

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

PATRYCY ASSIS NORONHA TAVARES

**IMUNOREATIVIDADE PARA OS RECEPTORES DE
NEUROTROFINAS p75^{NTR} E TrkA NA ZONA SUBVENTRICULAR DE
RATOS ADULTOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL**

Belém
2015

PATRYCY ASSIS NORONHA TAVARES

**IMUNOREATIVIDADE PARA OS RECEPTORES DE
NEUROTROFINAS p75^{NTR} E TrkA NA ZONA SUBVENTRICULAR DE
RATOS ADULTOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Neurociências, sob a orientação do professor Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do professor Dr. Rafael Rodrigues Lima.

Belém
2015

Aos meus pais ***Hélio Noronha Tavares*** e ***Rosana Assis Marçal*** e às minhas filhas ***Beatryce Tavares*** e ***Claryce Tavares***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Wallace Gomes Leal.

À prof^ª Elizabeth Yamada e ao laboratório de neuropatologia experimental.

Ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, especialmente ao Reginaldo Trindade e seu Amarildo.

Aos colegas do laboratório, Ijair Rodrigues, Michele, Adriano Guimarães, Marcelo Cardoso, Rosana Lopes e Nelson Abraão.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional.

Ao co-orientador Rafael Rodrigues Lima.

RESUMO

Neurotrofinas são fatores de crescimento expressos por células do Sistema Nervoso, tanto durante o desenvolvimento quanto na vida adulta. O Fator de Crescimento Nervoso (NGF, do inglês- Nerve Growth Factor), o Fator Neurotrófico derivado do Cérebro (BDNF- do inglês- Brain-derived Neurotrophic Factor), Neurotrofina-3 (NT-3) e Neurotrofina-4/5 (NT-4/5), desempenham inúmeras funções relacionadas a maturação e resposta do tecido nervoso à patologias, como o Acidente Vascular Encefálico (AVE). Nesta condição, o aumento da expressão das neurotrofinas pode interferir no grau de neurogênese na Zona sub-ventricular (SVZ), bem como redirecionar a corrente migratória das Células-tronco Neurais Adultas (CTNAs) para a região isquêmica. A presença dos receptores de neurotrofinas p75^{NTR} e TrkA, em CTNAs da SVZ, indica que eles podem participar na regulação da neurogênese nessa região. Neste trabalho, descrevemos a influência de uma isquemia experimental, através de uma microinjeção do peptídeo vasconstritor Endotelina-1, restrita ao estriado adjacente à SVZ; sobre o padrão de imunoreatividade para os receptores p75^{NTR} e TrkA em diferentes tempos de sobrevivência. Foi analisado o padrão histopatológico do estriado isquêmico e a citoarquitetura da SVZ, seguidos de análises imunoistoquímicas para os receptores. Inúmeras células p75^{NTR}+ foram encontradas na SVZ contra e ipsilateral ao sítio de injeção, ocorrendo uma redução de imunoreatividade no primeiro e terceiro dia após a isquemia. Raríssimas células TrkA+ foram encontradas na SVZ de ambos os grupos, porém, observamos inúmeros terminais axonais TrkA+ na SVZ ipsilateral a isquemia. Logo, após o processo isquêmico, houve espessamento da SVZ, concomitante à redução da imunoreatividade para o p75^{NTR} e surgimentos de terminais axonais TrkA+.

Palavras-Chave: Neurogênese, AVE, p75^{NTR}, TrkA, SVZ, estriado.

Apoio Financeiro: CNPQ, CAPES.

ABSTRACT

Neurotrophins are growth factors expressed by cells of the nervous system both during development and in adulthood. The Nerve Growth Factor (NGF, the English- Nerve Growth Factor), brain-derived neurotrophic factor (English- BDNF- of Brain-Derived Neurotrophic Factor), Neurotrophin-3 (NT-3), Neurotrophin-4/5 (NT-4/5), have many functions related to aging and response of nervous tissue to the pathology such as vascular accident (CVA). In this pathology, the increase of the neurotrophin expression can interfere with the degree of neurogenesis in the sub-ventricular zone (SVZ) and redirect the rostral migratory flow of Adult Neural Stem Cells (CTNAs) to the ischemic region. The presence of neurotrophin receptors TrkA and p75NTR in the CTNAs of SVZ indicates that they may participate in the regulation of neurogenesis in this region. Here we describe the influence of an experimental ischemia by microinjection of a vasoconstrictor Endothelin-1 peptide, which is restricted to the striatum adjacent SVZ; on the pattern of immunoreactivity for TrkA and p75NTR receptors in different survival times. The histopathological pattern of ischemic striatum and the cytoarchitecture of the SVZ, followed by immunohistochemical analysis to the receptors were analyzed. Numerous p75NTR + cells were found in the ipsilateral SVZ and against the injection site, with had a reduction in immunoreactivity at first and third day after ischemia. Few TrkA + cells were found in SVZ of both groups, however, many TrkA + axonal terminals were saw in the ischemic ipsilateral SVZ. Soon after the ischemic process, there was thickening of the SVZ, the concomitant reduction in immunoreactivity for p75NTR and TrkA + arisings of axonal terminals.

Key-Words: Rat, Stroke, Neurotrophins, Neurogenesis, Subventricular Zone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Desenho esquemático representando uma visão sagital das duas principais regiões neurogênicas no cérebro do rato adulto.....	2
Figura 2.	Composição celular e propriedades antigênicas das células da Zona sub-ventricular (SVZ) do camundongo.....	6
Figura 3.	Organização esquemática da Zona ventricular-subventricular (V-SVZ).....	8
Figura 4.	Desenho ilustrativo da neurogênese na SVZ do rato normal e após isquemia estriatal.....	24
Figura 5.	Fotomicrografias de secções de cérebro de rato coradas com Cresil Violeta.....	34
Figura 6.	Fotomicrografias de secções cerebrais de ratos submetidos a isquemia estriatal com peptídeo vasoconstritor ET-1, coradas com cresil violeta.....	35
Figura 7.	Fotomicrografia de uma secção de cérebro de rato corada com Cresil Violeta, 7 dias após a indução isquêmica estriatal com vasoconstritor Endotelina 1 (ET-1).....	35
Figura 8.	Fotomicrografias de secções histológicas imunorreativas para o pan receptor de neurotrofinas (p75 ^{NTR}) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1.....	36
Figura 9.	Representação gráfica do número de células imunorreativas para o pan-receptor de neurotrofinas (p75 ^{NTR}) na V-SVZ dos hemisférios ipsilateral e contralateral à indução isquêmica com o vasoconstritor ET-1.....	37
Figura 10.	Fotomicrografias de secções histológicas imunorreativas para o receptor de neurotrofinas Tirosina cinase A (TrKA) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1.....	38
Figura 11.	Fotomicrografias de secções histológicas imunorreativas para o receptor de neurotrofinas Tirosina cinase A (TrKA) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEs	Acidentes Vasculares Encefálicos
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BO	Bulbo olfatório
CPN	Célula Precursora Neural
CSF	Fluído Cérebro-espinhal
CTNAs	Células Tronco Neurais Adultas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ETs	Endotelinas
ET1	Endotelina 1
FCE	Fator de Crescimento Epidermal
FCEr	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
FCF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FCN	Fator de Crescimento Neural
FGF2	Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
FNDC	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofinas 4 e 5
PAFG	Proteína Ácida Fibrilar Glial
PSA-NCAM	Molécula de Adesão Celular Neural Poli-sialada

p75 ^{NTR}	Pan-receptor de neurotrofinas
V-SVZ	Zona Subventricular-ventricular
SGZ	Zona Subgranular
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SVZ	Zona Subventricular
TrkA	Receptor Tirosina Kinase A
TrkB	Receptor Tirosina Kinase B
VMR	Via Migratória Rostral
ZNs-	Zonas Neurogênicas
ZV	Zona Ventricular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO- A DESCOBERTA E O SIGNIFICADO FUNCIONAL.....	2
1.2 ORGANIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS DA V-SVZ.....	4
1.2.1 Célula tipo B- A Célula-tronco da V-SVZ apresenta-se em estado quiescente e em estado ativado.....	7
1.2.2 Célula Tipo C da V-SVZ- A Célula em amplificação rápida.....	9
1.2.3 Células Tipo A- Neuroblastos.....	10
1.3 ESTÍMULOS NEUROGÊNICOS NA V-SVZ.....	10
1.3.1 Neurogênese na V-SVZ induzida por acidente vascular encefálico- O papel das neurotrofinas como estímulo neurogênico após AVE isquêmico.....	11
1.4 O MICROAMBIENTE NEUROGÊNICO E OS FATORES QUE REGULAM A NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO.....	14
1.4.1 Neurotrofinas.....	15
1.4.2 Receptores de Neurotrofinas Tirosina-kinase A (TrkA) e Tirosina-kinase B (TrkB). Aspectos relevantes da expressão em células-tronco da V-SVZ.....	17
1.4.3 Pan-receptor de Neurotrofinas p75 ^{NTR} no Cérebro Adulto.....	19
1.5 EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	22
1.6 O MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL COM ENDOTELINA1.....	24
1.7 PERGUNTA EXPERIMENTAL E HIPÓTESE.....	25
1.8 OBJETIVOS.....	28
1.8.1 OBJETIVO GERAL.....	28
1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29

2.1	ANIMAIS.....	29
2.2	INDUÇÃO DE LESÃO ISQUÊMICA ESTRIATAL.....	29
2.3	PERFUSÃO E CRANIOTOMIA.....	31
2.4	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	31
2.5	ANÁLISE QUALITATIVA.....	31
2.6	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	31
3.	RESULTADOS.....	34
3.1	A MICROINJEÇÃO DE ENDOTELINA-1 INDUZIU LESÃO ISQUÊMICA FOCAL RESTRITA AO ESTRIADO ADJACENTE À ZONA SUBVENTRICULAR.....	34
3.2	IMUNORREATIVIDADE PARA O PAN-RECEPTOR DE NEUTROFINAS (P75 ^{NTR}) NA V-SVZ APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....	36
3.3	IMUNORREATIVIDADE PARA O RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkA AO LONGO DA V-SVZ E ESTRIADO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....	37
4.	DISCUSSÃO.....	40
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	40
4.2	A IMUNOREATIVIDADE PARA O RECEPTOR p75 ^{NTR} OCORRE EM TODA A EXTENSÃO DA SVZ DE RATOS ADULTOS NORMAIS E EM REGIÕES DISCRETAS DA V-SVZ DE RATOS ADULTOS ISQUÊMICOS.....	41
4.3	O SIGNIFICADO DA PERDA DE IMUNOREATIVIDADE PARA O RECEPTOR p75 ^{NTR} NA V-SVZ DE RATOS ADULTOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL FOCAL.....	43
4.4	A IMUNORREATIVIDADE PARA O RECEPTOR TrkA NA V-SVZ APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....	44
5.	CONCLUSÃO.....	46
6.	BIBLIOGRAFIA.....	47
	ANEXO I.....	57
	ANEXO II.....	58
	ANEXO III.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO- A DESCOBERTA E O SIGNIFICADO FUNCIONAL

Acreditou-se, por muitos anos, que o cérebro de vertebrados superiores adultos não produzia novos neurônios, sustentando-se na seguinte declaração: *“In the adult centers the nerve paths are something fixed, ended and immutable. Everything may die, nothing may be regenerated.”* Ramon y Cajal's *Degeneration and Regeneration of the Nervous System* (1928).

De acordo com esse dogma, funções do sistema nervoso central (SNC) perdidas durante um Acidente Vascular Encefálico (AVE), não podem ser recuperadas através da substituição dos neurônios mortos. Além disso, pensava-se que a contínua produção de neurônios ao longo da vida adulta prejudicaria as características funcionais dos circuitos neurais já estabelecidos (GROTE and HANNAN 2007).

Esses conceitos foram abandonados após os resultados das pesquisas de Altman em 1962. Através de auto-radiografia com $[H^3]$ timidina, a qual se incorpora ao ácido desoxirribonucléico (DNA) durante a fase de síntese, Altman detectou células em contínua proliferação no bulbo olfatório e no hipocampo do cérebro de ratos adultos (ALTMAN 1962). A partir daí, essa técnica permitiu a detecção de células com propriedades de células-tronco em várias regiões do SNC adulto: Na parede dos ventrículos laterais (ALVAREZ-BUYLLA and GARCIA-VERDUGO 2002), no giro denteado hipocampal (GOULD and GROSS 2002, SONG, STEVENS et al. 2002), na medula espinhal (HORNER, POWER et al. 2000), no hipotálamo (MARKAKIS, PALMER et al. 2004) e no córtex cerebral (GU et al. 2009).

As principais regiões produtoras de células tronco do cérebro de vertebrados superiores adultos são a Zona Ventricular-subventricular (V-SVZ) e a Zona Sub-granular (SGZ) do giro denteado hipocampal (ALVAREZ-BUYLLA AND LIM 2004, GIL-PEROTIN, ALVAREZ-BUYLLA et al. 2009), (Figura 1). Na parede dos ventrículos laterais, a V-SVZ é o principal sítio de nascimento de neurônios e células gliais no cérebro de mamíferos jovens e adultos (TONG and ALVAREZ-BUYLLA 2014).

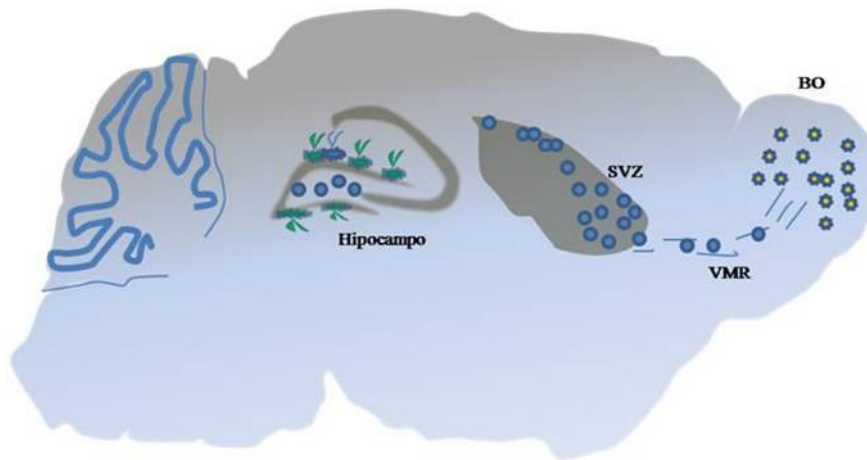


Figura 1: Desenho esquemático representando uma visão sagital das duas principais regiões neurogênicas no cérebro do rato adulto. Células precursoras neurais produzidas na zona subventricular (SVZ) migram tangencialmente através da via migratória rostral (VMR) para o bulbo olfatório (BO), onde se diferenciam e integram-se aos circuitos neurais locais. No hipocampo, os precursores neurais são produzidos na zona subgranular e migram para camada de células granulares.

A descoberta de células-tronco no cérebro adulto, em regiões restritas, chamadas Zonas Neurogênicas (ZNs) (ALTMAN and DAS 1965, ALVAREZ-BUYLLA and GARCIA-VERDUGO 2002) instigou um novo campo dentro da Neurociência: A busca pela identificação fenotípica e entendimento da fisiologia dessas células-tronco cerebrais endógenas, no intuito de manipulá-las para restaurar a estrutura e funções do tecido nervoso comprometido em doenças agudas e crônicas (LINDVALL and KOKAIA 2006; LIM and ALVAREZ-BUYLLA 2014).

As células-tronco do cérebro adulto são conhecidas como Células-tronco Neurais Adultas (CTNAs), pois, diferem das células-tronco neurais encontradas durante o desenvolvimento do tecido nervoso (TONG and ALVAREZ-BUYLLA 2014). No entanto, em ambos os períodos, as células-tronco caracterizam-se pelas propriedades de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares do sistema nervoso (OBERNIER, TONG et al. 2014). Nas ZNs, a proliferação, maturação e migração das CTNAs são reguladas por sinais das células diferenciadas adjacentes, moléculas da matriz extracelular (CONOVER and NOTTI 2008), neurotransmissores e fatores de crescimento (Lim and Alvarez-Buylla 2014), os quais regulam o Nicho das células-tronco (CONOVER and NOTTI 2008). Essas CTNAs da V-SVZ

são heterogêneas, gerando pelo menos seis diferentes subtipos de interneurônios do bulbo olfatório, dependendo da sua posição ao longo do eixo dorso-ventral e antero-posterior da V-SVZ (TONG and ALVAREZ-BUYLLA 2014).

A V-SVZ produz, aproximadamente 30.000 novos neurônios por dia, enquanto na SVZ esse número oscila entre 3.000 e 9.0000 novos neurônios (GOULD, TANAPAT et al. 1999). As CTNAs foram, também, encontradas no neocórtex (CAMERON and DAYER 2008) no cordão espinhal (DANILOV et al., 2006), nervo óptico, septum, estriato, substância nigra (MING and SONG 2005) e até mesmo no centro isquêmico, a principal região acometida por uma isquemia cerebral (NAKAGOMI, TAGUCHI et al., 2009). Isto indica, que as CTNAs são altamente resistentes, pois, o centro isquêmico é a área mais carente de suporte energético e, portanto, de maior morte celular (NAKAGOMI, TAGUCHI et al. 2009).

A terminologia “Neurogênese”, para o cérebro adulto, refere-se não só ao nascimento de novos neurônios, mas, também, a migração, diferenciação, integração sináptica e sobrevivência destas células no sítio-alvo (DAYER, JENNY et al. 2008). Logo, para que as CTNAs integrem-se à estrutura cerebral e assumam algum papel funcional dentro do cérebro, elas devem sobreviver durante a migração para o sítio-alvo, diferenciar-se nos tipos celulares perdidos e formar conexões sinápticas com os circuitos neurais pré-existentes (IMITOLA 2007; KOCH, KOKAIA et al. 2009).

A produção de CTNAs em regiões restritas do cérebro adulto pode ser considerada uma estratégia evolutiva de adição de novos neurônios apenas quando e onde necessário e indica que a integração contínua de novas células no cérebro adulto prejudicaria o funcionamento dos circuitos neurais já estabelecidos (ZHAO, DENG et al. 2008).

As CTNAs da V-SVZ são chamadas células B1 e originam-se de células-tronco do cérebro em desenvolvimento conhecidas como células da Glia Radial (LIM AND ALVAREZ-BUYLLA 2014). As Células B1 possuem características eletrofisiológicas e estruturais de astrócitos, geram neuroesferas multipotentes com capacidade auto-renovação *in vitro* (DOETSCH, CAILLE et al. 1999) e fazem a contínua substituição dos neurônios do bulbo olfatório após migrarem através da Via Migratória Rostral (VMR) (DOETSCH and SCHARFF 2001). Já as células produzidas na SGZ integram-se aos circuitos neurais do giro denteado hipocampal e estão envolvidas com a formação da memória espacial (FRANKLAND and MILLER 2008; IMAYOSHI, SAKAMOTO et al. 2008). A produção de

novos neurônios é, portanto, importante para manutenção de funções do cérebro maduro (KEE, TEIXEIRA et al. 2007).

A neurogênese na V-SVZ adquire novo papel funcional quando doenças neurodegenerativas, traumas ou AVE comprometem a integridade estrutural e funcional do cérebro (SOTTHIBUNDHU, LI et al. 2009). Em um modelo animal de doença de Alzheimer, por exemplo, observa-se o aumento da neurogênese na V-SVZ induzida pela ligação do peptídeo β -amilóide ao receptor p75^{NTR} presente em uma subpopulação de CTNAs da V-SVZ (SOTTHIBUNDHU, LI et al. 2009) e em animais modelos de doença de Parkinson a dopamina também aumenta a proliferação de CTNAs na V-SVZ (WINNER, DESPLATS et al. 2009).

O AVE induzido experimentalmente em roedores adultos também é capaz de interferir na neurogênese na V-SVZ (GRADE and WENG, 2013), amplificando e redirecionando o fluxo de neuroblastos migratórios da VMR para o estriado isquêmico (GRADE and WENG, 2013). O aumento da neurogênese na V-SVZ induzido pelo AVE é o objetivo do nosso trabalho e será discutido, em tópico específico após a descrição dos tipos celulares encontrados dentro da V-SVZ, como segue.

1.2 ORGANIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS CÉLULAS DA V-SVZ

A V-SVZ é o principal nicho neurogênico do cérebro adulto e apresenta-se como uma delgada camada epitelial de células multipotentes situada na parede dos ventrículos laterais (TONG and ALVAREZ-BUYLLA 2014). Ela é mais evidente na parede lateral dos ventrículos, adjacente ao estriado, enquanto as porções medial e o teto dos ventrículos são praticamente isentos de V-SVZ (GIULIANI, A. 2004).

As características ultra-estruturais e as propriedades antigênicas dessas células foram descritas em camundongos (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997), pássaros (ALVAREZ-BUYLLA, GARCIA-VERDUGO et al. 1998), coelhos (PONTI, G. et al. 2006) e humanos (QUINONES-HINOJOSA SANAE et al. 2006). Na V-SVZ de camundongos foram encontrados três tipos celulares principais: Os neuroblastos, nomeados células Tipo A;

astrócitos, nomeados células Tipo B e um tipo celular dividindo-se ativamente, nomeado célula Tipo C (Figura 2), (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997).

A caracterização imunocitoquímica das células da V-SVZ foi feita com a utilização de anticorpos para detecção do antígeno PSA-NCAM (Molécula de adesão celular neural polisialada, do inglês, polysialylated neural adhesion cell molecule) uma proteína expressa em sítios de plasticidade neural (THEODOSIS, ROUGON et al. 1991); TuJ1, um marcador para β -tubulina, encontrada em neurônios jovens (EASTER, ROSS et al. 1993, Moody, Miller et al. 1996); GFAP, um marcador de astrócitos (BIGNAMI and DAHL 1974); Vimentina, um filamento intermediário expresso por células precursoras (COCHARD and PAULIN 1984); (ALVAREZ-BUYLLA, BUSKIRK et al. 1987), células gliais (SCHIFFER, GIORDANA et al. 1986) e alguns neurônios (SCHWOB, NALBANTOGLU et al. 1990).

Com a utilização desses marcadores foram descritas as células tipo A, as quais têm ultra-estrutura de precursores neurais migratórios e são imuno-positivas para PSA-NCAM, TUJ1 e nestina. Essas células são vimentina e GFAP negativas. Além disso, elas migram paralelas à parede dos ventrículos laterais, dentro de “túneis” formados pelas células tipo B (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997). As células tipo A são as mais escuras da V-SVZ, pois, possuem uma grande quantidade de ribossomos livres em seu citoplasma, possuem corpo celular alongado com um ou dois processos e trocam vesículas endocíticas através de pequenos complexos juncionais existentes entre elas (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997).

As células Tipo B são imuno-positivas para GFAP, vimentina e nestina, porém, negativas para PSA-NCAM, e TUJ1. Elas possuem contorno bastante irregular, citoplasma claro (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997) e são consideradas um sub-tipo de astrócito especializado, derivado da glia radial (TONG, HAN et al. 2014). As células B são as células progenitoras primárias e originam as células progenitoras intermediárias (CPI), chamadas células tipo C (TONG, HAN et al. 2014).

As células tipo C organizam-se em pequenos agregados próximos às células tipo A e possuem características ultra-estruturais imaturas; são imuno-positivas para nestina e negativas para os outros marcadores que foram utilizados (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997). As células C são mais largas, esféricas e translúcidas que as células A e mais eletrodensas que as células B. Elas também apresentam complexos juncionais semelhantes ao

encontrado nas células A e não foram encontradas na VMR (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997). Um marcador específico para a identificação das células C foi identificado só foi identificado posteriormente, o fator transcricional Dlx2 (DOETSCH, PETREANU et al. 2002).

A organização celular da V-SVZ sugere que a produção e diferenciação dessas células ocorre no sentido B-C-A, sendo que as células A convergem ao longo da VMR para o bulbo olfatório, onde adquirem o fenótipo de interneurônios maduros (CURTIS, KAM et al. 2007) (Figura 2).

O estudo pioneiro de Doetsch, Garcia-Verdugo et al. 1997 também mostrou que as células Tipo A, B e C da V-SVZ são proliferativas, pois, incorporam [H^3]Timidina, sendo que as mais proliferativas são as células Tipo C, seguidas pelas células A e B. Uma contínua monocamada epitelial de células endoteliais (Tipo E) separa a V-SVZ da cavidade ventricular (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997).

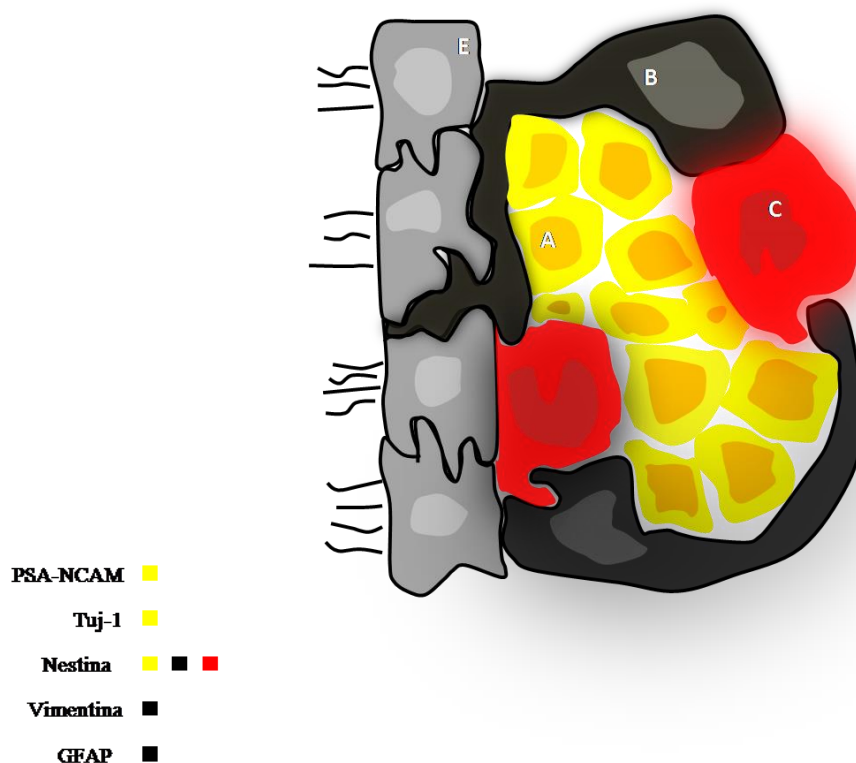


Figura 2: Composição celular e propriedades antigênicas das células da SVZ do camundongo. O desenho ilustra os principais tipos celulares presentes na SVZ do camundongo adulto. As células B (pretas) são células-tronco neurais e geram as células C (vermelhas), conhecidas como células amplificadoras transitórias (do inglês, transit amplifying cells) e estas geram os neuroblastos imaturos (amarelas), conhecidos como células A. A figura também mostra alguns dos principais constituintes antigênicos destes tipos celulares (ver código de cores).

1.2.1 Célula tipo B- A Célula-tronco da V-SVZ apresenta-se em estado quiescente e em estado ativado

Em 1999, Doetsch *et al.* demonstraram que as células tipo B são as células-tronco da V-SVZ de camundongos (DOETSCH, CAILLE et al. 1999).

Essas células retêm os marcadores de proliferação BrdU e H3-timidina, geram todos os tipos celulares da V-SVZ após tratamento com a droga anti-mitótica Ara-C e formam neuroesferas multipotentes *in-vitro*. Esse trabalho ressaltou a possibilidade de a célula-tronco ser uma sub-população de células tipo B, até então chamada de célula B2 (DOETSCH, CAILLE et al. 1999). As células B1 foram identificadas como células não proliferativas em trabalho anterior (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al.1997).

Mais recentemente, demonstrou-se que a célula Tipo B é encontrada em dois estados na V-SVZ, o estado quiescente e o estado ativado (CODEGA, SILVA-VARGAS et al. 2014). A célula tipo B em estado ativado, chamada célula Tipo B1, expressa o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e a proteína filamentar nestina, ambos não expressos por células tipo B em estado quiescente (CODEGA, SILVA-VARGAS et al. 2014).

A células B1 expressa os receptores tirosina kinase B (TrkB) e tirosina-kinase C (TrkC), que são receptores das neurotrofinas BDNF e NT4/5, respectivamente (CODEGA, SILVA-VARGAS et al. 2014). Essas células são imuno-negativas para o receptor TrkA (Codega, Silva-Vargas et al. 2014). Ambas populações de células tipo B são GFAP positivas e capazes de gerar todos os tipos celulares da V-SVZ após tratamento com a droga anti-mitótica Ara-C, por isso, elas são consideradas as células tronco da V-SVZ (DOETSCH et al., 1999a, 1999b, 2002). Além disso, essas células têm um tempo de vida longo, muito do qual elas passam em estado quiescente (MICH, SIGNER et al. 2014).

As células B1 mantêm a polaridade apical-basal de seus predecessores, a glia radial. A maioria delas contacta o ventrículo através de pequenos e especializados processos apicais, que contém um único cílio primário, envolvido por células endimárias, formando a uma estrutura nomeada *pinwheels*. As células B1 contém, também, longos processos basais com terminações especializadas contactando vasos sanguíneos. O contato entre as células B1 ocorre através de junções gap e delas com as células endimárias através de junções aderentes (TONG and ALVAREZ-BUYLLA 2014).

Tanto as células B ativadas quanto as quiescentes expressam o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α) (MUDO, BONOMO et al. 2009) e

possuem um cílio em contato com o fluido cérebro-espinhal (CSF) do ventrículo (TONG, HAN et al. 2014). O contato do CSF com o cílio ativa a sinalização *sonic hedgehog nas células B*, mecanismo celular importante para a regulação da proliferação e neurogênese na V-SVZ (TONG, HAN et al. 2014).

Ainda não está totalmente esclarecido como as CTNAs, as quais são derivadas de células progenitoras no embrião, são capazes de reter sua capacidade neurogênica e especificidade regional por longos períodos (LIM and ALVAREZ-BUYLLA 2014). A descrição dos marcadores dessas células vêm ajudando na identificação e entendimento dessas questões.

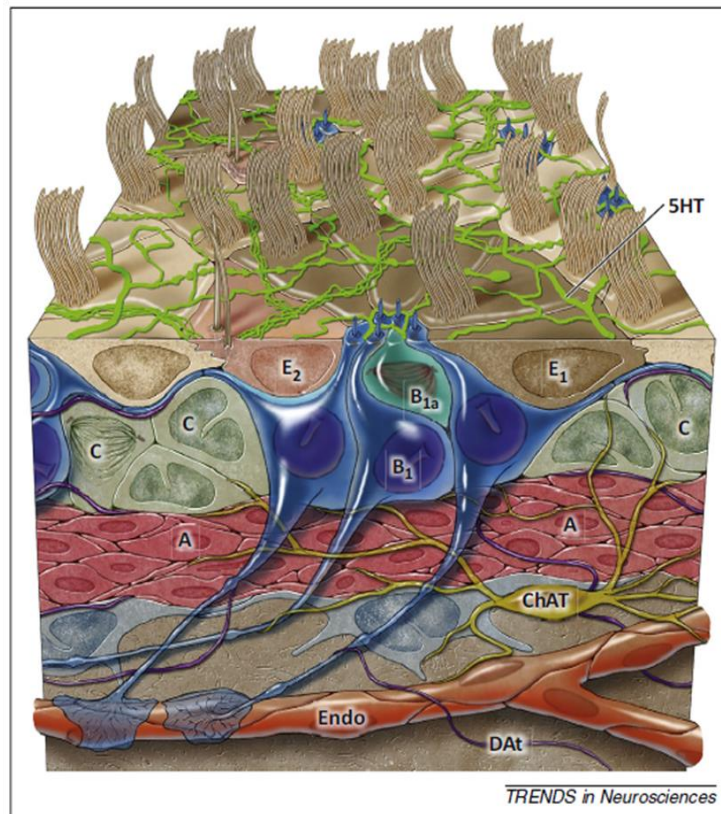


Figura 3: Organização esquemática da zona ventricular-subventricular (V-SVZ). Células B1 (azul escuro) originam as células B1 ativadas (B1a, azul claro), que dividem-se ativamente. Células B1a geram células em amplificação rápida, tipo C (verde), que após três divisões consecutivas geram as células tipo A, os neuroblastos migratórios. As células B1 contactam o ventrículo com um processo apical. A zona sub-ventricular adulta é constituída também por células ependimárias multiciliadas, que junto com as terminações apicais das células B1 formam estruturas *pinwheels* na superfície. Na superfície ventricular existe uma densa rede de axônios serotoninérgicos (SHT, verde). O processo basal das células B1 formam terminações especializadas contactando vasos sanguíneos. Neurônios positivos para colina acetil-transferase (ChAT) são encontrados na V-SVZ (marrom). Terminais dopaminérgicos (Dat) são também observados nessa região (Lim and Alvarez-Buylla 2014).

1.2.2 Célula Tipo C da V-SVZ- A Célula em amplificação rápida

Células C caracterizam-se pelo elevado poder de proliferação e amplificação da neurogênese na V-SVZ (CODEGA, SILVA-VARGAS et al. 2014). A presença do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR) é o fator desencadeante para a indução da proliferação rápida dessas células (MUDO, BONOMO et al. 2009).

Ela possui morfologia alongada e núcleo escuro (CODEGA, SILVA-VARGAS et al. 2014), expressa o fator transcricional homeobox Dlx2 (SUH, OBERNIER et al. 2009), expressa *Ascl1*- e origina-se da diferenciação da célula-tronco Tipo B (PASTRANA, CHENG et al. 2009).

O fator transcricional Dlx2 afeta a proliferação da célula C através de dois mecanismos: promovendo a transição de CTNAs para células C e aumentando a resposta proliferativa desses progenitores ao EGF (Fator de crescimento epidermal) (SUH, OBERNIER et al. 2009). Células C expressam, também, o pan-receptor de neurotrofinas e pró-neurotrofinas p75^{NTR} (DANILOV, GOMES-LEAL et al. 2009), respondem ao Fator de crescimento de Fibroblastos 2 (FGF2) e constituem a principal fonte de neuroesferas derivadas da V-SVZ (MUDO, BONOMO et al. 2009).

A resposta proliferativa das células C ao EGF (DOETSCH, PETREANU et al. 2002) levantou a possibilidade de elas serem as células-tronco da V-SVZ, contudo, elas não foram encontradas na V-SVZ de ratos (DANILOV, GOMES LEAL et al. 2009) e humanos (QUINONES-HINOJOSA, SANAI et al. 2006), nos quais, as células tipo B, possivelmente originam diretamente os neuroblastos; sem passar por um fenótipo de expansão (DANILOV, GOMES LEAL et al. 2009). A ausência de células C no rato ainda não foi confirmada, acreditamos que a utilização de outros marcadores celulares possa ajudar na sua identificação.

São necessárias mais investigações sobre as propriedades antigênicas e funcionais das CTNAs da V-SVZ, especialmente do rato, já que esta é a espécie mais utilizada em estudos sobre neurogênese (ARVIDSSON, COLLIN et al. 2002).

1.2.3 Células Tipo A- Neuroblastos

Neuroblastos são progenitores neurais DCX e PSA-NCAM positivos originados da diferenciação das células tipo C (MICH, SIGNER et al. 2014).

Cadeias de neuroblastos dispõem-se tangencialmente na parede dos ventrículos laterais. Eles são precursores de neurônios e preservam seu potencial proliferativo enquanto migram ao longo da VMR (MENEZES and LUSKIN 1994) (LOIS, GARCIA-VERDUGO et al. 1996) (MENEZES and LUSKIN, 1994; LOIS et al., 1996).

Possuem ultra-estrutura de neurônios migratórios imaturos e são imuno-positivos para PSA-NCAM, TUJ1 e nestina. Eles são vimentina e GFAP negativos e migram paralelos à parede dos ventrículos laterais, dentro de “túneis” formados pelas células tipo B (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997).

As células tipo A são as mais escuras da V-SVZ, pois, possuem uma grande quantidade de ribossomos livres em seu citoplasma, possuem, também, corpo celular alongado com um ou dois processos e trocam vesículas endocíticas através de pequenos complexos juncionais existentes entre elas (DOETSCH, GARCIA-VERDUGO et al. 1997).

1.3 ESTÍMULOS NEUROGÊNICOS NA V-SVZ

Estímulos neurogênicos são condições capazes de ativar a neurogênese da V-SVZ além do seu potencial basal. Entre tais condições, destacam-se determinadas patologias que afetam o cérebro, como o AVE (BAYDYUK and XU 2014).

Quando patologias afetam o tecido cerebral, o dano neuronal interfere na vascularização do tecido nervoso, secreção de neurotrofinas, sobrevivência celular, metabolismo, proliferação, amadurecimento, migração, diferenciação e integração das CTNAs presentes na V-SVZ (GRADE, WENG et al. 2013).

A secreção de neurotrofinas por neurônios, células endoteliais vasculares e astrócitos da região de lesão neuronal é um forte estímulo neurogênico para a V-SVZ, pois, as CTNAs apresentam receptores para essas moléculas, cuja ligação ativa a proliferação,

amadurecimento, migração, diferenciação e integração à rede celular da região comprometida (CHRISTIE and TURNLEY 2012).

As neurotrofinas existem em níveis muito baixos no sistema nervoso adulto, porém, a lesão celular provoca aumento da secreção dessas moléculas por astrócitos, células endoteliais vasculares e neurônios. Essas moléculas se difundem da região tecidual acometida até alcançarem a V-SVZ, onde interferem na neurogênese (BUTTI, CUSIMANO et al. 2014).

A neurodegeneração do núcleo caudado, encontrada na doença de Huntington, também é um forte estímulo neurogênico, pois, induz aumento na produção de células progenitoras tipo A, tipo B e tipo C na V-SVZ, que migram em direção ao sítio danificado e podem diferenciar-se em neurônios e células gliais (CURTIS M. et al., 2007). Nas doenças de Alzheimer e Parkinson, a progressiva neurodegeneração e resposta inflamatória, caracterizada pela secreção de citocinas e quimiocinas pelos astrócitos, macrófagos e micróglia ativada, ativam receptores nas CTNAs da V-SVZ; interferindo na neurogênese nessa região (BAYDYUK and XU 2014).

1.3.1 Neurogênese na V-SVZ induzida por acidente vascular encefálico- O papel das neurotrofinas como estímulo neurogênico após AVE isquêmico

O AVE induzido experimentalmente em roedores adultos amplifica a neurogênese na V-SVZ (GRADE, WENG et al. 2013) e redireciona o fluxo de neuroblastos migratórios da VMR para o estriado isquêmico (GRADE, WENG et al. 2013).

Os neuroblastos migram para a região isquêmica associados aos vasos sanguíneos, de uma maneira dependente do Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e do pan-receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (GRADE, WENG et al. 2013). O BDNF liberado pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos e pelos neurônios estriatais da região isquêmica ativa o receptor p75^{NTR} expresso nos neuroblastos migratórios, regulando a migração dos mesmos (GRADE, WENG et al. 2013).

O evento isquêmico dispara a expressão de BDNF na área cerebral comprometida pelo AVE (KOKAIA, ANDSBERG et al. 1998), o qual se difunde e alcança a V-SVZ, ligando-se ao p75^{NTR} expresso não apenas em neuroblastos, mas também em células

Tipo C e alguns astrócitos (SNAPYAN M., et al., 2009; YOUNG K. M, et al., 2007). Os neuroblastos migram para o sítio de lesão e integram-se aos circuitos neurais adquirindo o fenótipo dos neurônios típicos da região. Nesse sentido, a neurogênese atua como um mecanismo de auto-reparo após AVE (ZHANG et al. 2014).

No modelo de isquemia em cultura de células, ocorre elevação da expressão do receptor $p75^{NTR}$, juntamente com a elevação de pró-NGF (NGF imaturo), o ligante de alta afinidade desse receptor (IRMADY, JACKMAN et al. 2014). A sinalização mediada pelo complexo pró-NGF/ $p75^{NTR}$ é pró-apoptótica, sendo a principal responsável pela morte celular e desabilitação encontrados após AVE isquêmico em humanos (Irmady, Jackman et al. 2014). A sinalização mediada pelo complexo pró-NGF/ $p75^{NTR}$ interfere, também, na morfologia neuronal e plasticidade sináptica (IRMADY, JACKMAN et al. 2014).

Tais achados indicam que as neurotrofinas controlam o processo de neurogênese na V-SVZ, por isso, nos interessamos em conhecer ainda mais como essas moléculas podem controlar o processo de neurogênese da V-SVZ, no cérebro intacto e no cérebro acometido por um AVE isquêmico. Acreditamos que, futuramente, seja possível manipulá-las no intuito de reverter o dano celular causado pelo evento isquêmico, bem como manipular a diferenciação dessas células para um fenótipo neural ou glial específico, dependendo da doença instalada (SUH, OBERNIER et al. 2009). O uso das CTNAs pode contribuir, também, nas terapias por trauma e doenças neurodegenerativas, sendo necessário um melhor entendimento dos mecanismos que regulam a divisão, diferenciação, migração e amadurecimento das CTNAs adultas (BUTTI, CUSIMANO et al. 2014).

A expressão do $p75^{NTR}$ em uma sub-população de células neurogênicas da V-SVZ, antes e após isquêmica, foi demonstrada em resultados anteriores do nosso estudo (TAVARES, P.A.N & GOMES-LEAL, W.), porém, a oscilação temporal do número de células $p75^{NTR}$ positivas após AVE ainda precisa ser respondida. Acreditamos que a sinalização mediada por esse receptor participe no amadurecimento da CTNAs dentro da V-SVZ e que alterações na sua expressão possam estar relacionadas a expressão de outros receptores de neurotrofinas como TrkA e TrkB, após AVE.

A proliferação celular na V-SVZ, após AVE, ocorre do 2º ao 14º dia, com um pico de proliferação após sete dias, principalmente na V-SVZ ipsilateral à lesão (ZHANG, ZHANG et al. 2001). Contudo, os neuroblastos migram para a área isquêmica por até quatro

meses, suprimindo continuamente a região danificada com novos neurônios (THORED, ARVIDSSON et al. 2006).

Dentre os fatores que regulam as mudanças neurogênicas na V-SVZ após AVE, está a condição fisiológica do cérebro isquêmico. Os neuroblastos, por exemplo, migram para a área de lesão com velocidade e distância significativamente maiores que a observada em cérebros não-isquêmicos, além disso, propriedades do cérebro isquêmico mantêm o potencial de divisão dos neuroblastos até chegarem a área de lesão (ZHANG, LETOURNEAU et al. 2007).

Observa-se, também, que o cérebro isquêmico modifica as propriedades das CTNAs da V-SVZ através do aumento da liberação de fatores de crescimento por vasos sanguíneos e astrócitos (OHAB AND CARMICHAEL 2008). Logo, a otimização da vascularização pode ser uma estratégia promissora para amplificar a neurogênese e aumentar o reparo tecido nervoso após AVE (THORED, WOOD et al. 2007).

Ao nível molecular, o AVE induz uma reprogramação genética nas células precursoras neurais da SVZ, cujo resultado é o *upregulation* de 58 genes comumente expressos apenas durante o desenvolvimento embrionário, envolvidos na proliferação, migração e diferenciação das CPNs (LIU, ZHANG et al. 2007).

Como a neurogênese induzida pelo AVE ocorre no cérebro humano (JIN, WANG et al. 2006; MINGER, ECONOMOU et al. 2007) existe grande interesse em utilizá-la no tratamento restaurativo de pacientes (THORED, WOOD et al. 2007). Porém, ainda são necessários mais conhecimentos sobre como a neurogênese é regulada na SVZ e como as células dessa região respondem ao insulto isquêmico (IOSIF, AHLENIUS et al. 2008).

Acreditamos que alterações na expressão de receptores de neurotrofinas possam estar relacionadas ao controle da proliferação e diferenciação das CTNAs na V-SVZ após AVE e demonstramos resultados que indicam essa alteração.

1.4 O MICROAMBIENTE NEUROGÊNICO E OS FATORES QUE REGULAM A NEUROGÊNESE NO CÉREBRO ADULTO

Microambientes neurogênicos são regiões especializadas na manutenção das propriedades de multipotência, auto-renovação e migração das CTNAs (SILVA-VARGAS, CROUCH et al. 2013).

Essas regiões são constituídas basicamente de astrócitos, vasos sanguíneos, matriz extracelular (ALVAREZ-BUYLLA and LIM 2004) e sofrem influência de fatores de crescimento, neurotransmissores e hormônios (JIN and GALVAN 2007), importantes reguladores da auto-renovação e sobrevivência das CTNAs (JONES and WAGERS 2008).

Os microambientes neurogênicos permitem que as células-tronco assumam uma organização física importante para a polarização do fuso mitótico e consequente divisão assimétrica, responsável por gerar progenitores comprometidos com fenótipos específicos e células-filhas com a capacidade de auto-renovação (GLEASON, FALLON et al. 2008).

Dentro da V-SVZ de camundongos adultos, o microambiente permite uma divisão celular rápida das CTNAs, levando menos de um dia para ocorrer (PONTI, OBERNIER et al. 2013). Quando a célula B1 se divide, ela gera uma nova célula tipo B1 e uma célula tipo C, a qual divide-se duas ou três vezes gerando células A capazes de se dividir uma ou duas vezes antes de deixarem a V-SVZ (PONTI, OBERNIER et al. 2013).

A ausência de moléculas chamadas *efrinas* dentro da V-SVZ, é um fator importante para a manutenção da neurogênese nessa região (HOLMBERG, ARMULIK et al. 2005). Como as células-tronco da V-SVZ não produzem *efrinas* e camundongos deficientes em *efrinas* apresentam forte resposta neurogênica em regiões consideradas não-neurogênicas, acredita-se que essas moléculas inibem o potencial neurogênico nas regiões não-neurogênicas (HOLMBERG, ARMULIK et al. 2005).

A presença de células-tronco em microambientes especializados do cérebro adulto sustenta a possibilidade de manipulá-las para o tratamento de distúrbios neurológicos e outras patologias do SNC (TAUPIN 2006). Contudo, ainda são necessários maiores conhecimentos sobre as propriedades destes microambientes e sobre os fatores que influenciam as características funcionais das células-tronco dentro dessas regiões (IMITOLA 2007).

Outras moléculas com efeitos importantes sobre a neurogênese são as neurotrofinas (Andress, 2008).

1.4.1 Neurotrofinas

As Neurotrofinas são fatores de crescimento polipeptídeos secretados por diferentes células do SNC e pertencentes a uma pequena família de proteínas: Fator de Crescimento Nervoso (do inglês, NGF- Nerve Growth Factor), Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, BDNF- Brain-derived Neurotrophic Factor), Neurotrofina-3 (NT-3) e neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (CANDALIJA, CUBI et al. 2014).

Essas moléculas ligam-se a duas classes de receptores nas células-alvo, glicoproteínas transmembranas da família de receptores tirosina quinases (do inglês, Trk- Tropomyosin-related kinase) e ao receptor de baixa afinidade de neurotrofinas $p75^{NTR}$, um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (LOPEZ-SANCHEZ and FRADE 2002). Através da interação com seus receptores, elas ativam cascatas de sinalização e modulam o desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso de vertebrados (CANDALIJA, CUBI et al. 2014).

Cada Neurotrofina (NT) liga-se especificamente a um tipo de receptor Tirosina Kinase (do inglês, Trk- Tropomyosin-related kinase). O NGF liga-se com alta afinidade ao receptor TrkA, enquanto o BDNF liga-se com alta afinidade ao receptor TrkB (LIU, XUAN et al. 2014). Já a neurotrofina 3 liga-se com alta afinidade principalmente ao receptor TrkC e com menor afinidade TrkB (CANDALIJA, CUBI et al. 2014). As NT4/5 ligam-se ao TrkC com alta afinidade, mas podem também ligar-se ao TrkB (CANDALIJA, CUBI et al. 2014). Tanto as neurotrofinas quanto as pró-neurotrofinas ligam-se com baixa e alta afinidade, respectivamente, ao receptor $p75^{NTR}$ (MEEKER R. et al., 2004). Além disso, o receptor $p75^{NTR}$ interage com os receptores da família Trk, interferindo no controle de muitos aspectos da sinalização, especialmente em resposta as injúrias e doenças que atingem o sistema nervoso (MEEKER R. et al., 2004).

As neurotrofinas influenciam múltiplas funções celulares, dependendo dos receptores aos quais se ligam, das vias de sinalização ativadas (KALB 2005) e das proteínas citoplasmáticas recrutadas (AREVALO and WU 2006). Entre seus efeitos destacam-se o

controle da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e morte celular; tanto no cérebro em desenvolvimento como no cérebro adulto (KALB 2005). Controlam, também, a mielinização, o crescimento axonal, a plasticidade sináptica e a morfologia neuronal, como orientação axonal e arborização dendrítica (AREVALO and WU 2006).

No cérebro em desenvolvimento e peri-natal, a sinalização mediada pela neurotrofina NGF, através da ligação ao $p75^{NTR}$, tem papel importante na regulação da neurogênese, diferenciação cortical, migração celular e formação de conexões axonais. A expressão desse receptor inicia-se por volta dos dias 56-64 do período embrionário, primeiramente na parede dos ventrículos laterais e posteriormente em neurônios da sub-placa e processos axonais. Acredita-se que este é um mecanismo pelo qual os neurônios em desenvolvimento no córtex cerebral respondem a diferentes sinais, os quais guiam os processos de sinaptogênese e morfogênese (ALLEENDOERFER et al. 1994).

As Neurotrofinas também exercem importantes efeitos no controle das propriedades das CTNAs da V-SVZ, funcionando como moduladores da neurogênese (GRADE, WENG et al. 2013). Em camundongos com reduzida secreção de BDNF há um prejuízo significativo na migração e sobrevivência de células tipo B e tipo C, que migram através da via migratória rostral (VMR), da V-SVZ para o bulbo olfatório (BATH et al. 2008).

Outros resultados mostram que tanto as células A quanto as células B expressam o receptor TrkB, o qual liga-se ao BDNF, modulando a velocidade de migração dessas células ao longo da VMR (GRADE, WENG et al. 2013).

No cérebro em desenvolvimento, a sobrevivência celular mediada pelas neurotrofinas deve-se, principalmente, à ativação de receptores da família Trk, enquanto a sinalização mediada pelo receptor $p75^{NTR}$ geralmente está envolvida na indução de morte celular (BARRETT 2000).

No cérebro adulto, o receptor TrkB é expresso em neurônios estritais espinhais médios do estriato, nos quais o BDNF liga-se e ativa cascatas de sinalização relacionadas com a manutenção da sobrevivência (BAYDYUK and XU 2014).

O BDNF promove a migração de neuroblastos da V-SVZ, atuando como indutor e atraente através da ligação ao TrkB presente nessas células. Neuroblastos

imunopositivos para TrkB são encontradas em toda a extensão da V-SVZ. Essa via de sinalização atua aumentando a velocidade de migração dos neuroblastos migratórios (CHIARAMELLO, S. et al., 2007).

Quando combinados, o NGF e BDNF promovem uma maior diferenciação de células-tronco para o fenótipo neural, do que quando utilizados isoladamente (LIU, XUAN et al. 2014). Quando utilizados isoladamente, um maior número de células-tronco diferencia-se em oligodendrócitos (LIU, XUAN et al. 2014). Tais resultados revelam que as neurotrofinas regulam aspectos importantes da neurogênese no cérebro adulto, como a proliferação e a diferenciação.

1.4.2 Receptores de Neurotrofinas Tirosina-kinase A (TrkA) e Tirosina-kinase B (TrkB). Aspectos relevantes da expressão em células-tronco da V-SVZ.

O receptor TrkA é uma proteína transmembrana de passagem única que serve como receptor tirosina-kinase de alta afinidade para NGF (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001). Existem duas isoformas de receptor TrkA, as quais diferem no seu domínio extracelular, com seis aminoácidos adicionais próximos ao domínio transmembrana de um variante (TrkAii) (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001).

O receptor TrkA possui alta afinidade de ligação à neurotrofina NGF, ou seja, a sua ativação depende de concentrações muito baixas dessa neurotrofina. Esta molécula foi descoberta 50 anos atrás como uma molécula que promove a sobrevivência e a diferenciação de neurônios jovens (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001). Posteriormente, verificou-se que a expressão de NGF/TrkA eleva-se durante injúrias no SNC e no SNP (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001).

Tanto o NGF quanto o receptor TrkA são produzidos durante o desenvolvimento, na vida adulta e no envelhecimento por vários tipos de células do sistema nervoso central e periférico, por células inflamatórias e muitos outros tecidos (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001).

A expressão do TrkA parece ser muito baixa na V-SVZ (AHMED, REYNOLDS et al. 1995), pois, neuroesferas derivadas da V-SVZ apresentam pouca ou nenhuma expressão de TrkA (AHMED, REYNOLDS et al. 1995).

Foi demonstrado que a infusão intra-nasal de NGF, em ratos submetidos a isquemia, aumentou a sobrevivência neuronal na V-SVZ ipsilateral e estriato isquêmico, sem interferir no grau de proliferação de progenitores da V-SVZ. (ZHU et al., 2011).

O receptor tirosina-kinase B (TrkB) é o receptor de alta afinidade para a neurotrofina BDNF(CHIARAMELLO S. 2007). Ele é expresso em neuroblastos da V-SVZ, nos quais controla, através do BDNF, a migração dessas células para o bulbo olfatório. Logo, o BDNF é indutor e quimioatraente de neuroblastos através da ativação do receptor TrkB (CHIARAMELLO S. et al. 2007).

O recrutamento dos neuroblastos da V-SVZ, para o estriado isquêmico, ocorre através de contato físico dos mesmos com vasos sanguíneos, pois, as células endoteliais dos vasos produzem BDNF, que promove a migração associada a vasculatura (LIU, XUAN et al. 2014). Além disso, o BDNF, juntamente com o NGF, atuam promovendo a proliferação e diferenciação de CTNAs da V-SVZ em neurônios maduros (LIU, XUAN et al. 2014).

Após isquemia ou injúria cerebral traumática, há aumento da expressão de vários fatores de crescimento, incluindo, NGF e BDNF, os quais modulam a neurogênese (CHRISTIE and TURNLEY 2012). O BDNF, através da ativação do receptor TrkB regula vários aspectos funcionais das CTNAs da V-SVZ. Ele promove, também, o desenvolvimento dendrítico de células derivadas da V-SVZ através do receptor TrkB (GASCON, VUTSKITS et al. 2005).

In vitro, neuroesferas derivadas da V-SVZ apresentam elevada expressão de TrkB e pouca expressão de TrkA (AHMED, REYNOLDS et al. 1995). Além disso, a adição de BDNF aumenta o número de neurônios através do aumento da diferenciação para o fenótipo neural (AHMED, REYNOLDS et al. 1995).

O receptor TrkB é o mais proeminente receptor de neurotrofinas na V-SVZ, sendo expresso em astrócitos e células endimárias (GALVAO, GARCIA-VERDUGO et al. 2008). De acordo com esse estudo, o receptor TrkB não é expresso em neuroblastos. Camundongos mutantes para o receptor TrkB têm reduzida proliferação na V-SVZ e sobrevivência de poucos neurônios no bulbo olfatório. Contudo, a infusão intra-ventricular de BDNF em camundongos não afetou a neurogênese na V-SVZ e em ratos essa infusão provocou redução da neurogênese (GALVAO, GARCIA-VERDUGO et al. 2008).

1.4.3 Pan-receptor de Neurotrofinas p75^{NTR} no Cérebro Adulto

O pan-receptor de neurotrofinas p75^{NTR} ou receptor de neurofinas de baixa afinidade, é uma proteína integral de membrana, membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), os quais possuem um domínio intra-celular envolvido na indução de apoptose (UNDERWOOD and COULSON 2008).

Ele foi identificado em 1973 como o receptor da neurotrofina NGF, quando recebeu a denominação NGFR (HERRUP and SHOOTER 1973). Posteriormente, descobriu-se que ele liga-se com baixa afinidade a todas neurotrofinas, passando a ser chamado receptor de neurotrofinas de baixa afinidade (AREVALO and WU 2006). Ele também liga-se, com alta afinidade, às pró-neurotrofinas e pode formar sítios de alta afinidade de ligação à neurotrofinas, quando associado a receptores da família Trk (UNDERWOOD, REID et al. 2008).

Esse receptor é altamente expresso em neurônios, durante o desenvolvimento do SN, quando sua atividade induz a apoptose neural, mecanismo responsável pela regulação do número de neurônios (COULSON, MAY et al. 2008). Esse processo é fundamental para o refinamento e maturação do sistema nervoso (KENCHAPPA, ZAMPIERI et al. 2006).

No cérebro adulto, a expressão do p75^{NTR} é ínfima, restando algumas células p75^{NTR} imuno-positivas em restritas regiões: no prosencéfalo basal e na V-SVZ (ROUX and BARKER 2002). Contudo, observa-se aumento da expressão do p75^{NTR} em regiões cerebrais afetadas por injúria isquêmica e excitotoxicidade (COULSON, MAY et al. 2008), situações nas quais ele pode ser o responsável pela neurodegeneração e perda celular (NYKJAER, WILLNOW et al. 2005). O aumento da expressão do p75^{NTR} ocorre também mediante epilepsia, axotomia e neurodegeneração (COULSON, MAY et al. 2008). Em nosso trabalho, nós encontramos alterações na expressão desse receptor na V-SVZ após isquemia estriatal, um mecanismo possivelmente envolvido com a regulação da neurogênese após isquemia.

Experimentalmente, *in vivo* e *in vitro*, encontrou-se que o p75^{NTR} é re-expresso em neurônios estriatais sob condição isquêmica (WANG et al, 2001). Nessa condição, as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α contribuem para *up-regulation* desse receptor em neurônios da área isquêmica (WANG et al, 2001). A sinalização Pró-NGF/p75^{NTR} ativa

caspsases que induzem a morte neuronal, contribuindo significativamente para a morte celular, tamanho da área de infarto e desabilitação após isquemia (IRMADY, JACKMAN et al. 2014).

A presença de células proliferativas imunopositivas para o p75^{NTR} na V-SVZ, reguladas sob condições inflamatórias e degenerativas, foi demonstrada pela primeira vez por Laura Calzá em 1997. Esse estudo revelou um aumento significativo da proliferação celular na V-SVZ durante a Encefalomielite alérgica experimental, uma doença desmielinizante usada como modelo de esclerose múltipla. Concomitante a isso, observou-se aumento do número de células p75^{NTR} positivas na V-SVZ, bem como aumento do nível de NGF no fluido cérebro-espinhal (CALZA, GIARDINO et al. 1998). Foi demonstrado, também, que essas células apresentam morfologia alongada e destacou-se que a reação celular proliferativa das mesmas pode ter função de reparo e neuroproteção (CALZA, GIARDINO et al. 1998). A partir de então, investiga-se a hipótese de relação funcional entre os níveis de neurotrofinas, imunorreatividade para p75^{NTR} na V-SVZ e doenças do SN.

Sabe-se, também, que a sinalização mediada pelo BDNF promove aumento do número de neurônios recém-formados na V-SVZ, bulbo olfatório (ZIGOVA, PENCEA et al. 1998) (BATH, MANDAIRON et al. 2008) e estriado (HENRY et al., 2007). Tais efeitos ocorrem de uma maneira dependente do receptor p75^{NTR} (YOUNG et al., 2007).

As atividades celulares mediadas pelo p75^{NTR} no SNC são inúmeras e complexas, dependendo do estado fisiológico e do tipo de célula em que é expresso. Além disso, suas ações dependerão também dos complexos que ele forma com outros receptores e das proteínas intracelulares recrutadas durante a ativação de vias de sinalização específicas (CRAGNOLINI and FRIEDMAN 2008).

Entre os efeitos desse receptor sob as células da V-SVZ destaca-se sua ação sobre os neuroblastos migratórios da V-SVZ em direção ao estriado isquêmico, cuja função é manter a migração dessas células associada à vasculatura, situação na qual ele atua como receptor de BDNF liberado pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos e neurônios do estriado isquêmico (GRADE, WENG et al. 2013). Assim, o BDNF/ p75^{NTR} tem papel fundamental em promover a migração de neuroblastos da V-SVZ para a área isquêmica (GRADE, WENG et al. 2013). Nesse mesmo estudo, alguns neurônios do estriado isquêmico foram positivos para o receptor p75^{NTR}.

A expressão do receptor $p75^{NTR}$ também foi encontrada em células Tipo C da V-SVZ, não sendo encontrada expressão desse receptor em células Tipo B (GRADE, WENG et al. 2013). Os neuroblastos também expressam o receptor $p75^{NTR}$, receptor de baixa afinidade para essa neurotrofina (GRADE, WENG et al. 2013).

Existe uma re-expressão do receptor $p75^{NTR}$ em neurônios do córtex cerebral de pacientes com doença de Alzheimer (MUFSON; BRASHERS-KRUG ; KORDOWER, 1992; MUFSON ; KORDOWER, 1992), além disso, o $p75^{NTR}$ torna as células do prosencéfalo basal vulneráveis à apoptose, devido ao elevado nível de NGF no cérebro desses pacientes (VALOSIN, M. 2006). Na esclerose lateral amiotrófica (ELA), os motoneurônios são altamente suscetíveis à apoptose devido expressão do $p75^{NTR}$ (PEHAR, VARGAS et al. 2007).

A expressão do $p75^{NTR}$ aumenta, também, no cérebro de animais modelos de isquemia cerebral (COULSON, MAY et al. 2008) Uma das causas da re-expressão deste receptor após injúria cerebral pode ser o edema, pois, o aumento da quantidade de água no parênquima cerebral expõe as células à hipo-osmolaridade extracelular que desencadeia a ativação e aumento da expressão do $p75^{NTR}$ (RAMOS, HO et al. 2007).

Outras funções executadas pelo $p75^{NTR}$ no cérebro adulto são: indução de crescimento axonal (BENTLEY and LEE 2000), formação da bainha de mielina em nervos periféricos (CRAGNOLINI and FRIEDMAN 2008), modulação da transmissão sináptica (Blochl and Sirrenberg 1996), remielinização dependente de BDNF em nervos periféricos após axotomia (SONG, ZHOU et al. 2006) e modulação da complexidade da arborização dendrítica de neurônios hipocampais (ZAGREBELSKY HOLZ et al. 2005).

O receptor $p75^{NTR}$ é ativado pelo peptídeo beta-amilóide que acumula-se na doença de Alzheimer. Através desse receptor esse peptídeo regula a neurogênese na V-SVZ (SOTTHIBUNDHU, SYKES et al. 2008).

Nesse trabalho, nós investigamos o perfil proliferativo das células imunorreativas para o $p75^{NTR}$ na V-SVZ, após indução de isquemia estriatal, bem como o perfil proliferativo de células imunorreativas para o receptor TrkA. Nossos resultados revelam que alterações na expressão dos receptores de neurotrofinas na V-SVZ, após isquemia, podem afetar a proliferação celular na V-SVZ, controlando a neurogênese nessa região.

1.5 EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA E TRATAMENTO DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é um problema de saúde pública global e gera uma pesada carga sócio-econômica, cujos impactos negativos atingem não só os pacientes, mas toda a sociedade (MEAIRS, WAHLGREN et al. 2006, ZHANG, ZHANG et al. 2008).

Nas nações desenvolvidas ele é a terceira causa de morte, superado apenas por doenças cardiovasculares e pelo câncer (DOYLE, SIMON et al. 2008). No Brasil, espera-se que aumente a prevalência desta patologia devido o aumento da expectativa de vida da população (MURRAY and LOPEZ 1996).

A organização mundial de saúde estima que em 2002 ocorreram 15.3 milhões de acidentes vasculares encefálicos por todo o mundo, sendo mais de um terço fatais . Se ações apropriadas não forem tomadas o número de mortes é projetado para 6.5 milhões em 2015 e 7.8 milhões em 2030 (LOPEZ, MATHERS et al. 2006).

O AVE é definido como a perda de funções cerebrais causadas por um suporte energético ineficiente ou ausente, cuja causa tem origem vascular (MEAIRS, WAHLGREN et al. 2006); (WOLFE 2000, MARKUS 2008). Essa alta suscetibilidade ao comprometimento das funções cerebrais deve-se ao elevado metabolismo energético dos neurônios, o que torna a interrupção do fluxo sanguíneo um desencadeador imediato de morte de neurônios e comprometimento de funções neurológicas (SAUERBECK 2006).

Existem duas categorias principais de AVE, o isquêmico e o hemorrágico. O primeiro resulta geralmente de uma trombose ou de um embolismo e engloba aproximadamente 87% dos casos, já o segundo deve-se à hemorragia de vasos sanguíneos (ROSAMOND, FLEGAL et al. 2008). Nos dois tipos de AVE, o resultado é a morte celular e a presença de déficits neurológicos (DIJKHUIZEN, SINGHAL et al. 2003).

Dependendo da localização do vaso sanguíneo comprometido e da duração em que o fornecimento de sangue é reduzido, a disfunção cerebral pode ser focal ou generalizada, temporária ou permanente e envolver desde sintomas imperceptíveis ou levar a morte (SAUERBECK 2006). Observa-se, em muitos casos, uma injúria isquêmica que produz déficits permanentes severos e, em outros casos, uma recuperação é dinâmica, devido a

plasticidade e adaptação das redes neurais do córtex cerebral e das estruturas sub-corticais (LLEDO and GHEUSI 2006).

As principais disfunções celulares responsáveis pela morte celular após AVE são excitotoxicidade, acidotoxicidade, despolarização peri-infarto, estresse oxidativo e nitrativo, inflamação e apoptose; cada um com uma janela temporal distinta (BROUNS and DE DEYN 2009) (Figura 2). Além disso, a região isquêmica é constituída de duas áreas, o centro isquêmico, onde o fluxo sanguíneo é severamente reduzido e a morte celular ocorre em minutos e a penumbra isquêmica, onde ainda existe re-perfusão e a morte celular é lenta através de apoptose (GONZALES et al., 2006).

Apesar da alta mortalidade associada ao AVE, não tem sido dada a devida atenção ao seu tratamento (LOTUFO and BENSENOR 2004). Os tratamentos tromboembolíticos são os únicos utilizados, os quais apresentam limitada eficácia dentro de uma curta janela temporal da doença e são aplicáveis em um limitado número de pacientes (DOYLE, SIMON et al. 2008).

Como a isquemia cerebral focal induz neurogênese na SVZ e migração de neuroblastos para a fronteira isquêmica (THORED, ARVIDSSON et al. 2006) (Figura 5), até mesmo no cérebro humano (MINGER, EKONOMOU et al. 2007), têm-se estudado a possibilidade de utilizar esta resposta natural do cérebro como tratamento restaurativo após AVE e em outras patologias que comprometem a estrutura e função do cérebro (OHAB, FLEMING et al. 2006, THORED, WOOD et al. 2007).

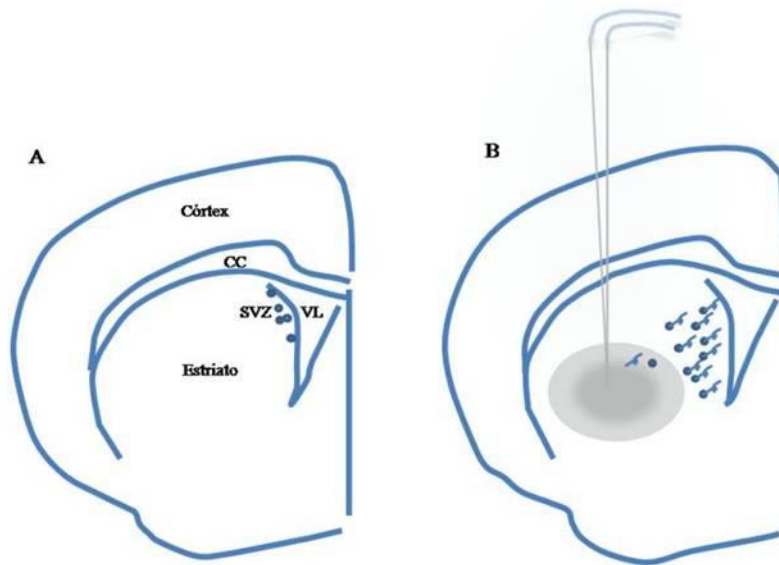


Figura 4: Desenho ilustrativo da neurogênese na Zona Sub-ventricular (SVZ) do rato normal (A) e após isquemia estriatal (B). A isquemia causa aumento da proliferação de células precursoras neurais na SVZ, as quais migram para o estriado isquêmico (cinza) e substituem parcialmente os neurônios perdidos durante o processo patológico. Uma substância indutora de isquemia, como o vasoconstritor endotelina-1 (ET-1), pode ser injetada no parênquima estriatal através de uma pipeta para produzir isquemia focal (B). CC: corpo caloso, VL: ventrículo lateral.

1.6 O MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL COM ENDOTELINA1

As endotelinas (ETs) são peptídeos endógenos com ação nos sistemas somatossensório, circulatório, respiratório, endócrino, visual, digestivo e no SNC (KHODOROVA, MONTMAYEUR et al. 2009).

Em humanos existem as ETs 1, 2 e 3, sendo a endotelina 1 (ET1) sintetizada e liberada por células endoteliais, epiteliais, cardiomiócitos, leucócitos e macrófagos (LUSCHER and BARTON 2000). Ela possui potente atividade vasoconstritora na pele (ZOCHODNE, HO et al. 1992), no endotélio vascular (FROST, BARBAY et al. 2006) e em nervos periféricos de ratos (SHRESTHA, GRACIAS et al. 2009).

Quando injetada em regiões específicas do córtex sensório-motor de ratos ela cria lesões isquêmicas focais com maior acurácia que em outras técnicas de lesão isquêmica, permitindo estudar os efeitos de lesões em restritas regiões do cérebro (GILMOUR,

IVERSEN et al. 2004). Ela pode ser utilizada também para induzir infarto confinado a substancia branca da cápsula interna, onde induz necrose, desmielinização e déficits sensório-motores focais (FROST, BARBAY et al. 2006).

Além disso, a injeção intra-cortical de ET1 aumenta em 50% a proliferação de CTNAs na V-SVZ do hemisfério ipsilateral à lesão, revelando-se como um método eficiente para a investigação dos efeitos do AVE sobre a neurogênese na V-SVZ (WANG, JIN et al. 2007).

Assim, a ET-1 permite criar modelos animais de AVE focal, o principal tipo de AVE em seres humanos (WILTROUT, LANG et al. 2007), bem como estudar os efeitos dessa patologia sobre as funções do SNC, dentre elas a produção de novos neurônios na V-SVZ.

1.7 PERGUNTA EXPERIMENTAL E HIPÓTESE

As neurotrofinas regulam diversos aspectos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso, como proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese e morfogênese neural (ALLEENDOERFER, CABELLI et al. 1994).

Esse controle se dá pela ligação seletiva de diferentes neurotrofinas aos seus vários receptores, em diferentes momentos do desenvolvimento do sistema nervoso (ALLEENDOERFER, CABELLI et al. 1994). O receptor de neurotrofinas de baixa afinidade (p75^{NTR}) e os receptores tirosina kinase TrkA e TrkB possuem papel fisiológico importante neste sentido (ALLEENDOERFER, CABELLI et al. 1994).

Entre as funções controladas pelas neurotrofinas destacam-se o controle da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e morte celular; tanto no cérebro em desenvolvimento como no cérebro adulto (KALB 2005). Controlam, também, a mielinização, o crescimento axonal, a plasticidade sináptica e a morfologia neuronal, como orientação axonal e arborização dendrítica (AREVALO and WU 2006).

No cérebro em desenvolvimento e peri-natal, a sinalização mediada pela neurotrofina NGF, através da ligação ao p75^{NTR}, tem papel importante na regulação da neurogênese, diferenciação cortical, migração celular e formação de conexões axonais. Acredita-se que este é um mecanismo pelo qual os neurônios em desenvolvimento no córtex cerebral respondem a diferentes sinais, os quais guiam os processos de sinaptogênese e morfogênese.

As Neurotrofinas também exercem importantes efeitos no controle das propriedades das CTNAs da V-SVZ, funcionando como moduladores da neurogênese (GRADE, WENG et al. 2013). Em camundongos com reduzida secreção de BDNF há um prejuízo significativo na migração e sobrevivência de células tipo B e tipo C, que migram através da VMR, da V-SVZ para o bulbo olfatório.

Apesar de a expressão do TrkA ser muito baixa ou ausente na V-SVZ (AHMED, REYNOLDS et al. 1995), foi demonstrado que a infusão intra-nasal do seu ligante NGF, em ratos submetidos a isquemia, aumenta a sobrevivência neuronal na V-SVZ ipsilateral e estriado isquêmico, sem interferir no grau de proliferação de progenitores da V-SVZ. (ZHU et al., 2011).

Foi demonstrado que a expressão de NGF/TrkA eleva-se durante injúria, tanto no SNC como no SNP (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001). A expressão do TrkA parece ser muito baixa na V-SVZ (AHMED, REYNOLDS et al. 1995), pois, neuroesferas derivadas da V-SVZ apresentam pouca ou nenhuma expressão de TrkA (AHMED, REYNOLDS et al. 1995).

Foi demonstrado que o pan-receptor de neurotrofinas p75^{NTR} controla a neurogênese na V-SVZ em condições inflamatórias e degenerativas (SOTTHIBUNDHU, LI et al. 2009), bem como na encefalomielite alérgica experimental, um modelo de esclerose múltipla humana (CALZA, GIARDINO et al. 1998). Na presença de BDNF e NGF *in vitro*, as células p75^{NTR} positivas oriundas da V-SVZ diferenciam-se em neurônios; levando a crer na existência de uma via neurogênica regulada por neurotrofinas e seus receptores nesta região (Young et al., 2007).

A pequena população de células da V-SVZ de ratos neonatos e adultos que expressa o receptor p75^{NTR} forma neuroesferas em cultura e possui potencial neurogênico, o qual aumenta na presença de NGF e BDNF (GIULIANI, D'INTINO et al. 2004, YOUNG, MERSON et al. 2007). Estas células p75^{NTR} positivas aparecem na V-SVZ como pequenos

grupos celulares, principalmente na extensão dorsal e anterior dos ventrículos laterais. Em secções tangenciais é possível ver células p75^{NTR} positivas na VMR e na camada glomerular do bulbo olfatório (GIULIANI, D'INTINO et al. 2004). Na VMR, este receptor regula o comportamento migratório de astrócitos e neuroblastos através do BDNF liberado por células epiteliais de vasos sanguíneos (SNAPYAN, LEMASSON et al. 2009).

Além disso, o receptor p75^{NTR} é considerado um marcador específico de células-tronco mesenquimais da medula óssea (HUBER and CHAO 1995) e regula a proliferação e multipotência de células-tronco embrionárias de camundongos (MOSCATELLI, PIERANTOZZI et al. 2009). Alguns autores acreditam que ele é um marcador geral de células-tronco embrionárias (MOSCATELLI, PIERANTOZZI et al. 2009).

Observa-se que, no cérebro adulto normal, as células p75^{NTR} positivas da V-SVZ possuem potencial neurogênico, enquanto que em pacientes e modelos animais de esclerose múltipla estas células geram oligodendrócitos (PETRATOS, GONZALES et al. 2004).

Apesar das evidências indicando que o p75^{NTR} é importante para diversos aspectos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso e que ele influencia a neurogênese na SVZ de roedores adultos, o padrão temporal de expressão e a função deste receptor na V-SVZ ainda não foram estudados em inúmeras condições patológicas, entre as quais o AVE isquêmico estriatal experimental (MOSCATELLI, PIERANTOZZI et al. 2009).

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, há uma competição por fatores tróficos, dentre eles, as neurotrofinas, cujo resultado determina o número de neurônios sobreviventes (LEVI-MONTALCINI, R. 1987).

Diante dessas questões, nós levantamos a hipótese de que a expressão de receptores de neurotrofinas, dentre eles o p75^{NTR} e o TrkA pode ser alterada após processos isquêmicos próximos a V-SVZ e que este fenômeno pode estar relacionado à regulação da neurogênese endógena observada após isquemia estriatal. Devido mudanças na expressão dos níveis das neurotrofinas no cérebro acometido por diversas condições patológicas, dentre elas o AVE, nós acreditamos que alterações na expressão desses receptores pode controlar as alterações na proliferação, migração e maturação das CTNAs da V-SVZ após o AVE isquêmico estriatal. Assim, nesta tese, nós investigamos os padrões de imunoreatividade para

o receptores p75^{NTR} e TrkA na V-SVZ de ratos que foram submetidos à isquemia estriatal através de microinjeções de ET-1 e em animais que receberam apenas injeção de salina estéril.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo Geral

Investigar o padrão de imunoreatividade para os receptores de neurotrofinas p75^{NTR} e TrkA na V-SVZ de ratos adultos submetidos à isquemia estriatal focal induzida por microinjeção de endotelina-1.

1.8.2 Objetivos Específicos

1.8.2.1 Descrever o padrão neuropatológico após isquemia estriatal.focal.

1.8.2.2 Descrever qualitativa e quantitativamente o padrão de imunoreatividade para o receptor TrkA na V-SVZ de ratos adultos submetidos à isquemia estriatal focal induzida pela microinjeção de endotelina-1.

1.8.2.3 Descrever qualitativa e quantitativamente o padrão de imunoreatividade para o receptor p75^{NTR} na V-SVZ de ratos adultos submetidos à isquemia estriatal focal induzida por microinjeção de endotelina-1.

1.8.2.5 Comparar os padrões de imunoreatividade para os receptores em questão em animais normais e patológicos e entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão, inferindo possíveis alterações no padrão de imunoreatividade.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 ratos adultos da raça *Wistar* pesando entre 250-280g, fornecidos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará (protocolo BIO002-10 CEPAE-UFPA). Todos os esforços foram feitos para evitar o sofrimento dos animais.

2.2 INDUÇÃO DE LESÃO ISQUÊMICA ESTRIATAL

Para a indução de isquemia estriatal, utilizamos as propriedades vasoconstritoras do peptídeo ET-1. Demonstrou-se que este peptídeo, quando injetado no parênquima neural, induz vasoconstricção intensa com diminuição de mais de 70% do fluxo sanguíneo (GILMOUR, IVERSEN et al. 2004). Este modelo experimental de isquemia focal é utilizado de rotina em nosso laboratório (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

Os procedimentos pré-cirúrgicos envolveram a manutenção dos animais em gaiolas limpas com alimento e água à vontade. Cada animal foi anestesiado via intraperitoneal com um coquetel de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König, 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol®, König, 9mg/kg), seguido de tricotomia da cabeça e imobilização em um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil).

Após abolição dos reflexos corneano e de retirada da pata após um estímulo aversivo, realizou-se uma incisão ântero-posterior de 4cm na cabeça do animal para expor a calota craniana. Os músculos foram afastados e o crânio limpo com solução fisiológica para permitir a visualização do brégma, ponto anatômico do crânio onde a sutura coronal é interceptada perpendicularmente pela sutura sagital. O brégma serviu como referência para as coordenadas estereotáxicas (AP +1mm, ML +2mm, DV -4mm) do sítio onde realizou-se uma pequena abertura no crânio com auxílio de um rotor de cirurgião dentista: 1mm ântero-posterior e 2mm médio-lateral. Após a remoção das meninges e a exposição da superfície do

córtex, injetou-se 80 pMol de ET-1 (Sigma), diluídos em 1µl de solução salina estéril diretamente no estriato, com o auxílio de uma pipeta de vidro, com graduações de 1µl (Sigma, EUA). Esta pipeta era acoplada a uma seringa hipodérmica, utilizada para a infusão por pressão do volume injetado de ET-1. A solução de ET-1 foi diluída 1:1 no corante azul de colanil, para facilitar a localização precisa do sítio de injeção nas secções histológicas.

Após a infusão da substância vasoconstritora, deixou-se a pipeta *in situ* durante três minutos para que a solução pudesse difundir-se, evitando seu refluxo para o interior da pipeta. Após este período, a pipeta foi removida lentamente do parênquima estriatal. Foram produzidos três grupos experimentais, com tempos de sobrevida de 1, 3 e 7 dias (Figura 5), cada um com cinco animais. Outros três grupos, cada um com três animais, recebeu o mesmo volume de 1µl da solução diluente para servir como controle para os animais com lesão isquêmica.

Após a cirurgia, cada animal foi colocado em uma gaiola com água e comida à vontade, onde permaneceu por 1, 3 ou 7 dias, para posteriormente verificarmos os efeitos da isquemia sobre o padrão de imunoreatividade dos receptores p75^{NTR} e TrkA na V-SVZ.

TEMPO DE SOBREVIDA	ISQUÊMICOS	CONTROLES
1 DIA	5 ANIMAIS	3 ANIMAIS
3 DIAS	5 ANIMAIS	3 ANIMAIS
7 DIAS	5 ANIMAIS	3 ANIMAIS

Tabela 1: Tabela ilustrativa do número de animais utilizado para produção dos grupos experimentais e controles.

2.3 PERFUSÃO E CRANIOTOMIA

Após os tempos de sobrevivência estabelecidos, os animais foram novamente anestesiados, tiveram seus reflexos corneano e de retirada da pata testados e sacrificados por perfusão, que envolve a introdução lenta e contínua de líquidos na circulação sanguínea.

A perfusão consistiu inicialmente de toracotomia para exposição do coração. Seguida de uma incisão no ventrículo esquerdo do coração, através do qual foram injetados 250ml de Tampão Fosfato Salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) durante 30 minutos, para limpar o sistema circulatório, seguidos de 300-500ml de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4) durante cerca de 45 minutos, para promover a fixação e preservação morfológica do encéfalo. A remoção do sangue foi efetuada através de uma abertura no ventrículo direito.

Os encéfalos foram posteriormente removidos e pós-fixados overnight na mesma solução fixadora, seguido de crioproteção em soluções de sacarose-glicerol diluídas em uma mistura de glicerina com PB (0,05M; pH 7,2 – 7,4) à 25%, 50% e 100%, consecutivamente.

2.4 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

Após a crioproteção, os encéfalos foram cortados em um criostato (Carl Zeiss-Micron, Alemanha) para obtenção de secções com espessura de 20 e 50µm. De cada encéfalo, foram escolhidas em média 25 secções que representassem uma amostra anatômica ântero-posterior do estriato comprometido pela lesão. Este método permitiu, além da análise histopatológica do sítio de lesão e da V-SVZ, através da coloração violeta de cresila (ver anexo), a escolha de encéfalos em bom estado de criopreservação, com SVZ íntegra em toda a sua extensão e, portanto, a determinação das secções que seriam utilizadas na imunoistoquímica.

Apenas animais nos quais a lesão isquêmica estriatal foi focal, restrita ao estriato adjacente à SVZ e com ausência de lesão mecânica, foram incluídos nos grupos de animais isquêmicos. Para os grupos de animais controles, injetados com solução salina estéril,

foram utilizados apenas aqueles que não apresentavam processo inflamatório ou lesão mecânica.

Em secções com espessura de 50 µm, coradas pela violeta de cresila (anexo), foram observados os padrões de perda tecidual, inflamação, necrose, picnose e palor estriatais. Observou-se a influência da lesão isquêmica estriatal sobre a V-SVZ, incluindo processos inflamatórios, perda celular e espessura celular desta região.

As imunohistoquímicas para os receptores de neurotrofinas p75^{NTR} (anexo 2) e **TrkA** (anexo3) foram realizadas em secções histológicas com espessura de 20µm que apresentavam boas condições de criopreservação e que continham o estriado e a V-SVZ visíveis. Utilizou-se o anticorpo monoclonal feito em coelho anti-p75^{NTR} (1µc:200µl, Promega) que marca o componente intracelular do receptor de neurotrofinas p75^{NTR} (Young et al., 2007) e o anticorpo monoclonal anti-TrkA (1µc:200µl, Millipore).

2.5 ANÁLISE QUALITATIVA

As secções foram inspecionadas em microscópio óptico (Bioval, L2000C) para a averiguação dos padrões histológicos e histopatológicos gerais. Fotomicrografias foram obtidas utilizando câmara digital (Sony, Carl Zeiss, 7.2 MP) acoplada àquele microscópio, de modo a obter imagens mais representativas dos resultados obtidos.

2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA

A imunoreatividade para os receptores p75^{NTR} e TrkA foi quantificada em células da V-SVZ ipsilateral e contralateral à lesão isquêmica estriatal. Células p75^{NTR+} e TrkA+ foram quantificadas em toda a extensão dorso-ventral da V-SVZ. . A contagem foi realizada em 5 secções de cada animal isquêmico e em 3 secções de cada animal controle no devido tempo de sobrevida, totalizando um número de 204 secções. Para isso, foi utilizada objetiva de 100x e ocular de 10x em um microscópio (Bioval, L2000C).

A comparação entre os lados ipsilateral e contralateral à isquemia foi feita utilizando o teste Anova tukey um critério.

3. RESULTADOS

3.1 A MICROINJEÇÃO DE ENDOTELINA-1 INDUZIU LESÃO ISQUÊMICA FOCAL RESTRITA AO ESTRIADO ADJACENTE À ZONA SUBVENTRICULAR

A microinjeção de solução salina estéril não resultou em lesão conspícua no parênquima estriatal (Figura 5). Observou-se um pequeno espessamento da V-SVZ nos animais que receberam a solução salina, comparado ao Sham (Figura 5). Por outro lado, microinjeções de ET-1 resultaram em conspícua lesão isquêmica no estriado, com intenso infiltrado inflamatório, palor e perda tecidual em diferentes tempos de sobrevida (Figuras 6). Nos animais isquêmicos, observou-se espessamento da V-SVZ principalmente 7 dias após a indução isquêmica (Figura 7).

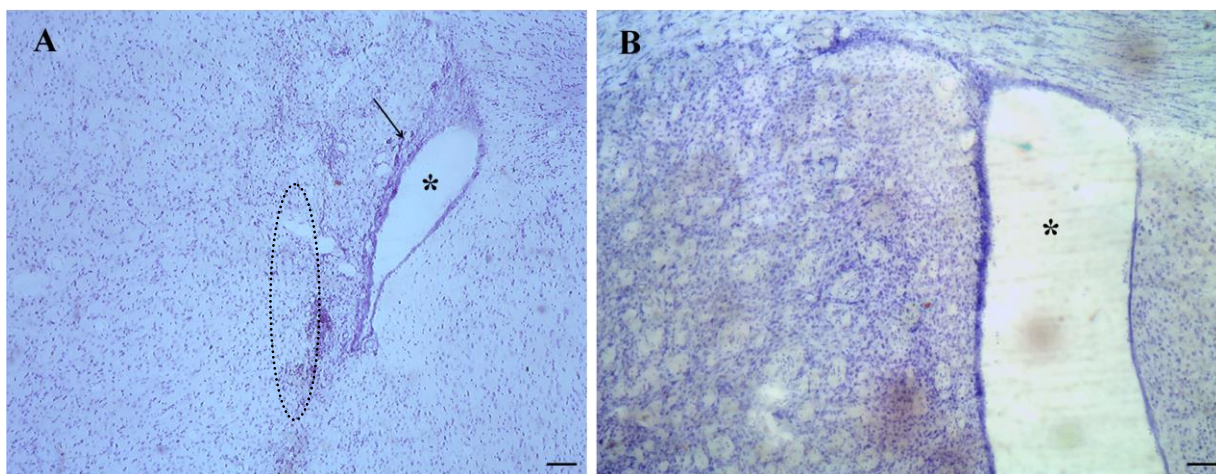


Figura 5: Fotomicrografias de secções de cérebro de rato coradas com Cresil Violeta. Em A, o animal foi submetido a injeção de salina estéril no parênquima estriatal e sacrificado 1 dia após, observa-se pequena lesão na área da injeção (círculo). Em B, o animal não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico (sham) e apresenta o estriado totalmente preservado. A V-SVZ em A apresenta-se como uma delgada camada de células, porém mais espessa que em B.*Ventrículo Lateral. Objetiva: 10X. Barra de escala: 100µm.

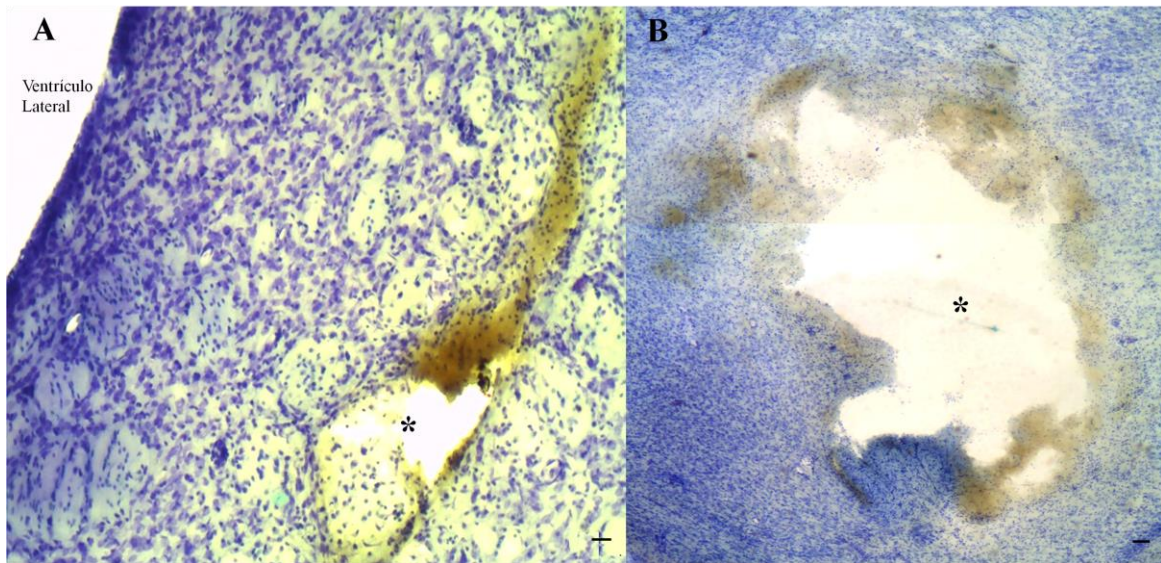


Figura 6: Fotomicrografias, de secções cerebrais de ratos submetidos a isquemia estriatal com peptídeo vasoconstritor ET-1, coradas com cresil violeta. Observa-se conspícua lesão isquêmica no estriado, com intenso infiltrado inflamatório, palor e perda tecidual, 7 dias (A) e 1 dia (B) após indução isquêmica. Objetivas 10X (A) e 4X (B). Barra de escala: 100µm.

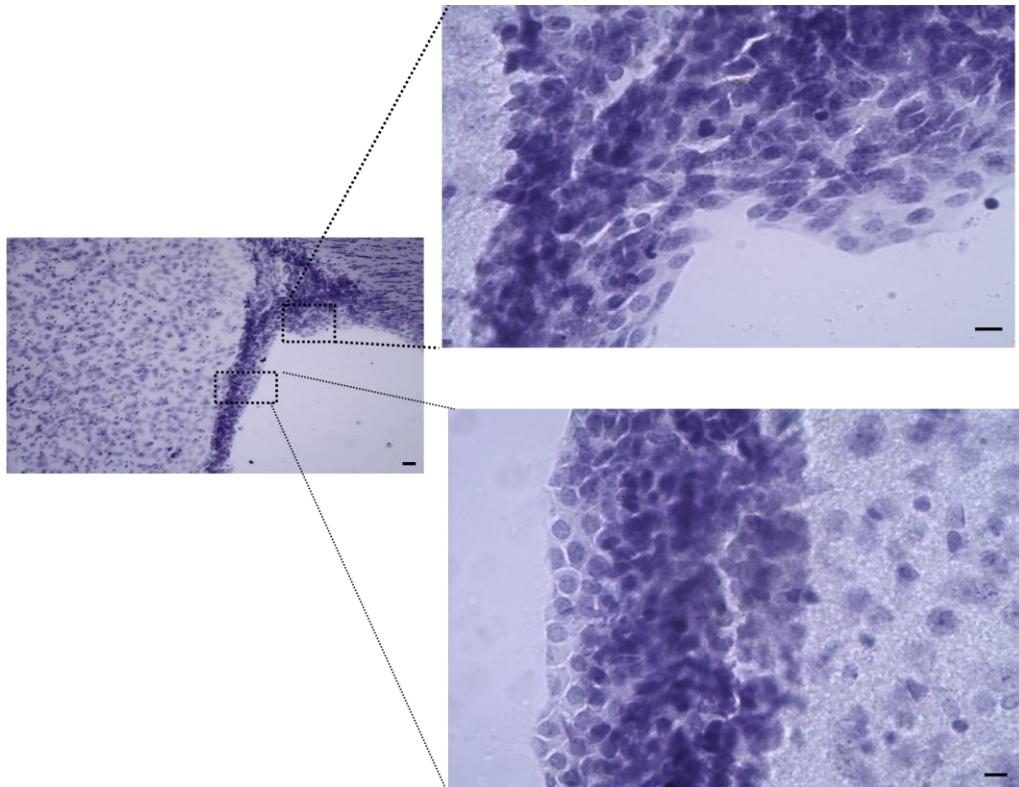


Figura 7: Fotomicrografia de uma secção de cérebro de rato corada com Cresil Violeta, 7 dias após a indução isquêmica estriatal com vasoconstritor Endotelina 1 (ET-1). A V-SVZ apresenta-se espessa, com grande número de camadas celulares ao longo de toda sua extensão. Barra de escala: 100µm.

3.2 IMUNORREATIVIDADE PARA O PAN-RECEPTOR DE NEUTROFINAS (P75^{NTR}) NA V-SVZ APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

A imunohistoquímica para a porção intracelular do receptor p75^{NTR} revelou a presença de células p75^{NTR}+ ao longo de toda a extensão dorso-ventral da V-SVZ de animais controle e isquêmicos. (Figura 8). A análise estatística revelou uma redução significativa no número de células p75^{NTR} positivas no lado ipsilateral à isquemia 1 e 3 dias após o procedimento cirúrgico, quando comparado ao lado contralateral à lesão ($p < 0.01$ após 1 dia e $p < 0.05$ após 3 dias), (Figura 9). No tempo de sobrevivência de 7 dias a redução da imunorreatividade na V-SVZ ipsilateral à lesão não foi significativa ($p > 0.05$).

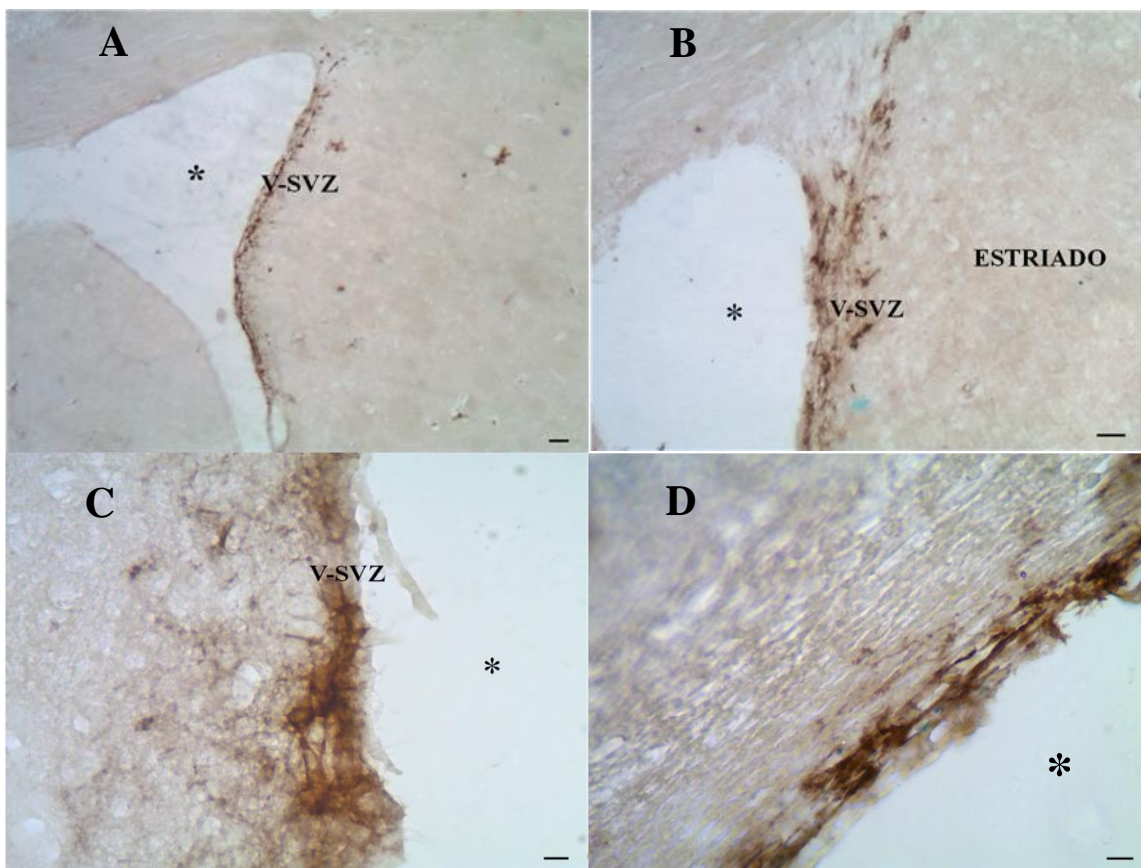


Figura 8: Fotomicrografias de seções histológicas imunorreativas para o pan receptor de neurotrofinas (p75^{NTR}) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1. Precipitados do cromógeno Diaminobenzidina (DAB) revelaram células p75^{NTR} + ao longo de toda a extensão da V-SVZ (A) e um maior número de células imunorreativas no corno dorsal dessa região (B). Essas Células p75^{NTR} + justapostas, possivelmente estão em proliferação (C). Animais que receberam solução salina estéril também apresentaram células imunorreativas na parede da V-SVZ (D). Espessura das seções: 20 μ m. Tempo de sobrevivência: 1 dia. Ventrículo Lateral (*). Objetivas: (A: 4X, B: 10X, C e D: 40X). Barra de escala: 100 μ m.

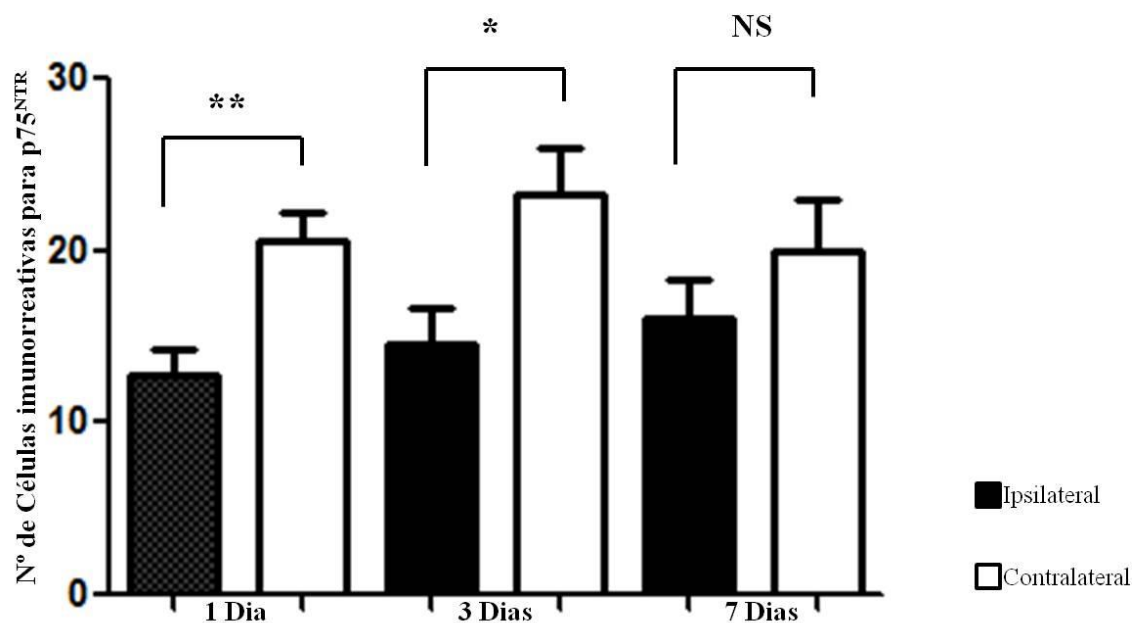


Figura 9: Representação gráfica do número de células imunorreativas para o pan-receptor de neurotrofinas (p75^{NTR}) na V-SVZ dos hemisférios ipsilateral e contralateral à indução isquêmica com o vasoconstritor ET-1. O número de células p75^{NTR}+, 1 e 3 dias após a indução isquêmica, foi significativamente menor no lado ipsilateral à lesão comparado ao lado contralateral ($p < 0.01$, $p < 0.05$; respectivamente). Após 7 dias, essa diferença não foi significativa ($p > 0.05$). NS: Não Significativo. Foram quantificadas 5 seções de cada grupo.

3.3 IMUNORREATIVIDADE PARA O RECEPTOR DE NEUROTROFINAS TrkA AO LONGO DA V-SVZ E ESTRIADO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Raras células TrkA positivas foram encontradas na V-SVZ de animais controles e isquêmicos. Corpos celulares TrkA positivos foram encontrados principalmente no estriado isquêmico adjacente ao centro da lesão (Figuras 10). A imunoistoquímica para o TrkA revelou a presença de células arredondadas similares à morfologia de células inflamatórias na penumbra isquêmica (Figura 10). Nos animais isquêmicos, ocorreu a marcação de inúmeras axônios, tanto na V-SVZ quanto no estriado adjacente (Figura 11).

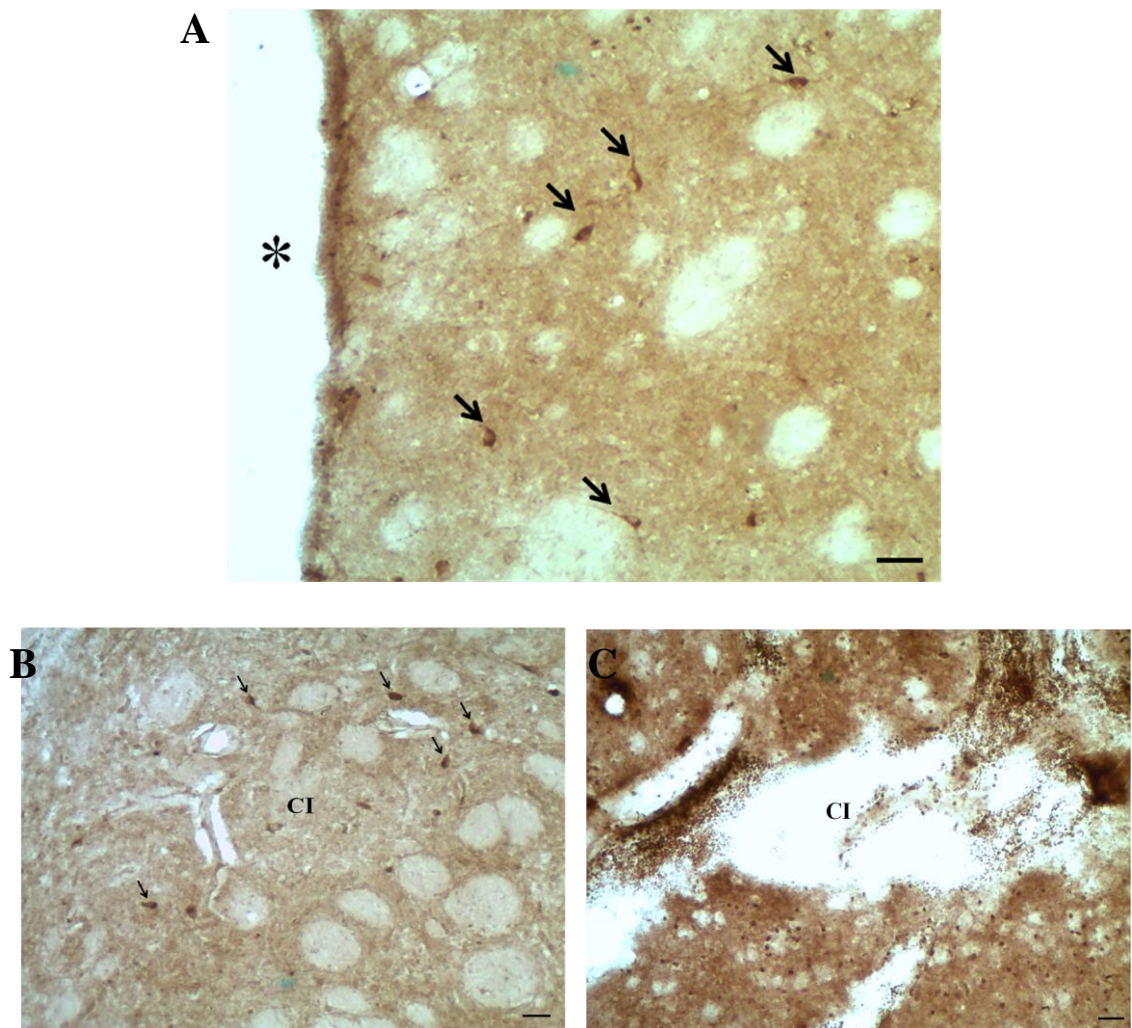


Figura 10: Fotomicrografias de secções histológicas imunorreativas para o receptor de neurotrofinas Tirosina cinase A (TrKA) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1. Precipitados do cromógeno Diaminobenzidina (DAB) revelaram escassas células TrKA+ no estriado adjacente à V-SVZ (A). Células imunorreativas também foram visualizadas na região peri-infarto (B). Algumas secções revelaram precipitados de DAB em células inflamatórias na penumbra isquêmica (circundante ao centro isquêmico). Espessura das secções: 20µm. CI: Centro Isquêmico. Tempo de sobrevivência: A, 1 dia; B e C, 7 dias. Objetiva: 40X, Ocular: 100X. Barra de escala: 100µm.

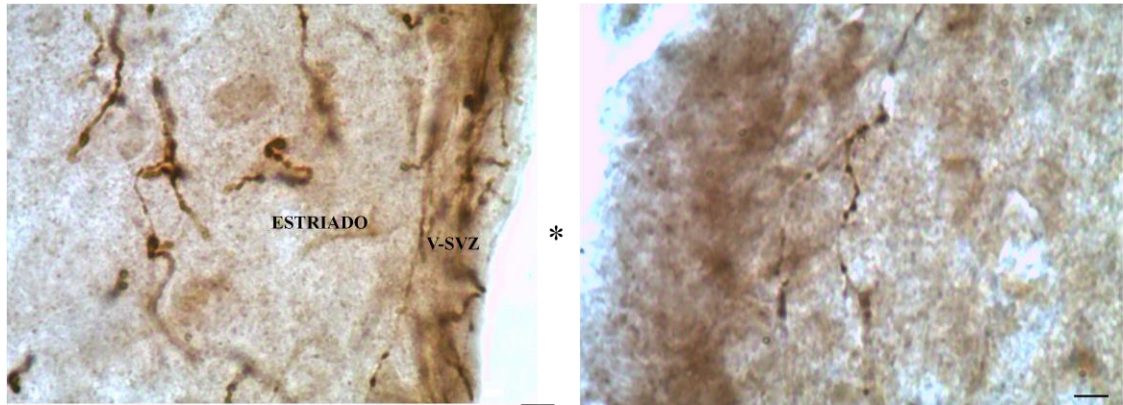


Figura 11: Fotomicrografias de secções histológicas imunorreativas para o receptor de neurotrofinas Tirosina cinase A (TrKA) no cérebro de rato que sofreu isquemia estriatal induzida por microinjeção do vasoconstritor ET-1. Precipitados do cromógeno Diaminobenzidina (DAB) revelaram grande densidade de terminais axonais imunorreativos para TrkA na V-SVZ e no estriado adjacente de animais isquêmicos. Secções imunorreativas de animais controles apresentaram raras terminações (Foto inferior). Tempo de sobrevivência: 7 dias. Objetiva: 100X.. Barra de escala: 100µm.

4. DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

As neurotrofinas, incluindo fator de crescimento neural (NGF, do inglês neural growth factor), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês, brain derived neurotrophic factor) e fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF, do inglês glial derived neurotrophic factor) desempenham uma série de importantes funções no sistema nervoso (SN) em desenvolvimento e adulto. Estas se constituem em um grupo heterogêneo de moléculas com funções relacionadas à neurogênese, migração celular, crescimento axonal e sinaptogênese durante o desenvolvimento do SN (MEINECKE and RAKIC, 1993). No SN adulto, as neurotrofinas são importantes para o crescimento axonal e sobrevivência de neurônio e células gliais, em condições normais e patológicas (MEINECKE and RAKIC, 1993).

Independente do estágio de maturação do SN, as neurotrofinas exercem seus efeitos agindo em receptores de membrana, presentes em uma infinidade de células, incluindo neurônios e células gliais (MEINECKE and RAKIC, 1993). Durante o desenvolvimento do SN, acredita-se que a ativação diferencial destes diversos receptores, incluindo os da família Trk e $p75^{NTR}$, seja fundamental para os fenômenos de neurogênese, migração celular, sinaptogênese e crescimento axonal (MEINECKE and RAKIC, 1993).

O receptor de NGF de baixa afinidade $p75^{NTR}$ executa uma gama de funções celulares tanto no cérebro em desenvolvimento como no cérebro adulto de vertebrados superiores. Investigações anteriores mostraram a existência de uma população de células $p75^{NTR+}$ na SVZ de roedores adultos, cuja função é pouco conhecida (CALZA, GIARDINO et al. 1998). No entanto, acredita-se que a expressão do receptor de neurotrofinas $p75^{NTR}$ esteja relacionada com a regulação da neurogênese na SVZ do cérebro de roedores adultos (CALZA, GIARDINO et al. 1998; SOTTHIBUNDHU, Li et al. 2009; YOUNG et al., 2007).

Inexistiam investigações sobre a influência de um processo isquêmico em uma região próxima à SVZ, no padrão de imunoreatividade para o receptor $p75^{NTR}$. Neste trabalho, nós investigamos a hipótese de que a imunoreatividade para o receptor de neurotrofinas $p75^{NTR}$ na SVZ é alterada após isquemia estriatal focal em uma região próxima à SVZ. O

padrão de expressão deste receptor ainda não havia sido descrito nesta condição experimental. Os resultados mostraram uma conspícua diminuição da imunoreatividade para o receptor p75^{NTR} na SVZ ipsilateral de ratos adultos submetidos à isquemia estriatal focal induzida por microinjeções de ET-1.

4.2 A IMUNOREATIVIDADE PARA O RECEPTOR p75^{NTR} OCORRE EM TODA A EXTENSÃO DA SVZ DE RATOS ADULTOS NORMAIS E EM REGIÕES DISCRETAS DA V-SVZ DE RATOS ADULTOS ISQUÊMICOS

Os resultados mostram uma pequena população celular positiva para o receptor de baixa afinidade de neurotrofinas p75^{NTR} na SVZ, estendendo-se por toda a extensão dorso-ventral desse epitélio proliferativo. A maioria destas células possui uma distribuição discreta, geralmente em uma porção bem lateral da SVZ em uma zona de transição com o estriado.

Outros autores descreveram inicialmente a presença de células p75^{NTR} + na SVZ de roedores adultos (CALZÁ et al., 1998; GIULIANI et al., 2004; TRIACA et al., 2005; YOUNG et al., 2007; SNAPYAN et al., 2009). A identidade destes tipos morfológicos é desconhecida, mas outros autores sugerem que o receptor p75^{NTR} + é expresso em um pequeno grupo de células altamente proliferativas da SVZ, incluindo as células C no cérebro de camundongos (BATH et al., 2008). Outros autores mencionam que este receptor de neurotrofinas pode ser expresso em um pequeno grupo de neuroblastos e, ocasionalmente em células B (GIULIANI et al., 2005; YOUNG et al., 2007; SNAPYAN et al., 2009). Em uma investigação não concluída em nosso laboratório, os estudos também indicam que o receptor p75^{NTR} não é expresso em astrócitos e microglia e possui expressão limitada em um pequeno grupo de neuroblastos no cérebro de ratos adultos (GOMES-LEAL, dados não publicados)

Dos estudos mencionados anteriormente, pode-se concluir que o receptor p75^{NTR} pode ser expresso principalmente nas células C e B, e em menor intensidade em neuroblastos, no cérebro de roedores adultos, principalmente camundongo. No entanto, um estudo recente sugere que inexitem células C no cérebro do rato (DANILOV et al., 2009). Neste estudo, não foi possível identificar as células C por critérios ultra-estruturais, como previamente determinado em camundongos (DOETSCH et al., 1997). Talvez as características morfológicas das células C difiram entre ratos e camundongos. Neste caso, o estudo da expressão de p75^{NTR} em nível ultra-estrutural seja necessário para confirmar a

inexistência de células C no cérebro do rato. A inexistência de células C em espécies tão próximas filogeneticamente pode ser questionada, mas este fenômeno foi descrito no cérebro de aves (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1998) e, mais recentemente, em primatas (GIL-PEROTIN et al., 2009).

As células $p75^{NTR}$ positivas aqui presentes podem representar a expressão de $p75^{NTR}$ nos diferentes tipos celulares da SVZ. Estudos futuros com imunofluorescência dupla e microscopia eletrônica são necessários para confirmar a hipótese levantada e a verdadeira identidade das células $p75^{NTR}+$ na SVZ de ratos adultos.

O papel funcional da expressão de $p75^{NTR}+$ em tipos celulares da SVZ de roedores adultos normais não é totalmente estabelecido. Estas células são altamente proliferativas e marcadas por BrdU e Ki67, marcadores mitóticos, na SVZ de roedores adultos (GIULIANI et al., 2004; YOUNG et al., 2007). Sugeriu-se inicialmente que a expressão de $p75^{NTR}$ pode estar relacionada à regulação do ciclo celular, especificamente a saída de um estado não diferenciado, com os de células C ou B, para um estágio mais diferenciado, como o de neuroblastos e neurônios (GIULIANI et al., 2004). Estudos recentes no cérebro de camundongos parecem confirmar esta hipótese, sugerindo que neurotrofinas podem regular a neurogênese na SVZ de roedores adultos através da ativação de receptores $p75^{NTR}$ (YOUNG et al., 2007). Young et al., (2007) forneceram dados experimentais sugerindo que uma pequena população de células $p75^{NTR}+$ no cérebro de camundongos adultos são progenitores que geram principalmente neurônios, mas não células gliais na presença de BDNF. Estes autores acreditam que as células $p75^{NTR}+$ são células C que, na presença de BDNF, contribuem para a formação da metade dos neuroblastos no cérebro de camundongos normais (YOUNG et al., 2007).

Outros estudos sugerem que a expressão de $p75^{NTR}$ em neuroblastos é importante para a migração destas células da SVZ para o bulbo olfatório na presença de neurotrofinas como o BDNF (SNAPYAN et al., 2009). Sabe-se que a expressão de $p75^{NTR}$ pode estar relacionada à morte celular programada, estudos na SVZ de ratos adultos sugerem que neste nicho neurogênico a expressão do receptor de neurotrofinas em questão não é relacionada à morte celular programada (GIULIANI et al., 2004).

Estudos futuros, utilizando bloqueio do receptor p75^{NTR} ou a deleção gênica específica deste receptor, são necessários para elucidar o seu papel funcional na regulação da neurogênese que ocorre na SVZ de roedores adultos.

4.3 O SIGNIFICADO DA PERDA DE IMUNOREATIVIDADE PARA O RECEPTOR p75^{NTR} NA V-SVZ DE RATOS ADULTOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL FOCAL

Apesar dos estudos mencionados acima, na SVZ de roedores adultos normais, inexistem estudos que tenham investigado a expressão de p75^{NTR} após isquemia em uma região próxima à SVZ de ratos adultos. Neste estudo, observou-se que no primeiro dia após o evento isquêmico, há um grande espessamento da SVZ, uma característica da amplificação da neurogênese após o AVE (KOKAIA, THORED et al. 2006; THORED, ARVIDSSON et al. 2006). Concomitante a isto, ocorreu grande redução da imunoreatividade para o receptor p75^{NTR} na SVZ ipsilateral a isquemia, comparado ao lado contralateral, 1 e 3 dias após a indução isquêmica com o peptídeo vasoconstritor ET-1. Estes resultados não devem refletir redução física por perda real de células p75^{NTR+} na SVZ, mas a diminuição da expressão deste receptor na membrana celular. Considerando que após isquemia estriatal, há um grande aumento do número de neuroblastos na SVZ de ratos adultos (ARVIDSSON et al., 2002), estes resultados sugerem que a expressão do receptor p75^{NTR} pode-se estar relacionada à manutenção do nível basal de neurogênese nesta região e que, durante um processo isquêmico, a diminuição da expressão deste receptor favorece o re-início do ciclo celular e a diferenciação. Este é primeiro estudo que descreve, *in vivo*, a perda de reatividade de um receptor de neurotrofinas após AVE experimental.

Sabe-se que em lesões cerebrais, os novos neurônios diferenciam-se nos tipos neuronais perdidos, mas ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares que controlam essa diferenciação (YAMASHITA, NINOMIYA et al. 2006; NAKAGOMI, TAGUCHI et al. 2009). Nosso trabalho apresenta uma evidência importante de que este controle pode iniciar na SVZ, através do receptor p75^{NTR}, nos estágios iniciais da diferenciação celular. Ressaltamos a importância de testar essa hipótese em outras situações patológicas, já que a sinalização mediada por neurotrofinas e seus receptores resultam em mecanismos diversos pelos quais as células respondem a diferentes sinais indutores de proliferação e morfogênese (ALLENDOERFER et al., 1994).

Alguns autores acreditam que o receptor p75^{NTR} é um marcador geral de células tronco embrionárias, nas quais regula a multipotência e auto-renovação (MOSCATELLI, PIERANTOZZI et al. 2009). De acordo com esta hipótese, a presença de células p75^{NTR+} na SVZ dos animais isquêmicos indica que este receptor deve participar no controle de um estágio não diferenciado de células tronco neurais na SVZ, que pode ser alterado mediante esta situação patológica. Sugerimos, ainda, que a diminuição da expressão do receptor p75^{NTR} deva ser acompanhada do aumento da expressão de outros receptores de neurotrofinas, como trkB, , o que deve favorecer a diferenciação das células B ou C em neuroblastos migratórios. Esta hipótese deve ser testada em estudos futuros, em diferentes tempos de sobrevida, através de imunistoquímica para os diferentes receptores de neurotrofinas.

4.4 A IMUNORREATIVIDADE PARA O RECEPTOR TrkA NA V-SVZ APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Sabe-se que as neurotrofinas exercem importantes efeitos no controle das propriedades das CTNAs da V-SVZ, funcionando como moduladores da neurogênese (GRADE, WENG et al. 2013).

Apesar de a expressão do TrkA ser muito baixa ou ausente na V-SVZ (AHMED, REYNOLDS et al. 1995), foi demonstrado que a infusão intra-nasal do seu ligante NGF, em ratos submetidos a isquemia, aumenta a sobrevivência neuronal na V-SVZ ipsilateral e estriado isquêmico, sem interferir no grau de proliferação de progenitores da V-SVZ. (ZHU et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a expressão de NGF/TrkA eleva-se durante injúria, tanto no SNC como no SNP (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001). A expressão do TrkA parece ser muito baixa na V-SVZ (AHMED, REYNOLDS et al. 1995), pois, neuroesferas derivadas da V-SVZ apresentam pouca ou nenhuma expressão de TrkA (AHMED, REYNOLDS et al. 1995).

Tais estudos nos levaram a investigar se ocorreriam alterações na expressão do TrkA na SVZ após AVE isquêmico induzido no estriado, com peptídeo vasoconstritor ET-1. Em nossos resultados, não encontramos células TrkA positivas na SVZ ipsilateral e contralateral à isquemia, bem como nos animais controles.

Foi demonstrado que a atividade de neurônios serotoninérgicos (5HT) TrkA positivos influencia o comportamento das células tronco da SVZ, pois, os axônios desses

neurônios fazem íntimo contato com células Tipo B1 e E1 que expressam receptores de serotonina 2C e 5A. A infusão intraventricular do agonista ou antagonista do 5HT2C aumenta ou reduz a neurogênese na SVZ, respectivamente (TONG, C. K. et al, 2014). Em nosso estudo encontramos uma densa rede de axônios TrkA positivos no estriado isquêmico e na SVZ ipsilateral à isquemia. Tais resultados revelam que esses axônios TrkA positivos influenciam a neurogênese após AVE isquêmico induzido com peptídeo ET-1.

Tanto o NGF quanto o receptor TrkA são produzidos durante o desenvolvimento, na vida adulta e no envelhecimento por vários tipos de células do sistema nervoso central e periférico, por células inflamatórias e muitos outros tecidos (SOFRONIEW, HOWE et al. 2001). Em nossos resultados, encontramos células inflamatórias TrkA positivas na penumbra isquêmica dos animais submetidos a isquemia com ET-1. Tal achado revela que as neurotrofinas talvez influenciem a comunicação entre as células inflamatórias e, ainda, o grau de inflamação na região acometida pelo AVE isquêmico, seja através do aumento da proliferação das células inflamatórias ou através da quimioatração de novas células do sangue circulante.

In vitro, neuroesferas derivadas da V-SVZ apresentam elevada expressão de TrkB e pouca expressão de TrkA (AHMED, REYNOLDS et al. 1995). Além disso, a adição de BDNF aumenta o número de neurônios através do aumento da diferenciação para o fenótipo neural (AHMED, REYNOLDS et al. 1995). Acreditamos que o receptor TrkB possa ter papel funcional no controle da neurogênese na SVZ após AVE isquêmico, contudo, essa investigação ficará para um estudo posterior em nosso laboratório.

5. CONCLUSÃO

5.1. O receptor de neurotrofinas p75^{NTR} é expresso em uma população de células da SVZ de ratos adultos.

5.2 A isquemia estriatal induzida por microinjeção de ET-1, em uma região próxima à SVZ, induz perda de imunoreatividade para o receptor p75^{NTR} em células dessa região. Tal redução ocorre principalmente no lado ipsilateral ao processo isquêmico no tempo de sobrevivência de 1 e 3 dias após a indução isquêmica. Sete dias após o insulto isquêmico, a imunoreatividade para o p75^{NTR} voltou a aumentar.

5.3 O receptor TrkA não deve participar no controle das células tronco neurais da SVZ diretamente, após AVE isquêmico experimental, contudo, a sua participação deve ocorrer através de neurônios estriatais TrkA positivos presentes nas adjacências da SVZ.

5.4 O receptor TrkA pode ser importante para o controle da inflamação dentro do sistema nervoso central após AVE isquêmico.

Estudos futuros, utilizando imunohistoquímica para os diferentes receptores de neurotrofinas, com tempos de sobrevivência mais longos, além de estudos com deleção gênica deste receptor, devem ser realizados para o estabelecimento definitivo do papel das neurotrofinas e seus receptores na regulação da neurogênese do cérebro adulto normal e em condições patológicas como a isquemia.

6. BIBLIOGRAFIA

- AHMED, S., et al. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. **J Neurosci**, v. 15, p. 5765-5778, 1995.
- ALLENDOERFER, K. L., et al. Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. **J Neurosci**, v. 14, p. 1795-1811, 1994.
- ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, v.135, p.1127-1128, 1962.
- ALTMAN, J. AND G. D. DAS. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**, v. 124(3), p. 319-335, 1965.
- ALVAREZ-BUYLLA, A., et al. Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. **J Comp Neurol**, v. 264(2), p. 159-170, 1987.
- ALVAREZ-BUYLLA, A. and J. M. GARCIA-VERDUGO. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J Neurosci**, v. 22(3), p. 629-634, 2002.
- ALVAREZ-BUYLLA, A., et al. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. **J Neurosci**, v.18, p. 1020-1037, 1998.
- ALVAREZ-BUYLLA, A. and D. A. LIM. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**, v. 41, p. 683-686, 2004.
- ANDRES, R. H., R. CHOI, et al. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy. **Regen Med**, v.3, p. 893-905, 2008.
- AREVALO, J. C. and S. H. WU. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! **Cell Mol Life Sci**, v. 63, p.1523-1537, 2006.
- ARVIDSSON, A., T. COLLIN, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med**, v. 8, p. 963-70, 2002.
- BATH, K. G., et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. **J Neurosci**, v. 28(10), p.2383-2393, 2008.
- BAYDYUK, M. AND B. XU BDNF signaling and survival of striatal neurons. **Front Cell Neurosci** v. 8, p. 254, 2014.
- BENTLEY, C. A. AND K. F. LEE. p75 is important for axon growth and schwann cell migration during development. **J Neurosci**, v. 20(20), p. 7706-15, 2000.
- BIGNAMI, A. AND D. DAHL. Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. **Nature**, v. 252(5478), p. 55-56, 1974.

BLOCHL, A. AND C. SIRRENBERG. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75L_{NTR} receptors. **J Biol Chem** 271(35): 21100-21107, 1996.

BROUNS, R. AND P. P. DE DEYN. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v.111(6), p.483-495, 2009.

BUTTI, E., et al. Neurogenic and non-neurogenic functions of endogenous neural stem cells. **Front Neurosci**, v. 8, p. 92, 2014.

CALZA, L., et al. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95(6), p. 3209-3214, 1998.

CAMERON, H. A.; DAYER, A. G. New interneurons in the adult neocortex: small, sparse, but significant? **Biol Psychiatry**, v. 73(7), p. 650-5, 2008.

CANDALIJA, A., et al. Trk receptors need neutral sphingomyelinase activity to promote cell viability. **FEBS Lett**, v. 588(1), p.167-174, 2014.

COCHARD, P. and D. PAULIN). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. **J Neurosci**, v. 4(8), p. 2080-2094, 1984.

CODEGA, P., et al. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. **Neuron**, v.82(3), p. 545-559, 2014.

CONOVER, J. C. and R. Q. NOTTI. The neural stem cell niche. **Cell Tissue Res**, v. 331(1), p.211-224, (2008).

CRAGNOLINI, A. B. and W. J. FRIEDMAN. The function of p75^{NTR} in glia. **Trends Neurosci**, v. 31(2), p.99-104, 2008.

CHRISTIE, K. J. and A. M. TURNLEY. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair-factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain. **Front Cell Neurosci**, v. 6, p.70, 2012.

CURTIS, M. A., M. KAM, et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. **Science**, v. 315(5816), p.1243-9, 2007.

DANILOV, A. I., et al.. Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. **Glia**, v. 57(2), p.136-152, 2009.

DAYER, A. G., B. JENNY, et al. Recruiting new neurons from the subventricular zone to the rat postnatal cortex: an organotypic slice culture model. **Eur J Neurosci**, v. 27(5), p.1051-60, 2008.

DIJKHUIZEN, R. M., et al. Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. **J Neurosci**, v. 23(2), p. 510-517, 2003.

DOETSCH, F., et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. **Cell** **97**, v. 6, p. 703-716, 1999.

DOETSCH, F., et al. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **J Neurosci** **17**, v. 13, p.5046-5061, 1997.

DOETSCH, F. and C. SCHARFF. Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. **Brain Behav Evol**, v. 58(5), p.306-322, 2001.

DOETSCH, F., L. PETREANU, et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. **Neuron**, v. 36(6), p.1021-34, 2002.

DOYLE, K. P., et al. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, V. 55(3), p.310-318, 2008.

EASTER, S. S., Jr., et al. Initial tract formation in the mouse brain. **J Neurosci**, v. 13(1), p.285-299, 1993.

FRANKLAND, P. W. and F. D. MILLER. . Regenerating your senses: multiple roles for neurogenesis in the adult brain. **Nat Neurosci**, v. 11(10), p.1124-6, 2008.

FROST, S. B., et al. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. **Behav Brain Res** **169**, v. 2, p.206-211, 2006.

FROST, S. B., et al. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. **Behav Brain Res** **169**, v. 2, p.206-211, 2006.

GALVAO, R. P., et al. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulatesubventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. **J Neurosci**, v. 28(50), p.13368-13383, 2008.

GASCON, E., et al. Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. **Eur J Neurosci**, v. 21, p.69-80, 2005.

GIL-PEROTIN, S., et al. Identification and characterization of neural progenitor cells in the adult mammalian brain. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 203, p.1-101, 2009.

GILMOUR, G., et al. The effects of intracortical endothelin-1 injections on skilled forelimb use: implications for modelling recovery of function after stroke. **Behav Brain Res**, v. 150, p.171-183, 2004.

GIULIANI, A., et al. p75(NTR)-immunoreactivity in the subventricular zone of adult male rats: expression by cycling cells. **J Mol Histol**, v. 35, p.749-758, 2004.

GLEASON, D., J. H. FALLON, et al. Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury. **Neuroscience**, v. 156, p. 81-8, 2008.

GOULD, E. and C. G. GROSS. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. **J Neurosci**, v. 22, p. 619-623, 2002.

GOULD, E., et al. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends Cogn Sci**, v. 3(5), p.186-192, 1999.

GRADE, S., et al. . Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum. **PLoS One**, v. 8(1), p.55039, 2013.

GROTE, H. E. and A. J. HANNAN . Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34(5-6), p.533-545, 2007.

GU, W., BRANNSTROM, T., ROSQVIST, R. & WESTER, P. Cell division in the cerebral cortex of adult rats after photothrombotic ring stroke. **Stem Cell Res.**: v. 2, p. 68 - 77, 2009.

HERRUP, K. and E. M. SHOOTER . Properties of the beta nerve growth factor receptor of avian dorsal root ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70(12), p.3884-3888, 1973.

HOLMBERG, J., et al.. Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. **Genes Dev**, v. 19(4), p. 462-471, 2005.

HORNER, P. J., et al.. Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. **J Neurosci**, v. 20(6), p.2218-2228, 2000.

IMAYOSHI, I., M. SAKAMOTO, et al.. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. **Nat Neurosci**, v. 11(10), p. 1153-61, 2008.

Imitola, J.. Prospects for neural stem cell-based therapies for neurological diseases. **Neurotherapeutics**, v. 4(4), p.701-714, 2007.

IOSIF, R. E., et al. Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28(9), p.1574-1587, 2008.

IRMADY, K., et al.. Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. **J Neurosci**, v. 34(9), p.3419-3428, 2014.

IMITOLA, J.. Prospects for neural stem cell-based therapies for neurological diseases." **Neurotherapeutics** 4(4): 701-714.Iosif, R. E., et al. (2008). Suppression of stroke-induced

progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. **28**(9), p.1574-1587, 2007

IRMADY, K., et al.. Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. **J Neurosci**, v. **34**(9), p.3419-3428.

JIN, K., X. WANG, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103(35), p.13198-202, 2014.

JIN, K. and V. GALVAN. Endogenous neural stem cells in the adult brain. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. **2**(3), p.236-242, 2007.

JONES, D. L. and A. J. WAGERS. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. **9**(1), p.11-21, 2008

KALB, R.. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. **Trends Neurosci**, v. **28**(1), p.5-11, 2005.

KEE, N., et al. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. **10**(3), p.355-362, 2007.

KHODOROVA, A., et al. Endothelin receptors and pain. **J Pain**, v. 10(1), p. 4-28, 2009

KOCH, P., Z. KOKAIA, et al. Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling. **Lancet Neurol**, v. 8(9),p.819-29, 2009.

KOKAIA, Z., et al. Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. **Exp Neurol** **154**, v. 2, p.289-301, 1998.KOKAIA, Z., P. THORED, et al. Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain--recent scientific progress. **Cereb Cortex**, v. 16 Suppl 1: i162-7, 2006.

LIM, D. A. and A. ALVAREZ-BUYLLA Adult neural stem cells stake their ground. **Trends Neurosci**, v. 37(10), p.563-571, 2014.

LINDVALL, O. and Z. KOKAIA. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**, v. 441(7097), p.1094-1096, 2006.

LIU, X. S., Z. G. ZHANG, et al. Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27(3), p.564-74, 2007..

LLEDO, P. M. and G. GHEUSI [Adult neurogenesis: from basic research to clinical applications]. **Bull Acad Natl Med**, v. 190(2), p.385-400; discussion 400-382, 2006.

- LOIS, C., et al. Chain migration of neuronal precursors. **Science**, v. 271(5251), p.978-981, 1996.
- LOPEZ-SANCHEZ, N. AND J. M. FRADE Control of the cell cycle by neurotrophins: lessons from the p75 neurotrophin receptor. **Histol Histopathol**, v. 17(4), p.1227-1237, 2002.
- LOPEZ, A. D., et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. **Lancet**, v. 367(9524), p.1747-1757, 2006.
- LOTUFO, P. A. and I. M. BENSENOR Stroke mortality in Sao Paulo (1997-2003): a description using the Tenth Revision of the International Classification of Diseases. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62(4), p.1008-1011, 2004.
- LUSCHER, T. F. and M. BARTON. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation**, v. 102(19), p.2434-2440, 2000.
- MARKAKIS, E. A., et al. Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. **J Neurosci**, v. 24(12), p.2886-2897, 2004..
- MARKUS, H. S. Stroke: causes and clinical features. **Medicine (Baltimore)**, v. 32(10), p.5, 2008.
- MEAIRS, S., et al. Stroke research priorities for the next decade--A representative view of the European scientific community. **Cerebrovasc Dis**, v. 22(2-3), p.75-82, 2006.
- MENEZES, J. R. and M. B. LUSKIN Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon. **J Neurosci**, v. 14(9), p.5399-5416, 1994.
- MICH, J. K., et al. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. **Elife** 3: e02669, 2014.
- MING, G. L. and H. SONG Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annu Rev Neurosci**, v. 28, p.223-250, 2005.
- MINGER, S. L., et al. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. **Regen Med**, v. 2(1), p.69-74, 2007.
- MUFSON, E. J.; KORDOWER, J. H. Cortical neurons express nerve growth factor receptors in advanced age and Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.89, n.2, p.569-73. Jan 15. 1992.
- MUFSON, E. J., S. Y. MA, et al. Loss of basal forebrain P75(NTR) immunoreactivity in subjects with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **J Comp Neurol**, v. 443(2), p.136-53, 2002.

MOODY, S. A., et al. Developmental expression of a neuron-specific beta-tubulin in frog (*Xenopus laevis*): a marker for growing axons during the embryonic period. **J Comp Neurol**, v. 364(2), p.219-230, 1996.

MOSCATELLI, I., et al. p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells. **Exp Cell Res**, v. 315(18), p.3220-3232, 2009.

MUDO, G., et al. (2009). The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. **J Neural Transm**, v. 116(8), p.995-1005, 2009.

MURRAY, C. J. and A. D. LOPEZ (1996). Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. **Science**, v. 274(5288), p.740-743, 1996.

NAKAGOMI, T., A. TAGUCHI, et al. (2009). Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. **Eur J Neurosci**, v. 29(9), p.1842-52, 2009.

NYKJAER, A., et al. p75NTR--live or let die. **Curr Opin Neurobiol**, v. 15(1), p.49-57, 2005.

OHAB, J. J. and S. T. CARMICHAEL Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. **Neuroscientist**, v. 14(4), p.369-380, 2008.

OHAB, J. J., et al. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. **J Neurosci**, v. 26(50), p.13007-13016, 2006..

PASTRANA, E., et al. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106(15), p. 6387-6392, 2009.

PETRATOS, S., et al. Expression of the low-affinity neurotrophin receptor, p75(NTR), is upregulated by oligodendroglial progenitors adjacent to the subventricular zone in response to demyelination. **Glia**, v. 48(1), p.64-75, 2004.

PEHAR, M., M. R. VARGAS, et al. Mitochondrial superoxide production and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation in p75 neurotrophin receptor-induced motor neuron apoptosis. **J Neurosci**, v. 27(29), p.7777-85, 2007.

PONTI, G., AIMAR, P. et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the rabbit subventricular zone and its extensions in the forebrain. **J Comp Neurol**, v. 498(4), p.491-507, 2006.

QUINONES-HINOJOSA, A., N. SANAI, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **J Comp Neurol**, v. 494(3), p.415-34, 2006.

RAMOS, A., W. C. HO, et al. Hypo-osmolar stress induces p75NTR expression by activating Sp1-dependent transcription. **J Neurosci**, v. 27(6), p.1498-506, 2007.

ROSAMOND, W., et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. **117**(4), p.25-146, 2008.

ROUX, P. P. and P. A. BARKER Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. **Prog Neurobiol**, v. **67**(3), p.203-233, 2002.

SAUERBECK, L. R. Primary stroke prevention. **Am J Nurs** **106**(11): 40-41, 43-45, 48-49; quiz 49-50, 2006.

SCHIFFER, D., et al. Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. **Brain Res**, v. **374**(1), p.110-118, 1986.

SCHWOB, N. G., et al. DNA cytosine methylation in brain of patients with Alzheimer's disease. **Ann Neurol**, v. **28**(1), p.91-94, 1990.

SHRESTHA, S., et al. Local antinociception induced by endothelin-1 in the hairy skin of the rat's back. **J Pain**, v. **10**(7), p.702-714, 2009.

SNAPYAN, M., et al. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. **J Neurosci**, v. **29**(13), p.4172-4188, 2009.

SOFRONIEW, M. V., et al. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev Neurosci**, v. **24**, p.1217-1281, 2001.

SONG, H. J., et al. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. **Nat Neurosci**, v. **5**(5), p. 438-445, 2002.

SONG, X., C. H. ZHU, et al. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. **Science**, v. **296**(5574), p.1855-7, 2002.

SONG, X. Y., F. H. ZHOU, et al. Knockout of p75(NTR) impairs re-myelination of injured sciatic nerve in mice. **J Neurochem**, v. **96**(3), p.833-42, 2006.

SOTTHIBUNDHU, A., et al. Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor. **Neurobiol Aging**, v. **30**(12), p.1975-1985, 2009.

SOTTHIBUNDHU, A., et al. Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. **J Neurosci**, v. **28**(15), p.3941-3946, 2008.

SUH, Y., et al. Interaction between DLX2 and EGFR regulates proliferation and neurogenesis of SVZ precursors. **Mol Cell Neurosci**, v. **42**(4), p.308-314, 2009.

TAUPIN, P. "Adult neurogenesis and neuroplasticity." **Restor Neurol Neurosci** v. **24**(1), p.9-15, 2006.

THEODOSIS, D. T., et al. Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88(13), p. 5494-5498, 1991.

THORED, P., et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells**, v. 24(3), p.739-747, 2006.

THORED, P., et al. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. **Stroke**, v. 38(11), p.3032-3039, 2007.

TONG, C. K. and A. ALVAREZ-BUYLLA SnapShot: adult neurogenesis in the V-SVZ. **Neuron**, v. 81(1), p.220-220 e221, 2014.

TONG, C. K., et al. Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111(34), p.12438-12443, 2014.

UNDERWOOD, C. K. and E. J. COULSON The p75 neurotrophin receptor. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 40(9), p.1664-1668, 2008.

UNDERWOOD, C. K., K. REID, et al. Palmitoylation of the C-terminal fragment of p75(NTR) regulates death signaling and is required for subsequent cleavage by gamma-secretase. **Mol Cell Neurosci**, v. 37(2), p.346-58, 2008.

WANG, Y., et al. Neurogenesis associated with endothelin-induced cortical infarction in the mouse. **Brain Res**, v. 1167, p.118-122, 2007.

WILTROUT, C., et al. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. **Neurochem Int**, v. 50(7-8), p.1028-1041, 2007.

WINNER, B., P. DESPLATS, et al. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Exp Neurol**, v. 219(2), p.543-52, 2009.

WOLFE, C. D. The impact of stroke. **Br Med Bull**, v. 56(2), p.275-286, 2000.

YAMASHITA, T., M. NINOMIYA, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. **J Neurosci**, v. 26(24), p.6627-36, 2006.

YOUNG, K. M., et al. p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. **J Neurosci**, v. 27(19), p. 5146-5155, 2007.

ZAGREBELSKY, M., A. HOLZ, et al. The p75 neurotrophin receptor negatively modulates dendrite complexity and spine density in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 25(43), p.9989-99, 2005

ZHANG, R. L., Z. G. ZHANG, et al. Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 105(1), p.33-41, 2001.

ZHANG, R. L., Y. LETOURNEAU, et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. **J Neurosci**, v. 27(12), p. 3157-62, (2007).

ZHANG, R. L., et al. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. **Neuropharmacology**, v. 55(3), p.345-352, 2008.

ZHAO, C., et al. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132(4), p. 645-660, 2008.

ZIGOVA, T., et al. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Mol Cell Neurosci**, v. 11(4), p.234-245, 1998.

ZOCHODNE, D. W., et al. Acute endoneurial ischemia induced by epineurial endothelin in the rat sciatic nerve. **Am J Physiol**, v. 263(6 Pt 2), p. H1806-1810,1992.

Anexos

I

Protocolo de Coloração com Cresil Violeta

Lâminas gelatinizadas contendo secções cerebrais foram imersas em cubas de vidro na seguinte seqüência:

- 1- 6 minutos em Ácido Acético
- 2- 14 minutos em cresil violeta
- 3- 1minuto e 30segundos em álcool 70%
- 4- 1minuto e 30segundos em álcool 80%
- 5- 1minuto e 30segundos em álcool 90%
- 6- 2minutos em álcool 100% (1)
- 7- 2 minutos em álcool 100% (2)
- 8- 1minuto em xileno (1)
- 9- 1minuto em xileno (2).

II

Protocolo de Imunoistoquímica para o pan receptor de neurotofina p75^{NTR}

- 1- Fazer o pré-tratamento das secções cerebrais em tampão borato (pH= 9) aquecido a 65 °C em banho maria por 20 minutos (marcado apenas depois da solução atingir essa temperatura).
- 2- Deixar as lâminas esfriarem por 20 minutos à temperatura ambiente.
- 3- Duas lavagens, de 5 minutos cada, em Tampão Fosfato Salina 0.1M (TFS 0.1M).
- 4- Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 30 % por 20 minutos.
- 5- Três lavagens, de 5 minutos, em TSF tween (1ml de tween para 2 litros de TFS 0.1M).
- 6- Bloqueio em soro normal de cabra a 10% por 1 hora.
- 7- Sem retirar o soro normal, encubar as secções *overnight* no anticorpo primário, anti-p75^{NTR} feito em coelho, diluído em soro normal ou em TFS 0.1M na concentração 1:200 (5 µl do anticorpo: 1ml de diluente).
- 8- Três lavagens, de 5 minutos cada, em TFS 0.1M tween.
- 9- Incubação no anticorpo secundário (feito em cabra anti-coelho) por 2h, na concentração 1:200 (1ml de anticorpo secundário:10ml de TSF).
- 10- Três lavagens, de 5 minutos cada, em TSF tween.
- 11- Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, vector) por 2h (uma gota da solução A + uma gota da solução B / 5ml de TFS 0.1M).
- 12- Quatro lavagens em TFS 0.1M tween de 5 minutos cada.
- 13- Reação em diamino benzidina (DAB) para revelação da peroxidase do antígeno:
0.125g de DAB foram diluídos em 5 ml de água destilada e adicionado à uma solução de 130 µl de H₂O₂ e 250ml de TFS 0.1M. Durante esta reação, o padrão de marcação pelo DAB deve ser verificado à cada 30 segundos.

III

Imunohistoquímica para detecção do antígeno endógeno TrkA (tirosina-kinase A) feito em coelho

- 1- Retirar as lâminas do freezer e deixá-las secando por 30min a 37°C.
- 2- Pré-tratamento em tampão borato pH 9, por 20min, a 65°C.
 - a. Tampão borato (Tb): 6g de ácido bórico para 500ml de água destilada.
 - b. Aquecer o Tb em uma cubeta em banho Maria por 25min marcados após atingir a temperatura de 65°C. As lâminas devem ser colocadas em uma cestinha para imersão.
- 3- Deixar as lâminas esfriarem por 20min a temperatura ambiente.
- 4- Lavagem em PBS 0,1M- 2x5min (obs: sem tween).
- 5- Bloqueio da Peroxidase endógena: Metanol + H₂O₂ (1ml de peróxido para 100ml de metanol).
- 6- Lavagem em PBStween- 3x 5min.

Obs: 1ml de tween para 2L de PBS 0,1M.
- 7- Bloqueio em soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário por 1h:

Soro de cabra a 10% (1ml de soro + 9ml de PBS 0,1M).
- 8- Retirar o excesso de soro normal e incubar as secções no anticorpo primário overnight (24h), diluído em soro normal ou em PBS 0,1M.

TrkA- 1µc para 200µl (10 µc para 1ml)-
- 9- Lavagem em PBS tween- 3x 5min.
- 10- Incubação no anticorpo secundário por 2h:

Cabra anti-coelho- 1:200- 5µl de soro para 1ml PBS 0,1M.
- 11- Lavagem em PBS twenn- 3x 5min.
- 12- Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC, vector) por 2h:

1 gota da sol A+ 1 gota da sol B + 5ml de PBS 0,1M

Obs: preparar e deixar em repouso por 1h antes de colocar nas secções.

13- Lavagem em PBS twenn 4x 5min.

14- Reação em Diaminobenzidina (DAB) para revelação:

- 130µl de H₂O₂ em 250ml de PBS 0,1M. Adicionar o H₂O₂ ao PBS apenas depois de adicionar a alíquota de DAB.

Obs: Alíquotas de DAB: 0,125g de DAB + 5ml de água destilada: Misturar bem para desfazer precipitados. Se necessário colocar na estufa rapidamente. As alíquotas devem ser usadas imediatamente ou congeladas.