et al*, 2010; FRANCO. *et al.*, 2012; BEDI. *Et al.*, 2013).

Os tratamentos com transplantes autólogos de CMMO, em momento agudo ou agudo e subagudo do curso isquêmico, promoveram sobrevivência neuronal que propiciou preservação da organização cortical e repercutiu na preservação dos padrões de assimetria exploratória nos períodos subagudo e crônico pós AVEi focal de nosso modelo experimental (item 4.2).

#### 5.4 TRANSPLANTES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM PRESERVAÇÃO E RECUPERAÇÃO PARCIAL DE PADRÃO DE ATIVIDADE SENSÓRIOMOTORA EXPECIFICA

Dependendo da intensidade da lesão, a neurodegeneração pode provocar alterações de organização da circuitaria neural que se manifestam em alterações funcionais (LO *et al.*, 2003; DOYLE *et al.*, 2008). No córtex motor, desorganizações neurais deletérias repercutem em alterações motoras

contralaterais com déficits diretamente relacionado com a intensidade da neurodegeneração (PANDIAN, *et al.*, 2009; TENNANT *et al* 2011). No presente trabalho, utilizamos modelo de lesão isquêmica focal no córtex motor que provocou desordem tecidual e perda neuronal que repercutiram em alterações de padrões de atividade sensório-motora específica (item 4.3).

Promovemos tratamentos autólogos experimentais com transplantes de CMMO, com a intenção de utilizar sua capacidade de, em ambiente inflamatório, liberar fatores tróficos e de crescimento descritos como capazes atuar na sobrevivência neuronal e promover neuroproteção (JIANG *et al.*, 2011; BRENNEMAN *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2012) permitindo sobrevivência celular e preservação de organizações teciduais, suficientes para repercutir em preservação funcional.

Os tratamentos com transplantes autólogos de CMMO, em momento agudo, ou agudo e subagudo do curso isquêmico, promoveram sobrevivência neuronal suficiente para propiciar preservação parcial dos padrões de assimetria exploratória, bem como recuperação parcial desta atividade motora em períodos subagudo e crônico pós lesão provocada por AVEi focal de nosso modelo experimental (item 4.7).

O transplante autólogo adicional de CMMO, em período subagudo, mostrou-se suficiente para promover melhora da recuperação de padrões da função sensório-motora (item 4.3 ). Efeito este que relacionamos com a manutenção e/ou aumento da atuação das CMMO sobre o ambiente inflamatório, já que o mesmo não ocorreu nos animais do grupo controle.

## 5.5 TRATAMENTOS AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVERAM NEUROPRESERVAÇÃO QUE SE EXPRESSA EM PRESERVAÇÃO FUNCIONAL

Após um surto isquêmico encefálico, os neurônios são as células mais sensíveis às alterações fisiopatológicas que se seguem (LO *et al.*, 2003; DOYLE *et al.*, 2008). Esse efeito neurodegenerativo promove perda funcional da área acometida. No córtex motor, a neurodegeneração manifesta-se em alterações

motoras contralaterais (HERMANN & CHOPP, 2012; HOSP & LUFT, 2011; TENNANT *et al.*, 2011). No presente trabalho utilizamos modelo de lesão isquêmica focal no córtex motor que provocaram desorganização neuronal (item 4.7) que repercutiram em alterações funcionais específicas (item assimetria e escada).

Estudos demonstram os efeitos neuroprotetores de CMMOs transplantadas em período pós isquêmico. Também são descritas melhoras funcionais relacionadas com tratamento com CMMO em modelos de isquemia encefálica (BRENNEMAN *et al.*, 2010; FRANCO *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2011). Após o transplante das CMMOs na área de lesão, elas promovem liberação de fatores tróficos, como o BDNF (do inglês *brain derived neurotrophic factor*) e o NGF (do inglês *nerve growth factor*), em maior escala. O BDNF age promovendo crescimento e diferenciação de células jovens e sobrevivência dos neurônios residentes, por estimula aumento da expressão IL – 10 (citocina com caráter anti-inflamatório), enquanto o NGF atua na diminuição de apoptose (BRENNEMAN *et al.*, 2010, JIANG *et al.*, 2011).

No presente trabalho, os transplantes de CMMO mostraram-se eficientes em promover preservação tecidual (item 4.6) e neuronal (item 4.7), atuando na modulação da resposta inflamatória e em suas alterações funcionais, desde a fase aguda como demonstrado em nossos resultados de marcação neuronal e glial (itens 4.2 a 4.5).

O transplante adicional de CMMO, em fase subaguda, mostrou-se eficiente em promover melhora da neuropreservação durante a fase crônica da lesão pós-AVEi (item 4.7). Efeito este, suficiente para repercutir em melhora da recuperação funcional de atividade motora específica (item 4.4). Correlacionamos estes achados com o que já está estabelecido na literatura acerca da produção de fatores tróficos, pelas CMMO, como por exemplo BDNF e NGF que, por sua vez, atuam na modulação do ambiente inflamatório promovendo preservação de neurônios e, assim, promovendo Neuroproteção.

## 5.6 TRANSPLETES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVE MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL E TORNA O AMBIENTE DE LESÃO MAIS PERMICIVEL À PRESERVAÇÃO TECIDUAL E À RECUPERAÇÃO FUNCIONAL

As células microgliais possuem caráter proliferativo em resposta inflamatória ao surto isquêmico no SNC, induzindo alterações como morte celular e necrose tecidual no nicho isquêmico. Células microgliais ativadas produzem e liberam várias citocinas pró-inflamatórias, radicais livres, óxido nítrico, metaloproteases e glutamato, atuantes na regeneração e são potencialmente neurotóxicos (JIANG *et al.*, 2011; GRAEBER & STREIT, 2010).

Todavia, a inflamação aguda, pode prejudicar os neurônios que estão em sofrimento em consequência à baixa súbita de ATP, mas ainda apresentam potencial recuperação e sobrevivência pós-isquêmica, e isto pode agravar o dano primário provocado pelo surto isquêmico ( JIANG *et al.*, 2011; BEDI *et al.*, 2013; ZANIER *et al.*, 2014). Perante isto, uma abordagem terapêutica potencialmente benéfica seria a inibição/modulação da resposta inflamatória microglial inata como estratégia para diminuir a lesão isquêmica, bem como todas as suas repercussões morfo-funcionais.

Nossos resultados demonstram que os transplantes de CMMO são eficientes em promover preservação tecidual (item 4.6) e neuronal (item 4.7), atuando na modulação da ativação microglial (item 4.8) e em suas alterações funcionais, desde a fase aguda (item 4.2 a 4.5).

## 5.7 TRANSPLETES AUTOLOGOS DE CMMO PROMOVEM MODULAÇÕES INFLAMATÓRIAS PERMICIVEIS A PRESERVAÇÃO TECIDUAL SUSEPTIVEIL A PRESERVAÇÃO FUNCIONAL

Ao serem afetados pelo ambiente isquêmico, os astrócitos liberam glutamato para o espaço extracelular, agravando ainda mais a excitotoxicidade na área de lesão (KAWANO, *et al.*, 2012). Após um surto isquêmico, na região

periférica à área de lesão, ocorre o aumento da densidade astrocitária e astrogliose, cronicamente formando cicatriz glial, impedindo assim o crescimento da área lesionada (FITCH & SILVER, 2008; KAWANO, *et al.*, 2012) e recrescimento axonal e dendrítico, anulando assim qualquer potencial capacidade de regeneração estrutural e funcional da referida área lesionada (KAWANO, *et al.*, 2012).

A astrogliose é estimulada, também, por citocinas secretadas das células microgliais, portanto a modulação da intensidade de ativação microglial pode atuar na modulação da astrogliose e potencialmente ter ação na diminuição da progressão da perda funcional do tecido (SCHMID-BRUNCLIK *et al.*, 2008; STREIT *et al.*, 2009).

Os transplantes de CMMO mostraram-se eficientes em promover diminuição da astrogliose desde a fase aguda até a fase crônica (item 4.2 a 4.5). Essa atuação é fundamental para ocorrência de recuperação de funções motoras aqui avaliadas (FIGURAS 11 e 12).

No presente estudo, o transplante adicional de CMMO em fase subaguda, mostrou-se eficiente em promover melhora da diminuição de astrogliose em fase crônica da lesão (item 4.9). Este efeito foi suficiente para repercutir em aumento da melhora da recuperação funcional de atividade motora específica (item 4.4 e 4.5). Propomos que este achado está relacionado ao fato de a diminuição da cicatriz glial propiciar ambiente mais susceptível a reorganizações neuroplásticas na área lesionada, fundamental para preservação e recuperação de funcionalidade neurais (SHUAI *et al.*, 2015; YANG 2012 *et al.*, 2012;). São necessários estudos adicionais para se investigar se esta estratégia terapêutica promove formação de novas sinapses e, assim, promove consequentemente recuperação funcional da área afetada por AVEi focal.



## 6 CONCLUSÃO

-O modelo de isquemia cerebral com injeções de 40 pMol de ET-1, com ou sem tratamento com injeções intravenosas de CMMO, não promoveram alterações funcionais de intensidade exploratória.

- Transplantes autólogos intravenosos de CMMO, em período agudo ou agudo e subagudo, promovem preservação e recuperação de propriedades funcionais de assimetria exploratória, em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplantes autólogos intravenosos de CMMO, em período agudo ou agudo e subagudo, promovem preservação e recuperação de padrões funcionais de atividade motora específica, em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplante autólogo intravenoso adicional de CMMO, em período subagudo, promove melhora da recuperação de padrões funcionais de atividade motora específica, em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplantes autólogos intravenosos de CMMO, em período agudo ou agudo e subagudo, promovem neuropreservação em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplante autólogo intravenoso adicional de CMMO, em período subagudo, promove melhora da neuropreservação, em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplantes autólogos intravenosos de CMMO, em período agudo ou agudo e subagudo, diminuem a ativação microglial em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

- Transplantes autólogos intravenosos de CMMO, em período agudo ou agudo e subagudo promovem diminuição da astrogliose em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

-- Transplante autólogo intravenoso adicional de CMMO, em período subagudo, promove melhora na diminuição da astrogliose em modelo de lesão isquêmica focal cortical.

## 7 REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. **Cellular and Molecular Immunology**, 5th ed., Saunders, 2003.

ALAM, M. *et al.* Hyperthermia up-regulates matrix metalloproteinases and accelerates basement membrane degradation in experimental stroke. **Neuroscience Letters**. 2011.

AMERICAN HEART ASSOCIATION: Heart Disease and Stroke Statistics – 2015 Update. Dallas, Texas: **American Heart Association**; 2015.

BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C, DAVOUST J, LEBECQUE S, LIU Y J, PULENDRAN B, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**. 18:767-811.2000.

BACIGALUPPI S, BACIGALUPPI M, TREDICI G. Solitary demyelinating plaques mimicking brain tumors: a tricky similarity. **J Postgrad Med**.;56(4):254-6. Out-Dec, 2010.

BACIGALUPPI, M.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; KILIC, E. & HERMANN, D.M. Neural stem/precursor cells for the treatment of ischemic stroke. **Journal of the Neurological Science**, v.265, n.1-2, p.73-77, Feb 15. 2008.

BARNABE C. C, LECLERCQ S. A, FITZGERALD A. A. The development of inflammatory arthritis and other rheumatic diseases following stem cell transplantation. **Semin Arthritis Rheum**, 39(1):55-60. Aug, 2009.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., &Paradiso, M. A. Fundamentos. Em: Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso.3ª Ed. Porto Alegre, RS: Artmed. (2008).

BECKER, K. Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. **Neuroscience**. v. 158, p. 1090–1097, 2009.

BEDERSON; PITTS; TSUJI; NISHIMURA; DAVIS; BARTKOWSKI. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. **Stroke**, v. 17, n.3, p. 472-476, 1986.

BIEGON, A. *et al.* Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. **J. Neurochem**. v. 82, p. 924–934, 2002.

BIERNASKIE J, CORBETT D, PEELING J, WELLS J, LEI H. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats. **Magn Reson Med**;46:827–830; 2001.

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

BLISS, T.M. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. **Neurobiology of Disease**. v. 37, p. 275–283, 2010.

BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free Radic. Biol. Med.* v. 40, n. 3, p. 388–397, 2006.

BRENNEMAN M., SHARMA S, HARTING M, STRONG R, COX C S , ARONOWSKI J ,GROTTA J AND SAVITZ S I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**. 30, 140–149, 2010.

BROUNS, R.; DE DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2009.

CAMARGO, E.C.S. *et al.* Stroke in Latin America. **Neuroimag Clin N Am**. v.15. p. 283 – 296, 2005.

CARDOSO MM, FRANCO EC, DE SOUZA CC, DA SILVA MC, GOUVEIA A, GOMES-LEAL W. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia. **Inflammation**, 36(1):197-205. Feb 2013.

CARMICHAEL S. T. Rodent Model of Focal Stroke: Size, Mechanism, and Purpose. **Jorn. Americ. Soc. Exp. NeuroTra**. 2005

CASTRO-ALAMANCOS; BORREL. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. **Neuroscience**, v. 68, n.3, p. 793-805, 1995.

CENCI; WHISHAW; SCHALLERT. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n.7, p. 574-579, 2002.

CHEN, J.; VENKAT, P.; ZACHAREK, A.CHOPP, M. Neurorestorative therapy for stroke. **Front Hum Neurosci**, v. 8, n. p. 382, 2014.

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, 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.

CONDUCTIER, G. *et al.* The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neuroimmunology**. v. 224, p. 93–100, 2010.

COUTTS M, KEIRSTEAD H.S. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. **Exp Neurol**, 209(2):368-77. 2010.

CUI, X., *et al.* Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. **Neuroscience** v. 159, p. 744–750, 2009.

CUMBLER, E. Stroke Alert Program Improves Recognition and Evaluation Time of In-Hospital Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**. v. 19, No. 6 (November-December), p. 494-4. 2010.

DAVID J. LOANE & KIMBERLY R. Byrnes. Role of Microglia in Neurotrauma. **Neurotherapeutics**. 366–377. Oct; 2010.

DAVIE N, HALEEN SJ, UPTON PD, POLAK JM, YACOUB MH, MORRELL NW, WHARTON J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Crit Care Med**; v165: 398-405. 2002.

DE FELIPE J, FARINAS I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. **Progress in Neurobiology**. v39:563-607.1992.

DEIERBORG, T. *et al.* Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation *ex vivo* and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. **Neuroscience**. v. 171, p. 1386–1396, 2010.

DENES, A. *et al.* Brain, Behavior, and Immunity. v. 24. p. 708–723, 2010.

DEWAR D., YAM P., MCCULLOCH J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter. *Eur. J. Pharmacol.* v. 375, p. 41-50, 1999.

DHAWAN, J. *et al.* Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors. **NeuroImage**. v. 51, p. 599–605, 2010.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., AND MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci.** p. 391–397, 1999.

DODICK, D.W.; GARGUS, J.J. Why migraines strike. *Sci. Am.* v. 299, p. 56, 2008. DOMERCQ, M.; MATUTE, C. Neuroprotection by tetracyclines. *Trends in pharmacological Sciences*. v.25, n.12, p.609-612, Dec. 2004.

DOYLE KP, SIMON RP, STENZEL-POORE MP. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**. 55:310-318. 2008.

EPSTEIN, D.; MASON, A. & MANCA, A. The hospital costs of care for stroke in nine European countries. **Health Economics**, v.17, n.1 Suppl, p.S21-31. Jan. 2008.

FARR; LIU; COLWELL; WHISHAW; METZ. Bilateral alteration in stepping pattern after unilateral motor cortex injury: a new test strategy for analysis of skilled limb movements in neurological mouse models. **J Neurosci Methods**, v. 153, n.1, p. 104-113, 2006.

FELTEN D L, SHETTY A N, NETTER F H. Netter's Atlas of Neuroscience, 2nd Ed. *Saunders/Elsevier*.2010.

FERNANDES, P. T. *et al.* Perception and Attitude towards Stroke by Professionals of Emergency Medical Service in an Urban City in Southeastern Brazil. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**. v. 18, No. 3 (May-June), p. 195-197, 2009.

FLYNN, R.W.; MACWALTER, R.S. & DONEY, A.S. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v.55, n.3, p.250-256, Sep. 2008.

FONTANA A. C. K. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. **Jorn. Neuroch.** 2015

FRANCO E. C., CARDOSO M.M., GOUVÊIA 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**, 73(2):122-32. Jun 2012.

Fuxe, K., E. Anggard, K. Lundgren, A. Cintra, L. F. Agnati, S. Galton, and J. Vane. Localization of [125I]endothelin-1 and [125I]endothelin-3 binding sites in the rat brain. **Acta Physiol. Scand.** 137: 563–564, 1989.

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.

GEISSMANN, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*. v. 327, 2010. GEYER, S., MATELLI, M., LUPPINO, G., ZILLES, K., Functional neuroanatomy of the primate isocortical motor system. **Anat. Embryol.** v202, 443–474. 2000.

GINSBERG, M.D. *et al.* Albumin-based neurotherapeutics for acute ischemic stroke: from bench to bedside. In: Krieglstein, J., Klumpp, S. (Eds.), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. **Medpharm Scientific Publishers**. p. 421 - 433, 2004.

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 Research**, Feb 9. 2009.

GÖGEL S, GUBERNATOR M, MINGER SL. Progress and prospects: stem cells and neurological diseases. **Gene Ther.** 18(1):1-6. Jan 2011.

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

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J. Microglia: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** v. 119, p. 89–105, 2010.

GUILLEMIN, G.J.; BREW, B.J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 75, 2004.

HACKE, W. *et al.* Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. **The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS).** **JAMA.** v. 274, p. 1017–25, 1995.

HALL, R. D. & LINDHOLM, E. P. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. **Brain Res.** 66: 23-38. 1974.

HERMANN & CHOPP. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. **Lancet Neurol**, v. 11, n.4, p. 369-380, 2012.

HESS D. C, BORLONGAN C. V. Cell-based therapy in ischemic stroke. **Expert Rev Neurother.** 8(8):1193-201. Aug 2008.

HEWLETT K.A & CORBETT D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. **Neuroscience.** 11;141(1):27-33. Aug, 2006.

HEUSCHMANN PU, BERGER K, MISSELWITZ B, HERMANEK P, LEFFMANN C, ADELMANN M, BUECKER-NOTT HJ, ROTHER J, NEUNDOERFER B, KOLOMINSKY-RABAS PL; German Stroke Registers Study Group; Competence Net Stroke. Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group. **Stroke.** 34(5):1106-13., Mar, 2003.

HEWLETT, K.A.; CORBETT, D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. **Neuroscience.** v.141, n.1, p.27-33, 2006.

HIMES BT, NEUHUBER B, COLEMAN C, KUSHNER R, SWANGER SA, KOPEN GC, WAGNER J, SHUMSKY JS, FISCHER I. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. **Neurorehabil Neural Repair**; 20(2):278-96 Jun 2006.

HOPE. **Lancet Neurol**. Jul;1(3):149-56,2002.

HOSP; LUFT. Cortical plasticity during motor learning and recovery after ischemic stroke. **Neural Plast**, v. 2011, n., p. 871296, 2011.

HOSSMANN, K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cellular & Molecular Neurobiology**, v.26, n.7-8, p.1057-1083, Oct-Nov. 2006.

HSU J. E & JONES T. A..Time-sensitive enhancement of motor learning with theless-affected forelimb after unilateral sensorimotor cortexlesions in rats. **European Journal of Neuroscience**, Vol. 22, pp. 2069–2080, 2005.

HUGHES, P. M.; ANTHONY, D. C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M. S.; RANKINE, E. L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A. K. e PERRY, V. H. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **J NeuropatholExpNeurol**, v. 62, n. 12, p. 1276-1286, 2003.

IMANAKA, Y. Management patterns and healthcare costs for hospitalized patients with cerebral infarction. **Health Policy**, v.88, n.1, p.100-109, Oct. 2008.

ISHISHITA Y, KIMURA T, MORITA A. Urgent superficial temporal artery to middle cerebral artery bypass shortly after intravenous rt-PA. **J Neurosurg**. 26(5):773-5. Oct 2012.

JIANG H, CHENG Z, TIAN M, ZHANG H. In vivo imaging of embryonic stem cell therapy. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 38(4):774-84. Apr 2011.

JIN SOO OH, MENG LU LIU, HONG LIAN JIN, SUNG SU AN, KEUNG NYUN KIM, DO HEUM YOON, YOON HA. Effect of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media for Neurite Outgrowth in Human Ntera-2 Neurons. **Tissue. Engineering and Regenerative Medicine**, 6(4) :562-567. June 2009.

JIN, R.; YANG, G.; JIANG, Y. *et al.* Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J Leukoc Biol**. v. 87, p. 779–789, 2010.

KAAS. Neurobiology. How cortex reorganizes. **Nature**, v. 375, n.6534, p. 735-736, 1995.

KAWANO H1, KATSURABAYASHI S, KAKAZU Y, YAMASHITA Y, KUBO N, KUBO M, OKUDA H, TAKASAKI K, KUBOTA K, MISHIMA K, FUJIWARA M, HARATA NC, IWASAKI K. Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. **PLoS One**. (10): Oct 26.2012

KELLER, A. F *et al.* Treatment with minocycline after disease onset *alters* astrocyte reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. **Experimental Neurology**. v. 228, p. 69–79, 2011.

KIDWELL C. S., JAHAN R. Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Neurol Clin**. 33 401-420; 2015.

KRABBE C, ZIMMER J, MEYER M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. **APMIS**. ;113(11-12):831-44; Nov-Dec 2005 .

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**. 2009.

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

LAVADO A, LAGUTIN OV, CHOW LM, BAKER SJ, OLIVER G. Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. **PLoS Biol**. 2010:8.

LEGG L, LANGHORNE P; OUTPATIENT SERVICE TRIALISTS.Rehabilitation therapy services for stroke patients living at home: systematic review of randomised trials.**Lancet**. 31;363(9406):352-6. Jan 2004.

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.

LENT, Roberto. Cem bilhões de neurônios: Conceitos Fundamentais em Neurociência. 2ª. Edição, Editora Atheneu, 2010.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v.79, n.4, p.1431-1568, Oct. 1999.

LIVINGSTON-THOMAS JM, TASKER RA.Animal models of post-ischemic forced use rehabilitation: methods, considerations, and limitations.**ExpTransl Stroke Med**. V23;5(1):2. 2013.

LO EH, DALKARA, T., MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews neuroscience*. 4:399-415. 2003.

LO, E.H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nature Medicine**. v. 14, 2008.



LOTUFO. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n.1, p. 3-4, 2005.

MACHADO, L.S.; KOZAK, A.; ERGUL, A.; HESS, D.C.; BORLONGAN 2008, C.V. & FAGAN, S.C. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. **BioMed Central Neuroscience**, v.7, p.56. 2006.

MAHLER, M.P.; ZUGER, K.; KASPAR, K.; HAEFELI, A.; JENNI, W.; LENIGER, T. BEER, J.H. A cost analysis of the first year after stroke - early triage and inpatient rehabilitation may reduce long term costs. **Swiss Medical Weekly**, v.138, n.31-32, p.459-465. 2008.

MAKIHARA N, OKADA Y, KOGA M, SHIOKAWA Y, NAKAGAWARA J, FURUI E, KIMURA K, YAMAGAMI H, HASEGAWA Y, KARIO K, OKUDA S, NAGANUMA M, TOYODA K. Effect of serum lipid levels on stroke outcome after rt-PA therapy: SAMURAI rt-PA registry. **Cerebrovasc Dis**. 33(3):240-7. 2012.

HABERMAN F1, TANG SC, ARUMUGAM TV, HYUN DH, YU QS, CUTLER RG, GUO Z, HOLLOWAY HW, GREIG NH, Mattson M. Soluble neuroprotective antioxidant uric acid analogs ameliorate ischemic brain injury in mice. **Neuromolecular Med**. (4):315-23. Epub Aug 10. 2007.

MCNEAL; DARLING; GE; STILWELL-MORECRAFT; SOLON; HYNES; PIZZIMENTI; ROTELLA; VANADURONGVAN; MORECRAFT. Selective long-term reorganization of the corticospinal projection from the supplementary motor cortex following recovery from lateral motor cortex injury. **J Comp Neurol**, v. 518, n.5, p. 586-621, 2010.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U. e MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, 2004.

METZ G. A, WHISHAW I. Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. **J Neurosci Methods**. V15;115(2):169-79. Apr. 2002

METZG A & WHISHAW. I. Q. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. **J Vis Exp**. ; (28): 1204. 2009.

MOUNTCASTLE. The columnar organization of the neocortex. **Brain**, v. 120, p. 701-722, 1997.

MILLS, C. D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit Rev Immunol**, v. 32, n. 6, p. 463-488, 2012.

MOSKOWITZ, M. A. *et al*. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**. 2010.

MÜLLER-EHMSEN J, KRAUSGRILL B, BURST V, SCHENK K, NEISEN UC, FRIES JW, FLEISCHMANN BK, HESCHELER J, SCHWINGER RH. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol.** 41(5):876-84. Nov 2006.

NAEGELE JR, MAISANO X, YANG J, ROYSTON S, RIBEIRO E. Recent advancements in stem cell and gene therapies for neurological disorders and intractable epilepsy. **Neuropharmacology.** 58(6):855-64. Feb 8 2010.

NAM KN, KIM KP, CHO KH, JUNG WS, PARK JM, CHO SY, PARK SK, PARK TH, KIM YS, LEE EH. Prevention of inflammation-mediated neurotoxicity by butylidenephthalide and its role in microglial activation. **Cell Biochem Funct.** Feb 11. 2013.

NEUHUBER B, TIMOTHY HIMES B, SHUMSKY JS, GALLO G, FISCHER I. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. **Brain Res.**, 21;1035(1):73-85. Feb 2005.

NEUMANN, J. *et al.* Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci.** v. 28, p. 5965–5975, 2008.

NEUMANN, J. *et al.* Microglia provide neuroprotection after ischemia. **FASEB J.** v. 20, p. 714–716, 2006.

NUDO. Neural bases of recovery after brain injury. **J Commun Disord**, v. 44, n.5, p. 515-520, 2011.

OTERO-ORTEGA L, GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ M, RAMOS-CEJUDO J, RODRÍGUEZ-FRUTOS B, FUENTES B, SOBRINO T, HERNANZ TN, CAMPOS F, LÓPEZ JA, CERDÁN S, VÁZQUEZ J, DÍEZ-TEJEDOR E. White matter injury restoration after stem cell administration in subcortical ischemic stroke. **Stem Cell Res Ther.** Jun 19;6(1):121; 2015.

PANDIAN, J.D. Re-canalization in acute ischemic stroke: the strategies. **Neurology.** v. 57, p. 20–27, 2009.

PAXINOS, G W. The rat brain in stereotaxic coordinates, 1982.

PENG, P. *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. **Neuron.** v. 49, p. 719-733, 2006.

RANSOHOFF, R.M.; PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol.** v. 27, p. 119 –145, 2009.

RIBES, S. *et al.* Fibronectin stimulates Escherichia coli phagocytosis by microglial cells. **Glia**. v. 58, p. 367–376, 2010.

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.

SACCO, R.L. *et al.* Experimental treatments for acute ischaemic stroke. **Lancet**. v. 369, p. 331–41, 2007.

PENFIELD. Some observations on the cerebral cortex of man. **Proc R Soc Lond B BiolSci**, v. 134, n.876, p. 329-347, 1947.

QURESHI AI, SURI MA, SAFDAR K, OTTENLIPS JR, JANSSEN RS, FRANKEL MR. Intracerebral hemorrhage in blacks. Risk factors, subtypes, and outcome. **Stroke**. ;28(5):961-4. May, 1997.

SACCO; FRIEDEN; BLAKEMAN; JAUCH; MOHL. What the million hearts initiative means for stroke: a presidential advisory from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 43, n.3, p. 924-928, 2012.

SCHIEBER. Constraints on somatotopic organization in the primary motor cortex. **J Neurophysiol**, v. 86, n.5, p. 2125-2143, 2001.

SCHMID-BRUNCLIK, N. *et al.* Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation. **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.** 295, R864–R873, 2008.

SCHROETER, M.; JANDER, S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. **Neuromol Med** 7:1–13, 2005.

SCHWARZMAIER S. M. AND NIKOLAUS PLESNILA. Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury – evidence by intravital microscopy. **Cell Neurosci. Nov**; 2014.

SEKIMOTO, M.; KAKUTANI, C.; INOUE, I.; ISHIZAKI, T.; HAYASHIDA, K. & IMANAKA, Y. Management patterns and healthcare costs for hospitalized patients with cerebral infarction. **Health Policy**, v.88, n.1, p.100-109, Oct. 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.

SHARMA; SELZER; LI. Scar-mediated inhibition and CSPG receptors in the CNS. **Exp Neurol**, v. n., p. 2012.

SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON; BLAND. 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, 2000.

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.

SHENHAR-TSARFATY, S. *et al.* Early signaling of inflammation in acute ischemic stroke: Clinical and rheological implications. **Thrombosis Research**. v. 122, p. 167–173, 2008.

SOLEMAN; YIP; DURICKI; MOON. Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats. **Brain**, v. 135, n.Pt 4, p. 1210-1223, 2012.

SONG J, CHRISTIAN K., MING G. & SONG H. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. **Dev Neurobiol**. 72 (7); 1032-1043. July, 2012.

STREIT, W.J. *et al.* Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol**. v. 118, p. 475–485, 2009

STREIT WJ1, XUE QS. Life and death of microglia. **J Neuroimmune Pharmacol**. Dec;4(4):371-9. Epub Aug 14. 2009.

TAKAKURA M, SAKIHARA S. Gender differences in the association between psychosocial factors and depressive symptoms in Japanese junior high school students. **J Epidemiol**;10(6):383-91, Nov 2000.

TARAWNEH, R.M.D.; GALVIN, J.E. Potential Future Neuroprotective Therapies for Neurodegenerative Disorders and Stroke. **Clin Geriatr Med**. v. 26, p.125–147, 2010.

TENNANT & JONES. Sensorimotor behavioral effects of endothelin-1 induced small cortical infarcts in C57BL/6 mice. **J Neurosci Methods**, v. 181, n.1, p. 18-26, 2009.

TREGUB P. P., KULIKOV V. P. , RUCHEIKIN N. YU. , BELOVA E. V. & MOTIN YU. G. Proliferative and Synthetic Activity of Nerve Cells after Combined or Individual Exposure to Hypoxia and Hypercapnia. **Exp. Bio. and Med**. V 159. July, 2015.

TURNER RC, LUCKE-WOLD B, LUCKE-WOLD N, ELLIOTT AS, LOGSDON AF, ROSEN CL, HUBER JD. Neuroprotection for ischemic stroke: moving past shortcomings and identifying promising directions. **Int J Mol Sci**. V17;14(1):1890-917. Jan ,2013.

VASCONCELOS DOS SANTOS, A. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**. v. 1306, p. 149 – 158, 2010.

VOGELGESANG, A.; BECKER, K. J.DRESSEL, A. Immunological consequences of ischemic stroke. **Acta Neurol Scand**, v. 129, n. 1, p. 1-12, Jan, 2014.

WANG J, FUA X, JIANGA C, YUA L, WANG M, HANA W, LIU L & WANG J. Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation Promotes Therapeutic Angiogenesis via Upregulation of the VEGF-VEGFR2 Signaling Pathway in a Rat Model of Vascular Dementia. **Behav Brain Res**. 15;265: 171-180. May; 2014.

WARD A.B.A literature review of the pathophysiology and onset of post-stroke spasticity.**Eur J Neurol**. 19(1):21-7. Jan 2012.

WISLET-GENDEBIEN S, LAUDET E, NEIRINCKX V, REGISTER B. Adult bone marrow: which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders?**J Biomed Biotechnol**. 560-601. 2012.

WOODRUFF, T. M., THUNDYIL, J., TANG, S.C., SOBEY, C. G., TAYLOR, S. M., ARUMUGAM, T.V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration** . 6:11; 2011.

XIONG X, WHITE RE, XU L, YANG L, SUN X, ZOU B, PASCUAL C, SAKURAI T, GIFFARD RG, XIE XS. Mitigation of Murine Focal Cerebral Ischemia by the Hypocretin/Orexin System Is Associated With Reduced Inflammation.**Stroke**. Jan 24, 2013.

YANAGISAWA M, KURIHARA H, KIMURA S, TOMOBE Y, KOBAYASHI M, MITSUI Y, YAZAKI Y, GOTO K. MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature** 332:411–415. 1988;

YENARI, M. A. Microglial Activation in Stroke: Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. v. 7, p. 378–391, 2010.

YRJÄNHEIKKI J1, TIKKA T, KEINÄNEN R, GOLDSTEINS G, CHAN PH, KOISTINAHO J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Nov 9;96(23):13496-500. 1999.

ZHANG, J.CHOPP, M. Cell-based therapy for ischemic stroke. **Expert Opin Biol Ther**, v. 13, n. 9, p. 1229-1240, Sep, 2013.

## 8 ANEXO



### PARECER 204-14

**Projeto:** EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL NO CORTEX MOTOR PRIMARIO

**Coordenador:** Prof. Dr. Antonio Pereira Junior

**Área Temática:** Neurociências

**Vigência:** 10/2012 a 10/2014

**Nº no CEPAE-UFPA:** 204-14

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação (N= 24, ratos Wistar) nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido.

As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 11 de novembro de 2012

  
Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente do CEPAE-UFPA