

NILTON DE BARROS ABREU JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL DE RATOS
TRATADOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS APÓS ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

A162c
2013

Abreu Júnior, Nilton de Barros, 1971-

Caracterização da área de infarto cerebral de ratos tratados com células-tronco mesenquimais após acidente vascular encefálico isquêmico experimental / Nilton de Barros Abreu Júnior. – Viçosa, MG, 2013.

xiv, 80 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Células-tronco. 2. Isquemia cerebral. 3. Terapia celular.
4. Neurologia veterinária. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.089602774

NILTON DE BARROS ABREU JÚNIOR

**CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE INFARTO CEREBRAL DE RATOS
TRATADOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS APÓS ACIDENTE
VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

13 de Dezembro de 2013.

Betânia de Souza Monteiro

Tatiana Schmitz Duarte

Marlene Isabel Vargas Vilorio

Ricardo Junqueira Del Carlo
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Ao professor Ricardo Junqueira Del Carlo por sua vida dedicada ao ensino e formação de cidadãos.

A minha querida família, em especial meu filho, Álvaro, que inicia sua jornada neste plano.

“As perfeições de Deus são tão grandes e tão admiráveis que, se o mundo estivesse cheio de livros, se todas as criaturas fossem outros tantos escritores e se toda a água dos mares se convertesse em tinta; primeiro se encheriam todos os livros, se cansariam todos os escritores e se esgotariam os mares, e ainda se não teria explicado uma só de Suas perfeições”.

(Santo Agostinho)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado em todas as conquistas durante minha vida, por me permitir conhecer todas estas pessoas que me ajudaram chegar até aqui.

Ao meu mentor espiritual que incondicionalmente zela por mim.

Ao professor, Doutor Ricardo Junqueira Del Carlo sou eternamente grato, pela confiança, paciência, compreensão e ensinamentos.

Aos meus queridos pais, Nilton e Végliã, pelos ensinamentos para a vida, pela minha formação moral e ética, que hoje em dia levo comigo.

Às minhas queridas irmãs, Elaine e Vívian, pelo carinho e incentivo aos meus projetos.

À minha esposa Aline, obrigado pelo incentivo, pelo respeito e pela ajuda.

Ao meu filho Álvaro, sua chegada preencheu minha vida.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária, em especial o professor Evandro Favarato, pelo apoio, disponibilidade e contribuição.

À professora Betânia Monteiro, da Universidade de Vila Velha, pela contribuição e colaboração em todas as etapas do estudo.

Às professoras da Universidade Federal de São João Del Rei, Maira Lima, Laila Damázio e Rosi Ribeiro, por apoiarem a etapa da histopatologia.

Ao professor Antônio J. Natali, por apoiar a etapa de manutenção dos animais.

Ao professor Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, por ceder o laboratório para a etapa do cultivo celular.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, em especial Carmen, Rosi e Maninha.

Aos colegas Bárbara Silva Okano e Raul Felipe Dornas. Suas presenças e disposições foram fundamentais.

Aos colegas Eveline Caetano, Luís Eugênio, Vanessa Guedes, Marta Araújo, Rodrigo Sepúlveda, Letícia, Paula, Gláucia e Natália Alves (UFSJ), recebam o meu obrigado.

A José Grosso, Joseph Gleber e Fritz Schein, por me auxiliarem em momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e a Coordenação do Programa de Pós-graduação da Medicina Veterinária, que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao CNPq e a FAPEMIG, pelo apoio.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO I – FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA CEREBRAL	6
Resumo	7
Abstract	8
INTRODUÇÃO	9
PATOGÊNESE DA ISQUEMIA CEREBRAL	9
LESÃO CEREBRAL SECUNDÁRIA	11
Liberação do Glutamato	11
Acúmulo de Cálcio Intracelular	12
Aumento de Radicais Livres	12
Espécies Reativas de Oxigênio	13
Óxido Nítrico	13
Elevação do Ferro	14
Mediadores Inflamatórios	15
MORTE CELULAR	16
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II: CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA ISQUEMIA CEREBRAL	22
Resumo	23
Abstract	24
INTRODUÇÃO	25
MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	26
SECREÇÃO DE FATORES NEUROTROFICOS	28

NEUROGÊNESE E ATIVAÇÃO GLIAL	29
INDUÇÃO DA ANGIOGÊNESE	31
EFEITO ANTIAPOPTÓTICO	32
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO CELULAR DA ÁREA DE	39
INFARTO CEREBRAL DE RATOS TRATADOS COM CÉLULAS-	
TRONCO MESENQUIMAIS APÓS ACIDENTE VASCULAR	
ENCEFÁLICO ISQUÊMICO EXPERIMENTAL	
Resumo	40
Abstract	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	45
RESULTADOS	56
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	73
AGRADECIMENTOS	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Capítulo I - Fisiopatologia da Isquemia Cerebral.	
Figura 1. A evolução da fisiopatologia da isquemia cerebral.	10
Figura 2. Cascata de eventos danosos na isquemia cerebral	17
Capítulo II – Células-tronco Mesenquimais na Isquemia Cerebral.	
Figura 1. Os principais efeitos neuroprotetores das células-tronco mesenquimais.	26
Capítulo III – Caracterização Celular da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental	
Figura 1. Anatomia vascular da região cervical lateral do rato.	50
Figura 2. Procedimento microcirúrgico de oclusão temporária da artéria cerebral média esquerda do rato.	50
Figura 3. Parâmetros estereotáxicos para a identificação das secções e medida do volume de infarto.	53
Figura 4. Secção 0,20mm do cérebro dos ratos, evidenciando o <i>striatum</i> .	54
Figura 5. Fotomicrografia das CTM diferenciadas <i>in vitro</i> .	56
Figura 6. Caracterização imunofenotípica das CTM em citometria de fluxo.	57
Figura 7. Fotomicrografia da CTM após nanomarcacão demonstrando a fluorescência.	58
Figura 8. Imagens de microscopia de fluorescência do parênquima pulmonar.	58
Figura 9. Lesão isquêmica induzida no encéfalo de rato.	59
Figura 10. Imagens das secções coronais dos encéfalos obtidas em <i>scanner</i> de mesa.	60
Figura 11. Imagens dos cérebros de ratos comparando a atrofia no hemisfério cerebral esquerdo em relação ao direito.	62
Figura 12. Fotomicrografias de animal do grupo controle.	63
Figura 13. Fotomicrografia de animal do grupo CTM.	64
Figura 14. Fotomicrografia de animal do grupo sham.	65

LISTA DE TABELAS**Capítulo III – Caracterização Celular da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental**

Tabela 1. Índice de gravidade dos déficits neurológicos.	51
Tabela 2. Déficit neurológicos apresentados pelos ratos após oclusão temporária da artéria cerebral média, segundo a escala de Menzies <i>et al.</i> (1992).	60
Tabela 1. Percentagem média da área de infarto, após AVE, mensurada nos animais dos diferentes grupos experimentais.	61

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo III – Caracterização Celular da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental

Gráfico 1. Percentagem média da área de infarto, após AVE, mensurada nos animais dos diferentes grupos experimentais. 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC-	Artéria carótida comum
ACE-	Artéria carótida externa
ACI-	Artéria carótida interna
ACM-	Artéria cerebral média
AMPAr-	Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
Apaf-1-	Fator de ativação de protease associada a apoptose 1
APO1	Antígeno de apoptose 1
APP-	Proteína precursora de amilóide
APT-	Antígeno de apoptose 1
ATP-	Trifosfato de Adenosina
AVE-	Acidente Vascular Encefálico
AVEi-	Acidente Vascular Encefálico Isquêmico
A β -	Proteína β -amilóide
BDNF-	Fator neurotrófico derivado do cérebro
bFGF-	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BHE-	Barreira Hemato-encefálica
Ca ⁺⁺	Cálcio
CEUA-	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
COBEA-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cox-	Ciclooxigenase
CT-	Células-tronco
CTA-	Células-tronco adultas
CTH-	Células-tronco hematopoiéticas
CTM-	Células-tronco mesenquimais
CTN-	Células-tronco neurais
CTS-	Células-tronco somáticas
DAMPs-	Padrões moleculares associados ao perigo
DMEM-	Dulbecco's modified Eagle's
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
Fe-	Ferro
FSC-	Fluxo Sangüíneo Cerebral

GDNF-	Fator neurotrófico derivado glial
GFAP-	Proteína Glial Fibrilar Ácida
H ₂ O ₂ -	Peróxido de Hidrogênio
HGF-	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1 α -	Fator de hipóxia 1 α
IA-	Intra-arterial
IFN-	Interferon
IL-	Interleucina
iNOS-	Óxido Nítrico Sintetase Induzida
ISCT-	Sociedade Internacional para Terapia Celular
IV-	Intravenoso
MMP-	Metaloproteinase
MO-	Medula óssea
MTD-	Membro torácico direito
MTE-	Membro torácico esquerdo
Na ⁺ -	Sódio
NADPH-	Nicotiamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NGF-	Fator de crescimento neuronal
NMDA-	N-metil-D-aspartato
NMDAr-	Receptor de N-metil-D-aspartato
NT-3-	Neurotrofina-3
O ₂ -	Oxigênio
OC3-	Ânion superóxido
OH ⁻ -	Hidroxila
ON-	Óxido Nítrico
ONOO ₃ -	Peroxinitrito
ONS-	Óxido nítrico sintase
ONS-	Óxido nítrico sintase
PCR-	Proteína C reativa
ROS-	Espécies Reativas de Oxigênio
SDF-1 α -	Fator derivado das células estromais 1 α
SFB-	Soro fetal bovino
SNC-	Sistema Nervoso Central
TTC-	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

VEGF-	Fator de crescimento vaso-endotelial
ZSG-	Zona subgranular do giro dentado do hipocampo
ZSV-	Zona subventricular

RESUMO

ABREU JÚNIOR, Nilton de Barros, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2013. **Caracterização da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental.** Orientador: Ricardo Junqueira Del Carlo. Coorientador: Evandro Silva Favarato

O acidente vascular encefálico isquêmico geralmente resulta em déficits neurológicos graves e, na maioria, irreversíveis. Ultimamente, novas terapias representam uma nova estratégia para o tratamento destas lesões, sobretudo, com a utilização de células-tronco, em que estudos pré-clínicos demonstram resultados satisfatórios em modelos animais. O presente experimento comparou a lesão de isquemia cerebral em ratos tratados e não-tratados com células-tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea. As CTM foram obtidas da medula óssea de ratos Wistar, cultivadas, caracterizadas, marcadas com nanocristais e infundidas na sexta passagem nos animais com isquemia cerebral. A lesão isquêmica foi induzida pela oclusão temporária da artéria cerebral média esquerda (ACM) com fio de oclusão introduzido e mantido por 60 minutos. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais e submetidos a cirurgia e divididos em grupos sham, controle e tratamento. Os grupos tratados receberam o transplante de células na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL diluídas em 1 mL de PBS e administradas 24 horas após a indução isquêmica por via intravenosa. Realizada a eutanásia dos animais com 24 horas, 15 e 30 dias pós-lesão. Foi mensurado a área macroscópica da isquemia e realizada a contagem celular. Apesar das CTM não terem sido encontradas no local da lesão, na avaliação histológica, os ratos tratados com CTM apresentaram significativa redução da área de isquemia. Os resultados indicam que o tratamento da isquemia cerebral induzida utilizando terapia com CTM tem ação benéfica sobre a recuperação e proteção do tecido nervoso. As CTM infundidas foram localizadas nos pulmões, a ação terapêutica foi realizada a distância.

ABSTRACT

ABREU JÚNIOR, Nilton de Barros, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December 2013. **Characterization of the Area Infarction in Rats Treated with Mesenchymal Stem Cells After Experimental Ischemic Stroke.** Advisor: Ricardo Junqueira Del Carlo. Coadvisor: Evandro Silva Favarato.

Vascular ischemic brain injury usually results in severe neurological deficits and mostly irreversible. Lately, new therapies represent a new strategy for treatment of these lesions, especially with the use of stem cells in preclinical studies in animal models have shown satisfactory results. The present experiment compared the injury of cerebral ischemia in mice treated and non-treated with mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow . MSCs were obtained from bone marrow of rats cultured characterized marked with nanocrystals in the sixth passage and transplanted animals with cerebral ischemia. Ischemic injury was induced by temporary occlusion of the left middle cerebral artery (MCA) for 60 minutes. The rats were randomly divided into 7 experimental groups and they were underwent surgery and divided into sham, control and treatment groups. The treated groups received a transplant of cells at a concentration of 1.0×10^6 cells / mL diluted in 1 mL administered intravenously 24 hours after ischemic induction . Performed euthanasia of animals at 24 hours, 15 and 30 days post-injury. Was measured in the area of ischemia fragment of macroscopic lesions and the cell count performed. Although MSC have not been found at the site of the lesion, the histological assessment, the group treated with MSCs showed significant reduction in the area of ischemia. The results indicate that treatment of cerebral ischemia induced using MSC therapy has beneficial effects on the recovery and protection of nerve tissue. Transplanted MSCs were localized in the lungs, the therapeutic action at a distance was performed.

INTRODUÇÃO GERAL

O acidente vascular encefálico (AVE) é a interrupção do fluxo sanguíneo em vasos encefálicos que resulta em uma área de infarto no tecido nervoso, danos neurológicos permanentes, graves limitações funcionais e morte se não tratado rapidamente (HANKEY, 1999; MUNTNER *et al.*, 2002). Também pode ser causado por hemorragias no encéfalo, e a gravidade do quadro clínico é um reflexo do tamanho e localização da lesão. Os déficits neurológicos mais comuns incluem a hemiplegia ou hemiparesia contralateral ao lado da lesão, ataxia, deficiências visuais, afasia, disartria, amnésia e problemas com o controle vesical.

É a segunda causa mais frequente de morte em todo o mundo, a terceira causa de incapacidade em adultos nos Estados Unidos (FEIGIN, 2005), a principal causa de morte no Brasil (CAMARGO *et al.*, 2005; MINELLI *et al.*, 2007). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do AVE estão a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, sedentarismo, a dislipidemia e o tabagismo, afecções com alta prevalência em todo o mundo tornando crescente a expectativa de novos casos da doença (CAMPOS-SOUSA *et al.*, 2007).

Atualmente, as opções de tratamento para o AVE são limitadas, e muitas medicações promissoras falharam em ensaios clínicos em humanos devido a efeitos colaterais intoleráveis ou limitações terapêuticas (DANTON e DIETRICH, 2003; MERGENTHALER *et al.*, 2004). O objetivo terapêutico na fase aguda e subaguda do AVE é proteger os neurônios em risco, enquanto, após este período, as terapias visam principalmente aumentar a capacidade de regeneração endógena do sistema nervoso central (SNC) e conseqüentemente diminuir as seqüelas funcionais. Neste cenário, as terapias celulares vêm sendo consideradas como possíveis alternativas terapêuticas para tratar doenças para as quais não há, no momento, tratamentos farmacológicos adequados, incluindo aí doenças neurológicas e, mais especificamente, o AVE.

As células-tronco adultas (CTA) são células não-diferenciadas capazes de auto-renovação e de originar tipos celulares diferenciados com morfologia característica e função específica. Essas características exibidas fazem dessas células tipos essenciais para a reparação e manutenção dos tecidos no organismo (PITTENGER *et al.*, 1999; MINGUELL *et al.*, 2000).

Estas células podem ser isoladas e expandidas em cultivo *in vitro*, sendo mantidas como células-tronco ao longo de muitas gerações e mantendo também a

capacidade de se diferenciar quando submetidas aos estímulos apropriados. O grande progresso observado, mais recentemente, no isolamento e caracterização de diferentes tipos de células-tronco somáticas tem permitido sua aplicação em protocolos pré-clínicos e clínicos de terapia para uma variedade de doenças (KORBLING e ESTROV, 2003).

Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco após a vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoiéticas (CTH), quanto de células-tronco mesenquimais (CTM) (HERZOG *et al.*, 2003).

As CTM são capazes de se diferenciar em diversas linhagens (plasticidade), como condroblastos, osteoblastos, adipócitos, tenócitos e mioblastos (MINGUELL *et al.*, 2000). No entanto, pesquisas contemporâneas descreveram a capacidade das CTM originarem linhagens celulares de outra origem embrionária (ADOLPHE e WAINWRIGHT, 2005; RASULOV *et al.*, 2005), sendo descrita a diferenciação em neurônios e células da glia *in vitro* e *in vivo* em condições experimentais especiais (KAN *et al.*, 2005).

CHOPP e LI (2002) comprovaram que as CTM migram para o local lesado quando administrada por via intravenosa após a isquemia cerebral. Adicionalmente, PHINNEY e ISAKOVA (2005) relataram benefícios terapêuticos com a utilização das CTM após a isquemia cerebral. Vários estudos mostraram que as CTM promovem a proliferação celular endógena, reduzem a apoptose (CHEN *et al.*, 2003), e são capazes de diminuir déficits neurológicos após isquemia cerebral (CHEN *et al.*, 2001; IHHOSHI *et al.*, 2004; KUROZUMI *et al.*, 2004).

Estes achados tornaram-se uma esperança para o tratamento da lesão encefálica isquêmica, no entanto pouco se sabe sobre a real ação das CTM no tecido nervoso. Os mecanismos pelos quais o transplante celular resulta em melhora clínica e histológica do encéfalo é o alvo das pesquisas pré-clínicas, vislumbrando no futuro a possibilidade de aplicação deste tipo celular em pacientes humanos.

O presente experimento comparou a lesão de isquemia cerebral em ratos tratados e não-tratados com células-tronco mesenquimais alogênicas (CTM) da medula óssea. As CTM foram obtidas da medula óssea de ratos Wistar, cultivadas, caracterizadas, marcadas com nanocristais Qtracker 655® e transplantadas na sexta passagem nos animais com isquemia cerebral. A lesão isquêmica foi induzida pela oclusão temporária da artéria cerebral média esquerda (ACM) com fio de oclusão introduzido e mantido por

60 minutos. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos experimentais e submetidos a cirurgia e divididos em grupos sham, controle e tratamento. Os grupos tratados receberam o transplante de células na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL diluídas em 1 mL de PBS e administradas 24 horas após a indução isquêmica por via intravenosa. Realizada a eutanásia dos animais com 24 horas, 15 e 30 dias pós-lesão. Foi mensurada a área macroscópica de isquemia e realizada a contagem celular.

Apesar das CTM não terem sido encontradas no local da lesão, na avaliação histológica, os ratos tratados com CTM apresentaram significativa redução da área de isquemia. Os resultados indicam que o tratamento da isquemia cerebral induzida utilizando terapia com CTM tem ação benéfica sobre a recuperação e proteção do tecido nervoso. As CTM transplantadas foram localizadas nos pulmões, a ação terapêutica foi realizada a distância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHE, C.; WAINWRIGHT, B. Pathways to improving skin regeneration. **Exp. Rev. Mol. Med.** 23;7(20):1-14, 2005.

CAMARGO EC, BACHESCHI LA, MASSARO AR. Stroke in Latin America. **Neuroimaging Clin N Am.** May;15(2):283-96, 2005.

CAMPOS-SOUSA, R.N.; SOARES, V.Y.; ALMEIDA, K.J. et al. Knowledge of stroke among a Brazilian urban population. **Arq. Neuropsiquiatria**, v.65, p.587-591, 2007.

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

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

CHOPP M, LI Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet** Nov 15;102(10):3483-93, 2003.

DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 62(2):127-36, 2003.

FEIGIN, V.L. Stroke epidemiology in the developing world. **Lancet** 365(9478):2160-61, 2005.

HANKEY, G.J. Stroke prediction and prevention by carotid endarterectomy: keep an eye on the doughnut and not just the hole. **Cerebrovasc. Dis.** 9(6):345-50, 1999.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood** 102:3483-3493, 2003.

IHOSHII, S.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J.D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. **Brain Res.** 8(1-2):1-9, 2004.

KAN, I.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Integral therapeutic potential of bone marrow. **Neurol.** 1(2):92-100, 2005.

KORBLING M, ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N Engl J Med.** Aug 7;349(6):570-82, 2003.

KUROZUMI. K.; NAKAMURA, K.; TAMIYA, T. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Mol. Ther.** 9:189-197, 2004.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis.** 19(3-4):151-67, 2004.

MINELLI, C.; FEN, L.F.; MINELLI, D.P. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matão, Brazil: a population-based prospective study. **Stroke** 38(11):2906-11, 2007.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33(8):881-7, 2000.

MUNTNER, P.; GARRET, E.; KLAG, M.J.; CORESH, J. Trends in stroke prevalence between 1973 and 1991 in the US population 25 to 74 years of age. **Stroke** 33(5):1209-13, 2002.

PHINNEY DG, ISAKOVA I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. **Curr Pharm Des.** 11(10):1255-65, 2005.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-7, 1999.

RASULOV MF, VASILCHENKOV AV, ONISHCHENKO NA, KRASHENINNIKOV ME, KRAVCHENKO VI, GORSHENIN TL, PIDTSAN RE, POTATOV IV. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. **Bull Exp Biol Med.** Jan;139(1):141-4, 2005.

Capítulo I

Fisiopatologia da Isquemia Cerebral

Fisiopatologia da Isquemia Cerebral

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) é a interrupção do fluxo sanguíneo em vasos encefálicos que resulta em uma área de infarto no tecido nervoso, danos neurológicos permanentes, graves limitações funcionais e morte se não tratado rapidamente. É a segunda causa mais frequente de óbito em todo o mundo e a principal causa no Brasil. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do AVE estão a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, sedentarismo, a dislipidemia e o tabagismo, afecções com alta prevalência em todo o mundo tornando crescente a expectativa de novos casos da doença. Atualmente, as opções de tratamento para o AVE são limitadas, e muitas medicações promissoras falharam em ensaios clínicos em humanos devido a efeitos colaterais intoleráveis ou limitações terapêuticas. O objetivo terapêutico na fase aguda e subaguda do AVE é proteger os neurônios em risco, enquanto, após este período, as terapias visam principalmente aumentar a capacidade de regeneração endógena do sistema nervoso central (SNC) e conseqüentemente diminuir as sequelas funcionais. O conhecimento dos mecanismos moleculares que acontecem no AVE é fundamental para que sejam propostas novas terapias relativas a neuroproteção, neuroregeneração e neurogênese.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Fisiopatologia, isquemia cerebral, lesão cerebral primária, lesão cerebral secundária.

Pathophysiology of Cerebral Ischemia

ABSTRACT

Stroke is the interruption of blood flow in cerebral vessels, resulting in an area of infarction in the nervous tissue, permanent neurological damage, severe functional limitations, and death if not treated quickly. It is the second most common cause of death worldwide, the leading cause of death in Brazil. Among the risk factors for the development of stroke are high blood pressure and cardiovascular diseases, diabetes mellitus, physical inactivity, dyslipidemia, and smoking, diseases with high prevalence worldwide increasingly becoming an expectation of new cases. Nowadays, treatment options for stroke are limited, and many promising drugs have failed in clinical trials in humans due to intolerable side effects or therapeutic limitations. The therapeutic goal in acute and subacute stroke is to protect neurons at risk, while after this period, the therapies mainly aim to increase the capacity of endogenous regeneration of the central nervous system (CNS) and consequently decrease the functional sequelae. The knowledge of the molecular mechanisms that occur in stroke is critical to the proposal of new therapies for neuroprotection, neuroregeneration and neurogenesis.

KEYWORDS: Pathophysiology, cerebral ischemia, primary brain injury, secondary brain injury.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é a patologia que mais causa óbitos no Brasil (CAMARGO *et al.*, 2005; MINELLI *et al.*, 2007), a segunda causa mais frequente de morte em todo o mundo e o terceiro motivo de incapacidade em adultos nos Estados Unidos (FEIGIN, 2005). Dentre os fatores de risco estão a hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, sedentarismo, a dislipidemia e o tabagismo, tornando crescente a expectativa de novos casos (CAMPOS-SOUZA *et al.*, 2007). A lesão no encéfalo se estende para a área adjacente onde mecanismos de reperfusão acontecem na tentativa de reparação do dano e, portanto, minimizar as sequelas sofridas (DINARGL *et al.*, 1999).

Recentemente, estão sendo propostas muitas estratégias de tratamento e, apesar da melhora nos pacientes com dano neurológico agudo, não há tratamento específico para o AVE e o rápido avançar de distúrbios da função cerebral ou global, como no caso do coma, podem gerar danos neurológicos permanentes, graves limitações funcionais e óbito (HANKEY, 1999; MUNTNER *et al.*, 2002). Portanto, o conhecimento e entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dos eventos que ocorrem na isquemia cerebral são importantes para o estabelecimento de estratégias para reparar a lesão tecidual e estabelecer a neuroproteção. O objetivo desta revisão é apresentar os eventos celulares que ocorrem no SNC após a isquemia cerebral.

PATOGÊNESE DA ISQUEMIA CEREBRAL

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é causado pela interrupção do fluxo sanguíneo, num determinado ramo arterial, por mecanismo tromboembólico ou hemodinâmico e, como o tecido cerebral é dependente de oxigênio e glicose para o seu funcionamento normal, a ausência determinará morte celular (FEIGIN, 2005).

Em nível celular, a redução do fluxo sanguíneo cerebral (FSC), com depleção do oxigênio, inicia eventos bioquímicos que ocasionarão fosforilação desencadeando o metabolismo anaeróbio. A glicólise anaeróbia é insuficiente e determina depleção das reservas de fosfato, incluindo ATP, com acúmulo de ácido lático (WYATT *et al.*, 1989). O colapso das funções celulares permitirá acúmulo intracelular de sódio (Na⁺), cálcio (Ca⁺) e água, a membrana celular estará despolarizada e os neurotransmissores excitatórios serão liberados, em especial o glutamato das terminações axonais. No citoplasma existirá acúmulo de ácidos graxos livres, decorrentes da desintegração da

membrana de fosfolipídios que sofrerão peroxidação pelo oxigênio (O^2), radical livre que também atua na formação de mais radicais livres dentro das mitocôndrias, com a participação das prostaglandinas, xantina e ácido úrico e, por fim, em alguns neurônios o Ca^{++} induzirá a produção do óxido nítrico [ON] (SHALAK e PERLMAN, 2004).

Os efeitos decorrentes do colapso energético celular, do acúmulo de Ca^{++} , da peroxidação lipídica, da acidose, da liberação do glutamato, da intensa produção de radicais livres e da neurotoxicidade do ON culminarão com morte celular (Figura 1).

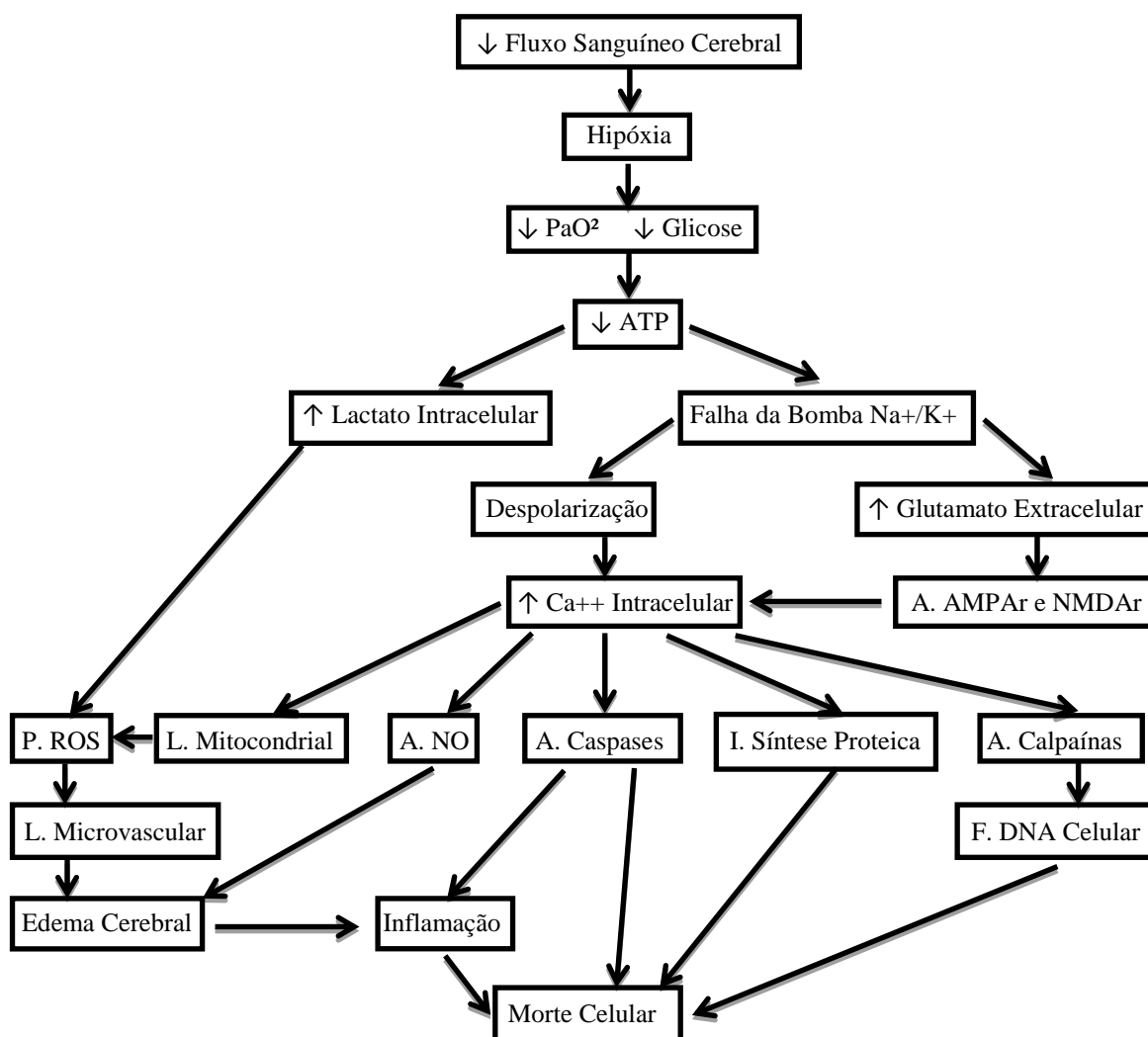


Figura 1. Evolução fisiopatológica da isquemia cerebral. (P) Produção. (L) Lesão. (A) Ativação. (I) Interrupção. (F) Fragmentação. (ROS) Espécies reativas de oxigênio. (NO) Óxido nítrico. (DNA) Ácido desoxirribonucleico (modificado de Shalak e Perlman, 2004).

LESÃO CEREBRAL SECUNDÁRIA

Análises neuropatológicas revelam que a isquemia cerebral possui duas áreas distintas, uma central e outra periférica, chamada penumbra. A intensa redução do fluxo sanguíneo cerebral conduz, na área central, ao colapso dos processos metabólicos, a queda da energia celular e da homeostase iônica e, conseqüentemente, perda da integridade celular, resultando na morte celular em poucos minutos. Na penumbra por haver hipoperfusão, ou seja, baixo fluxo sanguíneo compensado por irrigação colateral, as funções neurofisiológicas são perdidas, enquanto são mantidos o metabolismo e as estruturas celulares (SHARP *et al.*, 2000 e HOSSMANN, 2009).

Enquanto o fluxo sanguíneo é baixo, mas suficiente para manter a atividade elétrica, permanece ainda a atividade dos canais iônicos que é essencial para a sobrevivência do tecido nervoso. Já a reperfusão inicia a cascata dos processos inflamatórios e, junto com os radicais livres, liberados das células mortas, contribuem para a piora da lesão isquêmica.

Estima-se que, nas horas iniciais após a isquemia, a penumbra corresponde a 50% do tecido que mais tarde progredirá para o infarto (DINARGL *et al.*, 1999). A compreensão dos mecanismos que acontecem na penumbra é essencial para preservar a função e promover a sobrevivência das células nervosas após a reperfusão, e é a chave para oferecer tratamentos de fato eficazes.

Liberção do Glutamato

O glutamato é sintetizado pelos astrócitos e é o mais importante neurotransmissor excitatório do SNC. Os neurônios são expostos a pequenas quantidades por eficientes mecanismos de remoção e absorção que livra-os da ação tóxica (KOSTANDY, 2012). Em condições de isquemia cerebral, ocorre intensa diminuição do fluxo sanguíneo, com redução do trifosfato de adenosina (ATP), resultando em falência energética e colapso nos processos celulares dependentes de ATP, como os canais de íons (KIMELBERG e MONGIN, 1998). Com a despolarização da membrana celular, estimulada pela entrada de Ca⁺, haverá liberação do glutamato que estava retido nas vesículas intracelulares sendo eliminado por exocitose e, a liberação da glutaminase extracelular pelos neurônios lesados aumenta a hidrólise de glutamina com formação de glutamato extracelular (MENA *et al.*, 2000).

O colapso do gradiente eletroquímico dos astrócitos faz com que os transportadores de glutamato operem no sentido inverso, ocasionando o excesso de

glutamato extracelular. O acúmulo de glutamato extracelular estimula os receptores neuronais de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e do cainato. Estes receptores estão ligados aos canais iônicos da membrana, determinando o influxo de Na^+ e Ca^{2+} e, a água, passa juntamente com estes íons resultando no edema citotóxico (FURUKAWA, 1997).

A ativação do NMDAR é suficiente para destruir a maioria dos neurônios, sendo considerada preponderante na mediação de pelo menos alguns aspectos da neurotoxicidade do glutamato, pois permite o influxo de Ca^{2+} e a sua entrada determina disfunção das mitocôndrias, ativação da caspase-3 por ação da calpaína, e a produção de ON e ROS acarretando morte neuronal (DOBREK e THOR, 2011).

Acúmulo de Cálcio Intracelular

O Ca^{2+} intracelular, em baixas concentrações, participa de muitas reações citoplasmáticas. Durante a lesão isquêmica, ocorrerá influxo de Ca^{2+} nas células do tecido nervoso por estimulação dos receptores de NMDA, agonista de Ca^{2+} e regulado pelo glutamato, o efluxo de Ca^{2+} é paralizado. O Ca^{2+} também é liberado pelas mitocôndrias e pelo retículo endoplasmático. Estas alterações, resultando no aumento de Ca^{2+} intracelular, interferem em muitas reações enzimáticas incluindo a ativação de lipases, proteases, endonucleases e fosfolipases, na formação de radicais livres de oxigênio, derivados de xantina e da síntese da prostaglandina. O acúmulo citoplasmático de Ca^{2+} , após isquemia, determina lesão cerebral irreversível (GROW e BARKS, 2002).

Aumento de Radicais Livres

O tecido nervoso é muito vulnerável à ação dos radicais livres porque detém algumas peculiaridades como ser rico em lípidios e ácidos graxos insaturados que podem reagir com ROS para gerar radicais peroxil que determinam oxidação lipídica da membrana dos neurônios (PORTER, 1984). Também, há baixa a moderada atividade de catalase e de glutathione peroxidase que eliminam o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diminuindo a oxidação (COOPER e KRISTAL, 1997) e tem atividade metabólica elevada, utilizando 20% do O_2 consumido pelo corpo, embora o encéfalo constitua apenas 2% da massa corporal. A combinação destes fatores faz com que o sistema nervoso central esteja totalmente vulnerável ao dano oxidativo (DRINGEN, 2000).

Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas de vida curta criadas como parte do metabolismo celular normal e sistemas de defesa. Em níveis baixos desempenham papel na regulação do crescimento celular, diferenciação, proliferação e apoptose através da ação em diferentes receptores, genes, canais iônicos, enzimas, proteínas e fatores de transcrição nuclear (POLI *et al.*, 2004 e LIU *et al.*, 2005). Na isquemia cerebral ocorre aumento da produção de ROS, mas na reperfusão cerebral sua produção é acelerada devido aos eventos citotóxicos decorrentes da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e fragmentação do ácido desoxirribonucleico [DNA] (CRACK e TAYLOR, 2005). As ROS são produzidas pela redução do oxigênio molecular (O_2) para formar superóxido (O_2^-) mediado pela NADPH oxidase, xantina oxidase ou transporte em cadeia elétrico mitocondrial (DROGE, 2002). Existe um equilíbrio entre a produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante, que é essencial para o metabolismo normal. Nesse equilíbrio, as células produzem superóxido dismutase (SODs) que converte o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio, e a catalase e glutathione peroxidase convertem H_2O_2 em água. Na presença de metais de transição, pode produzir radical hidroxila (OH^-). O acúmulo de ROS, por produção excessiva ou depleção de enzimas antioxidantes, desencadeia uma cascata sinérgica com ativação de sinais que causariam lesão celular. Este dano decorre da alteração do DNA, da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e da ruptura das funções estruturais e de integridade celular, tais como a capacidade para transporte de moléculas e produção de energia e equilíbrio de íons (OLMEZ e OZYURT, 2012).

Óxido Nítrico

O óxido nítrico (ON) é um radical livre formado pela enzima óxido nítrico sintase (ONS), durante a conversão da L-arginina para L-citrulina. ONS é fortemente ativada durante a isquemia, bem como durante a reperfusão, e sua produção se estende por longos períodos nos neurônios, nas células gliais e endoteliais. O ON tem propriedades neuroprotetoras e neurotóxicas. A ativação de ONS na isquemia de neurônios provoca a morte de células neuronais, por combinar com superóxido produzindo peroxinitrito, um potente radical que ativa a peroxidação lipídica e aumenta a liberação de glutamato. A ativação do ONS nas células endoteliais é neuroprotetora

porque a produção de ON tem ação de relaxamento das células do músculo liso adjacente, conduzindo assim a vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo cerebral na região afetada. Já a produção do ON, nos astrócitos, ocorre na isquemia e tem consequências incertas, mas acredita-se que em excesso pode ser tanto neurotóxica e neuroprotetora (BOLAÑOS e ALMEIDA, 1999).

Durante a reperfusão, a concentração de O_2 pode exceder a capacidade mitocondrial para reduzir O_2 em H_2O e, portanto, a produção de ânion superóxido (O_2^-) pode ser aumentada. O superóxido reage com o ON e forma o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é um inibidor irreversível da função mitocondrial, além de ser um pró-oxidante que danifica lipídios, proteínas e DNA, determinando morte celular neuronal (RADI *et al.*, 1991).

Elevação do Ferro Livre

O ferro (Fe) é essencial para a vida graças a sua propriedade única de reverter oxidação cíclica e redução. Facilmente doa e recebe elétrons, alternando entre Fe_3^+ e Íons Fe_2^+ e, por isso, considerado uma fonte de radicais livres, particularmente o radical hidroxila (OH^\cdot). O Fe também é um cofator enzimático funcional que o torna participante-chave na toxicidade mediada pelo oxigênio, estando envolvido na geração de O_2 e H_2O_2 , através da aceleração da oxidação não enzimática de diversas moléculas, incluindo adrenalina e glutatona (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

No organismo, a maior parte do ferro está na hemoglobina, contudo, dentro das células, a ferritina é o principal reservatório, sob a forma de óxido de ferro, sendo usado para sintetizar co-fatores na respiração e síntese de DNA. A liberação de ferro da ferritina requer redução da forma sérica férrica para ferrosa pela ação de um agente quelante. O papel de ferritina é controverso uma vez que pode atuar tanto como neuroprotetor, porque na isquemia tem a capacidade de quelar o ferro liberado a partir de proteínas por radicais livres, mas também pode doar Fe livre, que aumenta o estresse oxidativo, contribuindo para a maior deterioração neurológica. A capacidade de danificar o tecido nervoso, provavelmente, está ligada ao aumento das reservas sistêmicas de ferro porque, quando elevadas, existirá um prognóstico pior durante a fase inicial da isquemia cerebral, aumentando o estresse oxidativo, e levando à necrose de algumas partes da penumbra isquêmica (CARBONELL e RAMA, 2007).

Mediadores Inflamatórios

Na isquemia, tendo o colapso da barreira hemato-encefálica (BHE) alterado a permeabilidade da membrana e exacerbado o extravasamento de leucócitos, a produção de ROS a partir das células danificadas, desencadeia o estresse oxidativo e a cascata inflamatória. Moléculas endógenas, conhecidas como padrões moleculares associados ao perigo (DAMPs), são liberadas do tecido necrosado e ativam as células infiltradas do sistema imunológico. Algumas delas são a proteína β -amilóide ($A\beta$), o ácido hialurônico, sulfato de heparina, complexos imunes de DNA ou RNA e lipoproteínas de baixa densidade dentre outras (RIVEST, 2009). A molécula HMGB1 (high mobility group box 1) localiza-se no núcleo de células do tecido nervoso e se transloca para o citoplasma e, em condições isquêmicas, vão para o espaço extracelular aumentando a permeabilidade vascular e promovendo a desagregação da BHE (ZHANG *et al.*, 2011).

Os DAMPs estimulam os receptores Toll-like TLR2 e TLR4 que desencadeiam a resposta inflamatória imunomediada não infecciosa ativando macrófagos e células T (SHICHITA *et al.*, 2012). São produzidas várias citocinas inflamatórias e mediadores. Dentre elas, a IL- β que sinaliza ou ativa outras moléculas como a caspase-1, proteína que participa do complexo chamado inflamassoma e está presente nos neurônios, células gliais, microglia e macrófagos e, que também, pode ser ativado por hipóxia, redução do ATP, ou a partir de moléculas endógenas das células lesadas (SHICHITA *et al.*, 2012).

A IL-1 β é um mediador neurotóxico que promove a morte celular neuronal e aumenta a expressão das quimiocinas em microglia e astrócitos e, sua inibição, está implicada na redução da área isquêmica (ALLAN *et al.*, 2005). O TNF α também está envolvido na isquemia, sendo expresso no tecido cerebral em hipoxemia dentro de 1h após reperfusão e ocasiona a morte celular neuronal por efeitos neurotóxicos, mas, também, pode ser considerado um mediador neuroprotetor porque participa dos mecanismos de supressão dos sinais inflamatórios (HALLENBECK, 2002). A IL-6 é importante em vários tipos de inflamação, mas na isquemia cerebral atua como citocina neuroprotetora contribuindo para a angiogênese, favorecendo a sobrevivência das células nervosas (JUNG *et al.*, 2011).

Quimiocinas são também potenciadores importantes da inflamação pós-isquêmica. A proteína quimiotática de monócitos-1 e IL-8 atuam na infiltração de leucócitos e aumentam a área da lesão isquêmica (SHICHITA, *et al.*, 2012). A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), produzida pelas células endoteliais, essencial para a

quimiotaxia e para a infiltração de leucócitos, está elevada na isquemia cerebral, favorecendo o aumento dos processos inflamatórios. As proteínas de matriz, metaloproteinases (MMP), são importantes mediadores da inflamação pós-isquêmica e acentuam a quebra da BHE. A MMP-9 tem ação neurotóxica (SHICHITA, 2012).

Citocinas produzidas a partir de células T atuam na regulação da inflamação durante lesão isquêmica. O IFN- γ é neurotóxico e age nos neurônios induzindo sua morte. A liberação de IL-4 e IL-5 induzem produção de fatores neurotróficos pelos astrócitos que atuam como sinalizadores neuroprotetores tendo efeito inibitório sobre a expressão de citocinas induzidas pela ONS (BUTOVSKY et al, 2005). A IL-10 é imunossupressora e exerce efeito neuroprotetor por supressão das ações neurotóxicas do TNF- α e IFN- γ (LIESZ *et al.*, 2009).

MORTE CELULAR

A morte de células neuronais induzida pela lesão isquêmica tem sido, tradicionalmente, caracterizada como necrose. Nela, os altos índices de glutamato extracelular estimulam os receptores NMDAr, AMPAr e cainato determinando influxo de Na⁺ e Ca⁺ através da membrana, com passagem de água juntamente com estes íons, resultando em edema citotóxico (FURUKAWA, 1997). Na necrose ocorre edema, ruptura das organelas citoplasmáticas, perda da integridade da membrana e lise das células nervosas com ativação do processo inflamatório (SHALAK e PERLMAN, 2004). Entretanto, existem evidências morfológicas e bioquímicas, em modelos de lesão isquêmica cerebral, que a morte das células aconteça por apoptose. Neurônios apoptóticos são mais facilmente detectados desde o início da lesão isquêmica na penumbra e durante o período de reperfusão e provavelmente aquelas células nervosas que mantém um nível mínimo de atividade metabólica (YUAN e YANKNER, 2000).

A apoptose, morte celular programada, é caracterizada pela ativação das caspases podendo ser desencadeada por via externa ou por ativação da via mitocondrial. A via extrínseca é induzida por ativação do receptor de superfície FAS (FasR), também conhecido como antígeno de apoptose 1 (APO1 ou APT). A oligomerização de receptores de morte recruta moléculas adaptadoras envolvidas na ativação da caspase-8. A ativação intrínseca ou mitocondrial, na isquemia, é iniciada pelos altos níveis de glutamato, cálcio intracelular, espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos no DNA. Quando a mitocôndria recebe sinalização apoptótica apropriada ou tem um dano irreversível, moléculas pró-apoptóticas, tais como o citocromo C, são liberadas para o

citoplasma. Juntamente com o ATP, o citocromo C forma o complexo do fator de ativação de protease associada a *apoptose* 1 (Apaf-1), chamado apoptossoma. Este cliva a procaspase-9, que libera a caspase-9. As caspases 8 e 9 ativam, entre outras, a caspase-3 que cliva a proteína precursora de amilóide (APP), resultando em aumento da produção de amilóide β -peptide, que por sua vez aumenta a ativação da caspase-3, iniciando a morte celular por apoptose (CARBONELL e RAMA, 2007).

CONCLUSÃO

Em nível celular, a redução do FSC, com depleção do oxigênio, inicia eventos bioquímicos diversos responsáveis pelas lesões primárias e secundárias que envolverão o SNC e acarretarão em prejuízos morfofuncionais. O evento isquêmico é dinâmico (Figura 2) e o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos desses momentos que ocorrem na isquemia cerebral são importantes para o estabelecimento de estratégias para reparar a lesão tecidual e propor medidas para estabelecer a neuroproteção.

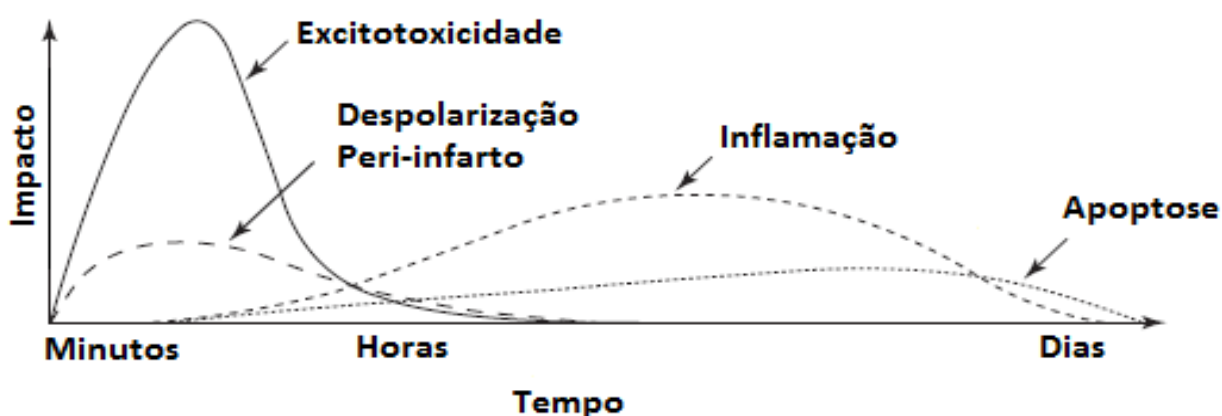


Figura 2. Cascata de eventos danosos na isquemia cerebral focal. Minutos iniciais ao déficit de perfusão focal, mecanismos excitotóxicos danificam neurônios e células gliais letalmente. Além disso, a excitotoxicidade desencadeia uma série de eventos que contribuem para intensificar a lesão tecidual. Tais eventos incluem despolarizações peri-infarto e os mecanismos que promovem inflamação e a apoptose. O eixo X reflete a evolução da cascata ao longo do tempo, enquanto que o eixo Y ilustra o impacto de cada elemento da cascata em resultado final da morte neuronal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN S.M.; TYRRELL P.J.; ROTHWELL N.J. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nat. Rev. Immunol.** 5:629–640, 2005.

BOLAÑOS, J.P.; ALMEIDA, A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. **Biochim Biophys Acta** 1411:415–436, 1999.

BUTOVSKY, O.; TALPALAR, A.E.; BEN-YAAKOV, K.; SCHWARTZ, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol. Cell. Neurosci.** 29:381–393, 2005.

CAMARGO, E.C.; BACHESCHI, L.A.; MASSARO, A.R. Stroke in Latin America. **Neuroimaging Clin. N. Am.** 15(2):283-96, 2005.

CAMPOS-SOUSA, R.N.; SOARES, V.Y.; ALMEIDA, K.J.; CARVALHO, L.I.; JACOBINA, K.S.; ATHAYDE NETTO, A.E.; MACEDO, E.A.; VELOSO, L.A. Knowledge of stroke among a Brazilian urban population. **Arq. Neuropsiquiatria**, v.65, p.587-591, 2007.

CARBONELL, T.; RAMA, R. Iron, Oxidative Stress and Early Neurological Deterioration in Ischemic Stroke. **Current Medicinal Chemistry** 14:857-874, 2007.

COOPER AJ, KRISTALL BS. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biol. Chem.** 378(8):793-802, 1997.

COOPER, A.J.; KRISTAL, B.S. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. **Biol. Chem.** 378(8):793-802, 1997.

CRACK, P.J.; TAYLOR, J.M. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free Radic. Biol. Med.** 38:1433–1444, 2005.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends neurosci.** 22:391-397, 1999.

DOBREK, L.; THOR, P. Glutamate NMDA receptors in pathophysiology and pharmacotherapy of selected nervous system diseases. **Postepy. Hig. Med. Dosw.** 65:338–346, 2011.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.** 62(6):649-71, 2000.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82:47-95, 2002.

FEIGIN, V.L. Stroke epidemiology in the developing world. **Lancet** 365(9478):2160-1, 2005.

FURUKAWA, K.; FU, W.; LI, Y.; WITKE, W.; KWIATKOWSKI, D.J.; MATTSON, M.P. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **J. Neurosci.** 17:8178–8186, 1997.

GROW, J.; BARKS, D.E. Pathogenesis of hypoxic–ischemic cerebral injury in the term infant: current concepts. **Clin. Perinatol.** 29:585–602, 2002.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 899:136-47, 2000.

HALLENBECK, J.M. The many faces of tumor necrosis factor in stroke. **Nat. Med.** 8:1363–1368, 2002.

HANKEY, G.J. Stroke prediction and prevention by carotid endarterectomy: keep an eye on the doughnut and not just the hole. **Cerebrovasc. Dis.** 9(6):345-350, 1999.

HOSSMANN, K.A. Pathophysiological basis of translational stroke research. **Folia Neuropathol.** 47:213-227, 2009.

JUNG, J.E., KIM, G.S. CHAN, P.H. Neuroprotection by interleukin-6 is mediated by signal transducer and activator of transcription 3 and antioxidative signaling in ischemic stroke. **Stroke** 42:3574–3579, 2011.

KIMELBERG, H.K.; MONGIN, A.A. Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain, relevance for pathophysiology. **Contrib. Nephrol.** 123:240–257, 1998.

KOSTANDY, B.B. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. **Neurol. Sci.** 33:223–237, 2012.

LIESZ, A.; SURI-PAYER, E.; VELTKAMP, C.; DOERR, H.; SOMMER, C.; RIVEST, S.; GIESE, T.; VELTKAMP, R. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. **Nat. Med.** 15:192–199, 2009.

LIU, H.; COLAVITTI, R.; ROVIRA, I.I.; FINKEL, T. Redox-dependent transcriptional regulation. **Circ. Res.** 97: 967–974, 2005.

MENA, F.V.; BAAB, P.J.; ZIELKE, C.L.; ZIELKE, H.R. In vivo glutamine hydrolysis in the formation of extracellular glutamate in the injured rat brain. **J. Neurosci. Res.** 60:632–641, 2000.

MINELLI, C.; FEN, L.F.; MINELLI, D.P. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matão, Brazil: a population-based prospective study. **Stroke** 38(11):2906-11, 2007.

MUNTNER, P.; GARRET, E.; KLAG, M.J.; CORESH, J. Trends in stroke prevalence between 1973 and 1991 in the US population 25 to 74 years of age. **Stroke** 33(5):1209-13, 2002.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochemistry International** 60:208–212, 2012.

POLI, G.; LEONARDUZZI, G.; BIASI, F.; CHIARPOTTO, E. Oxidative stress and cell signalling. **Curr. Med. Chem.** 11:1163–1182, 2004.

PORTER, N.A. Chemistry of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.** 105:273-82, 1984.

RADI, R.; BECKMAN, J.S., BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.** 266:4244-4250, 1991.

RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. **Nat. Rev. Immunol.** 9:429–439, 2009.

SHALAK, L.; PERLMAN, J.M. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. **Early Human Development** 80:125-141, 2004.

SHARP, F.S.; LU, A.; TANG, Y.; MILLHORN, D.E.J. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 20(7):1011-32, 2000.

SHICHITA, T.; AGO, T.; KAMOUCI, M.; KITAZONO, T.; YOSHIMURA, A.; OOBOSHI, H. Noveltherapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. **J. Neurochem.** 123 Suppl 2:29-38, 2012.

WYATT, J.S.; EDWARDS, A.D.; AZZOPARDI, D.; REYNOLDS, E.O.R. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic–ischemic brain injury. *Arch. Dis. Child.* 64:953-63, 1989.

YUAN J.; YANKNER, B.A. Apoptosis in the nervous system. **Nature** 12;407(6805):802-9, 2000.

ZHANG, J.; TAKAHASHI, H.K.; LIU, K. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. **Stroke** 42:1420–1428, 2011.

Capítulo II

Células-tronco Mesenquimais na Isquemia Cerebral

Células-tronco Mesenquimais na Isquemia Cerebral

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células indiferenciadas capazes de auto-renovação e de originar tipos celulares diferenciados com morfologia característica e função específica cujas características são essenciais para a reparação e manutenção dos tecidos no organismo. Estas células podem ser isoladas e expandidas em cultivo *in vitro*, sendo mantidas como células-tronco ao longo de muitas gerações, mantendo a capacidade de se diferenciar quando submetidas aos estímulos apropriados. São capazes de originar linhagens celulares de outra origem embrionária, sendo descrita a diferenciação em neurônios e células da glia *in vitro* e *in vivo* em condições experimentais especiais. As CTM migram para o local lesado quando administrada por via intravenosa após a lesão cerebral, promovem a proliferação celular endógena, reduzem a apoptose e são capazes de diminuir déficits neurológicos após isquemia cerebral. O presente trabalho resume as diversas ações das CTM sobre o tecido nervoso lesado através de seus efeitos diretos, parácrinos e sistêmicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Células-tronco mesenquimais, isquemia cerebral, apoptose, neuroproteção, neuroregeneração, angiogênese, neurogênese.

Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemia

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells capable of self-renewal and give rise to differentiated cell types with characteristic morphology and specific function whose are essential for the repair and maintenance of tissues in the body. These cells can be isolated and expanded in vitro culture were maintained as stem cells over many generations, and also maintaining the ability to differentiate when exposed to appropriate stimuli. Are capable of yielding cell lines of other embryonic origin, being described to differentiate into neurons and glial cells in vitro and in vivo in special experimental conditions. MSCs migrate to the injured site when administered intravenously after brain injury, promote endogenous cell proliferation and reduce apoptosis are able to reduce neurological deficits after brain ischemia. This paper summarizes the various actions that MSCs in the injury of nervous tissue through its direct, paracrine and systemic effects.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cells, cerebral ischemia, apoptosis, neuroprotection, neuroregeneration, angiogenesis, neurogenesis.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) estão presentes em todos os tecidos adultos incluindo o tecido adiposo, os pericitos, tecido muscular, órgãos e o cordão umbilical (MEIRELLES *et al.*, 2008). Na medula óssea, representam uma população rara, menos de 0,1% de células nucleadas. Possuem a capacidade de diferenciação em várias linhagens e participam da reconstrução de diferentes tecidos (PITTENGER, 1999). Estas características multipotentes sugerem que as CTM são as responsáveis pela reparação e manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009).

As CTM participam da proteção aos tecidos, liberando fatores de crescimento, moléculas e citocinas que possibilitam, na área do dano tecidual, a secreção de fatores neurotróficos que favorecem a neurogênese, e fatores angiogênicos que melhoram o fluxo sanguíneo no local de lesão pela neoformação e ou pela reconstrução dos vasos danificados (KINNAIRD *et al.*, 2004 e UCCELLI *et al.*, 2011). Além da neuro e angiogênese, as CTM potencializam a formação de conexões sinápticas e remielinizam axônios lesados, reduzem a apoptose e diminuem a inflamação através de ações parácrinas (SEO e CHO, 2012).

Estas células, mesmo não presentes na área do dano isquêmico, são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- γ e IL-10, que podem ter efeito benéfico sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais; na indução de regeneração; estimulando a neurogênese; no crescimento axonal; na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido após lesão espinal (KUROZUMI *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2005 e QUERTAINMONT *et al.*, 2012). Isto sugere que o efeito da terapia celular na isquemia não está diretamente relacionado com a presença das células no cérebro, uma vez que a recuperação funcional sem a presença das CTM no parênquima cerebral indicam que são capazes de agir à distância, ou seja, por mecanismo sistêmico através de efeitos imunomodulatórios (BORLONGAN *et al.*, 2004; BACIGALUPPI *et al.*, 2009 e BRENNEMAN *et al.*, 2010).

Nesta revisão estão sendo abordadas as principais ações das CTM que as tornam eficazes na reparação e proteção das lesões isquêmicas do SNC (Figura 1).

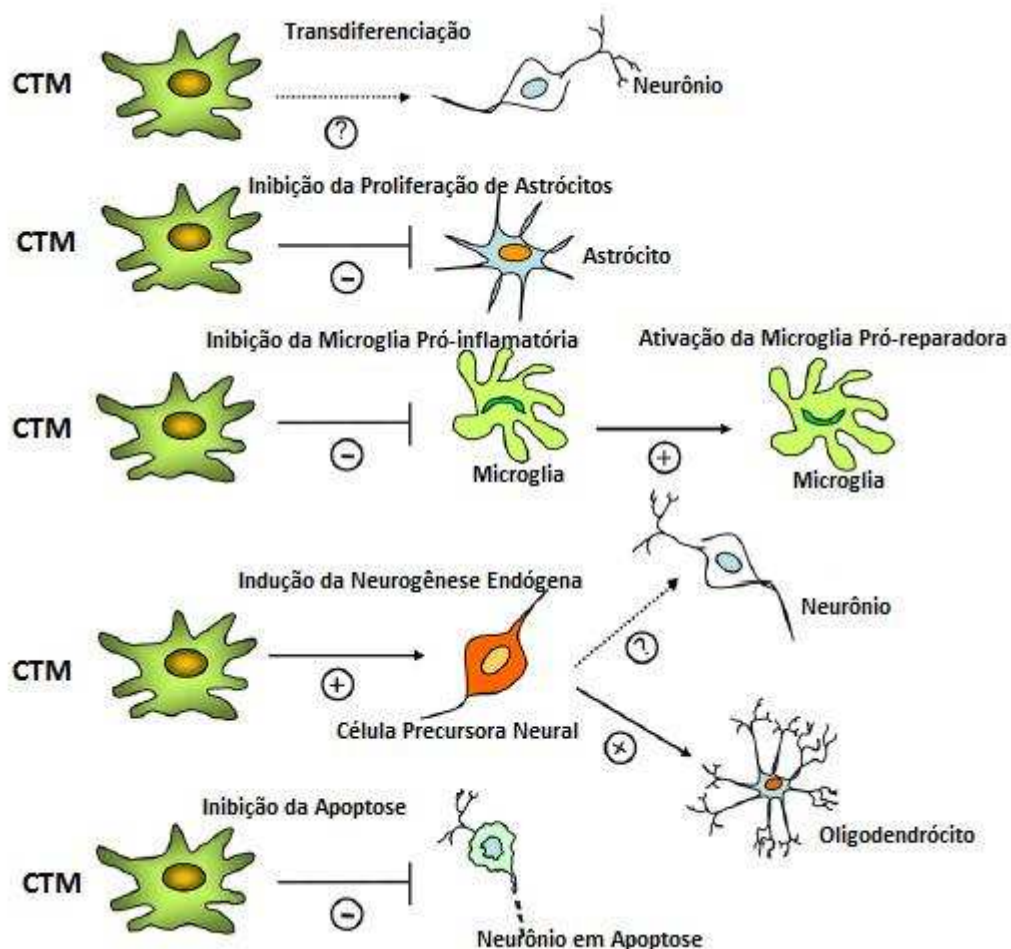


Figura 1. Os principais efeitos neuroprotetores das células-tronco mesenquimais. As linhas tracejadas indicam a atual falta de evidência forte para que fenômeno aconteça (Uccelli *et al.*, 2011).

MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é uma das principais conseqüências da isquemia cerebral, pois ocorre quebra da barreira hemato-encefálica permitindo a infiltração de neutrófilos e linfócitos e, portanto, aumento de enzimas pró-inflamatórias como a óxido nítrico sintase (ONS) e proteases (DEL ZOPPO *et al.*, 2000 e WANG *et al.*, 2007). As CTM podem ser utilizadas na terapia regenerativa ou reparadora porque são capazes de migrar para o local da lesão e possuem propriedades imunomoduladoras sistêmicas promovendo efeitos sobre o tecido, mesmo não estando presentes no local de lesão

(BACIGALUPPI *et al.*, 2009 e QUERTAINMONT *et al.*, 2012). São capazes de diferenciar em neurônios e células gliais, secretam citocinas, bem como fatores neurotróficos e angiogênicos que estimulam o reparo tecidual e a migração de células precursoras neurais (LI *et al.*, 2002a e WAKABAYASHI *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que as CTM, quando transplantadas em animais submetidos à isquemia cerebral, são capazes de modular o processo inflamatório pela redução do acúmulo de Iba-1⁺, proteína de ligação ao cálcio especificamente expressa na microglia. A Iba-1⁺ tem atividade na agregação de actina e participa na “*membrane ruffling*”, isto é, formação de uma superfície de células móveis que contém uma malha de filamentos de actina, recentemente polimerizados, que facilita a migração celular e a fagocitose pela microglia ativada (OHSAWA *et al.*, 2004). Portanto, a redução de Iba-1⁺, proporcionada pelas CTM transplantadas, contribui para inibir a expressão pró-inflamatória que atinge, não somente a área de infarto, mas também a área de penumbra, favorecendo a diminuição da expansão isquêmica (SHEIKH *et al.*, 2011). A redução significativa do volume da lesão é evidente nos primeiros dias e pode estar associada a maior produção de fatores neurotróficos pelas CTM conferindo uma ação neuroprotetora (WAKABAYASHI *et al.*, 2010).

As CTM inibem uma série de moléculas pró-inflamatórias como iNOS que induz a produção da enzima ONS, cicloxigenase-2 (Cox-2), IL-1 β , IL-8 e proteína 1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1), que são capazes de ampliar a isquemia cerebral (DEL ZOPPO *et al.*, 2000).

A ativação da microglia pode ser modulada por neurônios que inibem a inflamação (TIAN *et al.*, 2009). Os neurônios, bem como células endoteliais, diminuem a ativação microglial dependente de CD200, receptor da superfície da célula que contém domínios de imunoglobulinas e está presente na microglia e contribui para mantê-la em estado quiescente (AMOR *et al.*, 2010). As CTM, de modo semelhante aos neurônios e células endoteliais, aumentam a expressão de CD200 na presença da citocina anti-inflamatória IL-4, que foi suficiente para exercer efeito anti-inflamatório, modulando as respostas da microglia (McGUCKIN *et al.*, 2013).

SECREÇÃO DE FATORES NEUOTRÓFICOS

As CTM podem favorecer as condições microambientais para melhora da região do dano cerebral, por meio da produção de fatores neurotróficos que protegem ou ativam mecanismos endógenos de reparação do tecido nervoso (LI *et al.*, 2002). Substâncias que interferem positivamente na sobrevivência, diferenciação e função de neurônios do SNC são o fator de crescimento neuronal (NGF), neurotrofina-3 (NT-3), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado glial (GDNF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e o fator de crescimento vaso-endotelial [VEGF] (UCCELLI *et al.*, 2011).

O NGF, secretado pelas CTM, promove a fosforilação e, assim, a ativação da proteína C reativa (PCR). A fosforilação da PCR estimula a plasticidade neuronal, atua na capacidade regenerativa e na prevenção da morte de neurônios simpáticos (PIERCHALA *et al.*, 2004). De forma semelhante, o BDNF desempenha ações na sobrevivência celular atuando na regeneração axonal, promovendo formações e novas conexões sinápticas (COUMANS *et al.*, 2001) e, aumenta o estímulo da diferenciação das células-tronco neurais (CTN), além de proteger os neurônios nos locais de dano tecidual (BARNABÉ-HEIDER e MILLER, 2003).

Análises comparativas demonstram que as CTM derivadas da medula óssea liberam duas vezes mais BDNF em relação às CTM derivadas do tecido adiposo e, em geral, as células derivadas de tecidos diferentes secretam diferentes fatores de crescimento. Logo, a variação de fatores neurotróficos, de diferentes populações de CTM, possuem efeitos para cada tipo específico de células secretoras e podem ser escolhidas para o tratamento de uma doença neurodegenerativa em particular (RAZAVI *et al.*, 2013).

Estudos *in vivo*, demonstram que as CTM apresentam os receptores Trk, uma família de receptores tirosina-quinases que regulam o crescimento sináptico no sistema nervoso de mamíferos e participam da sobrevivência e diferenciação neuronal. Os ligantes aos receptores Trk são as neurotrofinas, uma família de fatores de crescimento essenciais para o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). A NT-3, neurotrofina que dá suporte na sobrevivência dos neurônios, desempenha papel na quimioatração de CTM devido a sua elevada afinidade para o Trk, contribuindo para a migração das CTM para o local do dano tecidual (CHEN *et al.*, 2013).

As CTN liberam o GDNF, que tem alta afinidade pelos neurônios motores, e confere neuroproteção aos neurônios monoaminérgicos no estriado e dopaminérgicos da via nigro-estriatal, podendo ser indicadas para o tratamento de doenças degenerativas desta via, como a doença de Parkinson (WHONE *et al.*, 2012). A expressão de GDNF diminui significativamente a apoptose, proporcionando neuroproteção em ratos expostos à hipóxia (YANG *et al.*, 2013), além de aumentar o número de junções neuromusculares (SUZUKI *et al.*, 2008).

A secreção parácrina de HGF, pelas CTM, reduz significativamente a desmielinização por ter maior reatividade na proteína básica de mielina. A melhora da recuperação neurológica é atribuída à remielinização de fibras nervosas e pela regeneração axonal em modelos *in vivo* de acidentes vasculares encefálicos isquêmicos e hemorrágicos (LIU *et al.*, 2010). Em condições *in vitro*, exibe efeitos antiapoptóticos nos neurônios (ZHANG *et al.*, 2000a).

O bFGF é um polipeptídeo que promove proteção às células do SNC. A sua liberação pelas CTM diminui o volume de infarto em modelos de isquemia cerebral focal em ratos. Também, foi demonstrado que a administração de bFGF, por via intravenosa, produz redução persistente no volume de infarto, pelo menos até três meses após acidente vascular cerebral focal (SUGIMORI *et al.*, 2001).

O transplante de CTM, após isquemia cerebral, melhora a angiogênese. Contudo, não é provável que se diferenciem em células endoteliais formando novos microvasos devido ao número limitado destas células. As CTM produzem vários fatores de crescimento, incluindo o VEGF, que promovem a angiogênese em modelos de isquemia cerebral em ratos, bem como reduz de forma significativa os déficits funcionais (ZHANG *et al.*, 2000b). Também, atua na sobrevivência das células nervosas, estimula o crescimento dos axônios e a proliferação das células de Schwann (SONDELL *et al.*, 1999).

NEUROGÊNESE E ATIVAÇÃO GLIAL

A zona subventricular (ZSV) de mamíferos adultos contém células-tronco neurais (CTN) que se diferenciam e dão origem aos neuroblastos Dcx+. Estes, em ratos, nas condições fisiológicas, migram e atingem o bulbo olfatório. Em modelos de isquemia encefálica, os neuroblastos Dcx+ migram para o território em sofrimento

isquêmico mediados pela sinalização do fator derivado das células estromais 1α (SDF- 1α). Contudo, estes neuroblastos, em sua maioria, morrem durante a migração para a área isquêmica por via apoptótica (ZHANG *et al.*, 2006). As CTM, quando implantadas em modelos de lesão isquêmica, influenciam o aumento da proliferação das CTN localizadas na ZSV, e atuam na sobrevivência dos neuroblastos recém-formados. Ocorrerá a indução da produção de maior número de células Dcx+, na ZSV, uma semana após a infusão das células intensificando a neurogênese. Portanto, as CTM aumentam a diferenciação das CTN por secretar fatores de crescimento favoráveis à neurogênese, além de promover a sobrevivência dos neuroblastos que migram para a área isquêmica (YOO *et al.*, 2008).

No encéfalo, a neurogênese ocorre na ZSV e na zona subgranular (ZSG) do giro dentado do hipocampo. No entanto, a baixa taxa de sobrevivência das células recém-formadas limita a capacidade reparadora do tecido lesado. O transplante de CTM, em modelos de isquemia cerebral, permite o aumento da proliferação e diferenciação das CTN na ZSV e aumento da proporção de novos neurônios, e do total de células em proliferação. Análises histológicas confirmam a sobrevivência de número significativo de células transplantadas, pelo menos 3 semanas após a transplantação e, foi observada a presença de expressão de BDNF, que participa na migração neuronal (KAN *et al.*, 2011). As CTN que migram da ZSV para a zona fronteira à área isquêmica e diferenciam-se em neurônios, além de reduzir a apoptose, em ratos tratados com CTM, melhora a capacidade funcional após a isquemia. (BAO *et al.*, 2011).

Os astrócitos modulam o microambiente em torno de neurônios, incluindo fluxos de íons, neurotransmissores, moléculas de adesão de células, moléculas sinalizadoras e liberam um enorme número de fatores de crescimento neuronal. Em resposta ao evento isquêmico, astrócitos reativos aparecem na área de lesão, já no segundo dia de isquemia, e desaparecem após 5 semanas (GROVES *et al.*, 1993). Estudos histopatológicos demonstram que poucas células sobrevivem na área do infarto. Após o terceiro dia observa-se aumento de astrócitos que expressam GFAP e vimentina, principalmente na zona de penumbra e, posteriormente, no sétimo dia, foram encontrados na área de isquemia (LI *et al.*, 2005 e WAKABAYASHI *et al.*, 2010). Estes astrócitos reativos são caracterizados pela intensa imunorreatividade à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e são responsáveis pela formação da cicatriz glial. Contudo, a intensa presença desses astrócitos na zona de penumbra inibe o crescimento e regeneração axonal (FITCH E SILVER, 2008).

A implantação de CTM, em modelos de oclusão da artéria cerebral média (ACM), demonstrou, a partir do terceiro dia, diminuição do acúmulo de astrócitos GFAP+ na zona de penumbra e, no sétimo dia, na área de lesão isquêmica (SHEIKH *et al.*, 2011). A diminuição da espessura desta gliose permite o crescimento axonal e formação de novas sinapses (LI *et al.*, 2005). Estudos mostram aumento da expressão de GAP-43 em axônios de neurônios na ZSV de ratos. A Gap-43 é uma proteína essencial para o axônio e região pré-sináptica cujos níveis elevados são expressos em cones de crescimento neuronal, durante o desenvolvimento e na regeneração axonal (BENOWITZ e ROUTTENBERG, 1997).

As CTM propiciam desenvolvimento de novas conexões axonais com projeções axonais intracorticais na zona de penumbra, construindo nova rede de ligações entre os neurônios e promovendo a recuperação funcional neurológica (LI *et al.*, 2005). Quando infundidas após a isquemia cerebral em ratos, são capazes de induzir diferenciação das CTN em oligodendrócitos, podendo melhorar a recuperação funcional, provavelmente, por estimulação de oligodendrogênese (RIVERA *et al.*, 2006).

INDUÇÃO DA ANGIOGÊNESE

A angiogênese, que ocorre nas isquemias cerebrais, auxilia na restauração do fluxo sanguíneo, melhorando a oferta de oxigênio e nutrientes para o tecido afetado e, portanto, é importante para a recuperação neurológica (KRUPINSKI *et al.*, 1994). Em pacientes com AVE, o grau de angiogênese está correlacionado com a sobrevivência, principalmente naqueles com maior densidade de microvasos na região da penumbra isquêmica (WEI *et al.*, 2012). Em modelos animais, a angiogênese pode ser acentuada pelo tratamento com CTM, pois elas migram para o tecido nervoso lesado (LI *et al.*, 2002b), liberando fatores de crescimento, tais como VEGF e o bFGF (CHEN *et al.*, 2003).

Em encéfalos de ratos com AVE induzido e tratados com CTM, análises quantitativas e de imunofluorescência, demonstraram que há aumento do número de células VEGF-positivas distribuídas no córtex isquêmico (GUO *et al.*, 2012).

As CTM, após isquemia cerebral, proliferam e remodelam a microvasculatura do córtex, permitindo a melhora do fluxo sanguíneo colateral, sendo possível identificar presença de fatores angiogênicos na região da penumbra (WHITAKER *et al.*, 2007 e

WEI *et al.*, 2012). Após o transplante de CTM foi demonstrado que, em condições de hipóxia, eleva-se a síntese do VEGF e estimula-se a diferenciação endotelial de células-tronco da medula óssea, favorecendo a angiogênese e o desempenho em testes neurológicos e comportamentais (LI *et al.*, 2002b e CAPLAN e DENNIS, 2006).

EFEITO ANTIAPOPTÓTICO

A morte dos neurônios e células gliais é reduzida pelos fatores tróficos secretados pelas CTM que, por efeito parácrino, aumentam a sobrevivência das células nervosas na lesão isquêmica cerebral e atuam na redução da apoptose (CHEN *et al.*, 2003 e CAPLAN e DENNIS, 2006). A proteção dos neurônios corticais pelas CTM, transplantadas em modelos de lesão isquêmica, pode ser mediada por diferentes mecanismos, tais como por efeitos diretos das CTM sobre os neurônios e pela secreção de fatores que estimulam astrócitos a produzir fatores neuroprotetores (SCHEIBE *et al.*, 2012).

Um dos principais mecanismos que estão por trás dos efeitos antiapoptóticos das CTM é o aumento da produção de NGF, BDNF e NT-3, que ativa a via dependente de Akt, também conhecida como proteína quinase B. A proteína Akt modula um amplo número de moléculas que participam da proliferação celular e, também, atuam na inibição da apoptose (INOKI *et al.*, 2002). As CTM super-expressam o gene Akt sendo significativa a partir do segundo dia da lesão isquêmica e retornando aos níveis basais no oitavo dia. Nesse período, a apoptose é inibida (KIM *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

As CTM participam da proteção aos tecidos, liberando fatores de crescimento, moléculas e citocinas que possibilitam, na área do dano tecidual, a secreção de fatores neurotróficos que favorecem a neurogênese, e fatores angiogênicos que melhoram o fluxo sanguíneo no local de lesão pela neoformação e ou pela reconstrução dos vasos danificados. Além da neuro e angiogênese, as CTM potencializam a formação de conexões sinápticas e remielinizam axônios lesados, reduzem a apoptose e diminuem a inflamação. Além disso, estas células são capazes de agir a distância modulando a ação do sistema imunológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology** 129(2):154-69, 2010.

BAO, X.; WEI, J.; FENG, M.; LU, S.; LI, G.; DOU, W.; MA, W.; MA, S.; AN, Y.; QIN, C.; ZHAO, R.C.; WANG, R. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Brain Res.** 1367:103-13, 2011.

BARNABÉ-HEIDER, F.; MILLER, F.D. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. **J. Neurosci.** 15:5149–5160, 2003.

BENOWITZ, L.I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends Neurosci.** 20(2): 84–91, 1997.

BACIGALUPPI, M.; PLUCHINO, S.; PERUZZOTTI-JAMETTI, L.; KILIC, E.; KILIC, U.; SALANI, G.; BRAMBILLA, E.; Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. **Brain** 132:2239-2251, 2009.

BORLONGAN, C.V.; HADMAN, M.; SANBERG, C.D.; SANBERG, P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. **Stroke** 35:2385-2389, 2004.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX Jr, C.S.; ARONOWSKI, J. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 30:140-149, 2010.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J. Pathology** 217:318-324, 2009.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J. Cell. Biochem.** 98:1076–1084, 2006.

CHEN, J.; LI, Y.; KATAKOWSKI, M.; CHEN, X.; WANG, L.; LU, D.; LU, M.; GAUTAM, S.C.; CHOPP, M. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. **J. Neurosci. Res.** Sep 15;73(6):778-86, 2003.

CHEN, Y.F.; ZENG, X.; ZHANG, K.; LAI, B.Q.; LING, E.A.; ZENG, Y.S. Neurotrophin-3 stimulates migration of mesenchymal stem cells overexpressing TrkC. **Curr. Med. Chem.** 20(24):3022-33, 2013.

COUMANS, J.V.; LIN, T.T.; DAI, H.N.; MACARTHUR, L.; MCATEE, M.; NASH, C.; BREGMAN, B.S. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. **J. Neurosci.** 21:9334-9344, 2001.

DEL ZOPPO, G.; GINIS, I.; HALLENBECK, J.M.; IADECOLA, C.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G.Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathol.** 10:95-112, 2000.

FITCH, M.T.; SILVER, J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. **Exp. Neurol.** 209:294-301, 2008.

GROVES, A.K.; ENTWISTLE, A.; JAT, P.S.; NOBLE, M. The characterization of astrocyte cell lines that display properties of glial scar tissue. **Dev. Biol.** 159:87-104, 1993.

GUO, F.; LV, S.; LOU, Y.; TU, W.; LIAO, W.; WANG, Y.; DENG, Z. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. **Cell. Biol. Int.** 36(11):997-1004, 2012.

INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat. Cell. Biol.** 4(9):648-57, 2002.

KAN, I.; BARHUM, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Mesenchymal stem cells stimulate endogenous neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. **Stem Cell Rev.** 7(2):404-12, 2011.

KINNAIRD, T.; STABILE, E.; BURNETT, M.S.; LEE, C.W.; BARR, S.; FUCHS, S.; EPSTEIN, S.E. Through paracrine mechanisms arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum. **Circ. Res.** 94:678-685, 2004.

KIM, H.J.; LEE, J.H.; KIM, S.H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. **J. Neurotrauma** 27(1):131-8, 2010.

KRUPINSKI, J.; KALUZA, J.; KUMAR, P.; KUMAR, S.; WANG, J.M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. **Stroke** 25:1794–8, 1994.

KUROZUMI, K.; NAKAMURA, K.; TAMIYA, T. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Mol. Ther.** 9:189-197, 2004.

LI, Y.; CHEN, J.; CHEN, X.G.; WANG, L.; GAUTAM, S.C.; XU, Y.X.; KATAKOWSKI, M.; ZHANG, L.J.; LU, M.; JANAKIRAMAN, N.; CHOPP, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. **Neurology** 59:514–523, 2002a.

LI, T.S.; HAMANO, K.; SUZUKI, K.; ITO, H.; ZEMPO, N.; MATSUZAKI, M. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 283(2):H468-73, 2002b.

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

LIU, A.M.; LU, G.; TSANG, K.S.; LI, G. WU, Y.; HUANG, Z.S.; NG, H.K.; KUNG, H.F.; POON, W.S. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with forced expression of hepatocyte growth factor enhance remyelination and functional recovery in a rat intracerebral hemorrhage model. **Neurosurgery** 67(2):357-65, 2010.

LU, P.; JONES, L.L.; TUSZYNSKI, M.H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. **Exp. Neurol.** 191:344-360, 2005.

McGUCKIN, C.P.; JURGA, M.; MILLER, A.M.; SARNOWSKA, A.; WIEDNER, M.; BOYLE, N.T.; LYNCH, M.A.; JABLONSKA, A.; DRELA, K.; LUKOMSKA, B.; DOMANSKA-JANIK, K.; KENNER, L.; MORIGGL, R.; DEGOUL, O.; PERRUISSEAU-CARRIER, C.; FORRAZ, N. Ischemic brain injury: a consortium analysis of key factors involved in mesenchymal stem cell-mediated inflammatory reduction. **Arch. Biochem. Biophys.** 534(1-2):88-97, 2013.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.L.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells** 26:2287-2299, 2008.

OHSAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI Y.; KOHSAKA S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbriin and enhances its actin-bundling activity. **J Neurochem.** 88(4):844-56, 2004.

PIERCHALA, B.A.; AHRENS, R.C.; PADEN, A.J.; JOHNSON, E.M.Jr. Nerve growth factor promotes the survival of sympathetic neurons through the cooperative function of the protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. **J. Biol. Chem.** 279:27986–27993, 2004.

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

QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUX, D.; BOTMAN, O.; SID, S.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. **Plos One** 7(6):e39500, 2012.

RAZAVI, S.; RAZAVI, M.R.; ZARKESH ESFAHANI, H.; KAZEMI, M.; MOSTAFAVI, F.S. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. **Dev. Growth Differ.** 55(6):648-55, 2013.

RIVERA, F.J.; COUILLARD-DESPRES, S.; PEDRE, X.; PLOETZ, S.; CAIONI, M.; LOIS, C.; BOGDAHAN, U.; AIGNER, L. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. **Stem Cells** 24(10):2209–19, 2006.

SCHEIBE, F.; KLEIN, O.; KLOSE, J.; PRILLER, J. Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia. **Cell. Mol. Neurobiol.** 32(4):567-76, 2012.

SEO, J.H.; CHO, S.R. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. **Yonsei Med. J.** 1(6):1059-67, 2012.

SHEIKH, A.M.; NAGAI, A.; WAKABAYASHI, K.; NARANTUYA, D.; KOBAYASHI, S.; YAMAGUCHI, S.; KIM, S.U. Mesenchymal stem cell transplantation modulates neuroinflammation in focal cerebral ischemia: contribution of fractalkine and IL-5. **Neurobiol. Dis.** 41(3):717-724, 2011.

SONDELL, M.; LUNDBORG, G.; KANJE, M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. **J. Neurosci.** 19:5731–5740, 1999.

SUGIMORI, H.; SPELLER, H.; FINKLESTEIN, S.P. Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats. **Neurosci. Lett.** 300:13–16, 2001.

SUZUKI, M.; MCHUGH, J.; TORK, C. Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. **Mol. Ther.** 16:2002–2010, 2008.

TIAN, L.; RAUVALA, H.; GAHMBERG, C.G. Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. **Trends Immunol.** 30(2):91-9, 2009.

UCCELLI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A.; GIUNTI, D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.** 24(1):59-64, 2011.

WAKABAYASHI, K.; NAGAI, A.; SHEIKH, A.M.; SHIOTA, Y.; NARANTUYA, D.; WATANABE, T.; MASUDA, J.; KOBAYASHI, S.; KIM, S.U.; YAMAGUCHI, S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. **J. Neurosci. Res.** 88:1017-1025, 2010.

WANG, Q.; TANG, X.N.; YENARI, M.A. The inflammatory response in stroke. **J. Neuroimmunol.** 184:53–68, 2007.

WEI, L.; FRASER, J.L.; LU, Z.Y.; HU, X.; YU, S.P. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Neurobiol. Dis.** 46(3):635-45, 2012.

WHITAKER, V.R.; CUI, L.; MILLER, S.; YU, S.P.; WEI, L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 27(1):57-68, 2007.

WHONE, A.L.; KEMP, K.; SUN, M.; WILKINS, A.; SCOLDING, N.J. Human bone marrow mesenchymal stem cells protect catecholaminergic and serotonergic neuronal perikarya and transporter function from oxidative stress by the secretion of glial-derived neurotrophic factor. **Brain Res.** 1431:86-96, 2012.

YANG, C.; ZHOU, L.; GAO, X.; CHEN, B.; TU, J.; SUN, H.; LIU, X.; HE, J.; LIU, J.; YUAN, Q. Neuroprotective effects of bone marrow stem cells overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor on rats with intracerebral hemorrhage and neurons exposed to hypoxia/reoxygenation. **Neurosurgery** 68(3):691-704, 2011.

YOO, S.W.; KIM, S.S.; LEE, S.Y.; LEE, H.S.; KIM, H.S.; LEE, Y.D. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. **Exp. Mol. Med.** 40:387-97, 2008.

ZHANG, L.; HIMI, T.; MORITA, I.; MUROTA, S. Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. **J. Neurosci. Res.** 59:489-496, 2000a.

ZHANG, Z.G.; ZHANG, L.; JIANG, Q.; ZHANG, R.; DAVIES, K.; POWERS, C.; BRUGGEN, N.; CHOPP, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. **J. Clin. Invest.** 106:829-838, 2000b.

ZHANG, R.; XUE, Y.Y.; LU, S.D.; WANG, Y.; ZHANG, L.M.; HUANG, Y.L.; SIGNORE, A.P.; CHEN, J.; SUN, F.Y. Bcl-2 enhances neurogenesis and inhibits apoptosis of newborn neurons in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. **Neurobiol. Dis.** 24:345-56, 2006.

Capítulo III

Caracterização da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental

Caracterização Celular da Área de Infarto Cerebral de Ratos Tratados com Células-tronco Mesenquimais Após Acidente Vascular Encefálico Isquêmico Experimental

RESUMO

O acidente vascular encefálico isquêmico resulta em graves déficits neurológicos que podem ser irreversíveis. Terapias envolvendo células são possíveis métodos de tratamento das lesões isquêmicas, sobretudo, a utilização de células-tronco (CT) que do ponto de vista experimental demonstra promissores caminhos e respostas em modelos *in vitro* e *in vivo*. O presente estudo analisa as áreas isquêmicas nos encéfalos de ratos Wistar que foram tratados com células-tronco mesenquimais (CTM) alógenas. As CTM foram extraídas de ratos, isoladas, cultivadas, caracterizadas e expandidas. Foram implantadas por via intravenosa (IV), na sexta passagem, em animais portadores de isquemia encefálica induzida com oclusão cirúrgica temporária da artéria cerebral média esquerda (ACM). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos. O grupo *sham* foi submetido ao procedimento cirúrgico sem oclusão da ACM. O grupo controle recebeu 1 mL de tampão fosfato salino (PBS), por via IV, 24 horas após a indução isquêmica. O grupo tratado recebeu as CTM, por via IV, na concentração de 1×10^6 células/mL de PBS, 24 horas após a indução da isquemia. Estes grupos foram subdivididos de acordo com tempo de observação, sendo parte dos animais submetida à eutanásia no décimo-quinto e outra no trigésimo dia. Também foi criado o grupo validação, submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da ACM por 60 minutos, e que recebeu a aplicação de 1×10^6 cels/mL na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após a infusão das células e os pulmões, fígado, rim e o encéfalo foram coletados para avaliação imunofluorescente e estudo da migração das CTM marcadas com nanocristais fluorescentes. O volume total de infarto de cada cérebro foi calculado a partir do somatório de todos os volumes dos hemisférios cerebrais direitos subtraídos de todos os volumes dos hemisférios cerebrais esquerdos e as análises quantitativa e morfométrica das células neuronais foram avaliadas em imagens capturadas. As CTM nanomarcadas estavam presentes no pulmão 24 horas pós-lesão e não encontradas nos encéfalos. A percentagem média da área de infarto, após AVE, mensurada nos animais foi maior, na sequência, quando comparados os

grupos controle, tratado e sham. Os resultados demonstram que a infusão de CTM por via intravenosa tem ação benéfica por mecanismo sistêmico na redução da expansão da lesão no cérebro por isquemia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Acidente vascular encefálico isquêmico, células-tronco mesenquimais, terapia celular, neuroproteção, neuroregeneração.

Characterization of the Area Infarction in Rats Treated with Mesenchymal Stem Cells after Experimental Ischemic Stroke

ABSTRACT

Ischemic cerebral vascular accident results in severe neurological deficits that may be irreversible. Therapies involving cells are possible methods of treatment of ischemic lesions, especially the use of stem cells (SC) that the experimental point of view and demonstrates promising avenues responses in models in vitro and in vivo. This study analyzes the ischemic areas in the brains of rats that treated with allogeneic mesenchymal stem cells (MSC). MSCs extracted from mice, isolated, cultured, characterized and expanded. They were implanted intravenously (IV), in the sixth passage in animals with temporary brain ischemia induced by surgical occlusion of the left middle cerebral artery (MCA). The animals randomly divided into groups. The sham group underwent the surgical procedure without occlusion of the MCA. The control group received 1 mL of phosphate buffered saline (PBS) intravenously 24 hours after the ischemic induction. The treated group received MSC, intravenously at a concentration of 1×10^6 cells / ml of PBS 24 hours after induction of ischemia. These groups subdivided according to observation time, being part of the animals euthanized on the fifteenth and thirtieth day in another. The validation group exposed to the anesthetic procedure, surgical approach and procedure of blood flow occlusion of the MCA for 60 minutes, and which received the application of 1×10^6 cells / mL in the lateral tail vein 24 hours after induction of ischemic stroke. The animals were euthanized 24 hours after cell infusion and lungs, liver, kidney and brain were collected for immunofluorescent evaluation and study of the migration of MSC. The total infarct volume obtained and carried the quantitative and morphometric analysis of the neuronal cells. Labeled MSC were present in the lung after injury 24 hours and not found in the brains. The average percentage of the infarct area after stroke, measured in animals was higher in the sequence, when compared to control groups, treated and sham. The results demonstrate that infusion of MSC by means intravenous has a beneficial effect in reducing the systemic growth mechanism of brain injury by ischemia.

KEYWORDS: Ischemic stroke, mesenchymal stem cells, cell therapy, neuroprotection, neuroregeneration.

1. INTRODUÇÃO

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é a interrupção do fluxo sanguíneo em vasos encefálicos que resulta em uma área de infarto no tecido nervoso, danos neurológicos permanentes e a gravidade do quadro clínico é reflexo do tamanho e localização da lesão com graves limitações funcionais e morte se não tratado rapidamente (HANKEY, 1999; MUNTNER *et al.*, 2002).

É uma doença que atinge elevados índices de internações em diversos centros de saúde de muitos países, sendo considerada a segunda causa mais frequente de morte em todo o mundo e primeira no Brasil (CAMARGO *et al.*, 2005; MINELLI *et al.*, 2007) e a terceira causa de incapacidade em adultos nos Estados Unidos (FEIGIN, 2005).

Atualmente, as opções de tratamento para o AVEi são limitadas, e muitas medicações promissoras falharam em ensaios clínicos em humanos devido a efeitos colaterais intoleráveis ou limitações terapêuticas (DANTON e DIETRICH, 2003; MERGENTHALER *et al.*, 2004). O objetivo terapêutico na fase aguda e subaguda do AVEi é proteger os neurônios em risco, enquanto, após este período, as terapias visam, principalmente, aumentar a capacidade de regeneração endógena do sistema nervoso central (SNC) e, conseqüentemente, diminuir as sequelas funcionais (SHEN *et al.*, 2007). Neste cenário, as terapias celulares vêm sendo consideradas como alternativas para tratar doenças para as quais não existem, no momento, tratamentos farmacológicos adequados, incluindo doenças neurológicas e, mais especificamente, o AVEi.

As células-tronco somáticas (CTS) são indiferenciadas, capazes de auto-renovação e de originar tipos celulares diferenciados com morfologia própria e função específica. Essas características fazem delas tipos essenciais para a reparação e manutenção dos tecidos no organismo (PITTENGER *et al.*, 1999; MINGUELL *et al.*, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2012).

Estas células podem ser isoladas e expandidas em cultivo *in vitro*, sendo mantidas como células-tronco ao longo de muitas gerações e mantendo também a capacidade de se diferenciar quando submetidas aos estímulos apropriados (KORBLING e ESTROV, 2003). A medula óssea vem sendo estudada, há anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoiéticas (CTH), quanto de mesenquimais [CTM] (HERZOG *et al.*, 2003).

As CTM são capazes de se diferenciar em diversas linhagens, inclusive originarem linhagens celulares de outra origem embrionária (ADOLPHE e WAINWRIGHT, 2005; RASULOV *et al.*, 2005), sendo descrita a diferenciação em

neurônios e células da glia *in vitro* e *in vivo* (KAN *et al*, 2005). São capazes de migrar para o local de lesão, quando administradas por via intravenosa (IV), após a isquemia cerebral (CHOPP e LI, 2002), e oferecerem importantes benefícios terapêuticos para o tecido nervoso. Vários estudos mostraram que promovem a proliferação celular endógena, reduzem a apoptose (CHEN *et al.*, 2003; PIERCHALA *et al.*, 2004), e são capazes de diminuir déficits neurológicos após isquemia cerebral (CHEN *et al*, 2001; IIHOSHI *et al*, 2004; KUROZUMI *et al.*, 2004).

As moléculas bioativas secretadas pelas CTM exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomodulatórios sobre as células do sistema imune, aumento da angiogênese e quimiotaxia para outras células jovens comprometidas com o processo de reparação (SEO e CHO, 2012). Assim, pode ocorrer redução da resposta inflamatória inicial, em algumas doenças isquêmicas, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adequada do tecido, dependendo da extensão e gravidade dos danos tissulares (MONTEIRO *et al.*, 2010).

Estes achados tornaram-se uma esperança para o tratamento da lesão encefálica isquêmica, no entanto pouco se sabe sobre a real ação das CTM no tecido nervoso. Os mecanismos pelos quais o transplante celular resulta em melhora clínica e morfológica do encéfalo é o alvo das pesquisas pré-clínicas, vislumbrando a possibilidade de aplicação deste tipo celular em pacientes humanos.

Na pesquisa foi avaliada e caracterizada a área de infarto do cérebro de ratos, submetidos ao acidente vascular cerebral isquêmico, após a aplicação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas pela via intravenosa. Essa análise envolveu a mensuração da área do infarto no cérebro e caracterização dos tipos celulares presentes, por meio de estudo anatômico e histopatológico da região acometida. Ademais, foram avaliados dados de migração e integração das CTM aplicadas por via intravenosa, bem como verificada a existência de benefícios terapêuticos discutindo-se os seus mecanismos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e Grupos

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa, processo 57/2011 em 24/08/2011.

Dois ratos Wistar, machos, de 45 dias de idade sofreram eutanásia, por sobredosagem anestésica, para coleta da medula óssea dos seus fêmures e úmeros. As células foram isoladas, caracterizadas e expandidas em laboratório para posterior aplicação. Previamente ao transplante, as células foram identificadas com marcador fluorescente nanocristal Q-tracker® para permitir a validação do método de aplicação e rastreamento das células submetidas a marcação.

Todos os animais foram oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa e, após as cirurgias eles foram separados de forma aleatória em sete grupos experimentais:

Grupo sham 15 (n=3) submetido ao procedimento anestésico e acesso cirúrgico para indução do AVEi, mas o procedimento para induzir a isquemia não foi efetuado. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área prevista para isquemia;

Grupo sham 30 (n=4) submetido ao procedimento anestésico e acesso cirúrgico para indução do AVEi, mas o procedimento para induzir a isquemia não foi efetuado. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área prevista para isquemia.

Grupo Controle 15 (n=5) submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da artéria carótida média por 60 minutos, e recebeu 1 mL de solução PBS na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área da isquemia.

Grupo Controle 30 (n=4) submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da artéria carótida média por 60 minutos, e recebeu 1 mL de solução PBS na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área da isquemia.

Grupo CTM/IV-15 (n=10) submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da artéria carótida média por 60 minutos, e recebeu a aplicação de 1×10^6 células/mL de PBS na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 15 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área da isquemia.

Grupo CTM/IV-30 (n=10) submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da artéria carótida média por 60 minutos, e recebeu a aplicação de 1×10^6 células/mL de PBS na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia aos 30 dias, o encéfalo foi coletado para processamento e avaliação histológica da área da isquemia.

Grupo Validação (n=4) submetido ao procedimento anestésico, acesso cirúrgico e ao procedimento de oclusão do fluxo sanguíneo da artéria carótida média por 60 minutos, e recebeu a aplicação de 1×10^6 células/mL de PBS na veia lateral da cauda, 24 horas após a indução do AVEi. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 horas após o transplante e os pulmões, fígado, rins e o encéfalo foram coletados para avaliação imunofluorescente e estudo da migração das CTM marcadas com nanocristais fluorescentes.

2.2 Coleta, Cultivo e Caracterização das Células-tronco Mesenquimais

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva de isoflurano em sobredosagem. Foi realizada tricotomia do abdômen caudal, membros pélvicos e torácicos, em seguida os animais foram imersos em uma cuba contendo álcool 70% e transferidos para capela de fluxo laminar. Os fêmures e úmeros foram retirados cirurgicamente, de forma asséptica, e seccionadas as epífises distais. Na epífise proximal do osso foi introduzida uma agulha de 23 G acoplada a uma seringa de 10 mL, totalmente preenchida com meio de crescimento DMEM¹ completo para lavagem do canal medular.

¹ Dulbecco's modified Eagle's[®] (baixa glicose, contendo 3,7 g/l de bicarbonato de sódio e 10 - 15 mM HEPES (acidfree), pH=7,4 O meio completo inclui a adição de 10% de soro fetal bovino).- Invitrogen[™], USA.

As células foram dispostas em frascos de cultivo em concentração mínima de $5,0 \times 10^6$ células/mL e foram mantidas em estufa incubadora à 37°C em 5% de CO_2 e umidade de 95%.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo protocolos para a manutenção da assepsia dos materiais e meios de cultura utilizados. As células foram monitoradas, diariamente, em microscópio invertido de contraste de fase, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 a 3 dias, de acordo com o metabolismo celular.

Após permanecerem em estufa, quando foi identificada a confluência de 80%, o meio de cultura foi totalmente desprezado e a cultura lavada com solução de PBS, tripsinizada (Tripsina-EDTA 10×2) e incubada a 37°C , durante cinco minutos. Após esse período, inativou-se a ação da tripsina com acréscimo de meio DMEM completo. A solução foi transportada para um tubo de centrífuga e centrifugada à temperatura de 22°C e 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi totalmente desprezado e o *pellet* ressuspenso em meio DMEM completo, transportado para garrafas de cultura com o dobro de área da anterior e novamente incubado.

Três garrafas de cultura contendo as células da sexta passagem foram mantidas incubadas a 37°C para registro fotográfico da morfologia *in vitro*, expansão para diferenciação osteogênica e adipogênica, e para realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo. As células foram mantidas em cultura com repiques sucessivos no máximo até a sexta passagem.

2.2.1 Indução de diferenciação osteogênica em culturas de CTM

Uma garrafa de cultura contendo as células da sexta passagem foi tripsinizada e repicada em seis poços de uma placa de crescimento. O meio de cultura de três poços foi enriquecido com 10^{-8} mol/mL de dexametasona, $5,0 \mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico 2-fosfato, $10,0 \text{ mmol/L}$ de β -glicerofosfato e incubado a 37°C por quatro semanas (PHINNEY e ISAKOVA, 2005; MEIRELLES e NARDI, 2009). Os três poços restantes foram mantidos como controle, contendo apenas o meio DMEM completo.

Após esse tempo, amostras das células foram fixadas por 1 hora em paraformaldeído a 4% e coradas pela técnica de Von Kossa e HE para detecção de depósitos de cálcio na matriz extracelular.

² Solução de Tripsina-EDTA $10 \times$, frasco com 100 mL. SIGMA Chemycal Co., St. Louis, MO, USA.

2.2.2 Indução de diferenciação adipogênica em culturas de CTMs

Uma garrafa de cultura contendo as células da sexta passagem foi tripsinizada e repicada em seis poços de uma placa de crescimento. Para a diferenciação adipogênica o meio DMEM sem SFB foi enriquecido com 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma), 10^{-8} M de insulina recombinante humana, 200 μ M de indometacina cristalina e 500 μ M de isobutil-metilxantina. Os meios de diferenciação foram trocados a cada 3 dias por 28 dias. Após esse tempo, amostras das células foram fixadas por 1 hora em paraformaldeído a 4% e coradas com Oil Red O para a detecção de vesículas de lipídeos intracelulares.

2.2.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Células da sexta passagem foram submetidas à caracterização das CTM. Uma concentração de 1×10^7 células suspensas em 0,5mL de PBS contidas em um tubo Falcon foi incubada com os anticorpos primários anti-CD11b clone M1/70 mouse, anti-CD45 clone 69 mouse, anti-CD90 clone Ox-7 mouse, anti-CD73 clone 5 F/B9 mouse, anti-CD54 clone 1A29 mouse e anti-HLA-DR (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), por 30 minutos, à 4° C. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa 488 sob as mesmas condições anteriores. As amostras foram analisadas usando citômetro de fluxo FACScan e *software* CellQuest, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

2.2.4 Nanomarcção celular das culturas de CTMs

Doze horas antes do transplante, células da sexta passagem foram incubadas por 60 minutos, a 37° C, com Qtracker Cell Labeling 655® (Invitrogen, California, EUA), segundo recomendações do fabricante. As células marcadas foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos na temperatura de 22° C para a obtenção do *pellet* celular que foi ressuspendido em PBS e alíquotas de 1×10^6 células foram preparadas em 1 mL de PBS, centrifugadas e armazenadas em caixa de isolamento térmico até o momento da aplicação intravenosa.

Uma dose foi preparada para avaliação à fresco em microscópio de fluorescência para comprovar a eficácia da nanomarcção.

2.3 Modelo Experimental de Isquemia Cerebral

O modelo experimental foi desenvolvido em 40 ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 250 g, que foram alojados em gaiolas coletivas (até 5 indivíduos). Os animais foram mantidos em um ciclo de 12 horas claro (6h às 18h) e 12 horas escuro, com livre acesso à água e à ração, temperatura controlada entre 22 e 23° C, e passaram por um período de adaptação de 15 dias antes do início do experimento.

Após sedação com fentanil (0,3 mL/Kg) e diazepam (2,5 mg/Kg) a anestesia foi induzida e mantida com inalação passiva de isoflurano (2,5-3,5%) em circuito anestésico com oxigênio 100%. Foi realizada antibioticoprofilaxia com enrofloxacina (10 mg/Kg) por via intramuscular. Após a anestesia, foi administrada, por via intraperitoneal, atropina diluída em salina a 2% (0,1 mL por animal) para prevenção de arritmias cardíacas e hipersecreção brônquica secundárias à estimulação mecânica do nervo vago durante a operação.

O procedimento cirúrgico utilizado para a realização da oclusão transitória da artéria cerebral média (ACM) foi semelhante ao descrito por Longa *et al.* (1989). Efetuou-se tricotomia e anti-sepsia da região cervical ventral, e incisão sagital mediana de aproximadamente 3 cm de comprimento e seguida da divulsão dos tecidos conjuntivos até a exposição da bifurcação da artéria carótida comum (ACC) esquerda (Figura 1).

O ramo pterigopalatino da artéria carótida interna (ACI) foi clampeado em sua origem utilizando um microclipe vascular. A artéria carótida externa (ACE) foi ligada com fio de polipropileno número 6.0 em sua porção distal da bifurcação da ACC. Após a ACC e a ACI terem sido clampeadas, a ACE foi seccionada para passagem do monofilamento de oclusão 5.0 (Docol Corporation, MA, EUA) revestido em uma das pontas de uma camada de silicone que funciona como um êmbolo. O fio foi introduzido no espaço endovascular por meio da ACE esquerda seccionada até atingir a ACI. Em seguida, o clipe da ACI foi removido e o fio introduzido aproximadamente 20-21 mm de distância em relação à bifurcação da ACC até que seja percebida uma discreta resistência à passagem do fio indicando a origem da ACM (Figura 2).

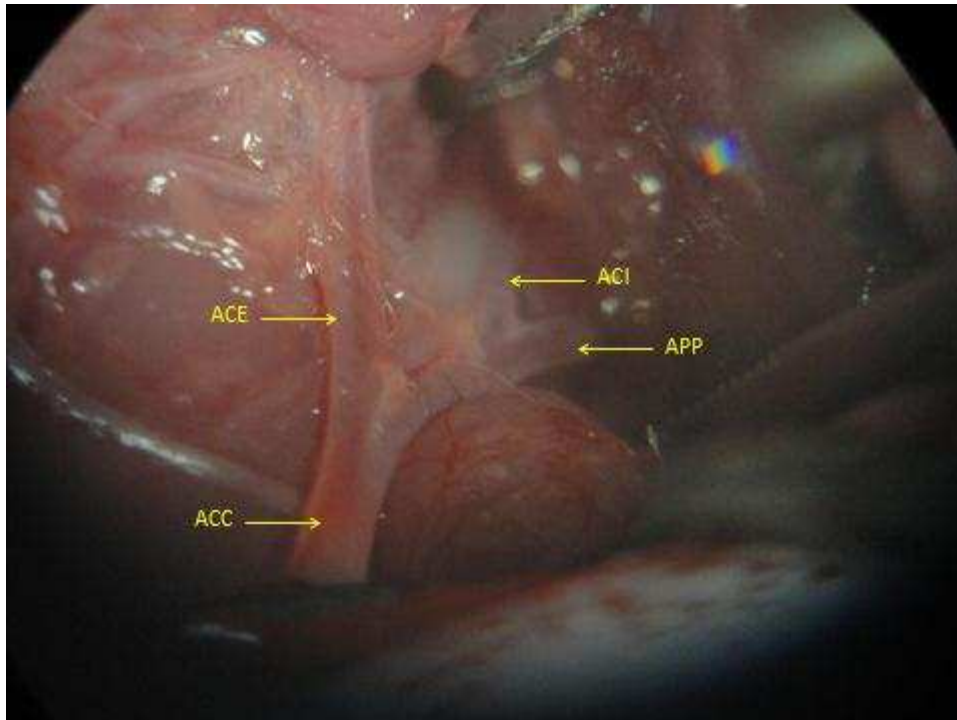


Figura 1. Anatomia vascular da região cervical lateral do rato. (ACC) artéria carótida comum esquerda; (ACE) artéria carótida externa esquerda; (ACI) artéria carótida interna esquerda; (APP) artéria pterigopalatina esquerda.

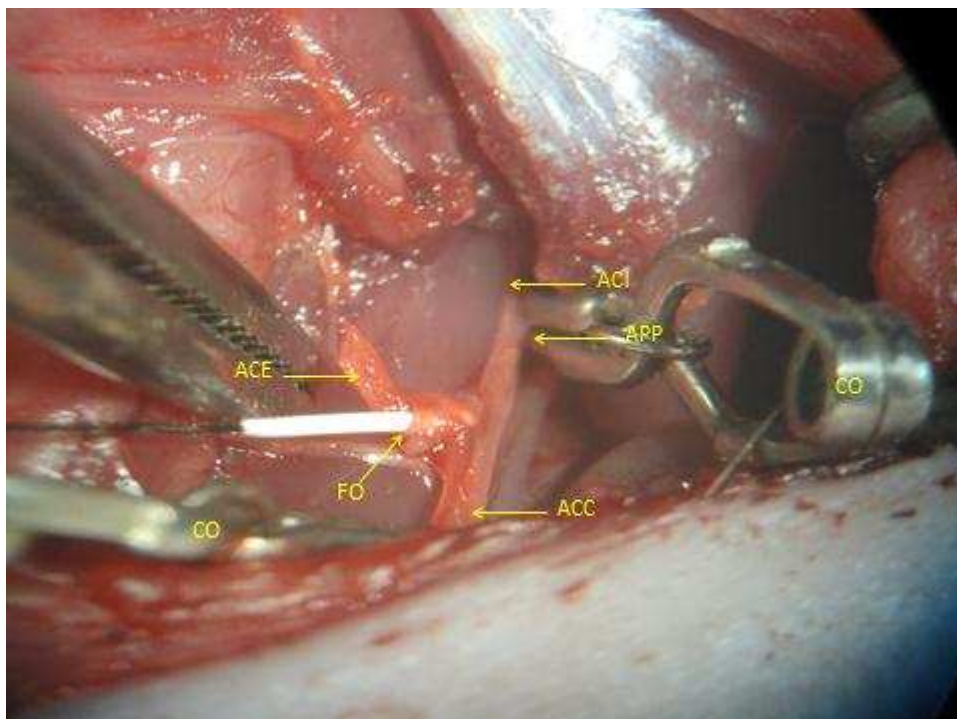


Figura 2. Procedimento microcirúrgico de oclusão temporária da artéria cerebral média esquerda do rato. (ACC) artéria carótida comum esquerda clampedada; (ACE) arteriotomia da carótida externa esquerda; (ACI) artéria carótida interna esquerda; (APP) artéria pterigopalatina esquerda clampedada; (FO) fio de oclusão; (CO) microclampes vasculares para oclusão.

A incisão cirúrgica foi fechada, mantendo o fio de oclusão e o clipe da ACC. O fio e o clipe permaneceram por 60 minutos e, posteriormente, o animal foi novamente anestesiado, o fio e o clipe foram retirados e a porção da ACE proximal à bifurcação da ACC (por onde foi introduzido o fio de oclusão) ligada. Em seguida, foi realizada aproximação dos tecidos e dermorrafia com náilon 3-0.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos em recuperação por duas horas, sob luz de lâmpada incandescente para a manutenção da temperatura corporal entre 36-38° C, e com água e ração. O fundo da gaiola foi coberto com papel absorvente por até 12 horas e em seguida os animais foram transferidos para caixas forradas com maravalha. Os animais receberam analgesia com administração de morfina (0,1 mL) por via subcutânea.

2.4 Avaliação Clínica

Nas primeiras 24 horas, os animais foram avaliados e classificados em um índice de gravidade de 0 a 4, segundo critérios determinados por Menzies *et al.* (1992), onde 0- representa a ausência de déficits neurológicos aparentes; 1- expressa animais que ao serem suspensos pela cauda apresentam postura de flexão do membro torácico direito (MTD); 2- diminuição da preensão do MTD quando suspenso pela cauda; 3- movimentação espontânea para todas as direções, mas movimento circular para a esquerda quando suspenso pela cauda, e 4- movimento circular espontâneo para a esquerda (Tabela 1).

Tabela 1. Índice de gravidade do déficit neurológico, segundo Menzies *et al.*, 1992.

Índice	Déficit Neurológico
0	Ausência
1	Flexão do membro torácico direito
2	Redução da preensão do MTD
3	Movimento circular esquerdo
4	Movimento circular espontâneo E

2.5 Tratamento

Após a marcação celular com Q-tracker, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 22° C, 1500 rpm, por 10 minutos, e ressuspensas em solução PBS. Uma alíquota de 100 µL, de cada amostra, foi incubada com o mesmo volume da solução de Azul de Tripán para contagem da concentração e viabilidade celular. Preparadas as doses contendo 1×10^6 células em 1 mL de PBS foram novamente centrifugadas para formar o *pellet* celular, em sexta passagem. No momento da aplicação o *pellet* celular foi ressuspensado.

Vinte e quatro horas após a indução da isquemia cerebral o grupo tratado com as CTM recebeu a dose de 1×10^6 células em 1 mL de PBS. Simultaneamente, o grupo controle recebeu o mesmo volume de PBS utilizado como diluente das células.

2.6 Avaliação Histológica

2.6.1 Fixação do cérebro e coloração com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)

Aos 15 e aos 30 dias após a cirurgia de oclusão da ACM, conforme o grupo experimental, os ratos foram anestesiados com xilazina (1mg/kg) e ketamina 1% (30mg/kg), para posterior perfusão transcardíaca. Quinze minutos antes de perfundir a solução fixadora, foi injetada, por via intraperitoneal, heparina na dose de 130 UI de peso corporal/kg. O aparato para a realização da perfusão transcardíaca consistiu em dois frascos de 500 mL, um contendo solução de cloreto de sódio 0,9% e outro com solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7.2-7.4). Os frascos foram mantidos a uma altura de 122 cm da mesa de cirurgia e conectados a dois conjuntos de equipo com agulha hipodérmica 18G. Foi realizada a primeira incisão no plano médio-ventral do abdome do rato seguida por outras duas incisões a partir da altura do processo xifóide às axilas. Por meio destas incisões, o tórax e o coração foram expostos. Em seguida, foi realizado o seccionamento da veia cava superior e inferior, começando-se a perfusão transcardíaca no ventrículo esquerdo. A perfusão foi iniciada com solução de cloreto de sódio 0,9% durante 5 minutos e depois com paraformaldeído tamponado 4%, por mais 5 minutos.

Em seguida à perfusão transcardíaca, o cérebro foi removido após craniectomia, e fixado em solução de paraformaldeído 4%, por 24 horas. Após a fixação, os cérebros foram mantidos em solução de álcool 70% para posterior seccionamento num fatiador

manual, obtendo-se oito fatias no plano coronal, cada uma com 1 milímetro de espessura. O seccionamento do cérebro foi orientado de acordo com o atlas estereotático do encéfalo de ratos produzido por Paxinos e Watson (1997), obtendo-se fatias nos intervalos de +4,20mm a -3,80mm de distância do Bregma (Figura 3). Estas secções são exclusivamente irrigadas pela ACM.

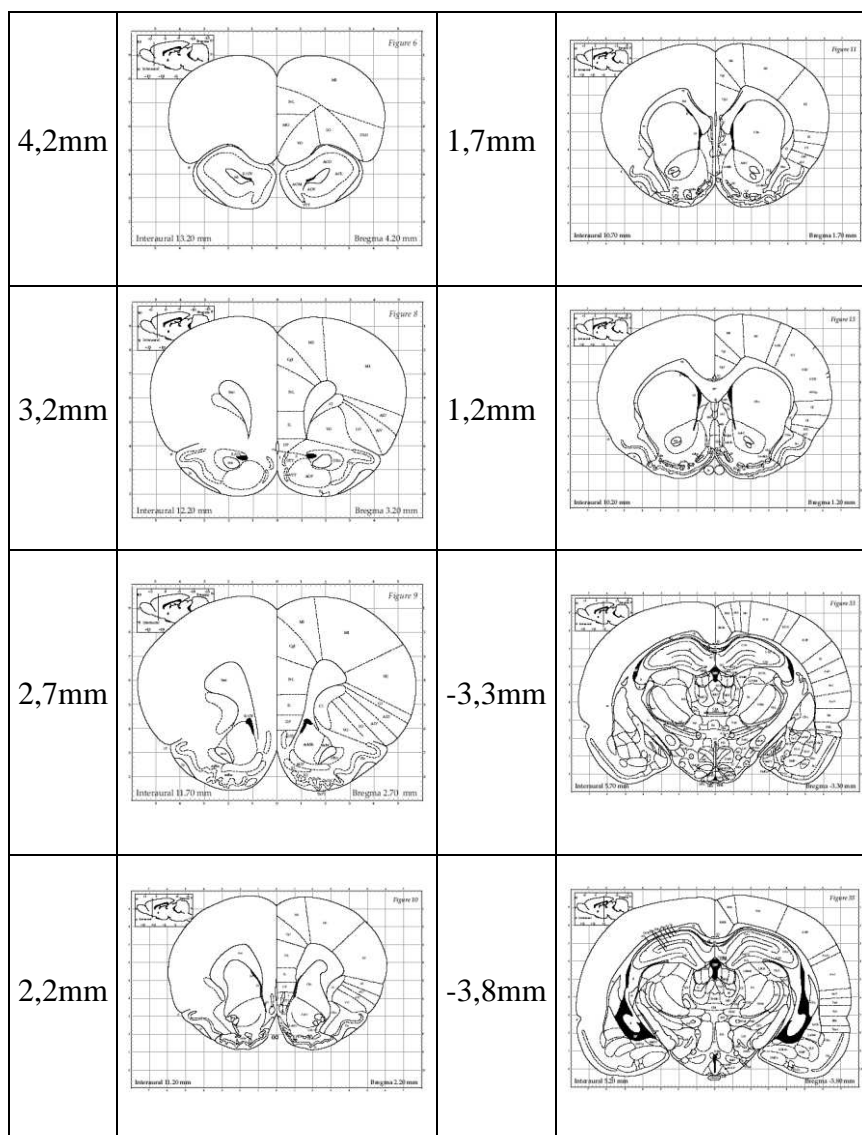


Figura 3 - Parâmetros estereotáticos para identificação das secções utilizadas para e medida do volume de infarto (Paxinos e Watson, 1997).

As fatias de cérebro foram imersas em solução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), na concentração de 2%, dissolvida em PBS (0,1 mol/L) a 37°C por 30 minutos, para marcação da área de isquemia cerebral. A coloração TTC foi

utilizada por oferecer preparações de alto contraste para determinação do volume de tecido infartado no cérebro de ratos.

2.6.2 Quantificação do volume de infarto cerebral

As oito fatias coradas com TTC, correspondentes ao cérebro de cada animal, foram reunidas e digitalizadas em um *scanner* de mesa (HP ScanJet M1120MFP resolução 300dpi). As áreas do hemisfério cerebral direito e esquerdo foram calculadas com auxílio do programa Axio Vision Rel. 4.8 (microscópio Zeiss Axiophot). Essas áreas foram somadas para obtenção dos volumes do hemisfério cerebral direito e esquerdo. No hemisfério cerebral esquerdo a área de infarto foi desconsiderada no cálculo do volume cerebral esquerdo. O volume total de infarto de cada cérebro foi calculado a partir do somatório de todos os volumes do hemisfério cerebral direito subtraído de todos os volumes do hemisfério cerebral esquerdo. O volume de infarto total foi dividido pelo volume do hemisfério cerebral direito multiplicado por cem para obtenção do percentual de infarto cerebral.

2.6.3 Análise histoquímica pelo método de Nissl e morfometria

Para a análise histoquímica, foram selecionadas as fatias de 1 mm da secção 0,20 mm (Figura 4) que permitiram evidenciar as células neuronais presentes no *striatum*. Essas estruturas estão envolvidas com o planejamento e execução do movimento, além de serem irrigadas pela artéria cerebral média.

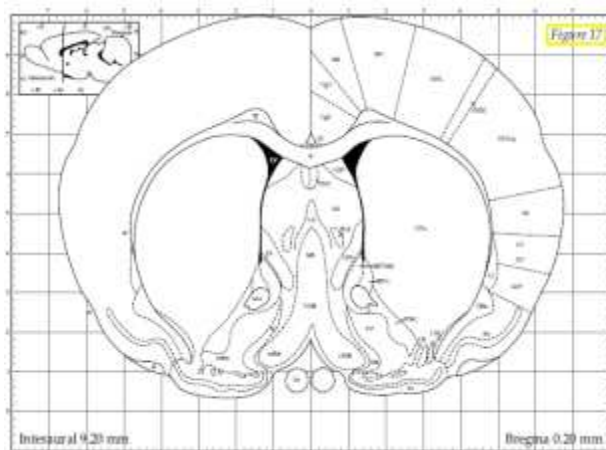


Figura 4 – Secção 0,20mm do cérebro dos ratos, evidenciando o *striatum*. Para a análise histoquímica foram selecionadas as fatias de 1 mm da secção 0,20 mm que permitiu evidenciar as células neuronais no *striatum*.

A coloração das células neuronais foi realizada pelo método de Nissl que consiste no processo de coloração, com imersão da lâmina com as fatias histológicas, em solução de cresil violeta para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl que são compostos, basicamente, por RNA. Esta coloração serviu como indicador da viabilidade neuronal, pois, quando da ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer (fenômeno conhecido por cromatólise). Fatias de 1 mm, parafinizadas, foram seccionadas em micrótomo rotativo (Leica®, modelo RM2255), obtendo-se secções transversais de 10 µm de espessura, semi-seriadas, com intervalo mínimo entre cortes de 4 µm, para coloração de Nissl.

As lâminas com as secções foram imersas, por 5 minutos, no xilol 1, xilol 2, no álcool 100%, no álcool 100%, no álcool 95% e no álcool 70%. Em seguida, foram imersas 30 minutos na solução de 0,5% de cresil violeta. Logo, as lâminas foram desidratadas por 5 minutos no álcool 70%, no álcool 95%, no álcool 100%, no álcool 100%, finalizando com a diafanização no xilol 1 e xilol 2.

As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Axio Vision (versão 4.8) e o sistema composto de câmera digital (AxionCam ERC5S) acoplada ao microscópio (Zeiss modelo Lab A1). Logo após, foi realizada a análise morfométrica das imagens obtidas através do programa de análise de imagem (*Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows 98) e, em seguida, procedeu-se a quantificação dos neurônios delimitando-se uma área de 50µm². Aqueles neurônios que não evidenciaram os limites do corpo neuronal, núcleo ou nucléolo bem definidos foram desconsiderados. A caracterização celular foi realizada comparando-se os hemisférios esquerdos contendo áreas isquêmicas em relação aos hemisférios direitos cujos tecidos não possuem lesão.

2.6.4 Análise Estatística

O volume de infarto foi calculado pela soma de todas as áreas de infarto cerebral das secções de cada animal. Para diminuir o erro introduzido pelo edema do tecido cerebral, foi utilizado o método indireto para cálculo do volume de infarto, que foi considerado igual á área do hemisfério contralateral subtraindo a área não infartada do hemisfério ipsilateral. A porcentagem foi obtida pela divisão do volume de infarto pela área do hemisfério contralateral multiplicado por 100%. Os cálculos estatísticos foram

realizados no programa Graphpad Prism 5, empregando os testes One-Way ANOVA e seguido do *Post-hoc de Tukey*, considerando o nível de significância de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

Caracterização das CTM derivadas da medula óssea

A técnica de cultivo das células-tronco extraídas da medula óssea dos fêmures dos animais permitiu o crescimento em monocamada e desenvolvimento de morfologia fibroblastóide. Após 48 horas, as culturas primárias aderiram aos substratos das garrafas de cultivo e apresentaram elevados índices de replicação.

A partir do 28º dia, as células submetidas à diferenciação osteogênica demonstraram presença de matriz extracelular calcificada pela coloração de Von Kossa e HE evidenciando a diferenciação em células da linhagem óssea. As CTM cultivadas e submetidas à indução adipogênica demonstraram, ao final das quatro semanas, presença de lipídios intracelulares identificados sob o microscópio de luz (Figura 5).

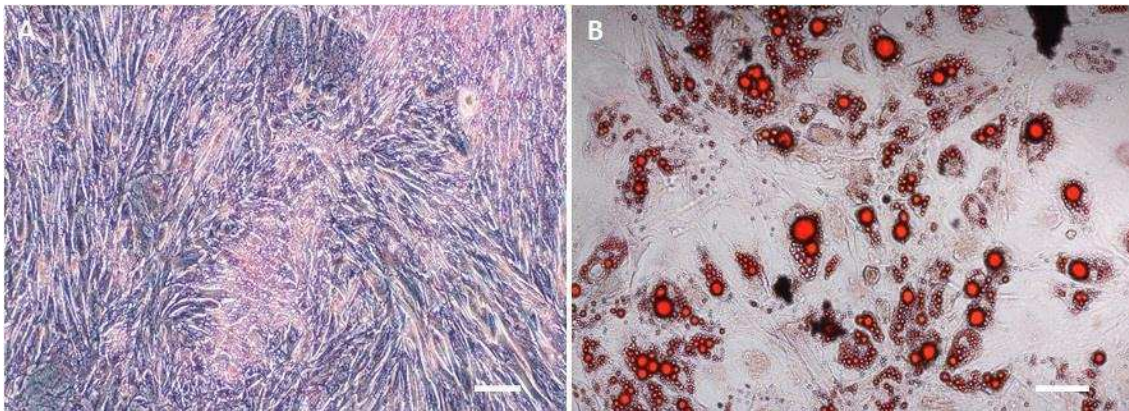


Figura 5: Fotomicrografias das CTM diferenciadas *in vitro*: (A) Diferenciação osteogênica exibindo nas regiões escuras calcificação da matriz extracelular. (B) Diferenciação adipogênica evidenciando em vermelho acúmulo de gotículas lipídicas (B). Barra: 50µm.

Em análise através da citometria de fluxo, as CTM cultivadas de sexta passagem, mostraram expressão positiva para os marcadores de superfície CD54 (66,26%), CD73 (86,82%) e CD90 (90,30%) e expressão negativa para os marcadores CD11 (97,48%), CD45 (96,98%) e para HLA-DR (95,5%) como ilustrados na Figura 6.

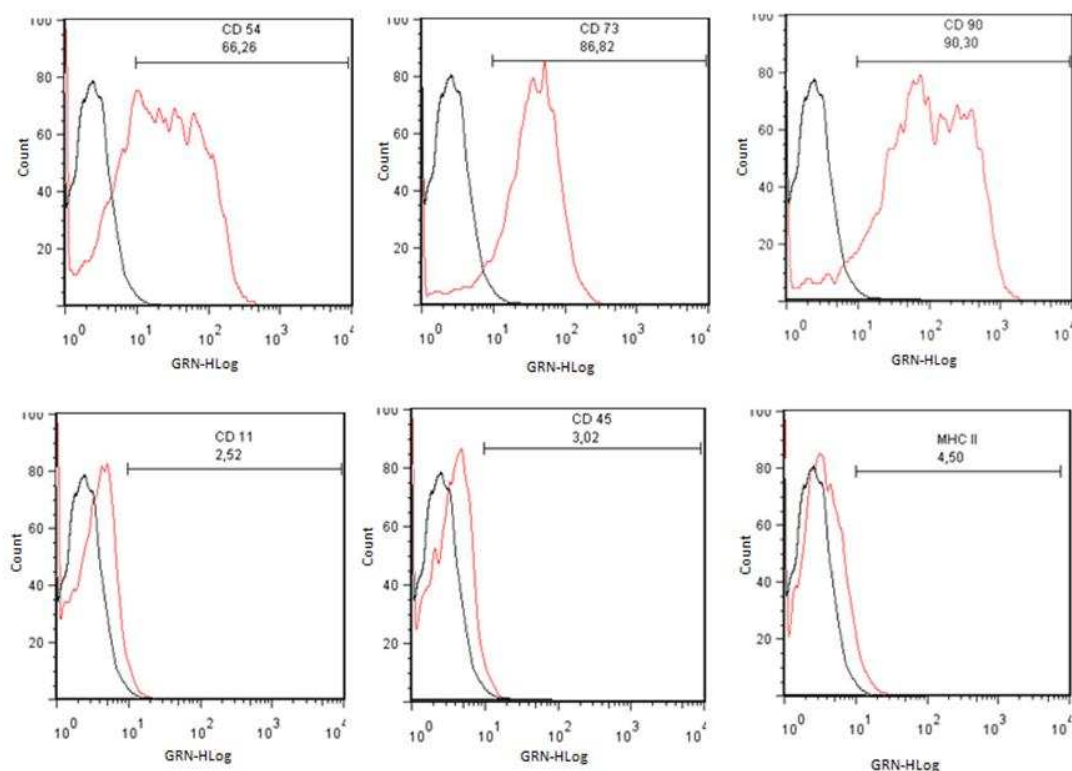


Figura 6. Caracterização imunofenotípica das CTM por citometria de fluxo. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos vermelhos) está comparada com os isotipos controle (gráficos pretos) e representada em valores percentuais. O número de células analisadas está representado no eixo y e a intensidade no eixo x.

Nanomarcção das CTM

As células previamente marcadas com o Q-tracker 655® apresentaram o marcador emitindo alta fluorescência citoplasmática (cor vermelha), com filtro de excitação WG e os núcleos (azul) corados com DAPI são mostrados com filtro de excitação WU (Figura 7).

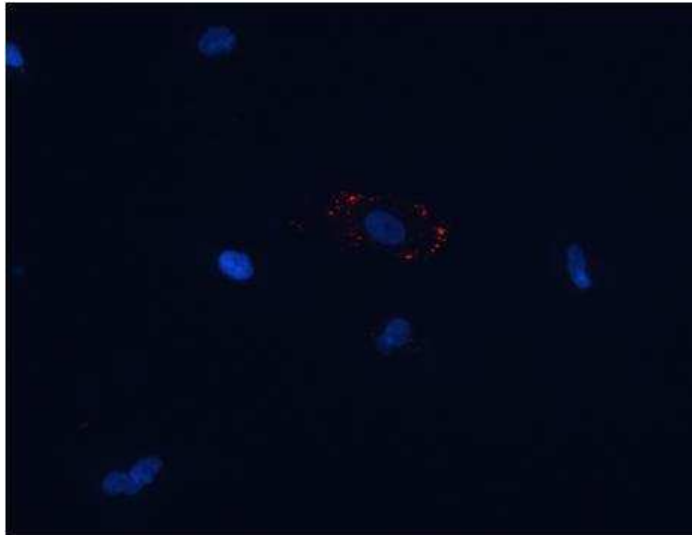


Figura 7. Imagens de microscopia de fluorescência. Fotomicrografia da CTM após nanomarcção com Q-tracker®, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células em suspensão. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (azul). Barra: 50 μm .

Identificação das CTM Infundidas

As CTM marcadas e infundidas foram identificadas nos pulmões dos animais do grupo validação, 24 horas após o transplante por via intravenosa (Figura 8), mas não foram encontradas no local da lesão isquêmica, nem em quaisquer outros órgãos de filtração, como o baço e os rins.

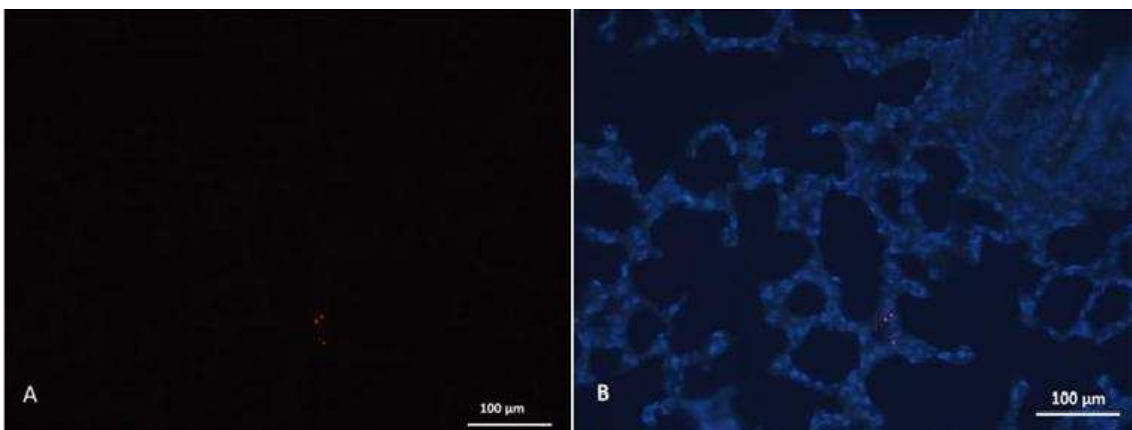


Figura 8. Imagens de microscopia de fluorescência do parênquima pulmonar. (A) Fotomicrografia da CTM após nanomarcção, demonstrando a fluorescência citoplasmática vermelha emitida pelas células localizadas no tecido pulmonar. Barra: 100 μm . (B) Identificação das células transplantadas, presentes no pulmão do grupo 24 horas pós-lesão. Estão evidenciados as CTM, os alvéolos pulmonares e os núcleos contra-corados com DAPI (azul). Barra: 100 μm .

Achados Macroscópicos

A interrupção temporária do fluxo sanguíneo da ACM por 60 minutos foi suficiente para indução da lesão isquêmica cerebral em sua região de irrigação no hemisfério cerebral esquerdo dos animais (Figura 9).



Figura 9. Lesão isquêmica induzida no encéfalo de rato controle 15 dias. Área de palidez no córtex cerebral circundado por setas no território de irrigação da artéria cerebral média esquerda.

Déficit Neurológico

Todos os animais submetidos à oclusão temporária da ACM, apresentaram ao exame neurológico, hemiparesia nos membros contralaterais ao hemisfério com lesão isquêmica. Nas primeiras 24 horas os animais foram avaliados e classificados segundo o índice de gravidade de 0 a 4 de Menzies *et al.* (1992). Sendo assim, três animais apresentam índice 2, ou seja, diminuição da preensão do membro torácico direito quando suspensos pela cauda; quatorze animais com índice 3, ou seja, movimentação espontânea para todas as direções, mas movimento circular para a esquerda quando suspenso pela cauda e doze animais com índice 4, isto é, com movimento circular espontâneo para a esquerda (Tabela 2). Portanto, o modelo de oclusão temporária da artéria cerebral média foi eficaz para redução dos movimentos dos membros, sugerindo indução de isquemia.

Tabela 2. Déficits neurológicos apresentados pelos ratos após oclusão temporária da artéria cerebral média, segundo a escala de Menzies *et al.* (1992).

Índice	Déficit Neurológico	Número de Animais
0	Ausência	0
1	Flexão do MTD	0
2	Redução da preensão do MTD	3
3	Movimento circular E	14
4	Movimento circular espontâneo E	12

Nos índices 1, 2 e 3 os déficits são observados com os ratos suspensos pela cauda. (MTD) membro torácico direito. (E) direção esquerda.

Avaliação da Área de Infarto

O volume de infarto calculado pela soma das áreas de todos os hemisférios cerebrais esquerdos divididos pela soma dos direitos (Figura 10), obtendo-se a porcentagem multiplicando-se por 100 são estão expressos na Tabela 2 e no Gráfico 1.

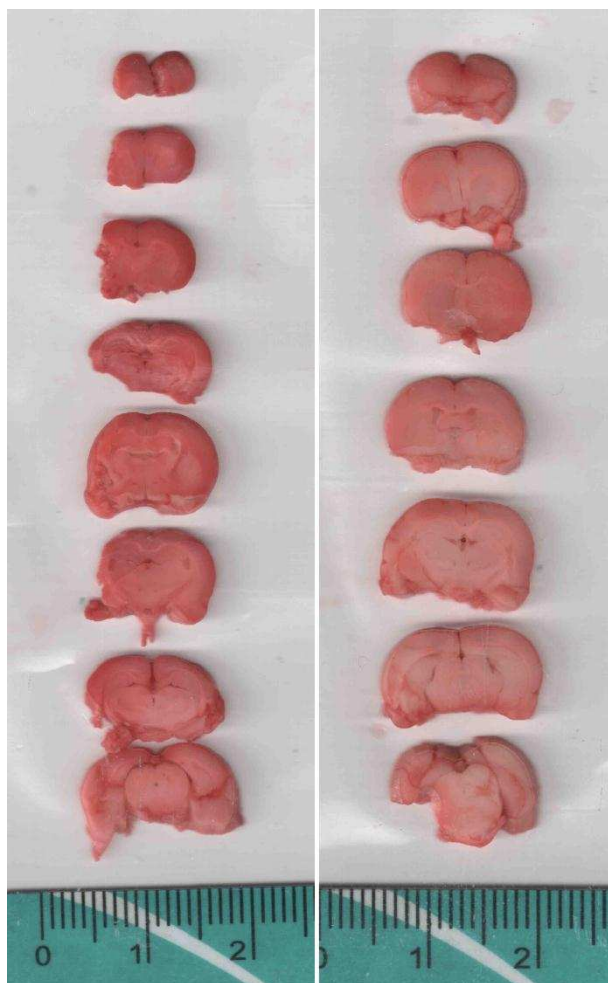


Figura 10. Imagens das secções coronais dos encéfalos obtidas em *scanner* de mesa e utilizadas para o cálculo dos volumes dos hemisférios esquerdos, direitos e das áreas de infarto.

Tabela 3. Percentagem média da área de infarto, após AVE, mensurada nos animais dos diferentes grupos experimentais

	Grupo Controle 15	Grupo Controle 30	Grupo CTM 15	Grupo CTM 30	Grupo Sham 15	Grupo Sham 30
N. de animais	5	4	10	10	3	4
Média	33,50 ^a	29,19 ^a	14,92 ^b	17,02 ^b	6,37 ^c	6,37 ^c
Desvio padrão	6,3	2,0	5,8	7,8	2,3	2,3
Erro padrão	2,8	1,0	1,8	2,4	0,8	0,8

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

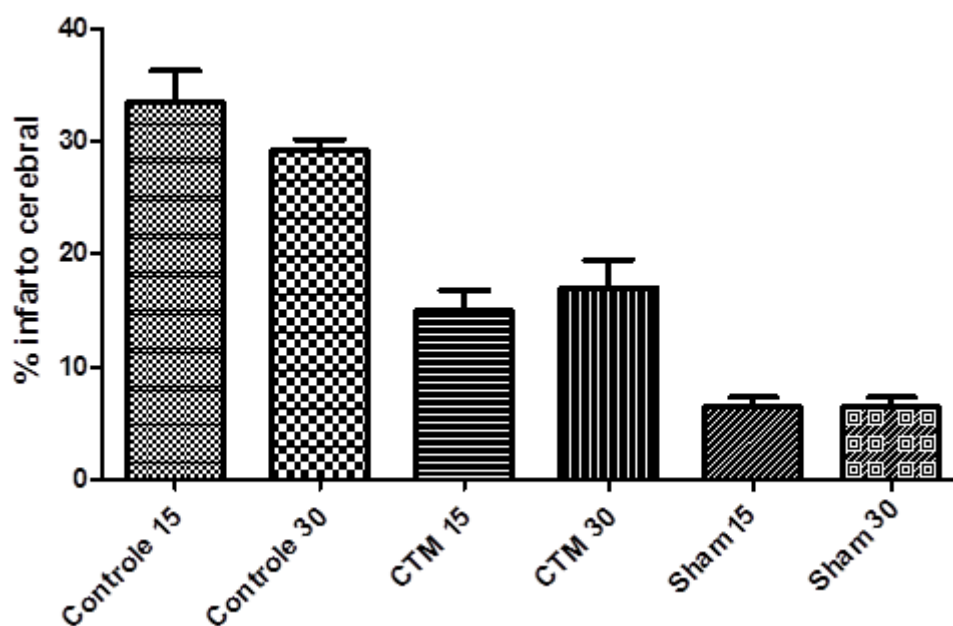


Gráfico 1. Percentagem média da área de infarto, após AVE, mensurada nos animais dos diferentes grupos experimentais.

Observa-se que o valor médio da área de isquemia manteve-se ao longo dos 30 dias de avaliação tanto nos grupos controle quanto nos tratados, quando comparados aos valores expressados aos 15 dias. Houve significativa redução do volume de perda de

tecido nervoso e menos área de infarto quando comparado os grupos controle e tratado (Figura 11).

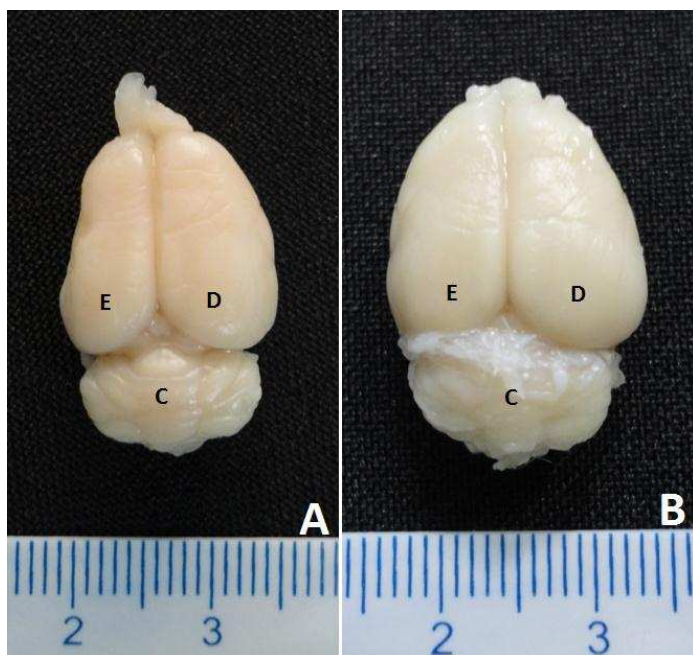


Figura 11. Imagens dos cérebros de ratos comparando a atrofia no hemisfério cerebral esquerdo em relação ao direito. (A) Controle 15 dias. (B) Tratado 15 dias. (E) Hemisfério cerebral esquerdo. (D) Hemisfério cerebral direito. (C) Cerebelo.

Os grupos tratados com as CTM apresentaram valores menores que os grupos controles (Controle 15 vs CTM 15 e CTM 30, $p < 0,001$ e Controle 30 vs CTM 15, $p < 0,01$ e Controle 30 vs CTM 30, $p < 0,05$).

No grupo sham, observa-se pequena área de isquemia, quando comparada aos grupos controle e tratado (Controle 15 e 30 vs Sham, $p < 0,001$; CTM 15 vs Sham, $p < 0,05$ e CTM 30 vs Sham, $p < 0,01$).

Caracterização Celular do Tecido Nervoso

Os dados relativos à caracterização celular do tecido nervoso, tanto no hemisfério cerebral direito, sem isquemia, como no esquerdo com área de isquemia são apresentados nas figuras 12 a 14. Na área de isquemia houve perda de neurônios e células da glia e ativação da micróglia com formação das células gitter (Figuras 12 e 13).

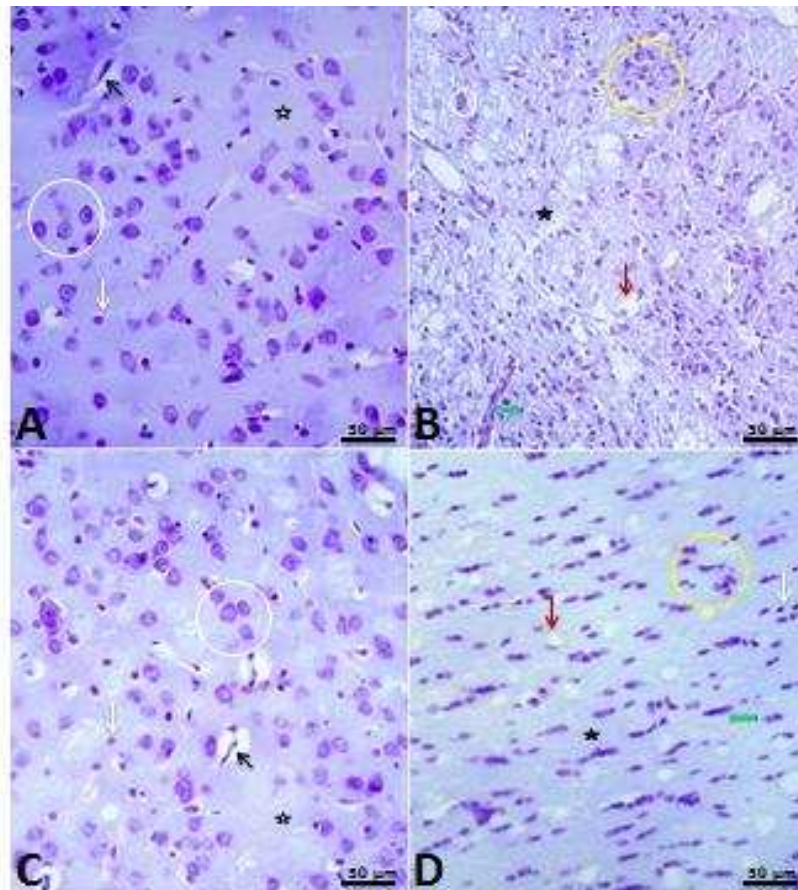


Figura 12. Fotomicrografia de animais do grupo controle secção 0,20. (A) 15 dias, hemisfério direito, sem isquemia. (B) 30 dias, hemisfério esquerdo, com isquemia (C) 30 dias, hemisfério direito, sem isquemia. (D) 30 dias, hemisfério esquerdo, com isquemia. Neurônios (círculo branco), neurópilo (☆), oligodendrocito (seta branca), vaso sanguíneo e células endoteliais (seta preta), oligodendrocito (seta branca), neurópilo desarranjado (★), nódulos microgliais (círculo amarelo), células gitter (seta vermelha). Barra 50 µm.

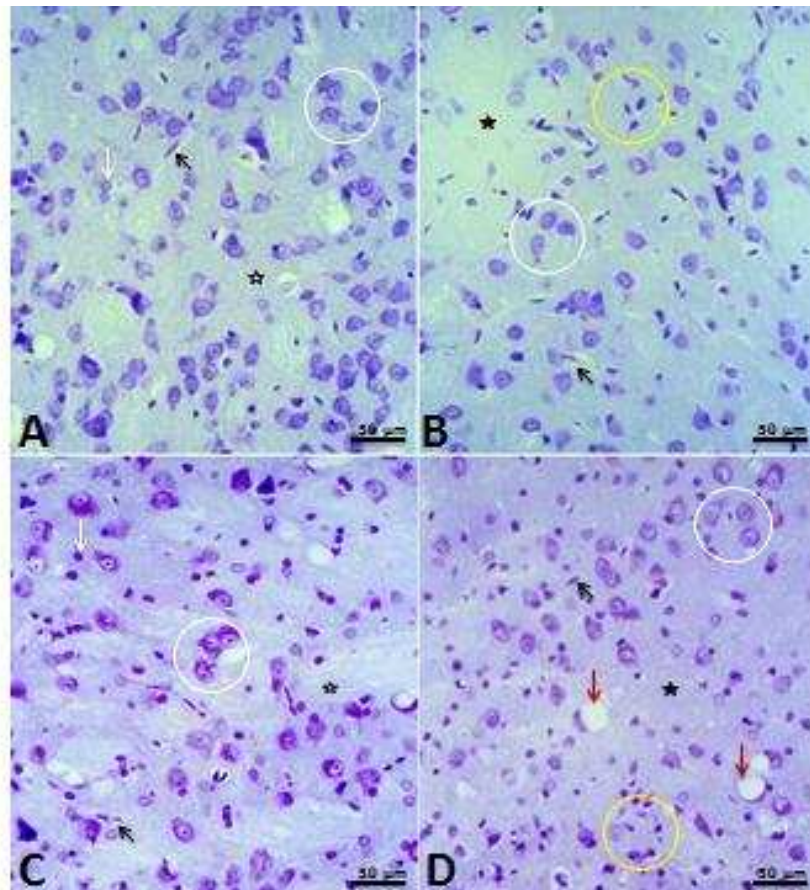


Figura 13. Fotomicrografia de animais do grupo CTM secção 0,20. (A) 15 dias, hemisfério direito, sem isquemia. (B) 30 dias, hemisfério esquerdo, com isquemia (C) 30 dias, hemisfério direito, sem isquemia. (D) 30 dias, hemisfério esquerdo, com isquemia. Neurônios (círculo branco), neurópilo (☆), oligodendrocito (seta branca), vaso sanguíneo e células endoteliais (seta preta), oligodendrocito (seta branca), neurópilo desarranjado (★), nódulos microgliais (círculo amarelo), células gitter (seta vermelha). Barra 50 µm.

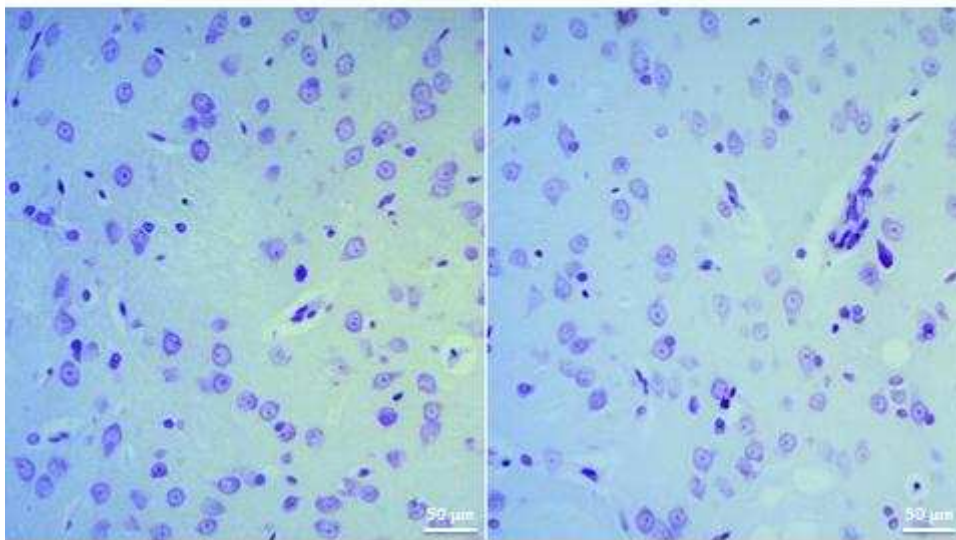


Figura 14. Fotomicrografias de animal do grupo sham 30 dias. Secções 0,20, lado direito (D) e esquerdo (E), sem isquemia. Apresentação celular semelhante no lado direito e esquerdo, entretanto com 60 neuronios em D e 53 em E. Barra 50 μ m.

4 DISCUSSÃO

As células cultivadas nesse estudo apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência a placa de cultura como descrito por Pittenger *et al.* (1999) e apresentaram expressão positiva dos marcadores celulares de superfície CD54, CD73 e CD90 e expressão negativa dos marcadores CD11b, CD45 e MHC II. Além disso, sofreram diferenciação para a linhagem óssea e adipogênica.

Segundo a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) são três os requerimentos mínimos para uma população celular ser classificada como CTM: O primeiro é que sejam isoladas de uma população de células mononucleares com base na sua aderência seletiva em cultura à superfície do plástico. O segundo é que as expressões de CD13, CD29, CD54, CD73, CD90, CD106 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Em terceiro e mais importante, é a capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens mesodermiais: osso, cartilagem e tecido adiposo

(MEIRELLES e NARDI, 2006). Em conjunto, todos os critérios para classificação foram obtidos e demonstrados no estudo, comprovando que as células infundidas foram CTM.

Todos os animais do estudo submetidos à oclusão temporária da artéria cerebral média esquerda (ACM) demonstraram paresia dos membros torácicos e pélvicos direitos logo após o retorno anestésico. A maioria deles apresentou índices de gravidade elevados (Tabela 1) com movimentos circulares para a esquerda quando suspensos pela cauda ou de forma espontânea. Estes achados corroboram aqueles observados por Calloni *et al.* (2010), quando a oclusão resultou em déficits motores suficientes para determinar movimentos circulares constantes ou inconstantes. Também, a metodologia foi eficaz para determinar a redução do fluxo sanguíneo e a consequente isquemia cerebral, de forma aguda e sem impor outros traumas mecânicos ao animal.

O modelo de oclusão temporária da ACM forneceu informações acerca da fisiopatologia e possibilidades de estratégias de tratamento para o acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) e, segundo Laing, *et al.* (1993), a técnica é considerada de escolha há anos para estudar isquemia aguda experimental, além de ser de natureza minimamente invasiva. De acordo com Modo *et al.* (2000) é o modelo mais utilizado por representar a forma mais prevalente de AVEi em seres humanos.

A via de infusão das CTM escolhida foi IV por ser fácil, rápida, de baixo custo e não oferece traumas mecânicos maiores. A implantação local das células não é viável do ponto de vista clínico devido ao seu potencial grau de invasão no encéfalo e as células implantadas podem morrer antes de atuarem de forma eficaz devido às limitações de difusão de nutrientes e oxigênio (MUSCHLER *et al.*, 2004). Jaafari *et al.* (2011) afirmaram que a injeção de células-tronco neurais adultas diretamente na área de isquemia causa danos ao parênquima cerebral pela agulha e limita a migração celular. De forma semelhante, a infusão intra-arterial (IA) direta das células na artéria cerebral média, além de requerer angiografia cerebral, é um procedimento invasivo que envolve riscos, inclusive de novo evento isquêmico (VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2012). Não bastassem os riscos da aplicação IA, Vasconcelos dos Santos *et al.* (2012) observaram, 24 horas após a transplantação celular, que o *homing* no cérebro é comparável quando ambas as rotas, IV e IA, foram analisadas e, por isso, reforçou a escolha pela via IV neste experimento.

O experimento mostrou a eficácia e manutenção da marcação das CTM com os nanocristais fluorescentes e, também, confirmou a viabilidade das células no momento

da infusão. A janela terapêutica estabelecida para infusão das células foi 24 horas após a indução da isquemia, ou seja, durante a fase aguda da doença, sendo igual à preconizada por Vasconcelos dos Santos *et al.* (2010) que afirmaram que a infusão IV de células-tronco derivadas da medula óssea deve acontecer até 7 dias após a injúria, com melhores resultados quando foram infundidas 1 dia após a isquemia.

Já foi demonstrado que as CTM possuem efeito terapêutico nas fases aguda e subaguda da doença, bem como determinam recuperação funcional quando são administradas um mês após a isquemia (SHEN *et al.*, 2007) e, como a barreira hematoencefálica (BHE) estará aberta, continuamente, por várias semanas após a isquemia (STRBIAN *et al.*, 2008), o tecido danificado permitirá a entrada de novas CTM ou de fatores liberados por elas, também nas fases mais tardias da isquemia cerebral. Os resultados obtidos no estudo demonstram que a infusão precoce das CTM pode atuar de forma decisiva e significativa para impedir a expansão da área de sofrimento isquêmico devido ao fato dos fatores tróficos, quimiorreceptores, citocinas e moléculas pró e antiinflamatórias estarem em atividade máxima nas primeiras horas ou dias do evento lesivo. A redução observada no tamanho da lesão está em linha com outros estudos que demonstram uma clara correlação entre o tamanho da lesão e o tempo de administração intravenosa de células-tronco (IIHOSHI *et al.*, 2004 e KEIMPEMA *et al.*, 2009).

No experimento, o número total de células infundidas por via IV foi 1×10^6 e foram encontradas nos pulmões dos animais vinte e quatro horas pós-lesão, porém não foram identificadas no local da lesão isquêmica um, quinze e trinta dias após a isquemia. Estudos de Omori *et al.* (2008), que investigaram o número de células e o tempo de aplicação, mostraram que o maior número de CTM e a administração de forma precoce não resultaram em diferenças funcionais. WU *et al.* (2008) afirmam que provavelmente existe um patamar acima do qual a quantidade de células administradas não melhoraria o resultado. Os nossos achados corroboram os dados de Gao *et al.*, (2001) e Detante *et al.* (2009), quando afirmam que a quantidade de células que migra para o cérebro 2 e 24 horas, após aplicação IV e IA, é muito pequena e sugerem que não é necessário que as células permaneçam no cérebro para gerar melhora funcional.

A presença das CTM acumuladas dentro dos órgãos de filtração, tais como o pulmão, fígado ou baço é frequentemente observada quando a via de administração é a intravenosa (SACKSTEIN, *et al.*, 2008). Segundo Karp e Leng Teo (2009), o *homing* de CTM expandida em cultura e infundida por essa via é ineficiente por existir perda de receptores de quimiocinas e da adesão celular, além de aumento do tamanho das CTM

em cultura. Estes eventos promoveria retenção de células em tecidos não específicos, incluindo o pulmão, reduzindo, assim, o número de células que atingem o sítio alvo. Entretanto, mesmo que estes eventos aconteçam, é fato que o número de células infundidas, no experimento, foi suficiente para impedir a expansão da lesão de isquemia.

Presume-se que a eficácia terapêutica das CTM infundidas de forma sistêmica depende do extravasamento da circulação e da enxertia onde elas podem apresentar atividades trófica e parácrina locais ou ainda, possam habitar um tecido e liberar fatores parácrinos na vasculatura para um efeito sistêmico. Ainda não está claro se as CTM atuam, nos tecidos, utilizando mecanismos de adesão celular mediada por selectina e integrinas (LEY *et al.*, 2007) ou tornam-se passivamente aprisionadas nos capilares ou microvasos, incluindo arteríolas e vênulas (SACKSTEIN *et al.*, 2008).

Não foram achadas CTM no cérebro nos grupos tratados e mesmo no grupo de validação, o que não impediu resultados de redução da expansão isquêmica. Quertainmont *et al.* (2012) e Araújo (2013) não encontraram células transplantadas, por via intravenosa, no local da lesão. Em lesão de medula espinhal, observaram efeito benéfico sobre a capacidade de locomoção e aumento significativo da expressão do fator de crescimento neural (NGF) no tecido lesionado, sugerindo que as CTM atuam através da secreção de fatores e não, necessariamente, pela sua própria integração/diferenciados dentro do tecido hospedeiro. Estas células são capazes de secretar fatores de crescimento e citocinas, como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além do aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias como IFN- γ e IL-10, que podem ter efeito benéfico sobre a reparação e reorganização das conexões neuronais; na indução de regeneração; estimulando a neurogênese; no crescimento axonal; na redução da resposta inflamatória e na proteção do tecido após lesão espinhal (KUROZUMI *et al.*, 2004, LU *et al.*, 2005 e QUERTAINMONT *et al.*, 2012).

A área de isquemia detectada no grupo *sham* foi proporcionalmente pequena em relação aos grupos controle e tratado (Figura 12). Pode ser creditada a redução do fluxo sanguíneo cerebral ocasionado pelo clampeamento da artéria carótida comum esquerda, uma vez que, naquele grupo, foram realizados todos os passos do procedimento cirúrgico com exceção da oclusão da artéria cerebral média. Sabe-se que, no meio celular, a redução do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) com depleção do oxigênio inicia

eventos bioquímicos que determinarão fosforilação desencadeando o metabolismo anaeróbio. A glicólise anaeróbia é insuficiente e determina depleção das reservas de fosfato, incluindo ATP, com acúmulo de ácido láctico e falência das funções celulares e a sensibilidade das células do SNC à anóxia obedece a seguinte ordem: neurônios, oligodendrócitos, astrócitos, microglia e células endoteliais (WYATT *et al.*, 1989).

A comparação dos valores médios, nos grupos controles de quinze e trinta dias, não demonstra alteração significativa da área de infarto, ao longo do tempo. Contudo, estas grandes áreas de isquemia, quando comparados aos grupos tratados, nesses, há evidências de redução da expansão da área isquêmica, sugerindo que as medidas terapêuticas empregadas impediram o aumento do dano tecidual. Os danos teciduais são decorrentes do colapso energético celular, do acúmulo de cálcio, da peroxidação lipídica, da acidose, da liberação do glutamato, da intensa produção de radicais livres e da neurotoxicidade do óxido nítrico que culminam na morte celular (SHALAK e PERLMAN, 2004). As CTM são capazes de exibir potenciais antiproliferativo, antiinflamatório e antiapoptótico, que favoreceram a proteção dos tecidos e, além disso, possuem mecanismos parácrinos mediados pela liberação de fatores de crescimento e moléculas anti-inflamatórias que criam um ambiente favorável para a regeneração dos tecidos e melhora do fluxo cerebral (UCCELLI *et al.*, 2011).

A administração intravenosa de CTM impediu a expansão do volume de infarto nos ratos submetidos ao AVEi. Sugere-se que a secreção de fatores neurotróficos, representados por uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, promoveu o crescimento neuronal endógeno, neurogênese e angiogênese, também pode ter incentivado a conexão sináptica e remielinização de axônios danificados, diminuiu a apoptose e regulou a inflamação. Todos estes eventos aconteceram à distância e, não somente por ações parácrinas, como citados por Seo e Cho (2012).

Como as CTM infundidas com o marcador fluorescente não foram encontradas no local da lesão, não parece que as alterações descritas tenham ocorrido em função de algum tipo de efeito justácrino ou mesmo parácrino. Também, Borlongan *et al.* (2004) sugerem que o efeito da terapia celular na isquemia não está diretamente relacionado com a presença das células no cérebro, uma vez que foi possível observar recuperação funcional sem a presença das mesmas no parenquima cerebral, ou poucas células, como mostrado em Bacigaluppi *et al.* (2009) e Brenneman *et al.* (2010). Também, parece que há efeitos imunomoduladores diretos sobre as células imunes residentes no cérebro. Um segundo efeito imunomodulador parece ser sistêmico. Sua principal ação é segregar as

células inflamatórias no baço e, já foi demonstrado proteção em longo prazo em modelos de isquemia cerebral em roedores (WEI *et al.*, 2011). Tomados em conjunto, os resultados do experimento apoiam o conceito de modulação local e sistêmica da resposta imune como mecanismo de ação potencialmente importante.

As CTM têm efeito imunomodulador atuando em uma via de resposta anti-inflamatória para regular a atividade de microglia, protegem neurônios e reduzem o número de células inflamatórias Iba-1⁺ e ED1⁺ (KIM *et al.*, 2008). Promovem importante papel na angiogênese que é induzida após um evento de isquemia com indução do fator de hipóxia 1 α (HIF-1 α) que confere efeitos citoprotetores e angiogênicos (AZARNOUSH *et al.*, 2005). Regulação do VEGF que estimula a diferenciação endotelial de células-tronco também foi observada melhorando o desempenho em testes neurológicos e comportamentais (LI *et al.*, 2005), bem como o efeito parácrino das CTM tem um potencial mecanismo de angiogênese (ZACHAREK *et al.*, 2010). As CTM após isquemia cerebral proliferam e remodelam a microvasculatura no córtex, permitindo a melhora do fluxo sanguíneo colateral e identifica-se o aumento dos fatores angiogênicos e da angiogênese endógena na região da penumbra (WHITAKER *et al.*, 2007 e WEI *et al.*, 2012).

No experimento, na avaliação da área de isquemia foram observados perda significativa de neurônios e oligodendrócitos, o neurópilo desarranjado com proliferação e tumefação de células endoteliais. Presença de ativação da microglia com formação de aglomerados, chamados nódulos microgliais e células grânulo-adiposas com citoplasma espumoso e núcleo excêntrico, chamadas células gitter. A infusão das CTM atenuou a reatividade dos astrócitos e a ativação da microglia, além de exibir capacidade em estimular a ativação de células-tronco neurais endógenas no local da lesão.

A microglia, com núcleos alongados em forma de vírgula e densos, deriva do sistema retículo-endotelial sendo constituída pelos macrófagos residentes do SNC e são consideradas as células imunocompetentes do tecido. Quando há lesão do tecido nervoso, as células microgliais perdem os prolongamentos e assumem forma arredondada, constituindo macrófagos com capacidade fagocitária (LU *et al.*, 2011). A lesão isquêmica leva à ativação das células microgliais existentes e atrai monócitos do sangue e a sua proliferação é denominada microgliose e pode ser difusa em nódulos microgliais, tratando-se de resposta celular a lesões (DERECKI *et al.*, 2012).

É comum observar-se em torno de núcleos de oligodendrócitos um halo claro, resultante da entrada de água na célula por anóxia (como durante o processo agônico). O fenômeno, conhecido como tumefação aguda da oligodendroglia, é apenas um artefato, mas tem utilidade em facilitar a identificação deste tipo de célula em cortes de parafina. A necrose do SNC é denominada malácia, se processa por liquefação e os macrófagos espumosos que caracterizam a remoção de detritos do SNC são denominados células gitter. Estas células surgem na área de infarto em cerca de 24 horas após o evento de lesão, sendo que um terço delas surgem a partir da microglia (pré-existente) e o restante dos monócitos do sangue e estão presentes tanto no córtex como na substância branca (LU *et al.*, 2011). A tumefação e proliferação das células endoteliais dos capilares cerebrais, muito evidente no infarto, é uma resposta do tecido à anóxia. Admite-se que isto ocorra porque no tecido submetido à anóxia as células liberem fatores angioproliferativos, como o VEGF (WEI *et al.*, 2012). Mais do que substituição de células, no SNC, torna-se evidente que as células-tronco exógenas agem como células bimodais, proporcionando um nicho favorável para neuroproteção e imunomodulação. Pesquisas tem demonstrado que a recuperação funcional é induzida, parcialmente, pela modulação das atividades fagocitárias da microglia (DERECKI *et al.*, 2012). Diferentes tipos de células possuem propriedades fagocíticas intrínsecas, que podem contribuir para seus efeitos benéficos no cérebro acometido (TSO *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2011).

A redução da área de infarto pode estar relacionada à neurogênese e ativação astrocitária ocasionada pela proliferação de células-tronco e progenitoras neurais endógenas na zona subventricular quando são administradas CTM e têm ação direta na diferenciação neural após o transplante que migra para o SNC a um número limitado de células (KOPEN *et al.*, 1999). Além disso, as CTM promovem a plasticidade de neurônios danificados e ativam as células gliais que secretam neurotrofinas, tais como BDNF, GDNF e NGF (LI *et al.*, 2005). Recentes experimentos revelam que componentes da matriz extracelular derivados das CTM podem melhorar o reparo do sistema nervoso (MALTMAN *et al.*, 2011). A fibronectina exerce proeminentemente ação para a sobrevivência neuronal e moléculas de adesão celular como a selectina, integrina e caderina promovem o crescimento axonal e melhoram as conexões sinápticas (PASTERKAMP e GIGER, 2009). O aumento da produção de NGF, BDNF e NT-3 induzido pelas CTM induz a ativação da via de Akt, que diminui a clivagem da caspase-3 impedindo ou reduzindo o desencadeamento da apoptose dos neurônios

(PIERCHALA *et al.*, 2004). A expressão de Akt na presença das CTM é significativa a partir do segundo dia da lesão isquêmica e retornando aos níveis basais no oitavo dia com redução da clivagem da caspase-3 e, nesse período, ocorre intensa inibição da apoptose (KIM *et al.*, 2010).

Nos grupos tratados com CTM não houve aumento significativo da área de infarto ao longo do tempo, mas a pequena diferença na redução da expansão do infarto nos grupos tratados 15 e 30 dias deve-se pelo aumento do número de células da glia. É certo que as CTM tenham algum tipo de ação por 15 ou 30 dias após a aplicação. Lee *et al.* (2009) verificaram a redistribuição das CTM de acordo com o tempo após a administração intravenosa e observaram que as células inicialmente aprisionadas nos pulmões desapareceram em 24 horas. Estas células não apareceram em número significativo em seis outros órgãos, sendo que apenas 0,04% delas foram recuperadas após 48 horas e 0,01% após 96 horas. Concluíram que as CTM sofrem processo de apoptose sobrevivendo poucas horas após o transplante.

A reparação do tecido nervoso pós-lesão é sempre realizada por substituição do tecido por uma cicatriz glial ou por uma cavidade cística. Os neurônios danificados não são repostos; em seu lugar, forma-se uma cicatriz glial constituída por processos astrocitários ricos em filamentos de GFAP. Alternativamente, quando a lesão compreende uma área de malácia, pode-se formar uma cavidade cística (lesão residual). Portanto, infartos antigos maiores, a partir de certo diâmetro, são císticos, com gliose na parede. Os menores mostram somente perda de neurônios e gliose, sem formar cavidade. O tratamento com CTM 24 horas após a isquemia demonstra diminuição da espessura de gliose tecidual (cicatriz astrocítica) em torno da lesão isquêmica (LI *et al.*, 2005). Estudos anteriores têm demonstrado que estas células migram para a periferia da lesão isquêmica e liberam uma grande variedade de fatores que acelerarão a restauração do tecido lesado (CHOPP e LI, 2002).

Portanto, os resultados demonstram que essas células podem ter proporcionado suporte trófico para os neurônios vulneráveis, particularmente na área de penumbra, e ações antiinflamatórias com redução do edema neuronal, poupando assim o tecido. Também, de acordo com Honmou *et al.* (2012), com o tempo as CTM podem induzir a neovascularização, estabilização vascular e remodelação da barreira hemato-encefálica, protegendo, assim, o tecido do SNC e limitando o edema cerebral. Como as células transplantadas sobrevivem, em maior número, apenas poucas horas, estas ações podem estar reduzidas propiciando aumento da lesão isquêmica ao longo do tempo, ou sua

estabilização como observado até os 30 dias. Talvez, sessões seriadas de injeções de CTM possam proporcionar novos estímulos, contribuindo para a redução da área de isquemia.

5 CONCLUSÃO

No acidente vascular encefálico isquêmico induzido em ratos, as avaliações realizadas demonstram que a infusão intravenosa de CTM promoveu redução da expansão da área de lesão isquêmica, atenuando a reatividade dos astrócitos e a ativação da micróglia, além de exibir capacidade em estimular a ativação de células-tronco neurais endógenas no local da lesão. Como as CTM infundidas não foram encontradas no local da lesão, sugerimos que o efeito terapêutico dessas células ocorra, também, por mecanismo sistêmico à distância por fatores atenuadores da resposta imune.

6 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV-BIOAGRO), Hospital Veterinário e Biotério da Educação Física, todos da Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Morfologia da Universidade Federal de São João Del Rei pelo apoio técnico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHE, C.; WAINWRIGHT, B. Pathways to improving skin regeneration. **Exp. Rev. Mol. Med.** 23;7(20):1-14, 2005.

ARAÚJO, M.R. Avaliação histológica e imunofluorescente da lesão compressiva na medula espinhal de ratos wistar tratados com células-tronco mesenquimais. 34f. Dissertação (mestrado) - Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, 2013.

AZARNOUSH, K.; MAUREL, A.; SEBBAH, L.; CARRION, C.; BISSERY, A.; MANDET, C.; POULY, J., BRUNÉVAL, P.; HAGÈGE, A.A.; MENASCHÉ, P. Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1alpha. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 130(1):173-9, 2005.

BACIGALUPPI, M.; PLUCHINO, S.; PERUZZOTTI-JAMETTI, L.; KILIC, E.; KILIC, U.; SALANI, G.; BRAMBILLA, E.; Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. **Brain** 132:2239-2251, 2009.

BORLONGAN, C.V.; HADMAN, M.; SANBERG, C.D.; SANBERG, P.R. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. **Stroke** 35:2385-2389, 2004.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX Jr, C.S.; ARONOWSKI, J. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 30:140-149, 2010.

CALLONI, R.L.; WINKLER, B.C.; RICCI, G.; POLETTI, M.G.; HOMERO, W.M.; SERAFINI, E.P.; CORLETA, O.C. Transient middle cerebral artery occlusion in rats as an experimental model of brain ischemia. **Acta Cir. Bras.** 25: 428-433, 2010.

CAMARGO, E.C.; BACHESCHI, L.A.; MASSARO, A.R. Stroke in Latin America. **Neuroimaging Clin. N. Am.** 15(2):283-96, 2005.

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

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LU, D.; LU, M.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Stroke** 32:1005–11, 2001.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.** 1(2):92-100, 2002.

DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 62(2):127-36, 2003.

DERECKI, N.C.; CRONK, J.C.; LU, Z.; XU, E.; ABBOTT, S.B.; GUYENET, P.G.; KIPNIS, J. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. **Nature** 484(7392):105-109, 2012.

DETANTE, O.; MOISAN, A.; DIMASTROMATTEO, J.; RICHARD, M.J.; Intravenous administration of 99mTc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution. **Cell Transplant.** 18:1369-1379, 2009.

FEIGIN, V.L. Stroke epidemiology in the developing world. **Lancet** 365(9478):2160-61, 2005.

GAO, J.; DENNIS, J.E.; MUZIC, R.F.; LUNDBERG, M.; CAPLAN, A.I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissue Organs** 169:12-20, 2001.

HANKEY, G.J. Stroke prediction and prevention by carotid endarterectomy: keep an eye on the doughnut and not just the hole. **Cerebrovasc. Dis.** 9(6):345-50, 1999.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood** 102:3483-3493, 2003.

HONMOU, O.; ONODERA, R.; SASAKI, M.; WAXMAN, S.G.; KOCSIS, J.D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. **Trends Mol. Med.** 18(5):292-297, 2012.

IHOSHII, S.; HONMOU, O.; HOUKIN, K.; HASHI, K.; KOCSIS, J.D. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. **Brain Res.** 8(1-2):1-9, 2004.

KAN, I.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Integral therapeutic potential of bone marrow. **Neurol.** 1(2):92-100, 2005.

KARP, J.M.; LENG TEO, G.S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Stem Cells** 6,4(3):206-216, 2009.

KEIMPEMA, E.; FOKKENS, M.R.; NAGY, Z.; AGOSTON, V.; LUITEN, P.G.; NYAKAS, C.; BODDEKE H.W.; COPRAY, J.C. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 35(1):89-102, 2009.

KIM, S.S.; YOO, S.W.; PARK, T.S.; AHN, S.C.; JEONG, H.S.; KIM, J.W.; CHANG, D.Y.; CHO, K.G.; KIM, S.U.; HUH, Y.; LEE J.E.; LEE, S.Y.; LEE, Y.D.; SUH-KIM, H. Neural induction with neurogenin1 increases the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in the ischemic brain. **Stem Cells** 26:2217-28, 2008.

KIM, H.J.; LEE, J.H.; KIM, S.H. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. **J. Neurotrauma** 27(1):131-8, 2010.

KOPEN, G.C.; PROCKOP, D.J.; PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:10711-6, 1999.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N. Engl. J. Med.** 349(6):570-82, 2003.

KUROZUMI, K.; NAKAMURA, K.; TAMIYA, T. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Mol. Ther.** 9:189-197, 2004.

LAINING, R.J.; JAKUBOWSKI, J.; LAINING, R.W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? **Stroke** 24(2):294-97, 1993.

LEE, R.H.; PULIN, A.A.; SEO, M.J.; KOTA, D.J.; YLOSTALO, J.; LARSON, B.L.; SEMPRUN-PRIETO, L.; DELAFONTAINE, P.; PROCKOP, D.J. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. **Cell Stem Cell.** 5(1):54-63, 2009.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.** 7:678–689, 2007.

LI, Y.; CHEN, J.; CHEN, X.G.; WANG, L.; GAUTAM, S.C.; XU, Y.X.; KATALOWSKI, M.; ZHANG L.J.; LU, M.; JANAKIRAMAN, N.; CHOPP, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. **Neurology** 59:514-23, 2002.

LONGA, E.Z.; WEINSTEIN, P.R.; CARLSON, S.; CUMMINS, R. Reversible middle cerebral-artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke** 20:84-91, 1989.

LU, P.; JONES, L.L.; TUSZYNSKI, M.H. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. **Exp. Neurol.** 191:344-360, 2005.

LU, Z.; ELLIOTT, M.R.; CHEN, Y.; WALSH, J.T.; KLIBANOV, A.L.; RAVICHANDRAN, K.S.; KIPNIS, J. Phagocytic activity of neuronal progenitors regulates adult neurogenesis. **Nat. Cell Biol.** 13(9):1076-1083, 2011.

MALTMAN, D.J.; HARDY, S.A.; PRZYBORSKI, S.A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochem. Int.** 59:347-56, 2011.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Front. Biosci.** 14:4281-4298, 2009.

MENZIES, S.A.; HOFF, J.T.; BETZ, A.L. Middle cerebral-artery occlusion in rats - A neurological and pathological evaluation of a reproducible model. **Neurosurgery** (31):100-106, 1992.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis.** 19(3-4):151-67, 2004.

MINELLI, C.; FEN, L.F.; MINELLI, D.P. Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matão, Brazil: a population-based prospective study. **Stroke** 38(11):2906-11, 2007.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33(8):881-7, 2000.

MODO, M.; STROEMER, R.P.; TANG, E.; VEIZOVIC, T.; SOWNISKI, P.; HODGES, H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. **J. Neurosci. Methods** 104: 99-109, 2000.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural** 40:238-245, 2010.

MONTEIRO, B.S.; DEL CARLO, R.J.; ARGOLO N.M.; NARDI, N.B.; CHEGASTELLES, P.C.; CARVALHO, P.H.; BONFÁ, L.P.; FILGUEIRAS, R.R.; REIS, A.M.S. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 84:841-851, 2012.

MUNTNER, P.; GARRET, E.; KLAG, M.J.; CORESH, J. Trends in stroke prevalence between 1973 and 1991 in the US population 25 to 74 years of age. **Stroke** 33(5):1209-13, 2002.

MUSCHLER, G.F.; NAKAMOTO, C.; GRIFFITH, L.G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. **J. Bone Joint Surg.** 86-A:1541–1558, 2004.

OMORI, Y.; HONMOU, O.; HARADA, K.; SUZUKI, J.; HOUKIN, K.; KOCSIS, J.D. Optimization of a therapeutic protocol for intravenous injection of human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia in adult rats. **Brain Res.** 1236:30–38, 2008.

PASTERKAMP, R.J.; GIGER, R.J. Semaphorin function in neural plasticity and disease. **Curr. Opin. Neurobiol.** 19:263–274, 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in the Stereotaxic Coordinates. Compact 3rd ed. CD-Rom. Academic Press, San Diego, 1997.

PHINNEY, D.G., ISAKOVA, I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. **Curr. Pharm. Des.** 11(10):1255-65, 2005.

PIERCHALA, B.A.; AHRENS, R.C.; PADEN, A.J.; JOHNSON, E.M. Nerve growth factor promotes the survival of sympathetic neurons through the cooperative function of

the protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. **J. Biol. Chem.** 279:27986–27993, 2004.

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

QUERTAINMONT, R.; CANTINIEAUX, D.; BOTMAN, O.; SID, S.; SCHOENEN, J.; FRANZEN, R. Mesenchymal Stem Cell Graft Improves Recovery after Spinal Cord Injury in Adult Rats through Neurotrophic and Pro-Angiogenic Actions. **Plos One** 7(6):e39500, 2012.

RASULOV, M.F.; VASILCHENKOV, A.V.; ONISHCHENKO, N.A.; KRASHENINNIKOV, M.E.; KRAVCHENKO, V.I.; GORSHENIN, T.L.; PIDTSAN, R.E.; POTATOV, I.V. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. **Bull. Exp. Biol. Med.** 139(1):141-4, 2005.

SACKSTEIN, R.; MERZABAN, J.S.; CAIN, D.W.; DAGIA, N.M.; SPENCER, J.A.; LIN, C.P.; WOHLGEMUTH, R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. **Nat. Med.** 14:181–187, 2008.

SHALAK, L.; PERLMAN, J.M. Hypoxic-ischemic brain injury in the term infant-current concepts. **Early Human Development** 80:125-141, 2004.

SEO, J.H.; CHO, S.R. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. **Yonsei Med. J.** 53(6):1059-67, 2012.

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

STRBIAN, D.; DURUKAN, A.; PITKONEN, M.; MARINKOVIC, I.; TATLISUMAK, E.; PEDRONO, E.; ABO-RAMADAN, U.; TATLISUMAK, T. The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. **Neuroscience** 153(1):175-81, 2008.

TSO, G.H.; LAW, H.K.; TU, W.; CHAN, G.C.; LAU, Y.L. Phagocytosis of apoptotic cells modulates mesenchymal stem cells osteogenic differentiation to enhance IL-17 and RANKL expression on CD4⁺ T cells. **Stem Cells** 28(5):939-954, 2010.

UCCELLI, A.; BENVENUTO, F.; LARONI, A.; GIUNTI, D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.** 24(1):59-64, 2011.

VASCONCELOS DOS SANTOS, A.; CASTRO, P.H.R.; SOUZA, S.A.L.; SILVA, J.C.; RAMOS, A.B.; FREITAS, G.R.; FONSECA, L.M.B.; GUTFILEN, B.; MENDEZ-OTERO, R. Intravenous and intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells after focal cerebral ischemia: is there a difference in biodistribution and efficacy? **Stem Cell Research** 9:1-8, 2012.

WEI, Y.; YEMISCI, M.; KIM, H.H.; YUNG, L.M.; SHIN, H.K.; HWANG, S.K.; GUO, S.; QIN, T.; ALSHARIF, N.; BRINKMANN, V.; LIAO, J.K.; LO, E.H.; WAEBER, C. Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia. **Ann. Neurol.** 69(1):119-129, 2011.

WEI, L.; FRASER, J.L.; LU, Z.Y.; HU, X.; YU, S.P. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Neurobiol. Dis.** 46(3):635-45, 2012.

WHITAKER, V.R.; CUI, L.; MILLER, S.; YU, S.P.; WEI, L. Whisker stimulation enhances angiogenesis in the barrel cortex following focal ischemia in mice. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** 27(1):57-68, 2007.

WU, J.; SUN, Z.; SUN, H.S.; WU, J.; WEISEL, R.D.; KEATING, A.; LI, Z.H.; FENG, Z.P.; LI, R.K. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. **Cell Transplant.** 16:993-1005, 2008.

WYATT, J.S.; EDWARDS, A.D.; AZZOPARDI, D.; REYNOLDS, E.O.R. Magnetic resonance and near infrared spectroscopy for investigation of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. **Arch. Dis. Child.** 64:953-63, 1989.

ZACHAREK, A.; SHEHADAH, A.; CHEN, J.; CUI, X.; ROBERTS, C.; LU, M.; CHOPP, M. Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment. **Stroke** 41(3):524-30, 2010.