

EFEITO DO TRANSPLANTE COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS E MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NA  
NEUROPLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES CÓRTICO-CORTICAIS E  
CÓRTICO-ESTRIATAIS APÓS LESÃO CORTICAL AGUDA E  
CRÔNICA

**MARIA DE FÁTIMA DOS SANTOS SAMPAIO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL - 2018

EFEITO DO TRANSPLANTE COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS E MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NA  
NEUROPLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES CÓRTICO-CORTICAIS E  
CÓRTICO-ESTRIATAIS APÓS LESÃO CORTICAL AGUDA E  
CRÔNICA

**MARIA DE FÁTIMA DOS SANTOS SAMPAIO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.”

Orientador: Prof. Arthur Giraldi Guimarães  
Coorientador: Prof. Norberto Cysne Coimbra

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
ABRIL – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biotecnologia e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

744 / 2018

Sampaio, Maria de Fátima dos Santos

Efeito do transplante com células-tronco mesenquimais e mononucleares de medula óssea na neuroplasticidade das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais após lesão cortical aguda e crônica / Maria de Fátima dos Santos Sampaio. -- Campos dos Goytacazes, 2018.

xiv, 93 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biotecnologia e Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: Guimarães, Arthur Giraldi

Bibliografia: f. 75-93

1. Células-tronco mesenquimais 2. Células mononucleares de medula óssea 3. Plasticidade neocortical 4. Ablação cortical 5. Isquemia cortical

I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

II. Título

573.86

S192e

EFEITO DO TRANSPLANTE COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS E MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA NA  
NEUROPLASTICIDADE DAS PROJEÇÕES CÓRTICO-CORTICAIS E  
CÓRTICO-ESTRIATAIS APÓS LESÃO CORTICAL AGUDA E  
CRÔNICA

**MARIA DE FÁTIMA DOS SANTOS SAMPAIO**

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.”

Aprovada em 19 de abril de 2018.

Comissão Examinadora:

*Marinete P. Carrera*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marinete Pinheiro Carrera (D.Sc., Psicobiologia) – UENF

*Amélia Miranda Gomes Rodrigues*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Amélia Miranda Gomes Rodrigues (D.Sc., Biociências e Biotecnologia)

FMC

*Ana Bárbara Freitas Rodrigues Godinho*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Bárbara Freitas Rodrigues Godinho (D.Sc., Ciência Animal) –  
UENF

*Norberto Cysne Coimbra*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra (D.Sc., Morfologia-Biologia Celular) – FMRP/USP  
(Coorientador)

*Arthur Giraldo Guimarães*

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Arthur Giraldo Guimarães (D.Sc., Ciências Biológicas/Biofísica) – UENF  
(Orientador)

“Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.  
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.  
Não viva de fotografias amareladas...  
Continue, enquanto todos esperam que desista.  
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.  
Faça com que, ao invés de pena, tenham respeito por você.  
Quando não conseguir correr atrás dos anos, trote.  
Quando não conseguir trotar, caminhe.  
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.  
Mas, nunca se detenha!”

**Madre Teresa de Calcutá**

Dedico aos meus queridos pais, Elza e Juerce e a minha inesquecível avó  
Leôncia Sampaio (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser Ele o responsável por esta conquista, pois me concedeu sabedoria, saúde, coragem e determinação para concretizar este objetivo. E a Nossa Senhora de Fátima, pela proteção e presença em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais, Elza e Juerce, por serem exemplos de luta, de caráter, de coragem e pelo amor incondicional.

A toda minha família, que muito contribuiu para conclusão deste objetivo; em especial à minha irmã Cláudia Márcia, por ter me ajudado a cumprir todas as etapas e vencer todo o cansaço físico e mental.

A Conceição Tinoco, “a mãe com que a vida me presenteou”, pelo seu sorriso irradiante, pelo apoio e incentivo incondicionais em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Messias Gonzaga Pereira, por ter cedido muito mais que o laboratório para as análises moleculares. Por sua amizade, seu precioso tempo na transmissão de conhecimentos e orientações e por, principalmente, ajudar-me a vencer os obstáculos e seguir em frente. Muito obrigada pelo importante e imprescindível apoio.

Ao orientador, Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães, pela oportunidade concedida para desenvolver este projeto, pela inspiração sobre o tema e orientação.

Ao coorientador, Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, por me ter acolhido em seu laboratório e ter transmitido muito mais que conhecimentos neurocientíficos. Pela confiança em mim depositada, pela orientação, paciência e por estar presente em todos os momentos que dele mais precisei.

À Profa. Dra Sílvia Menezes Pereira, que prontamente aceitou o convite para ser revisora desta tese e auxiliou na conclusão deste trabalho.

À Dra. Marcela Santana Bastos Boechat que, com toda competência e profissionalismo, colaborou na execução dos procedimentos moleculares, sendo incansável na repetição de protocolos a fim de chegar à perfeição requerida.

Ao companheiro de laboratório, Igor Augusto Gusman Cunha, pela colaboração no cultivo de células e pelas agradáveis e enriquecedoras discussões científicas.

Aos técnicos da FMRP/USP, Daoud Hibráhim Elias Filho e Roberta Ribeiro Costa Rosales, e ao pós-doutorando Rui Milton Patrício Júnior, pelas dicas, auxílio e contribuição técnica que foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Mendonça Vieira, pelo grande auxílio nas análises estatísticas e por ter ampliado relevantemente o meu conhecimento em estatística.

À Profa. Dra. Telma Nair Santana Pereira, por ter facilitado o desenvolvimento de alguns procedimentos experimentais.

À Profa. Dra. Marinete Pinheiro Carrera e ao Prof. Dr. Pedro Amorim Berbert, por serem pessoas muito especiais, que estão sempre colaborando e participando de minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Almy Júnior Cordeiro de Carvalho, por ser um excelente chefe, por me ter incentivado, compreendido e permitido que eu cursasse o doutorado.

Aos meus grandes amigos e companheiros de trabalho, Ana Lúcia Paes Barbosa, José Daniel de Almeida, Patrícia Laurindo e Jacielle Miranda Almeida. A esses, não conseguirei agradecer como merecem! Contribuíram, de maneira incansável, para que eu pudesse atingir este objetivo, principalmente com trabalho, carinho, amizade e diversão.

Aos meus grandes amigos, Luciana Tavares Nogueira, Marinaldo Borges de Oliveira e Vângela Maria Soares, pela amizade, incentivo e carinho!

Às Secretárias da Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, Beatriz Moraes e Marlene Flauzindo, pela competência e profissionalismo exemplares, pela amizade, pela paciência, pelo apoio constante e imprescindível.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação, Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha que em todos os momentos esteve disponível, com paciência e profissionalismo.

A toda equipe de profissionais do LBCT e do Biotério: Adriana Martins, Beatriz Ribeiro, Darly Grativol, Giovana Moraes, Rosemary Maciel, Márcia Adriana Carvalho, Luciana Timóteo, Maria Joana Atayde, Maurício de Oliveira Athayde, Paulo Sérgio Lopes, Ângela Vieira e Marinete Martins.

A UENF pelo apoio.

Aos meus guerreiros ratinhos, que deram suas vidas em toca de conhecimento à humanidade!



## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xii
RESUMO.....	xiii
<i>ABSTRACT</i> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1.O Córtex Cerebral: estrutura e funções.....	1
1.1.1. O Neocórtex.....	4
1.1.2. O córtex motor primário.....	7
1.2. Lesões Corticais.....	12
1.3. Neuroplasticidade.....	14
1.4. Brotamento axônico.....	16
1.4.1 Brotamento axônico após lesões neurológicas: contribuições experimentais.....	20
1.4.1.1. <i>Ferramentas moleculares</i> .....	20
1.4.1.2. <i>Optogenética</i> .....	22
1.4.1.3. <i>Treinamento motor induzido</i> .....	23
1.4.1.4. <i>Tratamento farmacológico</i> .....	24
1.5. Terapia Celular em doenças neurológicas.....	25
1.5.1. Aplicações de MSC e MNMO .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1. Animais .....	33
3.2. Cirurgias Estereotáxicas.....	33

3.3. Obtenção e transplante de MSC e MNMO.....	34
3.4. Reação histoquímica com cloreto de trifetil tetrazólio .....	35
3.5. Desenho Experimental .....	36
3.6. Microinjeção de neurotraçador anterógrado <i>in vivo</i> .....	41
3.7. Análises histológicas.....	41
3.8. Teste comportamental motor .....	42
3.9. Análise dos dados .....	43
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
4.1. Caracterização da lesão cortical.....	45
4.2. Aspectos morfológicos das células extraídas da medula óssea até a 4ª passagem.....	46
4.3. Confirmação histológica dos sítios de microinjeção.....	47
4.4. Distribuição de corpos neurônicos e eferências axônicas em neocórtex.....	48
4.5. Análise quantitativa das projeções córtico-corticais e córtico estriatais de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais, tratados com MNMO em fase aguda.....	57
4.6. Análise quantitativa das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais, tratados com MNMO e MSC em fase crônica.....	59
4.7. Efeito do tratamento endovenoso de MNMO e MSC no desempenho funcional motor causado por diferentes lesões neocorticais em ratos Wistar submetidos ao teste do cilindro.....	62
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
5.1. Efeito do tratamento endovenoso com MNMO nas reconexões córtico-corticais e córtico-estriatais em ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais em fase aguda.....	66
5.2. Efeito do tratamento endovenoso com MNMO e MSC nas reconexões córtico-corticais e córtico-estriatais e no desempenho funcional motor em ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais em fase crônica.....	68
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>

## Lista de Abreviaturas

- ACM - Artéria cerebral média
- AMS - Área motora suplementar
- APM - Área pré-motora
- AVE - Acidente vascular encefálico
- BDA - Amino-dextrana biotinizada (do inglês *biotinylated dextran amine*)
- BHE - Barreira hematoencefálica
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*)
- DPL - Dia pós-lesão
- EPM - Erro padrão da média
- ESC - Células-tronco embrionárias (do inglês *embryonic stem cells*)
- Fr - Isocórtex frontal
- GAP-43 - Proteína associada ao crescimento-43 (do inglês *growth-associated protein-43*)
- GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia (do inglês: *glial cell derived neurotrophic factor*)
- HGF - Fator de crescimento de hepatócitos
- iNSCs - Células-tronco neurais induzidas (do inglês *induced neural stem cells*)
- iPSC - Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cell*)
- M1 - Área motora primária
- MNMO – Células mononucleares de medula óssea
- MSC - Células-tronco mesenquimais (do inglês *mesenchymal stem cells*)
- NSC - Células tronco neurais (do inglês *neural stem cells*)
- NGF - Fator de crescimento neural (do inglês: *neural growth factor*)
- OACM - Oclusão da artéria cerebral média
- rTPA - Ativador do plasminogênio recombinante
- S2 - Córtex somato-sensorial secundário
- SNC - Sistema Nervoso Central
- TCE - Traumatismo cranio-encefálico

TTC – Cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio

VEGF - Fator de crescimento de endotélio vascular (do inglês, *vascular endothelial growth factor*)

## Lista de Figuras

Figura 1 - Ilustração representativa da divisão do córtex cerebral (componentes corticais) baseada em aspectos filogenéticos.....	3
Figura 2 - Ilustração representativa das fibras descendentes com origem cortical e subcortical.....	4
Figura 3 - Ilustração representativa das fibras de associação, comissurais e de projeção. ....	5
Figura 4 - Neurônios de projeção e de associação do neocórtex.....	6
Figura 5 - Representação do córtex motor a principal estrutura do controle motor pelo córtex cerebral.....	8
Figura 6 - Representação de áreas do córtex de roedores.....	9
Figura 7 - Trato córtico-espinais com suas subdivisões anterior e lateral no seu trajeto para a medula espinal.....	11
Figura 8 - Padrões de brotamento axônico após AVE.....	19
Figura 9 - Representação esquemática dos possíveis efeitos neuroprotetores e neurorestaurativos de células-tronco mesequimais (MSC). ....	30
Figura 10 - Desenhos representativos do experimento em fase aguda.....	38
Figura 11 - Desenhos representativos do experimento em fase crônica.....	40
Figura 12 - Imagem do teste do Cilindro.....	43
Figura 13 - Representação da técnica de neurotraçamento.....	44
Figura 14 - Extensão da lesão isquêmica induzida por termocoagulação e da lesão por ablação cortical.....	45
Figura 15 - Aspectos morfológicos das células extraídas da medula óssea até a 4ª passagem.....	46
Figura 16 - Representação esquemática dos sítios confirmados histologicamente de microinjeção do neurotraçador anterógrado no córtex motor primário (M1).....	47

Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar “NAÏVE”, submetidos à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran no neocórtex.....	49
Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar “ABL CONT”, submetidos à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran no neocórtex. ....	51
Figura 19 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ABL MNMO”, no neocórtex.....	52
Figura 20 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ISQ CONT” .....	54
Figura 21 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ISQ MNMO”, no neocórtex contralateral à lesão.....	56
Figura 22 - Efeito de diferentes lesões encefálicas no numero de fibras axônicas de projeções córtico-corticais e córtico-estriatais em fase aguda.....	58
Figura 23 - Efeito de diferentes lesões encefálicas no numero de fibras axônicas de projeções córtico-corticais e córtico-estriatais em fase crônica.....	61
Figura 24 - Efeito do tratamento endovenoso de MNMO e MSC no desempenho funcional motor causado por diferentes lesões corticais de ratos Wistar submetidos ao teste do cilindro.....	64

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Grupos experimentais.....	37
Tabela 2: Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais da fase aguda .....	59
Tabela 3: Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais da fase crônica .....	62
Tabela 4: Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais no teste do cilindro.....	65

## RESUMO

SAMPAIO, M. F.S.; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2018. **Efeito do transplante com células-tronco mesenquimais e mononucleares de medula óssea na neuroplasticidade das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais após lesão cortical aguda e crônica.** Orientador: Prof. Dr. Arthur Giraldo Guimarães. Coorientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra.

Células-tronco mesenquimais (MSC) e mononucleares de medula óssea (MNMO) têm sido identificadas como uma estratégia terapêutica de relevância para o tratamento de várias doenças do sistema nervoso central. Usando dois modelos experimentais de lesão cerebral (termocoagulação e ablação cortical sensório-motora), o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento endovenoso das MSC e MNMO na reconexão das vias córtico-corticais e córtico-estriatais e no comportamento motor de ratos Wistar adultos lesados, em fase aguda e crônica. Nos experimentos de fase aguda, no mesmo dia da lesão cortical o traçador anterógrado foi injetado no córtex motor primário dos animais experimentais e oito dias depois foram eutanasiados e submetidos às análises morfológicas e histológicas. Em fase crônica, os grupos experimentais tiveram seu desempenho motor avaliado pelo teste do cilindro no quinquagésimo sexto dia após as lesões cerebrais e, no sexagésimo dia, um neurotraçador foi injetado para análises das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais. A análise quantitativa e qualitativa das fibras axonais marcadas por um neurotraçador anterógrado (Amino Biodextran) foi realizada enfatizando as áreas corticais ao redor da lesão e nos núcleos basais. Experimentos de fase aguda mostraram que animais isquêmicos (controles e tratados) tenderam a responder melhor à recuperação de fibras axônicas que constituem as projeções córtico-corticais e córtico-estriatais. No entanto, o transplante de células MNMO em ratos Wistar submetidos à ablação resultou em redução de fibras axônicas em córtex ipsilateral e no neoestriado, ipsilaterais e contralaterais à lesão. Em fase crônica, aparentemente as fibras axônicas e os contatos sinápticos mostraram uma reorganização para permitir uma reconexão com áreas danificadas, sugerindo que esse fenômeno de neuroplasticidade é ativado para minimizar déficits neurais causados pelas lesões



encefálicas. Houve uma tendência à recuperação das fibras axônicas nas camadas corticais adjacentes à lesão, tanto nos ratos isquêmicos quanto nos submetidos à ablação tratados com MSC e MNMO. Animais isquêmicos tratados com MNMO mostraram um aumento significativo no número de fibras axônicas no neocórtico contralateral à área cortical lesada, em comparação com roedores não tratados. A maioria dos grupos experimentais mostrou uma alta taxa de assimetria no segundo dia após as lesões cerebrais, sugerindo uma perda de função devido à isquemia neocortical ou ablação. No 56º dia após as lesões corticais, houve melhora significativa do desempenho motor apresentado pelos ratos Wistar previamente lesados no teste do cilindro, embora os animais submetidos à ablação cortical sem tratamento com MNMO não conseguissem demonstrar melhora funcional motora completa. Mecanismos moleculares e celulares intrínsecos ao tecido lesado e particularidades do microambiente neural podem mediar diferentes padrões de neuroplasticidade, facilitando ou inibindo o brotamento axônico, de acordo com cada situação específica requerida.

**Palavras-chaves:** Células-tronco mesenquimais, células mononucleares de medula óssea, plasticidade neocortical, ablação cortical, isquemia cortical, trato córtico-cortical, trato córtico-estriatal.

## ABSTRACT

SAMPAIO, M. F.S.; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; abril de 2018. **Effect of mesenchymal and mononuclear bone marrow cells transplantation on the neuroplasticity of cortico-cortical and cortico-striatal projections after acute and chronic cortical lesions.** Advisor: Dr. Arthur Giraldo Guimarães. Co-advisor: Dr. Norberto Cysne Coimbra.

*Mesenchymal stem cells (MSC) and bone marrow mononuclear cells (BMMC) have been identified as a therapeutic strategy of relevance for the treatment of various diseases of the central nervous system. The objective of this study was to evaluate the effects of endovenous treatment of MSC and BMMC on the reconnection of cortico-cortical and cortico-striatal pathways and the motor behavior of Wistar rats adults, both acute and chronic. In the acute phase experiments, on the same day of the cortical lesion, the anterograde tracer was injected into the primary motor cortex of the experimental animals and eight days later they were euthanized and submitted to morphological and histological analyzes. In the chronic phase, the experimental groups had their motor performance evaluated by the cylinder test on the 56th day after the brain lesions and, on the sixtieth day, a neurotracer was injected for analysis of the cortico-cortical and cortico-striatal projections. The quantitative and qualitative analysis of the axonal fibers marked by an anterograde neurotractor (Biodextran Amine) was performed emphasizing the cortical areas around the lesion and in the basal nuclei. Acute phase experiments showed that ischemic (control and treated) animals tended to respond better to the recovery of axonal fibers that constitute the cortico-cortical and cortico-striatal projections. However, transplantation of BMMC cells in Wistar rats submitted to ablation resulted in reduction of axonal fibers in the ipsilateral and ipsilateral cortex, ipsilateral and contralateral to the lesion. In the chronic phase, apparently the axon fibers and the synaptic contacts showed a reorganization to allow a reconnection with damaged areas, suggesting that this phenomenon of neuroplasticity is activated to minimize neural deficits caused by the brain lesions. There was a tendency for the recovery of the axonal fibers in the cortical layers adjacent to the lesion, both in the ischemic and ablated*

*rats treated with MSC and BMMC. Ischemic animals treated with BMMC showed a significant increase in the number of axonal fibers in the contralateral neocortex to the injured cortical area, compared to untreated rodents. Most experimental groups showed a high asymmetry rate on the second day after brain injury, suggesting a loss of function due to neocortical ischemia or ablation. On the 56th day after the cortical lesions, there was a significant improvement in the motor performance presented by the Wistar rats previously injured in the cylinder test, although the animals submitted to cortical ablation without BMMC treatment could not demonstrate complete motor functional improvement. Molecular and cellular mechanisms intrinsic to the damaged tissue and particularities of the neural microenvironment may mediate different patterns of neuroplasticity, facilitating or inhibiting axonal budding, according to each specific situation required.*

**Key words:** *Mesenchymal stem cells, bone marrow mononuclear cells, cortical plasticity, cortical ablation, cortical ischemia, cortico-cortical tract, cortico-striatal tract.*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O Córtex Cerebral: estrutura e funções

O Córtex cerebral é o responsável pelos movimentos voluntários, bem como pelas sensações, percepções, aprendizado, fala e cognição. Trata-se de uma estrutura complexa que, no início do século XX, teve suas áreas mapeadas e identificadas por números pelo neuroanatomista alemão Korbinian Brodmann (BEAR *et al.*, 2002).

Durante muito tempo, acreditou-se que o córtex cerebral humano fosse responsável apenas por funções mentais conscientes. Em meados do século XIX, o neurologista John Hughlings Jackson propôs, baseando-se em observações em seus pacientes que sofriam de crises epiléticas, que apenas uma parte específica do córtex anterior ao sulco central teria um papel importante no movimento. Essas observações se juntaram aos estudos contemporâneos sobre os déficits de linguagem derivados de lesões corticais específicas, de Pierre Paul Broca e Karl Wernicke, fortalecendo e incentivando os estudos científicos sobre a função cortical (KURCGANT e PEREIRA, 2003; HOGAN e KAIBORIBOON, 2004; KANDEL *et al.*, 2014).

Com os avanços da anestesia e das técnicas de assepsias cirúrgicas, o córtex cerebral de sujeitos vivos pôde ser estudado diretamente, sendo possível obter evidência experimental de quais regiões específicas do córtex cerebral estavam envolvidas em funções motoras (KANDEL *et al.*, 2014).

Investigações a partir de estimulação elétrica do cérebro foram de grande importância na história da neurociência e, apesar de muitos neurocientistas terem executado este método, mas, ainda de forma fragmentária e não conclusiva, em 1870, o trabalho pioneiro de mapeamento elétrico funcional do córtex cerebral foi realizado pelos alemães, Gustav Theodor Fritsch e Eduard Hitzig. Estes alemães realizaram experimentos de estimulação elétrica em córtex de diversos animais, mas, em especial nos cães (SABBATINI, 2004, GROSS, 2007).

Em 1874, um neurologista americano chamado Roberts Bartholow, realizou a primeira estimulação experimental em seres humanos. Expondo o córtex de um paciente que estava com erosão no crânio, estimulou dois pontos no córtex pré-frontal e

obteve como resposta movimentos dos membros contralaterais ao córtex estimulado. Mesmo com alguns resultados preliminares, até meados do século XIX, grande parte dos neurocientistas acreditava que o cérebro era insensível e inexcitável (SABBATINI, 2004; JULIUS-HARRIS. e ALMERIGI, 2009).

Com experimentos em animais, Fritsch e Hitzig obtiveram os mesmos resultados que Bartholow, quando este estimulou o córtex em seres humanos. No entanto, Fritsch e Hitzig conseguiram fazer um mapeamento mais fino da função motora cortical e por isso observaram que ao estimular o córtex superiormente ocorriam movimentos nos membros inferiores, ao passo que uma estimulação na parte inferior do córtex, os movimentos ocorriam nos membros superiores e nos músculos da face. Pode-se dizer que estes achados foi um dos mais importantes da história da neurociência, uma vez que deu início aos estudos da localização cerebral das funções (SABBATINI, 2004; GROSS, 2007).

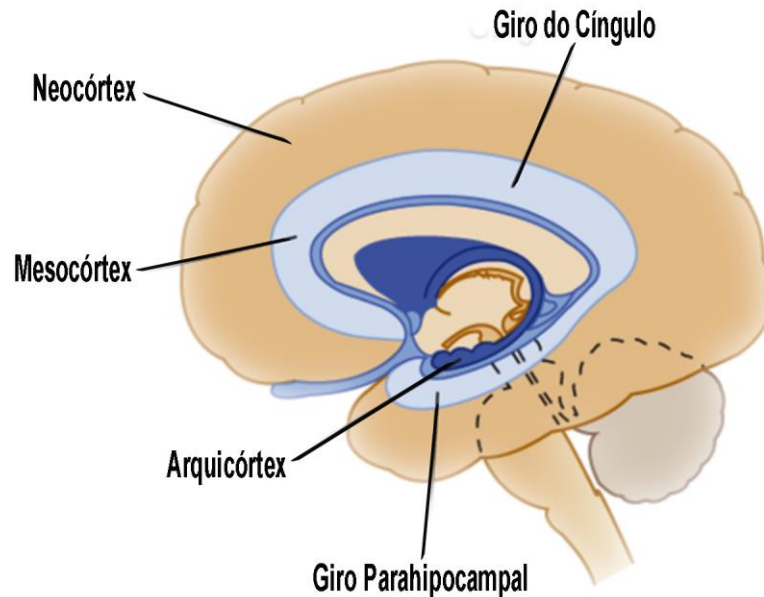
Por volta de 1875, inspirado nos experimentos de Fritsch e Hitzig, o médico inglês David Ferrier, com experimentos mais avançados e precisos estimulou o córtex de cães e de macacos, obtendo um mapeamento de 29 áreas. A partir da construção de uma metodologia básica de mapeamento cortical, Ferrier transpôs estes resultados com macacos para o córtex humano e isto foi de grande relevância visto que pode permitir aplicações médicas, especialmente à neurocirurgia (SABBATINI, 2004; GROSS, 2007, HOGAN e KAIBORIBOO, 2007).

Assim, a partir de experimentos de estimulação elétrica, iniciados em Berlim, por Fritsch e Hitzig, e também na Inglaterra por David Ferrier, sabe-se que a faixa motora contém um mapa motor ordenado do lado contralateral do corpo e que a integridade desse mapa é necessária para o controle voluntário das partes correspondentes a este corpo.

Adiante, na primeira metade do século XX, os estudos de Woolsey e colaboradores em várias espécies de mamíferos e de Penfield em pacientes humanos neurocirúrgicos, demonstraram que uma mesma organização topográfica geral é conservada entre muitas espécies (KANDEL *et al*, 2014).

Estudos de citoarquitetura sugerem que a superfície cerebral se desenvolveu conforme uma organização topográfica. Considerados os córtices mais antigos, o

arqueocórtex (hipocampo) e o paleocórtex (córtex piriforme ou olfatório) dos répteis primitivos originaram, ao seu redor, um córtex intermediário que, posteriormente, gerou um primeiro anel concêntrico constituído por um córtex mais diferenciado, com seis camadas. Este, ao se desenvolver, deu origem às estruturas para-hipocampais da face medial dos hemisférios (giro paraterminal, giro paraolfatório, giro do cíngulo e giro parahipocampal) e o córtex insular, lateralmente (figura 1). Em seguida, em cada hemisfério se desenvolveu outro anel lateral (constituído pelo neocórtex mais diferenciado), que originou as áreas corticais paralímbicas e parainsulares compostas pelos córtices especializados (córtex motor, sensitivo, auditivo e visual) (WILLIAMS & WARWICK, 1980; MACHADO, 2000; RIBAS, 2006).

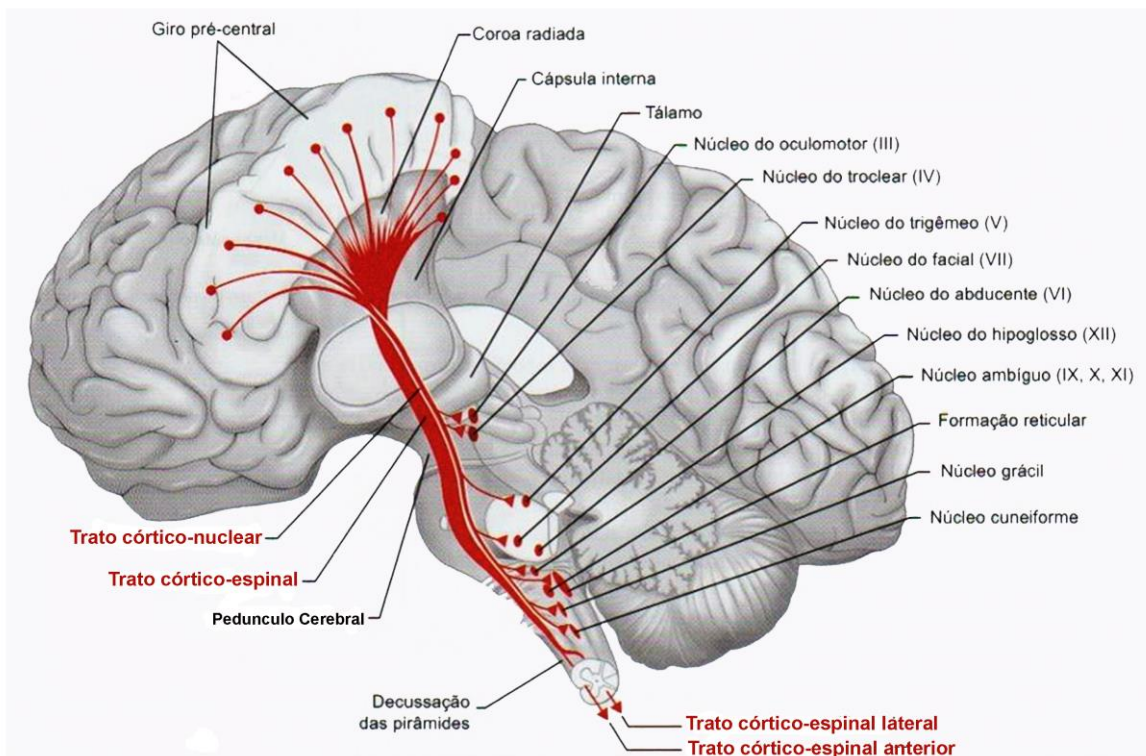


**Figura 1 - Ilustração representativa da divisão do córtex cerebral (componentes corticais) baseada em aspectos filogenéticos.** Giro do Cíngulo (mesocórtex), Giro Parahipocampal (paleocórtex), Hipocampo (arquicórtex), Área pré-frontal (neocórtex). Adaptado de Waxman, 2013.

### 1.1.1. O Neocórtex

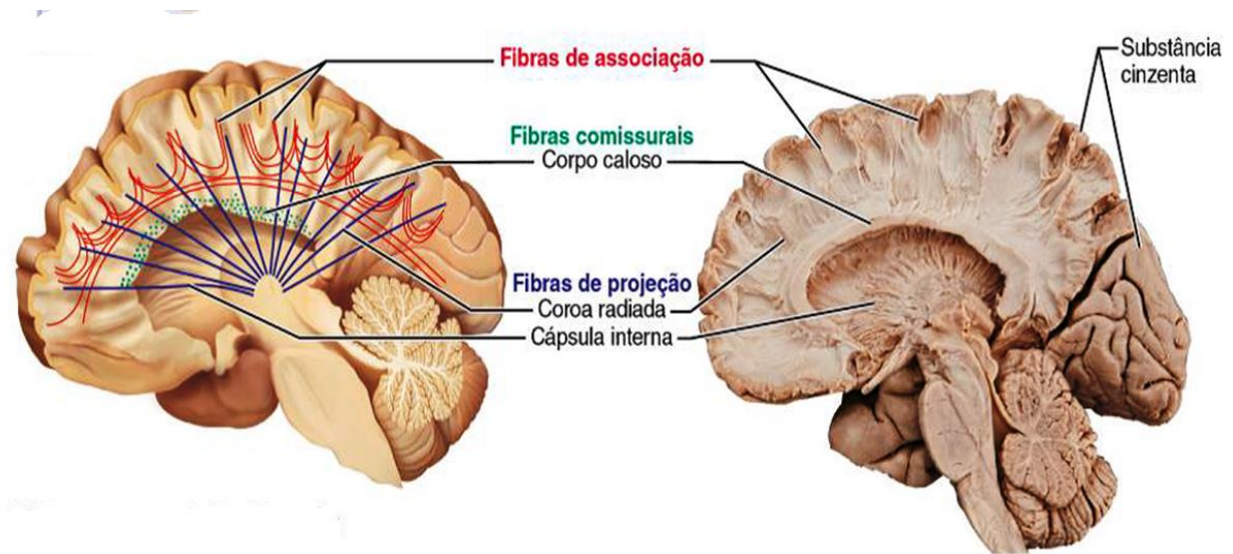
Em termos evolucionários, o neocórtex é a estrutura mais nova do cérebro, sendo bem desenvolvida apenas em mamíferos. Contém, aproximadamente, dez bilhões de neurônios e representa a maior parte no cérebro humano (BEAR *et al.*, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2004).

Juntamente com o desenvolvimento do neocórtex, surgiram feixes e tratos permitindo que diferentes centros e núcleos nervosos fossem conectados entre si. Essas conexões ocorrem por meio de fibras de projeção e de fibras de associação. As fibras de projeção têm origem no córtex, dirigem-se para a medula espinal, tronco encefálico, núcleos da base e tálamo, sendo, também constituídas de axônios com origem no tálamo que se projetam às diversas áreas corticais. Ao convergirem centralmente, constituem a chamada cápsula interna (figura 2) (RIBAS, 2006; LUNDY-EKMAN, 2007).



**Figura 2 - Ilustração representativa das fibras descendentes com origem cortical e subcortical.**  
Modificado VanPutte *et al.*, 2016.

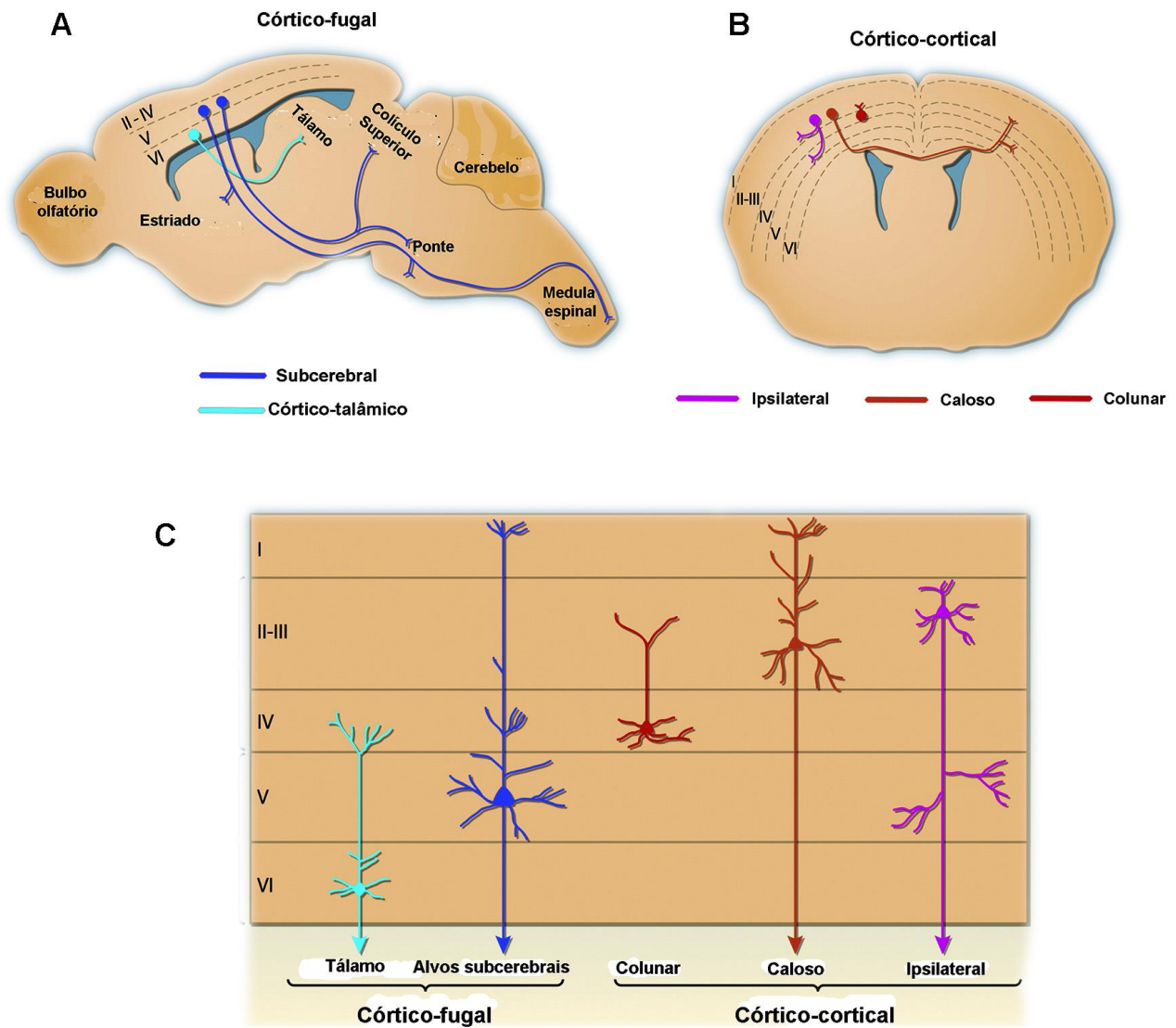
As fibras de associação (figura 3) podem ser intra-hemisféricas, quando conectam regiões corticais dentro de um mesmo hemisfério, podendo realizar conexões curtas, entre giros adjacentes, ou se dirigirem às regiões mais distantes, entre os lobos. Por outro lado, as fibras de associação inter-hemisféricas atravessam o plano mediano para unir áreas homólogas dos dois hemisférios, sendo também denominadas de comissuras, das quais a mais importante é o corpo caloso (BRANDÃO *et al.*, 2004, LUNDY-EKMAN, 2007) .



**Figura 3 - Ilustração representativa das fibras de associação, comissurais e de projeção.** Lopes, 2016.

No Neocórtex se observa que corpos celulares estão dispostos em camadas paralelas à superfície do encéfalo, recebendo aferências e eferências de maneira organizada e eficiente (figura 4).





**Figura 4 - Neurônios de projeção e de associação do neocórtex.** (A) Visão sagital dos neurônios de projeção córtico-fugal nas camadas V e VI, apresentando neurônios córtico-talâmicos que se situam majoritariamente na camada VI e se projetam para o tálamo. Na camada V, neurônios de projeção subcerebral se dirigem para o colículo superior, medula espinal e ponte. (B) Visão coronal dos neurônios de projeção córtico-cortical das camadas II, III e IV. As camadas II e III apresentam neurônios de projeção ipsilateral que se projetam para o mesmo hemisfério e de projeção calosa que, através do corpo caloso, se conectam ao hemisfério contralateral. Na camada IV, neurônios de projeção colunar enviam seus axônios a uma distância curta, dentro da própria coluna neocortical. (C) Representação esquemática indicando a posição laminar e o padrão de projeção de neurônios do neocórtex. Adaptado de Franco *et al.*, 2013.

As camadas são numeradas de I a VI, apresentando escassez de neurônios na camada molecular (camada I) e pelo menos uma camada com células piramidais que emitem dendritos apicais (BEAR *et al.*, 2002).

Neurônios das camadas II e III originam projeções para outras regiões do neocórtex, as chamadas conexões córtico-corticais ou de associação. A camada IV é a principal receptora de aferências sensoriais provenientes do tálamo, sendo bem caracterizada nas áreas sensoriais primárias. Já na camada V encontramos, principalmente, as células piramidais que dão origem às fibras eferentes do córtex, que se projetam para outras áreas corticais e para estruturas subcorticais, ou seja, originam-se do córtex e projetam-se para os núcleos da base, tronco encefálico e medula espinal. Por fim, temos uma camada VI com neurônios heterogêneos, com axônios para áreas corticais e, a partir delas, principalmente para o tálamo (KANDEL *et al.*, 2014).

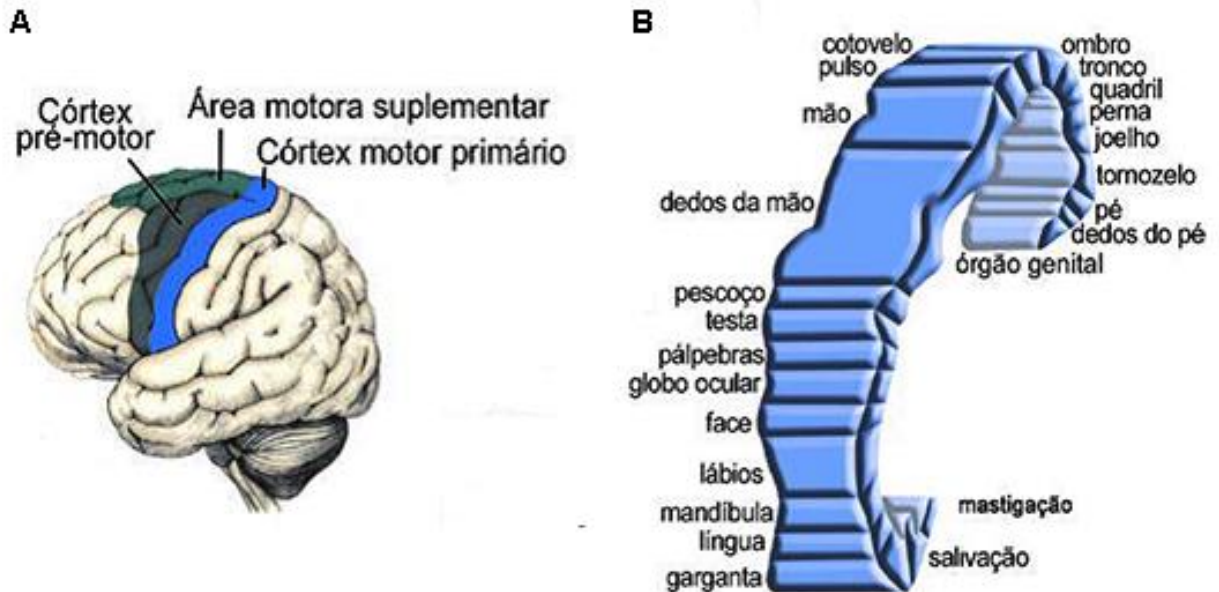
### **1.1.2. O Córtex Motor Primário**

Por definição, os comportamentos voluntários são intencionais, iniciados por uma decisão interna de agir (KANDEL *et al.*, 2014). No entanto, comandar as interações intencionais do corpo com o ambiente requer a atuação imprescindível do sistema nervoso.

O córtex motor é o principal ponto de partida para a execução de uma atividade motora complexa como gestos, linguagem, tocar um instrumento musical e até mesmo praticar uma atividade esportiva (BRANDÃO *et al.*, 2004). Ser capaz de usar os dedos, as mãos e os braços em ações voluntárias, independentes da locomoção, conferiu ainda mais vantagens aos primatas, em especial aos seres humanos na exploração ao meio ambiente (KANDEL *et al.*, 2014).

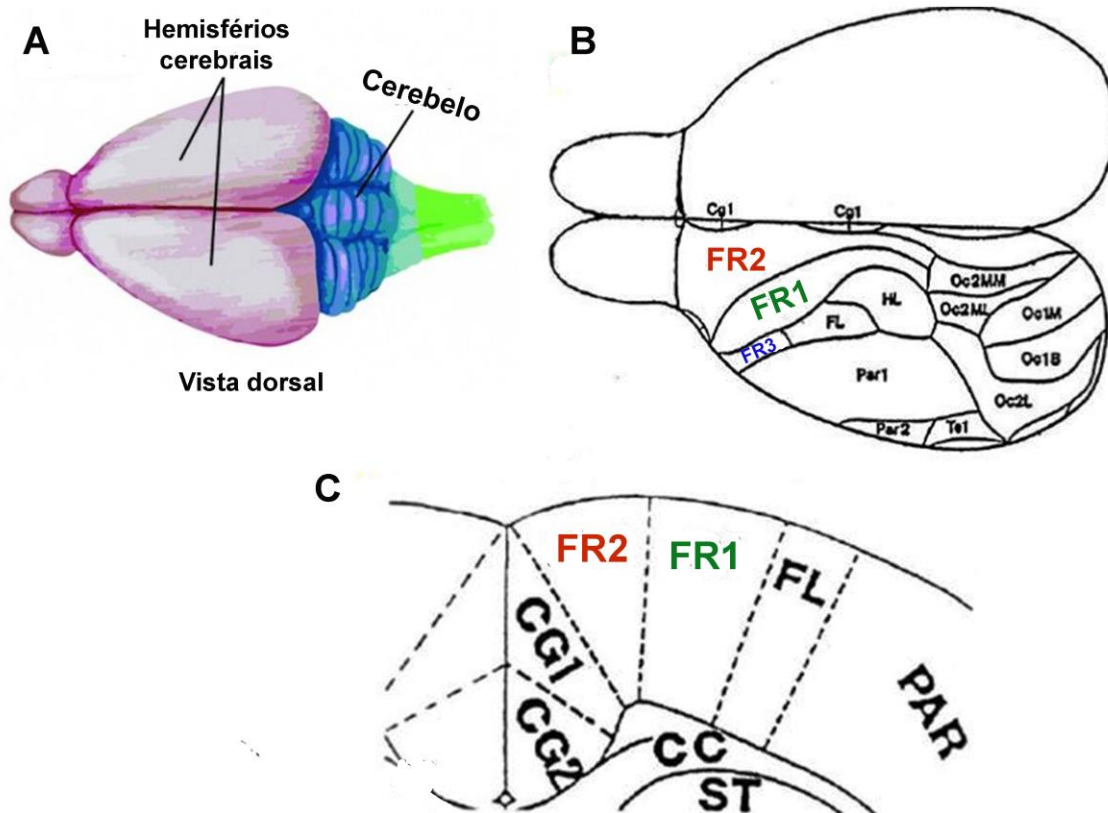
Em seres humanos, o córtex motor é dividido em córtex motor primário (M1), área pré-motora (APM) e área motora suplementar (AMS). Está localizado no giro pré-central e corresponde à área 4 de Brodmann (figura 5), sendo constituído de células piramidais ou células de Betz. Estas são células gigantes (50 a 80  $\mu\text{m}$  de diâmetro) em forma de pirâmides que permitem o acesso direto do cérebro nos neurônios do corno

ventral da medula espinal, chamados de motoneurônios (MACHADO, 2000; BRANDÃO *et al.*, 2004; LUNDY-EKMAN, 2007) .



**Figura 5 – Representação do córtex motor: a principal estrutura do controle motor pelo córtex cerebral.** (A) As áreas pré-motora e motora suplementar em vista dorsal. (B) Representação das diversas regiões do corpo no córtex motor primário. Modificado de Brandão *et al.*, 2004.

Em roedores, o córtex sensório-motor é chamado isocórtex frontal (Fr) que se divide em três áreas (figura 6), sendo as mesmas: Fr1 (M1), Fr2 (M2) e Fr3 que, quando comparadas às áreas do córtex motor humano, Fr1 corresponde ao córtex motor primário, Fr2 corresponde as APM e AMS, enquanto Fr3 trata-se de uma sub-região da representação somatotópica (BEAR *et al.*, 2002; PALOMERO-GALLAGHER & ZILLES, 2004).

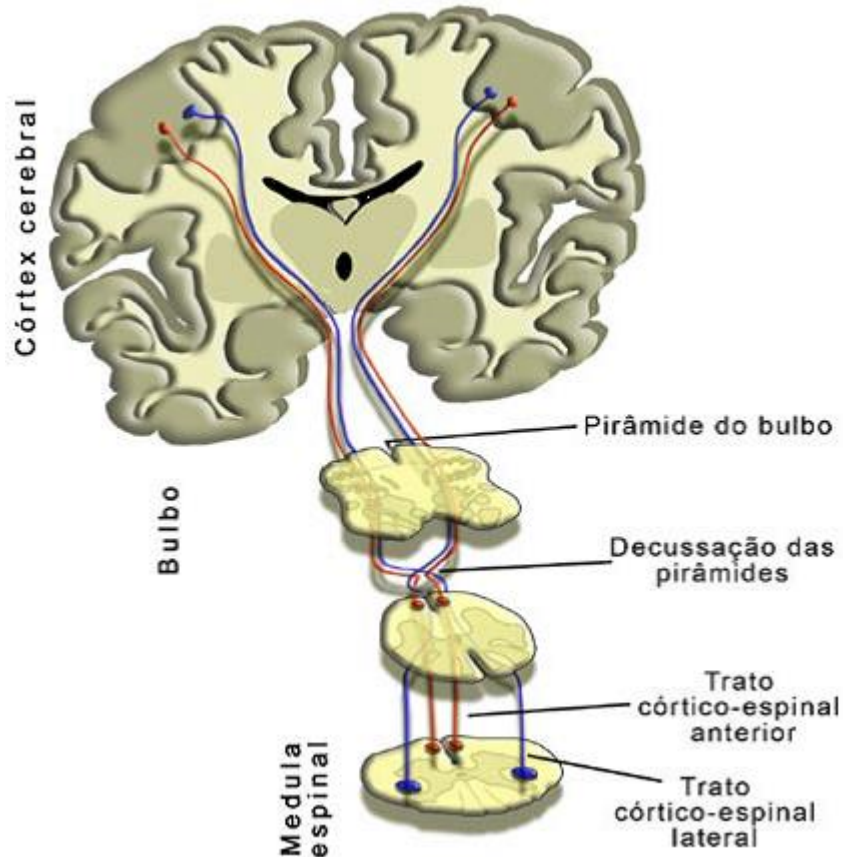


**Figura 6 - Representação de áreas do córtex de roedores.** (A) Vista dorsal. (B) Representação esquemática de uma vista dorsal do mapa neocortical do cérebro de rato com base em estudos citoarquitetônicos. Cg1, córtex do giro do cíngulo; Fr1-3, áreas corticais frontais; Oc1B, Oc1M, Oc2L, Oc2MM e Oc2ML, áreas corticais occipitais; Par1-2, FL, HL, áreas corticais parietais. (C) Diagrama esquemático de um corte coronal do córtex cerebral de ratos. CC, corpo caloso; CG1, área 1 do córtex do giro do cíngulo; CG2, área 2 do córtex do giro do cíngulo; FL, área dos membros anteriores; FR1, área 1 do córtex frontal; FR2, área 2 do córtex frontal; PAR, córtex parietal; ST, corpo estriado. Modificado de McNeill *et al.* (1999).

Para que o movimento voluntário aconteça, o córtex precisa ser ativado. Essa habilidade para evocar movimentos requer um nível suficiente de conectividade sináptica em nível cortical. Neste sentido, o córtex motor primário passa a ser a principal região de onde partem os comandos para a realização de um movimento voluntário uma vez que, o trato córtico nuclear e os tratos córtico-espinais vão

possibilitar a comunicação dos axônios do encéfalo com os motoneurônios de núcleos motores somáticos de nervos cranianos e da medula espinal.

Os tratos córtico-nuclear e córtico-espinais atuam como uma via motora direta entre o córtex, o tronco encefálico e a medula espinal (figura 7). A partir do córtex motor, os tratos descem pela cápsula interna, seguindo pela base do pedúnculo cerebral no mesencéfalo, e formarão os fascículos longitudinais da ponte, percorrendo a pirâmide do bulbo. Aproximadamente, 80% das fibras cruzam para o outro lado do tronco encefálico (decussação das pirâmides) e descem pelos funículos anteriores e lateral da medula espinal, formando os tratos córtico-espinais laterais e anteriores. Na substância cinzenta da medula, esta via vai fazer sinapse com neurônios motores inferiores, permitindo o controle dos movimentos distais finos, ao passo que a via córtico-espinal anterior, que não cruzou o eixo mediano, cruzará o plano mediano na medula espinal para fazer sinapse com os núcleos motores mediais do corno anterior da medula-espinal, controlando os neurônios motores que inervam a musculatura axial. (BRANDÃO *et al.*, 2004, LUNDY-EKMAN, 2007).



**Figura 7 - Tratos córtico-espinais com suas subdivisões anterior e lateral no seu trajeto para a medula espinal. BRANDÃO *et al.*, 2004.**

As vias laterais também apresentam outro componente que se origina no mesencéfalo, o trato rubro-espinal que, embora tenha um papel bem reduzido em humanos, contribui com o controle motor de muitas espécies de mamíferos, tendo como principal fonte de aferência o córtex frontal. Estudos em macacos demonstraram que lesões em ambos os tratos, córtico-espinal e rubro-espinal, deixaram os animais incapazes de realizar movimentos fracionados dos braços e das mãos (BEAR *et al.*, 2002; MONFILS *et al.*, 2005).

Enfim, o controle de movimento é um sistema complexo de informações que precisam ser comandadas, controladas e ordenadas. A medula espinal, o tronco encefálico e o córtex cerebral contam com a atuação relevante do cerebelo e dos núcleos da base, que também regulam o planejamento e a execução do movimento (KANDEL *et al.*, 2000). Conforme Handley *et al.* (2009), trata-se de um caminho

retroalimentado em que sinais vindos do neocórtex são retransmitidos através do *striatum*, globo pálido e tálamo e retornam para o córtex. Adicionalmente, através do trato córtico-pontino-cerebelar, o córtex manda informações sensório-motoras para o cerebelo, que pelos núcleos cerebelares profundos encaminha uma resposta de correção dos movimentos para o núcleo ventral anterior e ventral-lateral do tálamo, seguindo para o córtex. Finalmente, a informação é transmitida aos motoneurônios da medula-espinhal e ao tronco encefálico (KANDEL *et al.*, 2000; HOLSCHNEIDER *et al.*, 2007).

## 1.2. Lesões Corticais

Lesões no córtex motor ou no trato córtico-espinhal interferem no controle motor, dificultando a geração e a coordenação de movimentos e gerando perdas funcionais que, conseqüentemente, alteram a qualidade de vida de um indivíduo que deverá apresentar uma paralisia no lado contralateral (BEAR *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2009). Doenças como acidente vascular encefálico (AVE), traumatismo crânio-encefálico e, em menores proporções, tumores cerebrais e processos infecciosos produzem hemiplegia. No entanto, uma recuperação considerável dos movimentos voluntários pode ocorrer com o passar do tempo (GONZALEZ-PIÑA *et al.*, 2008).

Tais lesões encefálicas geram incapacidades e a grande maioria dos pacientes apresentam déficits neurológicos irreversíveis (YANG *et al.*, 2014). Na fase crônica, o indivíduo procura atendimento fisioterapêutico em busca de minimizar incapacidades e ter uma melhor qualidade de vida. Este processo de reabilitação, em especial de indivíduos acometidos por AVE, tem representado um sério problema de saúde pública, causando um impacto significativo à economia dos países (BROWN *et al.*, 2006; EPSTEIN *et al.*, 2008; PONTES-NETO *et al.*, 2008). Trata-se de uma disfunção cerebrovascular causada pela interrupção do fluxo sanguíneo em áreas encefálicas, inibindo o fornecimento de oxigênio e de nutrientes, e gerando danos ao tecido cerebral (RODRIGO *et al.*, 2005; DURUKAN & TATLISUMAK, 2007, MARKUS, 2008, ROSAMOND *et al.*, 2008).

Os mecanismos fisiopatológicos da isquemia cerebral e suas interações são bastante complexos. A partir da oclusão de um vaso, uma diversidade de eventos ocorre, resultando em morte celular por necrose e apoptose.

Segundo Brouns & De Deyn (2009), os processos neuroquímicos desencadeados pela isquemia cerebral, conhecidos como cascata isquêmica, são altamente heterogêneos e caracterizados por falência bioenergética celular devido à hipoperfusão cerebral focal, seguido de excitotoxicidade, inflamação pós-isquemia, estresse oxidativo, injúria microvascular, ativação hemostática, disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) e, por último, a morte celular de neurônios, glia e células endoteliais.

Kinoshita (2016) em uma revisão, aponta que uma lesão encefálica por trauma acarreta danos primários, como a falência dos vasos cerebrais e o rompimento da BHE gerando edema cerebral, aumento da pressão intracraniana e a diminuição da pressão de perfusão cerebral. Estes danos primários são estabelecidos pelas forças mecânicas diretas ocorridas no momento do impacto traumatizante para o tecido cerebral e, conseqüentemente, outros fatores são incorporados, como a despolarização e perturbações da homeostase iônica, a liberação de neurotransmissores (como por exemplo, a excitotoxicidade do glutamato), disfunção mitocondrial, apoptose neuronal, degradação lipídica e iniciação de respostas inflamatórias e imunitárias.

Evidências de regeneração do sistema nervoso foram demonstradas em várias linhagens de animais, incluindo invertebrados, peixes, anfíbios e répteis (TANAKA & FERRETTI, 2009). No entanto, o sistema nervoso central (SNC) de mamíferos adultos não é capaz de regenerar-se e apresenta uma grande limitação de neurogênese, o que dificulta uma recuperação funcional após lesões centrais, como AVE, TCE e lesão medular. Além disso, em estágios que sucedem o desenvolvimento do SNC, a capacidade de crescimento de axônios em mamíferos é suprimida para permitir a formação e a manutenção de sinapses, ambas essenciais para a formação e função de circuitos neuronais (CASE & TESSIER-LAVIGNE, 2005; TEDESHI *et al.*, 2017).

O fato dessas doenças gerarem uma incapacidade significativa, tornou-se um estímulo para estudos que investigam os mecanismos de reparos neurais relacionados com as mesmas. Tem sido estabelecido, então, de maneira crescente, o uso de animais



como modelo de estudo para lesões corticais, devido à similaridade na organização cortical entre seres humanos e roedores.

A remoção do córtex sensório-motor do rato (mimetizando um traumatismo craniano por trauma mecânico), por exemplo, traz déficits em uma variedade de tarefas; entre elas, discriminação tátil, destreza manual e lateralidade. Sabe-se que após essa remoção, ocorrem processos reorganizacionais, observados também em nível de expressão gênica que, provavelmente, medeiam uma recuperação funcional subsequente (CASTRO-ALAMANCOS *et al.*, 1995).

Após a isquemia cerebral, ao menos três processos estão envolvidos na recuperação funcional: cicatrização da lesão tecidual, neuroplasticidade e compensação comportamental (CARMICHAEL, 2003). Inicialmente, ocorre o processo de cicatrização da lesão tecidual com o estancamento das micro ou macro-hemorragias e a diminuição do edema e da inflamação associados ao enfarte do sistema nervoso. Semanas ou meses após o insulto, ocorre a compensação comportamental, na qual pacientes adotam estratégias para compensar a fraqueza, a dificuldade em falar e a perda sensorial, e isso reflete um aprendizado motor. No meio desses dois processos, ocorre neuroplasticidade, que inclui alterações estruturais e fisiológicas das conexões corticais. Sabe-se que em uma isquemia cerebral ocorrem alterações plásticas na região peri-enfarte, especialmente nas áreas que possuem funções similares às das regiões danificadas (LI *et al.*, 2010; STARKEY *et al.*, 2014).

### **1.3. Neuroplasticidade**

Em neurociências, o termo neuroplasticidade foi introduzido pela primeira vez por William James (1890) em referência à susceptibilidade do comportamento humano à modificação (PASCUAL-LEONE *et al.*, 2005). Anos depois, em 1904, Santiago Ramón y Cajal argumentou que a mutabilidade comportamental deve ter uma base anatômica no cérebro e sabe-se que as projeções cerebrais podem ser moldadas por fatores, como mudanças fisiológicas, experiências e por alterações do ambiente (PASCUAL-LEONE *et al.*, 2005). De acordo com Overman & Carmichael (2014), alterações nos padrões de

comportamento, alterações na experiência ambiental e uma lesão cerebral direta são paradigmas de ação no cérebro adulto, que influenciam a ocorrência de mudanças nos circuitos cerebrais. Cada um desses paradigmas pode produzir brotamento axônico, alterações na morfologia dendrítica e alterações na conectividade sináptica. Na plasticidade dependente de experiência/atividade, as alterações moleculares e anatômicas no SNC estão associadas a atividades comportamentais (como as alterações de movimentos-padrões) ou alterações causadas pelas condições ambientais. Um exemplo desse evento é a formação de conexões em neurônios imaturos no giro denteado que ocorre durante uma tarefa de memória em que estas células formam novos circuitos que são modulados pela experiência (KIM *et al.*, 2012).

Um exemplo de plasticidade dependente de atividade são as alterações no mapa cortical sensorial ou motor associadas ao treinamento ou exercício (ADKINS *et al.*, 2006). Isso tem sido demonstrado nas pesquisas em que ratos são submetidos ao treinamento para desempenhar uma tarefa de aprendizagem motora complexa, resultando em modificações estruturais, como o aumento significativo de sinapses e de neurônios, extensão de arborização dendrítica das células piramidais e alterações na organização do mapa motor (KLEIM *et al.*, 1998; MONFILS *et al.*; 2005, ADKINS, *et al.*, 2006; MANG *et al.*, 2013). Similarmente, na plasticidade induzida por lesão no SNC se observam alterações sinápticas e anatômicas; mas, resultantes apenas da própria injúria (BENOWITZ & CARMICHAEL, 2010; OVERMAN & CARMICHAEL, 2014). No entanto, evidencia-se que o processo de brotamento axônico é distinto para cada lesão, pois lesões de mesma extensão, mas provocadas por diferentes mecanismos causam resultados desiguais na indução da plasticidade estrutural e na recuperação funcional (CARMICHAEL, 2003; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2012). Por exemplo, lesões isquêmicas do córtex sensório-motor por termocoagulação induzem brotamento axônico e remodelação sináptica no córtex homotípico do hemisfério oposto à lesão e uma densa rede axônica é observada no corpo estriado dorsal ipsilateral à lesão. Ao contrário, em lesão cerebral induzida por ablação, de mesma localização e extensão, não se verifica nenhum ou mínimo brotamento axônico no corpo estriado dorsolateral desnervado (NAPIERALSKI *et al.*, 1998; URYU *et al.*, 2001; CARMICHAEL, 2003, FREITAS *et al.*, 2015).

Hubener *et al.* (2014) apontaram que a reabilitação após um AVE, de um traumatismo craniano ou de algumas doenças neurológicas depende crucialmente da capacidade de plasticidade do cérebro adulto. Portanto, o estudo da neuroplasticidade é relevante, uma vez que o conhecimento destes mecanismos, dos substratos neurais subjacentes e interações moleculares pode ajudar no desenvolvimento de tratamentos para condições patológicas do SNC.

Investigações entre neuroplasticidade e recuperação funcional têm sido frequentes em diferentes tipos de modelos de lesões encefálicas (CHOPP & LI, 2002; IIHOSHI *et al.*, 2004; KAMIYA *et al.*, 2008; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; de VASCONCELOS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013; COELHO & GIRALDI-GUIMARÃES, 2014; YANG *et al.*, 2014).

Para superar os danos provocados por uma lesão, mecanismos sinápticos que envolvem a plasticidade sináptica (recuperação da eficácia sináptica, hipersensibilidade de desnervação, hipereficácia sináptica, o “desmascarar” de sinapses silenciosas) e o brotamento em axônios intactos, são as principais alternativas de reorganização funcional, que levam à formação de novos circuitos (RAINETEAU E SCHWAB, 2001; LUNDY-EKMAN, 2007), Neste trabalho, se estabeleceu o estudo do brotamento axônico colateral para as análises da plasticidade cerebral.

#### **1.4. Brotamento axônico**

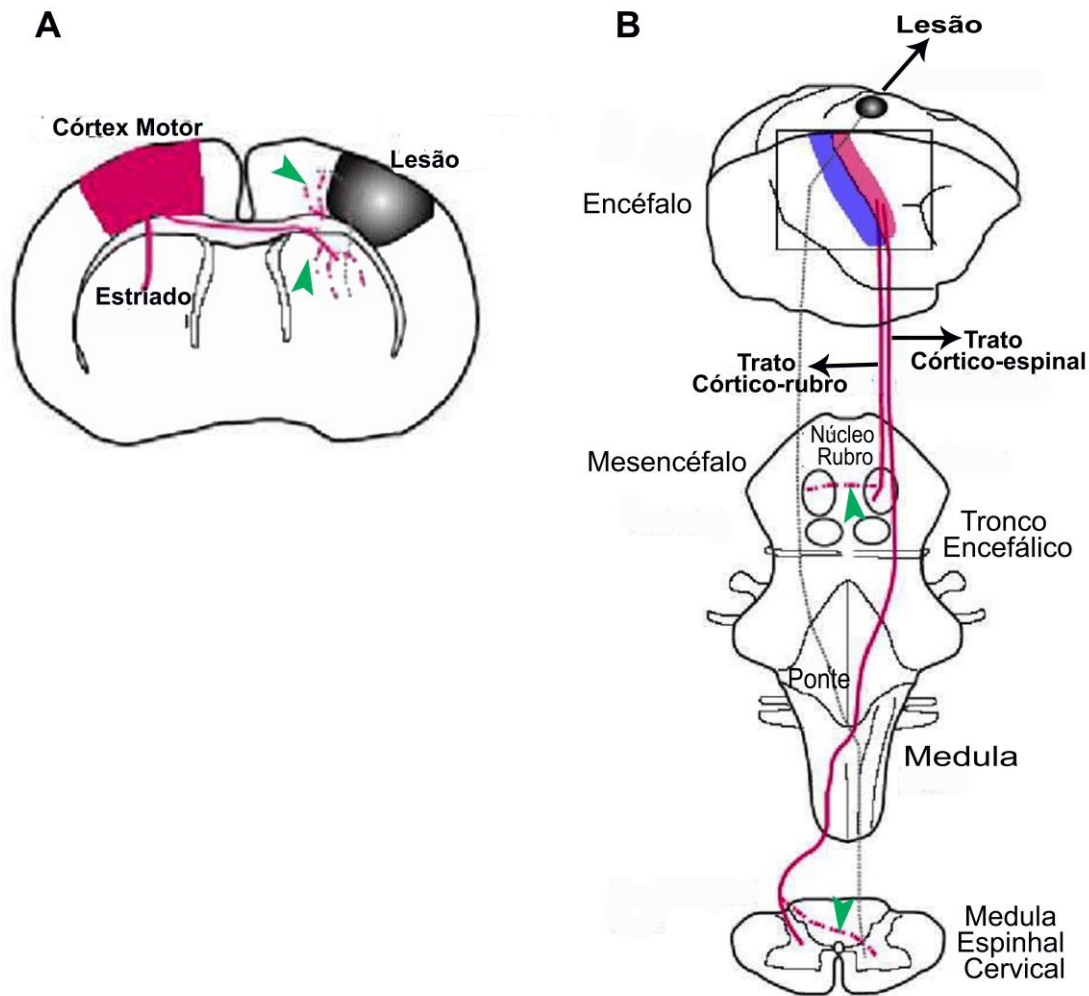
O crescimento do axônio lesado é denominado brotamento. Este assume duas formas, o regenerativo e o colateral. O brotamento regenerativo se dá quando um axônio e sua célula alvo (um neurônio, um músculo ou uma glândula) foram lesados, e o axônio lesado envia brotos colaterais para um novo alvo. Comumente, a regeneração funcional de axônios ocorre no sistema nervoso periférico, em parte, devido à produção de fator de crescimento de nervos (FCN) pelas células de Schwann. No entanto, esta regeneração não ocorre nos axônios do sistema nervoso central, pois o desenvolvimento de cicatrizes gliais e a ausência de FCN impedem a regeneração axonal no encéfalo e na medula espinal (DELLER *et al.*, 2006; LUNDY-EKMAN, 2007).

O brotamento colateral ocorre quando um alvo desnervado é reinervado por ramos de axônios intactos, todavia, dendritos de neurônios vizinhos assumem o papel de reinervação (LUNDY-EKMAN, 2007). Sabe-se que a própria lesão dispara esse processo (KOLB *et al.*, 2001; JOHANSSON, 2004).

A morte celular inicial leva a cascatas isquêmicas secundárias, que sinalizam para o tecido circundante à lesão. Ocorrendo a reperfusão da área danificada, há a produção de radicais livres, ativação de astrócitos e de leucócitos, que liberam citocinas e radicais livres, e a produção de atividade neuronal sincronizada. Sabe-se que as citocinas ativam astrócitos, promovem angiogênese e induzem brotamento axônico, e que a atividade neuronal sincronizada induz tanto o brotamento axônico quanto a formação de novas conexões (CARMICHAEL & CHESSELET, 2002; BRUMM & CARMICHAEL, 2012; GERTZ *et al.*, 2012; GLEICHMAN & CARMICHAEL, 2014; CARMICHAEL *et al.*, 2017). As citocinas inflamatórias são liberadas por micróglia ativada, promovendo a invasão de neutrófilos e mais tardiamente de macrófagos. Estes podem estimular diretamente o reparo neural e induzir um estado ativado nas células endoteliais cerebral e nos astrócitos. Resultados prévios mostraram que a ativação de astrócitos no córtex peri-ênfarte, em parte através de citocinas inflamatórias, induz moléculas que bloqueiam o brotamento axônico, como as proteoglicanas de sulfato de condroitina ou ephrin-A5 (OVERMAN *et al.*, 2012; CARMICHAEL *et al.*, 2017). No entanto, quando se trata de uma ativação do fator transformador de crescimento, que contém muitas moléculas que estimulam o brotamento axônico após o AVE, se observou que o GDF10, uma citocina membro da família TGF $\beta$ , é induzido no córtex peri-ênfarte após AVE em seres humanos, em roedores e primatas, sendo um potente estimulante para brotamento axônico e recuperação funcional (LI *et al.*, 2015). Interessantemente, em camundongos com propensão genética para o brotamento axônico após a injúria, incluindo AVE, há um aumento seletivo na outra via de sinalização de TGF $\beta$ , o sistema activina. Ambos GDF10 e Activina sinalizam, através dos seus respectivos receptores de superfície celular, para o fator de transcrição SMAD2 (OMURA *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015). Assim, pode se concluir que, após o AVE, sinais inflamatórios peri-ênfarte específicos e

citocinas controlam tanto a indução do brotamento axônico quanto a indução de inibidores de crescimento para bloqueá-lo (CARMICHAEL, 2017).

Baseando-se em estudos publicados realizados em ratos, camundongos, primatas e em seres humanos, Carmichael (2017) afirma que o brotamento axônico é um dos mecanismos de recuperação após o AVE e de outras lesões corticais, que levam à formação de novas conexões no encéfalo e na medula espinal, com início na primeira semana após a injúria. Neurônios adjacentes à lesão, no córtex peri-enfarte, formam novas conexões com áreas motoras, somatossensoriais e pré-motoras no hemisfério ipsilateral ao enfarte. Estas novas conexões podem ser locais, ou seja, com o tecido danificado muito próximo ao enfarte (figura 8A), ou a longas distâncias, ocorrendo entre os lobos frontal e parietal no hemisfério lesado, como demonstrado em macacos (CARMICHAEL *et al.*, 2001; DANCAUSE *et al.*, 2005). Paralelamente, há resultados que demonstram que o AVE induz o brotamento axônico em neurônios do córtex cerebral do hemisfério contralateral à lesão, na medula espinal cervical e no núcleo rubro. Com a desnervação dessas estruturas, neurônios de projeção córtico-espinal estendem suas projeções ao núcleo rubro e à medula espinal cervical ipsilateral à origem cortical desses neurônios de projeção, através do trato córtico-espinal (figura 8B). (BENOWITZ & CARMICHAEL, 2010; LINDAU *et al.*, 2014; WAHL *et al.*, 2014).



**Figura 8 - Padrões de brotamento axônico após AVE.** Esquema mostrando as projeções do córtex motor (vermelho). As projeções axônicas normais do córtex motor estão em linhas sólidas. As projeções da região cortical perdida por causa do AVE estão em linhas pontilhadas cinzas. As projeções formadas após o AVE estão em linhas tracejadas vermelhas e apontadas em verde (ponta de seta). (A) um AVE induz brotamento axônico através do córtex motor contralateral no corpo estriado ipsilateral e no córtex peri-ênfarte contralateral. Essas são áreas desnervadas em virtude de perdas celulares ocasionadas pelo AVE. (B) Um AVE induz brotamento axônico através do córtex motor contralateral no núcleo rubro ou na medula espinhal cervical ipsilaterais. Essas projeções são formadas em áreas que foram desnervadas devido à injúria no córtex. Modificado de BENOWITZ, 2010.

Nota-se que estes casos de brotamento axônico no sistema córtico-espinhal contralateral à lesão contribuem para recuperação comportamental após uma lesão

cortical e estão relacionados com o remapeamento de representações motoras do membro ipsilateral no córtex motor.

Neste contexto, sabe-se que o corpo estriado ipsilateral à lesão também é inervado por brotamentos axônicos do córtex contralateral. No entanto, o tamanho da lesão produzida tem indicado o efeito deste brotamento axônico. Em modelos animais, como roedores e primatas não humanos, grandes lesões produziram brotamento axônico maior, no corno ventral desnervado da medula espinal cervical, através da projeção, cuja origem é o córtex motor primário contralateral (SZELE *et al*, 1995; CARMICHAEL e CHESSELET, 2002; RIBAN e CHESSELET, 2006).

De acordo com Kolb e Muhammad (2014), apesar do SNC ser razoavelmente constante na sua organização e no seu funcionamento, tornou-se evidente que o mesmo é capaz de sofrer alterações após uma lesão para permitir, pelo menos, alguma restituição comportamental. Entretanto, conhece-se pouco acerca dos fatores que podem potencializar ou atenuar a resposta endógena nessas condições e, tampouco, quais regras guiam tais mudanças reparadoras.

#### **1.4.1. Brotamento axônico após lesão neurológica: contribuições experimentais**

Existem muitas informações acerca do brotamento axônico após a lesão neurológica. São diversas abordagens que evidenciam a formação de novos circuitos neuronais e o quanto este evento se tornou importante ao processo de reabilitação. O uso de ferramentas moleculares, optogenética, treinamento motor induzido e medicamentos tem mostrado resultados que vêm colaborando para o conhecimento deste evento num cérebro adulto e com lesão.

##### 1.4.1.1. Ferramentas moleculares

O conhecimento de eventos moleculares que desencadeiam o brotamento axônico e que, impulsionam o processo de reconexão num cérebro adulto após uma lesão encefálica é essencial para identificar alvos que promovam a recuperação.

Urban *et al.* (2012), analisando com a técnica de *microarray* a expressão de genes de um subconjunto de neurônios na região peri-ênfarte, observaram que muitas moléculas-guia de axônios foram reguladas, em particular aquelas associadas com a reorganização do citoesqueleto, ramificação de dendritos, orientação de moléculas e genes envolvidos na alteração da forma de espinhas dendríticas. Isto sugere que todos esses componentes moleculares são importantes para induzir alterações estruturais na circuitaria cortical que, por sua vez, pode servir como uma possível base de recuperação funcional. Li *et al.* (2014), por meio de RT-PCR e imunistoquímica com marcadores específicos, sugeriram que, após uma lesão traumática há alterações de expressão gênica em diferentes regiões do cérebro, com envolvimento dos fatores COX-2, GluR2 e PAFR que, em conjunto, promovem a ocorrência e o desenvolvimento de lesão neuronal hipocampal. Pode-se destacar, também, o estudo liderado por Carmichael, no qual se utilizaram dois marcadores fluorescentes para localizar células que geram uma nova conexão após uma isquemia cerebral global. Estas células foram isoladas e estudadas, permitindo identificar os genes que uma célula cerebral ativa para formar novas conexões após um AVE. Em seguida, puderam identificar várias moléculas-chave que desempenham um papel nos axônios após a isquemia, anteriormente não reconhecidos. Os resultados mostraram que o gene ATRX é ativado por células encefálicas para formar novas conexões após o AVE (LI *et al.*, 2010). Interessantemente, esta pesquisa mostrou também que o programa molecular que controla a formação de novas conexões no cérebro após um AVE difere consideravelmente entre adultos e jovens. Essas diferenças podem explicar, em parte, porque a recuperação é diminuída em indivíduos idosos (LI *et al.*, 2010). Avanços nas pesquisas têm sido permitidos com o uso das técnicas da transcriptômica e da proteômica, que possibilitam quantificar os processos biológicos dinâmicos de forma a melhorar nosso entendimento das funções gênicas e proteicas, bem como suas interações (KESSLER, 2010).

Mecanismos epigenéticos também têm sido relacionados em pesquisas de neuroplasticidade. Dajas-Bailador (2012) mostrou que o microRNA-9 (Mir-9) encontrado em axônios corticais regula os níveis de Map1b, uma proteína importante para a estabilidade dos microtúbulos, atuando também como um alvo funcional do BDNF para



extensão e ramificação do axônio. Observou-se que, uma redução no miR-9 alivia a repressão à tradução do Map1b, levando então a uma maior expressão da proteína Map1b, estabilização dos microtúbulos e crescimento axonal. No entanto, a ação prolongada de BDNF aumenta a expressão de miR-9 no axônio e promove a ramificação, diminuindo a expressão da proteína Map1b.

#### 1.4.1.2. Optogenética

Nessas últimas décadas, a optogenética tem sido destacada entre as terapias para as doenças neurológicas. Trata-se de uma técnica que tem como base a introdução de um vírus no tecido nervoso com o DNA modificado, permitindo a interação entre neurônios e luz (LIU e TONEGAWA, 2010; ZHANG *et al.*, 2010, KRUEGER *et al.* 2012).

Cheng *et al* (2014), utilizando a técnica de optogenética em roedores submetidos à oclusão unilateral e transitória da artéria cerebral média resolveram avaliar se uma estimulação neuronal seletiva no córtex motor primário ipsilateral à lesão resultaria na promoção de recuperação funcional. Nesta técnica, utilizaram-se proteínas microbianas ativadas por luz, como, por exemplo, *Channelrhodopsin 2* (ChR2), a qual despolariza neurônios quando iluminados com luz azul, ou *Halorhodopsin* (NpHR), que hiperpolariza os neurônios. As estimulações neuronais repetidas do córtex M1 ipsilateral à lesão aumentaram a expressão de GAP-43 em ratos com acidente vascular encefálico acometendo os córtices iS1 e no cM1, sugerindo que as estimulações neuronais podem trazer um aumento da plasticidade sináptica, observada 15 dias após o procedimento cirúrgico. Além disso, observou-se uma melhora significativa nos testes de comportamento sensório-motor e de neurotrofinas. Curiosamente, as estimulações em camundongos normais não alteraram o comportamento motor ou a expressão da neurotrofina, sugerindo que o efeito de proteção de estimulações neuronais seletivas depende do ambiente pós-lesão.

Recentemente, Wahl *et al.* (2018), também usando a estimulação optogenética, mas associada a intensos treinamentos de reabilitação em ratos submetidos a grandes lesões isquêmicas, demonstraram que, ao ativar o trato córtico-

espinhal intacto, no hemisfério contralateral à lesão, as fibras intactas deste trato forneceram inervação à hemimedula cervical desnervada. Os animais, além de apresentarem brotamento axônico, mostrou também uma recuperação nos movimentos finos da pata dianteira.

#### 1.4.1.3. Treinamento motor induzido

Pesquisas apontando resultados sobre diferentes tratamentos motores reabilitativos têm sido muito frequentes, sobretudo, por serem técnicas não invasivas que, de uma maneira geral, são aplicadas em pacientes hemiplégicos em sessões de fisioterapia. Estudos pré-clínicos e clínicos têm colaborado para um melhor entendimento de como a cinesioterapia beneficiará a neuroplasticidade e, conseqüentemente, a recuperação funcional .

Nakagawa *et al* (2013) utilizando modelos de ratos com traumatismo crânio-encefálico unilateral no córtex motor, decidiram investigar dois tipos de treinamentos motores, objetivando avaliar o remodelamento axônico do trato córtico-espinhal. Os animais foram divididos em dois grupos, dentre os quais um tinha sua performance avaliada em uma tarefa de treinamento repetitivo simples e o outro grupo desenvolvia treinamentos com movimentos bilaterais. Com uso de traçador anterógrado (BDA) os resultados desse estudo demonstraram que somente o treinamento de movimentos bilaterais promoveu efetivamente brotamento axônico e recuperação motora funcional quando comparado ao treinamento repetitivo simples.

Já os experimentos de Okabe (2017), realizados em ratos isquêmicos, mostraram existir uma seletividade ao remodelamento axônico no trato córtico-espinhal, após um treinamento motor de tarefas de habilidade e destreza. Resultados histológicos desse experimento mostraram o aumento de neurônios em *área forelimb rostral* (RFA) e no córtex somatossensorial secundário (S2), diferentemente das áreas do tronco encefálico que não apresentaram aumento de células positivas ao traçador retrógrado *fast-blue*. Com este tipo específico de treinamento também não se evidenciou uma recuperação funcional motora, aferida pelos testes do cilindro, *ladder walk* e de *staircase*.

Ishida *et al.* (2016) utilizaram como tratamento um treinamento motor intensivo, no qual se forçava o uso apenas do membro paralisado para desempenhar as tarefas, em ratos submetidos à lesão da cápsula interna e à hemorragia intracerebral. Nos grupos tratados, observou-se um aumento expressivo de fibras positivas ao BDA em áreas adjacentes ao núcleo rubro ipsilateral à lesão, para testar a relação entre a plasticidade da via córtico-rubrica e a recuperação funcional observada nos grupos treinados, experimentos de perda de função foram conduzidos, usando a técnica de vetor duplo viral que induziu o bloqueio seletivo desta via. Então, ao bloquear o trato córtico-rubrico sugeriu-se que esta via, de fato, foi o substrato para a recuperação induzida por este tratamento de treinamento intensivo com o uso forçado apenas do membro plégico. Suas análises foram feitas por meio de testes comportamentais, eletrofisiologia e morfologia.

#### 1.4.1.4. Tratamento farmacológico

Até o momento, o único fármaco antitrombótico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de AVE isquêmico agudo é o ativador de plasminogênio tecidual. No entanto, seu uso é recomendável apenas até 4h após o enfarte isquêmico do tecido nervoso.

Neste contexto, Meng *et al* (2014) demonstraram que o uso de ativador do plasminogênio tecidual humano recombinante (rTPA), administrado por via intranasal na fase subaguda (iniciado 7 dias após a lesão) em animais modelo de traumatismo crânio-encefálico, também se apresentou como um tratamento efetivo, o que foi analisado por testes cognitivos e sensório-motores. Esse tratamento, realizado por via intranasal, possibilitou um aumento da neurogênese no giro denteado e brotamento axônico na medula espinal desnervada requerendo mais estudos sobre uma possível interação entre o TPA e o BDNF.

## 1.5. Terapia Celular em doenças neurológicas

Após uma lesão encefálica, como o AVE isquêmico, por exemplo, ocorrem danos ao tecido cerebral capazes de destruir uma população heterogênea de células cerebrais e de prover uma relevante interrupção das conexões neuronais e do sistema vascular. Na tentativa de minimizar e eliminar os danos e perdas causadas por lesões no SNC, a busca de alternativas terapêuticas tem sido crescente e, entre elas, encontra-se a terapia celular.

De acordo com Zandonella (2005), a terapia celular é definida como métodos e abordagens tecnológicas baseadas no conhecimento de várias ciências, que visam a utilização de células para tratamento de doenças. E, com a utilização de diversas abordagens e métodos, observou-se em alguns estudos que as células transplantadas sobreviveram, proliferaram, diferenciaram e restauraram os elementos neuronais e vasculares perdidos. No entanto, outros estudos mostraram que as células transplantadas gozavam de uma habilidade limitada de restauração (MAREI *et al.*, 2018). Neste contexto de terapia celular, as células-tronco têm sido as mais estudadas.

Células-tronco são células indiferenciadas que apresentam a capacidade de se auto-renovarem e de dar origem a células diferenciadas (especializadas), que compõem os tecidos e órgãos do corpo. Podem ser obtidas do embrião, de tecidos fetais e de tecidos adultos (FUCHS *et al.*, 2000).

Conforme a capacidade de diferenciação são classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. (FUCHS *et al.*, 2000, KAN *et al.*, 2005, FILIP *et al.*, 2008):

Totipotentes, quando são capazes de dar origem a um organismo completo (FUCHS *et al.*, 2000, KAN *et al.*, 2005, FILIP *et al.*, 2008). Após a fecundação, uma única célula, resultante da fusão do óvulo e do espermatozoide, inicia-se o processo de divisão. Então, uma célula se divide em duas, duas em quatro, quatro em oito e assim por diante. Espera-se que, pelo menos até a fase de oito células, cada uma delas tenha a capacidade de se desenvolver em um ser humano completo (ZATZ, 2004)

Pluripotentes, com a capacidade de dar origem a todos os tipos celulares do organismo, gerando células originárias dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), mas não dos folhetos extra-embrionários. São incapazes de

gerar um organismo completo. Na fase de oito a dezesseis células, as células do embrião se diferenciam em um grupo de células externas que vão originar a placenta e os anexos embrionários e, também se diferenciam em uma massa de células internas que vai originar o embrião que, após 72h será um blastocisto que se implantará na cavidade uterina. As células internas do blastocisto vão originar as centenas de tecidos que compõem o corpo humano. São chamadas de células tronco embrionárias pluripotentes (ZATZ, 2004).

Multipotentes, com capacidade de se diferenciarem principalmente em tipos celulares do seu tecido/órgão de origem (FUCHS *et al.*, 2000, KAN *et al.*, 2005, FILIP *et al.*, 2008). Estas células somáticas, a partir de um momento, começam a diferenciar-se nos vários tecidos que vão compor o organismo, no entanto, os genes e o processo que controlam esta diferenciação são desconhecidos. O que se sabe é que uma vez diferenciadas, as células somáticas deixam de ter a capacidade dar origem a qualquer tecido. Assim, por exemplo, células de fígado vão originar células de fígado, células musculares vão originar células musculares, ou seja, as células descendentes de uma célula diferenciada vão manter as mesmas características daquela que as originou (ZATZ, 2004

Por outro lado, também é conhecido que apesar de, até poderem ser induzidas a se diferenciar em tipos celulares de folheto embrionário diferente do seu de origem, elas são incapazes de se diferenciar em todos os tipos celulares do organismo (FUCHS *et al.*, 2000, KAN *et al.*, 2005, FILIP *et al.*, 2008).

Vários tipos de células-tronco ou progenitoras têm sido avaliados em seu potencial neurorestaurativo, como, por exemplo, as células-tronco embrionárias, células precursoras/células-tronco neurais células-tronco pluripotentes induzidas e neurônios induzidos e células-tronco mesenquimais.

As **células-tronco embrionárias** (ESC - do inglês *embryonic stem cells*) são derivadas da massa interna dos blastocistos, são pluripotentes com a capacidade de se diferenciar em todas as outras células do corpo, exceto as da placenta. Tem apresentado uma capacidade regenerativa, dando origem a neurônios, astrócitos e oligodendrócitos que formam tecidos cerebrais (THOMSON *et al.*, 1998; WICHTERLE *et al.*, 2002; MAREI *et al.*, 2018). A capacidade tumorigênica destas células também

estão sendo investigadas e, de acordo com os estudos de Dean *et al.* (2006), o encapsulamento de ESC tem sido uma opção para se impedir a formação de teratomas.

As **células-tronco neurais** (NSC - do inglês *neural stem cells*) são células multipotentes que residem principalmente na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e na zona subventricular do terceiro ventrículo cerebral. Deslocam-se da zona subventricular para o fluxo migratório rostral e seguem até o bulbo olfatório onde se diferenciam em interneurônios. São boas candidatas para a restauração de danos neuroniais e comportamentais associados a diferentes distúrbios do SNC, uma vez que apresentam a capacidade de se diferenciar em diferentes elementos neuroniais e gliais (TODA *et al.*, 2001; ISHIBASHI *et al.*, 2004).

A partir de 2006, os pesquisadores Takahashi e Yamanaka mostraram estudos pioneiros com as **células-tronco pluripotentes induzidas** (iPSC - do inglês *induced pluripotent stem cell*), que são células somáticas, como fibroblastos e células mononucleares de sangue periférico, reprogramadas à pluripotência através de transdução dos fatores transcricionais Oct3 / 4, Sox2, Klf4 e c-Myc (TAKAHASHI *et al.*, 2006).

Quando comparadas às ESC, as iPSC têm a vantagem de absterem-se de conflitos éticos e morais e de evitar os danos ocasionados pela rejeição imunológica (ABE *et al.*, 2012). Em modelos animais de lesão isquêmica, levaram à recuperação sensório-motora, redução do volume da lesão e apresentaram melhoras em testes neurológicos (CHEN *et al.*, 2010). Entretanto, há indicações de que, após o transplante, as iPSC também formaram teratomas em cérebros de ratos (MIURA *et al.*, 2009; KAWAI *et al.*, 2010). Por outro lado, recentemente, células-tronco neurais induzidas (iNSCs - do inglês *induced neural stem cells*) surgiram como uma outra alternativa e foram transplantadas em modelos de isquemia em porcos. Os resultados foram promissores e surgiram expectativas de que as iNSC possam ser utilizadas em pacientes com acidente vascular encefálico. Tratam-se de células diferenciadas e derivadas de iPSC que, ao serem injetadas nestes modelos isquêmicos em porcos, induziram efeitos neuroprotetores e regenerativos, observados em nível de tecido cerebral e correlacionando-se com diminuição da resposta imune, proteção neuronal e neurogênese aumentada. Paralelamente, exames de ressonância magnética

multiparamétrica longitudinal demonstraram uma redução nas alterações do metabolismo cerebral no tecido enfartado, perfusão do sangue cerebral e uma integridade da substância branca. As iNSCs diferenciaram-se em neurônios e oligodendrócitos com indicação de integração a longo prazo (BAKER *et al*, 2017, MAREI *et al*, 2018).

Por último, com um reconhecido potencial terapêutico as **células-tronco mesenquimais** (MSC - do inglês *mesenchymal stem cells*) são derivadas de várias fontes de tecido, incluindo a medula óssea, cujo potencial terapêutico tem sido amplamente avaliado nos níveis pré-clínico e clínico. Mas, outras fontes destas células como cordão umbilical, geléia de Wharton, pele, placenta, polpa dentária e tecido adiposo também têm sido investigadas. Em modelos animais de AVE, é conhecido que o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea promoveu sinaptogênese, estimulou regeneração nervosa, melhorou a função sensório-motora e atuou como mediador de efeitos imunomodulatórios (TOHILL *et al.*, 2004; YOO *et al.* 2009; SANBERG *et al.*, 2011; HONMOU *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013). Em nível clínico, uma das vantagens atrativas das MSC é serem uma alternativa distante de discussões éticas que envolvem o uso de células embrionárias e fetais. Sua viabilidade e segurança têm sido demonstradas na prática clínica (BANG *et al.*, 2005; SUÁREZ-MONTEAGUDO *et al.*; 2009; LEE *et al.*, 2010).

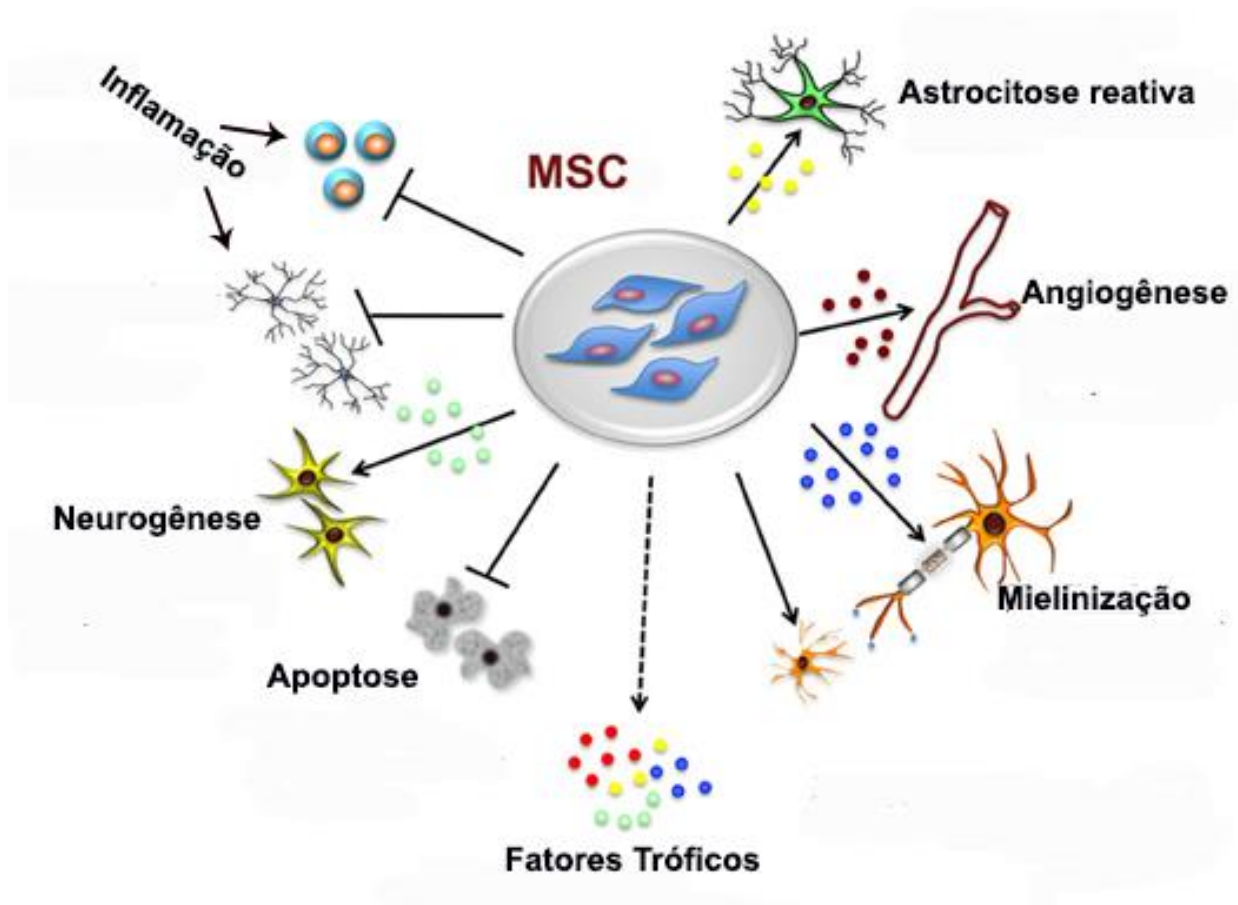
### 1.5.1. Aplicações de MSC e MNMO

As ações benéficas das células-tronco/progenitoras derivadas de medula óssea nas funções neurológicas vêm sendo amplamente demonstradas. Há evidências de que a liberação de fatores tróficos pelas células endoteliais e pelos astrócitos, incluindo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), BDNF (fator de crescimento derivado do cérebro), fator de crescimento nervoso (NGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), e promovem angiogênese, estabilidade vascular, neurogênese, proliferação, diferenciação e

sobrevivência celular, efetuam o reparo celular endógeno, desencadeiam a proliferação de neuroblastos e a migração para a zona subventricular, além de reduzirem a apoptose (CHEN *et al.*, 2001; ZACHAREK *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2010; MAREI *et al.*, 2018).

As células-tronco mesenquimais (MSC), pelo seu potencial de diferenciação multipotente e uma forte capacidade parácrina, tornaram-se a fonte celular mais comum e efetiva no tratamento baseado em células e um dos poucos tipos de células-tronco a serem aplicadas na prática clínica como agentes terapêuticos para imunomodulação e reparo tecidual isquêmico (LIANG *et al.*, 2014). Trata-se esta de uma população de células progenitoras mais purificadas que precisam ser cultivadas durante várias etapas, o que a impede de ser aplicada de forma autóloga em casos de lesões agudas. Demonstrando resultados similares, quando comparadas às MSC, alternativamente, células mononucleares de medula óssea (MNMO) vêm sendo usadas. Estas são enriquecidas com diferentes populações de células-tronco e tipos celulares, como células imaturas e maduras das linhagens mieloide e linfoide. Quando isoladas da medula óssea, estas não requerem cultivo e podem ser agudamente administradas, sendo, portanto, adequadas para um transplante autólogo na fase aguda de uma dada doença (SAVITZ, 2013; MONICHE *et al.*, 2016). Ambas, as MSC e as MNMO, apresentam a capacidade de serem quimioatraídas para o local da lesão, e então promoverem o reparo tecidual através da liberação de fatores tróficos que induzem a regeneração do tecido neural, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de células progenitoras neurais endógenas, encontradas no microambiente adjacente à lesão, atuando também na redução de reações inflamatórias e imunológica (figura 9) (CAPLAN *et al.*, 2006; CASTILLO-MELENDZ *et al.*, 2013, GUO *et al.*, 2017; JASMIN *et al.*, 2017).





**Figura 9 – Representação esquemática dos possíveis efeitos neuroprotetores e neurorestaurativos de células-tronco mesequimais (MSC).** As ações benéficas das MSC são mediadas principalmente por ações parácrinas. As MSC secretam uma série de fatores neurotróficos e angiogênicos que promovem o crescimento e a diferenciação neuronal, induzem angiogênese, neurogênese, crescimento e ativação astrogliar, promovem a sinaptogênese aumentando as conexões sinápticas e remielinização axônica, diminuem a infiltração de macrófagos e micróglia e a ativação de linfócitos T. Adaptado de Castelo-Melendez, 2013.

Um estudo clínico, objetivando avaliar os efeitos da terapia com MSC em pacientes com AVE, concluiu através de uma meta-análise haver um aumento significativo das funções neurológicas e melhoria na qualidade de vida, sem a ocorrência de reações adversas ocasionadas pelo transplante (CHEN *et al*, 2016; DETANTE *et al.*, 2017).

Experimentos de Andres *et al* (2011) investigaram ratos submetidos à oclusão permanente de artéria cerebral média, bilateralmente que receberam transplante de células progenitoras neurais humanas em córtex cerebral ipsilateral à lesão, 7 dias após a cirurgia. Com observações na 3ª e 5ª semanas pós-transplante, através de testes comportamentais e injeção de traçador anterógrado (BDA), foi demonstrado que o tratamento de células progenitoras neurais humanas pode aumentar significativamente a plasticidade dendrítica no córtex ipsi e contralateral à lesão, e isso coincidiu com a recuperação funcional induzida pelas células-tronco. Além disso, resultou num aumento da reconexão axônica córtico-cortical, córtico-estriatal, córtico-talâmica e córtico-espinal do lado contralateral à lesão. Andres e colaboradores também estabeleceram ensaios de co-cultura *in vitro* e observaram que tais células liberaram trombospondina 1 e 2, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que atuam como mediadores, parcialmente responsáveis pelos efeitos das células-tronco na indução de neuroplasticidade.

Moniche *et al.* (2016), num ensaio clínico para testar a dose eficaz de células mononucleares de medula óssea em pacientes com AVE, num transplante autólogo, avaliaram vinte e dois pacientes por seis meses e observaram que os melhores resultados estavam associados às maiores doses de células injetadas, especialmente se maiores que  $310 \times 10^6$  e administradas por via intra-arterial.

Outro estudo clínico muito interessante foi realizado por Steinberg *et al.*(2016), no qual células-tronco mesenquimais modificadas geneticamente foram implantadas intracerebralmente em pacientes de isquemia cerebral crônica, com 6 a 60 meses de doença. Estas células foram chamadas de SB623 e foram obtidas a partir da medula óssea de doadores saudáveis. Os primeiros resultados desse ensaio mostraram que esta terapia foi segura e bem tolerada, demonstrando uma melhora significativa na função neurológica após 12 meses de tratamento.

Resumidamente, desde 2005 os estudos clínicos usando MSC, MNMO e NSC estão sendo realizados em doenças encefálicas como AVE e TCE, encorajados pelos resultados satisfatórios encontrados em estudos pré-clínicos (MAREI et al. 2018).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com células derivadas de medula óssea (MSC e MNMO) na indução de brotamento axônico e na recuperação funcional motora em modelos experimentais de lesão cortical (termocoagulação da vascularização superficial e ablação dos córtices sensório-motor) nas fases aguda e crônica.

### **Objetivos específicos**

- a) Identificar e comparar alterações nas conexões córtico-corticais e córtico-estriatais, utilizando-se neurotraçadores e análises por microscopia;
- b) Identificar e comparar a recuperação funcional motora através do teste do cilindro;
- c) Analisar os efeitos do tratamento em diferentes lesões corticais e em fases aguda e crônica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram usados um total de 121 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*) com 3 a 4 meses de idade no início do experimento, com peso entre 300 a 350 gramas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da UENF, sendo alojados 4 animais por caixa (48 x 34 x 16 cm<sup>2</sup>), mantidos em condição-padrão de temperatura (22±1°C) e iluminação (ciclo de 12 horas de luz, das 7:00h às 19:00h / 12 horas de escuro, das 19:00h às 7:00h), com água e alimentação disponíveis *ad libitum*. Uma hora antes do experimento, os ratos foram transportados e acomodados na sala experimental. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de ratos usados. Os experimentos foram realizados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal de nossa instituição (CEUA – UENF), sob o número de protocolo número 86, em 02/09/2010.

#### 3.2. Cirurgias Estereotáxicas

Cada animal foi anestesiado com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e, em seguida sua cabeça foi fixada num aparelho estereotáxico (*Insight Ltda*, Ribeirão Preto, SP). O crânio foi exposto cirurgicamente e uma craniotomia foi realizada mostrando o córtex frontoparietal esquerdo. Com as medidas estereotáxicas (eixo ântero-posterior, +2,0 mm a -6,0 mm do Bregma) obtidas do atlas estereotáxico do encéfalo de rato (PAXINOS & WATSON, 2005), lesões isquêmica e por ablação, foram efetuadas no córtex motor primário e em parte do córtex somestésico primário, com acometimento apenas das seis camadas corticais, conforme descrito anteriormente (SZELE *et al.*, 1995; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009, SAMPAIO *et al.*, 2013, FREITAS *et al.*, 2012).

Para a realização da isquemia unilateral, um ferro de solda (40w, 450-550°C) foi fixado na haste do aparelho estereotáxico e aproximado dos vasos sanguíneos localizados sob a pia-máter para coagulação do sangue por calor, preservando a integridade da dura-máter. Para a ablação, o tecido foi aspirado com uma pipeta (1ml) fixada a uma bomba de vácuo, transpassando-se a *dura-mater* com leves e rápidos toques. Em seguida, um pedaço de esponja hemostática de colágeno (Hemospon®) foi inserido na lesão.

Após o procedimento, os animais tiveram a pele suturada, foram colocados sob uma lâmpada para aquecimento corporal e, ao se recuperarem da anestesia, retornaram ao biotério da Instituição.

### **3.3. Obtenção e transplante de MSC e MNMO**

Células de medula óssea foram obtidas de ratos naïve (n=12). Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e eutanasiados em uma câmara de CO<sub>2</sub>. Após, a confirmação da morte do animal, para obter as MNMO, a medula óssea foi assepticamente coletada da tibia e femur, conforme já descrito alhures (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Em meio estéril, os ossos foram cortados nas epífises, permitindo o acesso à medula com uma seringa contendo 10 ml de meio de cultura DMEM/F12 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA). O conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis de 15 ml, dissociados mecanicamente e centrifugado por 5 minutos (400g, velocidade de 8,5 rpm). Recolheu-se o precipitado e, novamente, este foi suspenso em 2ml de meio de cultura DMEM/F12 e submetido à centrifugação em 2ml de Histopaque (densidade 1,083 g/mL - Sigma-Aldrich Inc.), durante 30 minutos. Para a extração das MNMO, retirou-se as células que estavam entre o Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o DMEM/F12 a fim de aplicá-las no tubo com PBS (10mM) para a primeira lavagem, ressuspensão e centrifugação por 5 min (400g, velocidade de 8,5). Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 3 ml de PBS para uma segunda lavagem, ressuspensão das células, centrifugação e descarte do

sobrenadante. Mais uma lavagem foi efetuada, e após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas em 1ml de salina. Em seguida, efetuou-se a contagem das células com o auxílio da câmara de *Neubauer*, avaliando simultaneamente a viabilidade celular pela coloração do azul de tripan (0,4%). Esta coloração permitiu que as células mortas, que ficaram coradas, fossem desconsideradas na contagem.

Para o cultivo das MSC, as células obtidas foram plaqueadas em garrafas de cultura estéreis de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas em meio de cultura DMEM/F12, suplementado com soro fetal bovino (10%), além do antibiótico estreptomina (10µg.mL<sup>-1</sup>) e do antifúngico anfotericina B (fungizona; 25µg.mL<sup>-1</sup>). As culturas foram mantidas em incubação a 37 °C e atmosfera umidecida, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, com troca regular do meio. Ao atingirem confluência, as células eram soltas com solução contendo 0,25% de tripsina e de EDTA (Gibco®) e, replaqueadas em novas garrafas. Este processo foi repetido quatro vezes e, conforme descrito em outros trabalhos, este protocolo se mostrou eficaz para se obterem culturas altamente enriquecidas em MSC (FREITAS *et al*, 2012). Após a contagem, as células foram suspensas em PBS (10mM) com a concentração final de 3 x 10<sup>6</sup> MSCs / 500 µl.

Para se obterem as MNMO, ao final da contagem, as células foram diluídas em PBS (10Mm) e utilizou-se a concentração total de 3,0 x 10<sup>7</sup> células/500 µL por animal.

Vinte e quatro horas após as cirurgias estereotáxicas, os animais foram anestesiados e através da veia jugular esquerda, as células MNMO, MSC ou veículo (PBS; 10Mm) foram neles injetadas, conforme os grupos experimentais apresentados na Tabela 1.

#### **3.4. Reação histoquímica com cloreto de trifetil tetrazólio**

O cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) é um sal que atravessa a membrana plasmática da célula e sofre uma redução química, recebendo um íon de H<sup>+</sup> de enzimas desidrogenases participantes do ciclo de Krebs, nas mitocôndrias das células vivas. Esta redução origina o trifetil formazan, que leva a diferença de coloração entre um

tecido vivo e o enfartado, caracterizando o tecido viável com a cor vermelha, permitindo assim que a área isquêmica seja visualizada.

A fim de caracterização da lesão, após 72 horas, os animais submetidos à lesão isquêmica e à ablação do tecido cortical foram eutanasiados e os cérebros rapidamente removidos, inseridos numa matriz acrílica para corte de encéfalo de rato (*Insight Equipamentos Científicos LTDA*) e seccionados no plano coronal, com 2 mm de espessura. As fatias foram lavadas com PBS 10mM (*Phosphate-buffered Saline*) e imersas durante 30 minutos em solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2%, a 37 ° C, protegidas da luz. Em seguida, foram lavadas em PBS a 10mM e fixadas em paraformaldeído a 4% pelo período de 24 horas. Posteriormente, as imagens das quatro primeiras fatias foram captadas por uma câmara digital.

### **3.5. Desenho Experimental**

Para investigar os efeitos do tratamento com MSC e MNMO no remodelamento da circuitaria neural das projeções córtico-cortical e córtico-estriatal, em fases aguda e crônica de lesão cortical e da recuperação funcional em fase crônica, os animais foram randomicamente divididos nos seguintes grupos experimentais: NAÏVE (animais sem lesão), ABL CONT (animais submetidos à ablação cortical e tratados com veículo), ABL MNMO (animais submetidos à ablação cortical e tratados com células mononucleares derivadas de medula óssea), ABL MSC (animais submetidos à ablação cortical e tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea), ISQ CONT (animais submetidos à isquemia cortical e tratados com veículo), ISQ MNMO (animais submetidos à isquemia cortical e tratados com células mononucleares derivadas de medula óssea) e ISQ MSC (animais submetidos à isquemia cortical e tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea), conforme tabela 1. A janela terapêutica foi escolhida com base em nossos estudos anteriores (SAMPAIO *et al.*, 2013)

Para a realização dos procedimentos de TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio) e de extração de células foram utilizados animais não pertencentes aos grupos experimentais.

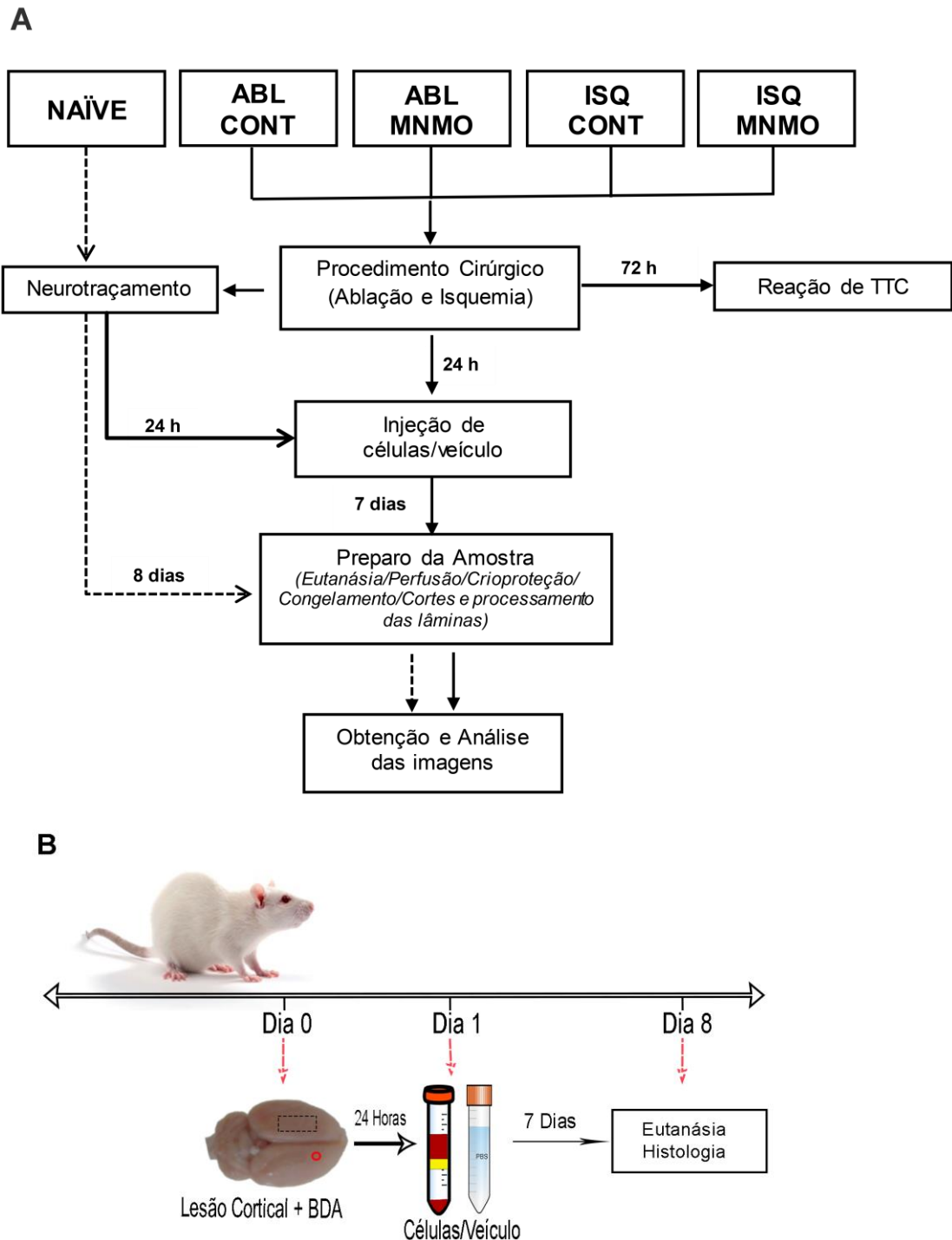
**Tabela 1: Grupos experimentais**

GRUPO	TRATAMENTO	Fase aguda n(animais)	Fase crônica n(animais)	
			Teste Cilindro	Neuro- traçamento
NAIVE	-	4	7	6
ABL CONT	500 µl PBS	4	9	6
ABL MNMO	3 x 10 <sup>7</sup> MNMO	5	8	9
ABL MSC	3 x 10 <sup>6</sup> MSC	-	8	4
ISQ CONT	500 µl PBS	4	10	6
ISQ MNMO	3 x 10 <sup>7</sup> MNMO	5	8	5
ISQ MSC	3 x 10 <sup>6</sup> MSC	-	11	5

Nos experimentos em fase aguda da lesão cortical, animais ABL CONT (n=4), ABL MNMO (n=5), ISQ CONT (n=4), ISQ MNMO (n=5), foram submetidos à cirurgia estereotáxica (isquemia por termocoagulação ou ablação cortical) e, imediatamente após o procedimento cirúrgico, todos os grupos experimentais, incluindo o NAÏVE (n=4), receberam injeção do traçador anterógrado (BDA), em M1 (contralateral à lesão). Cerca de 72 horas após o procedimento cirúrgico, alguns animais lesados (ablação, n=3; isquemia, n=3) foram submetidos ao TTC para caracterização da lesão. Após vinte e quatro horas da cirurgia e do neurotraçamento, os animais submetidos à lesão cortical foram transplantados, por via endovenosa, por MNMO (3x10<sup>7</sup> células/0.5ml) ou veículo



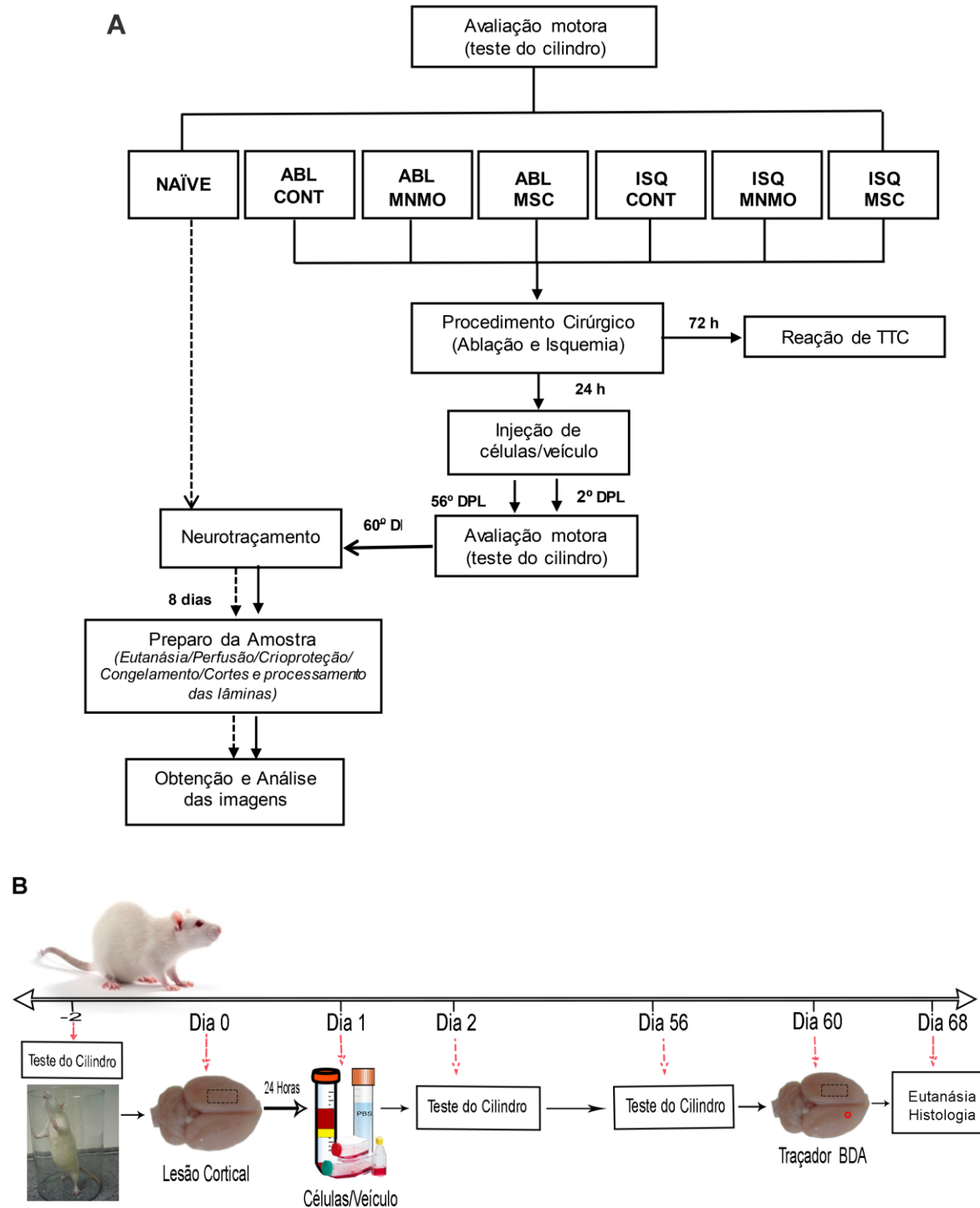
(0.5 ml de PBS), e sete dias após foram eutanasiados para o processamento das amostras seguido de obtenção e análises das imagens. .



**Figura 10 - Desenhos representativos do experimento em fase aguda.** (A) No dia zero, ratos *Wistar* foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e de microinjeção do neurotraçador (BDA). Vinte e quatro horas após foram tratados com MNMO ou veículo e, após sete dias, os animais foram eutanasiados para a histologia e subseqüentes análises. (B) *Timeline* do experimento.

.Nos experimentos em fase crônica da lesão cortical, animais ABL CONT (n=6), ABL MNMO (n=9), ABL MSC (n=4), ISQ CONT (n=6), ISQ MNMO (n=5), ISQ MSC (n=5), foram submetidos à cirurgia estereotáxica (isquemia por termocoagulação ou ablação cortical) e no dia seguinte, foram submetidos ao transplante, por via endovenosa, de MNMO ( $3 \times 10^7$  células/0.5ml) ou MSC ( $3 \times 10^6$  células/0.5ml) ou veículo (0.5 ml de PBS). Cerca de 72 horas após, alguns animais lesados foram submetidos ao TTC para caracterização da lesão. Sessenta dias após os procedimentos cirúrgicos, microinjeções de um traçador anterógrado (BDA) foram administradas em córtex motor primário (M1) contralateral à lesão de todos os grupos experimentais, inclusive o NAÏVE (n=6). Oito dias após, os animais foram eutanasiados e as amostras foram processadas para as análises por microscopia.

A avaliação funcional motora foi feita pelo teste do cilindro. Animais NAÏVE (n=7), ABL CONT (n=9), ABL MNMO (n=8), ABL MSC (n=8), ISQ CONT (n=10), ISQ MNMO (n=8), ISQ MSC (n=11) foram submetidos ao teste do cilindro dois dias antes dos procedimentos cirúrgicos e nos dias dois e cinquenta e seis após a lesão cortical. O desenho do experimento em fase crônica foi mostrado na figura 11.



**Figura 11 – Desenhos representativos do experimento em fase crônica.** (A) Ratos *Wistar* foram previamente avaliados pelo teste do cilindro para o registro inicial da taxa de assimetria. No dia zero, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico e vinte e quatro horas após foram tratados com MNMO ou MSC ou veículo. Nos dias dois e cinquenta e seis após a lesão, os ratos foram submetidos ao teste do cilindro e no dia sessenta foi administrado o neurotraçador anterógrado em M1 contralateral à lesão. Após, sete dias, os animais foram eutanasiados para a histologia e subsequentes análises. (B) *Timeline* do experimento.

### 3.6. Microinjeção do neurotraçador anterógrado *in vivo*

No dia do procedimento cirúrgico (fase aguda) ou no sexagésimo dia subsequente (fase crônica), animais de todos os grupos foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (90 mg/kg, i.p.), e fixados em um aparelho estereotáxico. Um pequeno orifício foi aberto na caixa craniana sobre o córtex sensório-motor, no hemisfério contralateral à lesão. Utilizando-se medidas estereotáxicas obtidas de um atlas de encéfalo de rato (eixo ântero-posterior, +1,2 mm, eixo médio-lateral, -2,7 mm), uma solução de 10% de BDA (*NeuroTrace*® BDA – 10.000 - *Neuronal Tracer Kit* – cód N7167 - *Life Technologies* ou *Dextran* - 10000 MW *anionic, fixable*, conjugado a *Alexa Fluor 546*), foi injetado no córtex motor primário (M1) através de uma seringa de 5 $\mu$ L. As microinjeções foram feitas nas profundidades, 1,8mm e 2,0mm a partir do Bregma, sendo o volume total de solução injetada de 500 $\mu$ L.

### 3.7. Análises Histológicas

Após 8 dias da injeção do neurotraçador, cada animal foi anestesiado com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e eutanasiado em uma câmara de CO<sub>2</sub>. Após a confirmação da morte por apneia, assístole, ausência de pulsação, palidez das mucosas e perda do reflexo da córnea, os animais foram perfundidos pelo ventrículo esquerdo com solução salina (NaCl; 0,9%), seguida de solução de paraformaldeído a 4%, em tampão fosfato (0,2M, pH 7,4). O encéfalo foi rapidamente removido e novamente imerso no fixador por 4 horas, após foi incubado em 20% de sacarose dissolvida em tampão fosfato (0,2M, pH 7,4), por 24 horas a 10°C. O encéfalo foi cortado, embebido em *Tissue Tek O.C.T Compound* e imerso em nitrogênio líquido para congelamento. Em seguida, foi seccionado no plano coronal (30  $\mu$ m de espessura), a -20 °C em um criostato (CM 1950 Leica) e as fatias dispostas em lâminas gelatinizadas que, posteriormente, foram reveladas conforme o procedimento previamente padronizado em laboratório (RIBEIRO *et al.*, 2005; CASTELLAN-BALDAN *et al.*; 2006) e analisadas no microscópio de fluorescência

(Axiolmager Z1; Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A análise estatística foi realizada exclusivamente com dados dos animais que apresentaram evidências de que a microinjecção no córtex motor primário (M1) foi realizada com sucesso.

### 3.8. Teste comportamental motor

A recuperação funcional motora foi estimada pelo teste do cilindro que analisa os movimentos menos sofisticados das patas dianteiras, que não requerem habilidade ou treinamento (SCHALLERT, 2006; SCHAAR *et al*, 2010). A eficácia deste teste para avaliar funções sensório-motoras tem sido demonstrada após as lesões corticais por temocoagulação (GIRALDI-GUIMARÃES *et al*, 2009; DE VASCONCELOS *et al*, 2010) e procedimentos de ablação neocortical (FREITAS *et al*, 2013, 2012).

Primeiramente, todos os animais tiveram sua taxa de assimetria (linha de base) avaliada, antes de serem submetidos aos procedimentos cirúrgicos. Após, todos os grupos experimentais foram submetidos ao teste do cilindro nos dias 2 e 56 após a lesão. O teste foi avaliado conforme previamente descrito (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; DE VASCONCELOS *et al*, 2010).

Estabeleceu-se o dia zero para a realização do teste nos animais ainda saudáveis e para se avaliar o desempenho motor inicial dos animais. O dia 2, para uma avaliação dois dias após a lesão e a análise do efeito deste procedimento cirúrgico na perda da função motora e, por último, no dia 56 para se obter dados comparativos entre os diferentes grupos, após o tratamento com células MSC e MNMO.

O teste do cilindro constitui-se de uma avaliação de preferência, quando o animal utiliza as patas dianteiras para apoiar na parede de um cilindro de vidro transparente (20 cm x 30 cm), durante a exploração vertical. Cada animal é colocado dentro do cilindro e filmado por 5-10 minutos ou até que se atinja 10 eventos (figura 12). São contados o número de vezes que o animal se apoia com a pata direita (contralateral à lesão), com a esquerda (ipsilateral) e com ambas. É calculada então a taxa de assimetria (% de uso com a ipsilateral - % de uso com a contralateral. Estas % são em relação ao total de subidas: no de usos com a contra + com a ipsi + com ambas). Sendo a taxa de assimetria representada por X:  $X = 0 \rightarrow$  uso simétrico;  $0 < X \leq$

100 → uso maior da ipsilateral;  $-100 \leq X < 0$  → uso maior da contralateral. Animais com taxa de assimetria maior que 15, no dia 0 (zero), ou menor que 30, no dia 2 (dois) pós-lesão, foram excluídos da análise estatística.



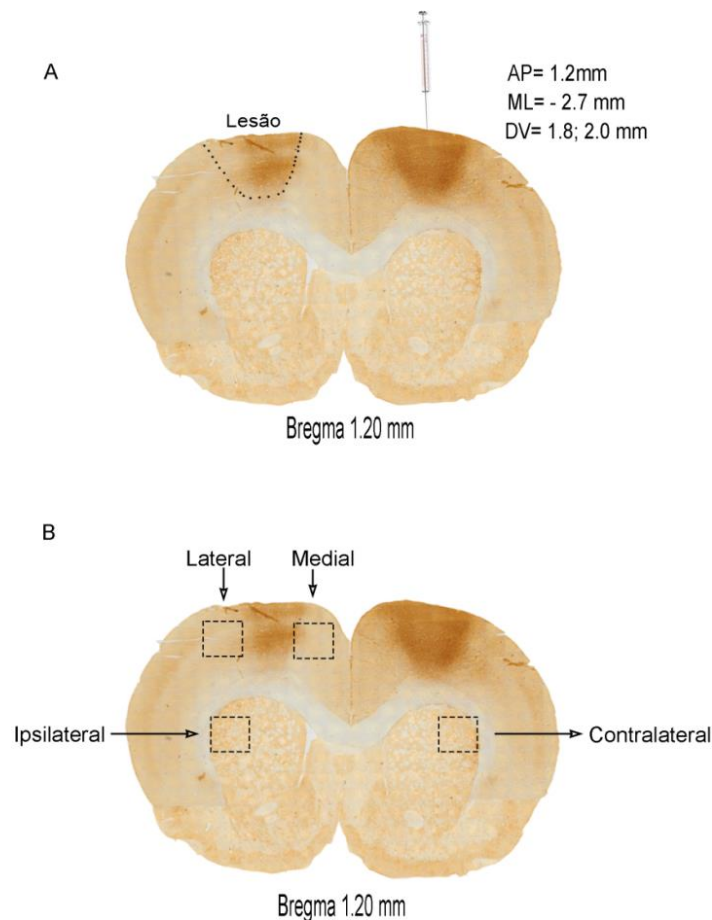
**Figura 12 - Imagem do teste do Cilindro:** Animal durante a exploração vertical, com o apoio de ambas as patas (ipsilateral e contralateral à lesão).

### 3.9. Análise dos dados

No que se refere à técnica de neurotraçamento, inicialmente, as lâminas foram escaneadas no *scanner* Olympus BX61VS (*Olympus Optical* do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e, em seguida, as imagens foram selecionadas e tratadas utilizando o *Plugin BIOT – VSI Reader* através da plataforma FIJI (SCHINDELIN, J. *et al*, 2012). A partir da eficácia do neurotraçamento, em cada dois cortes por animal, foram analisados 3 campos: Córtex subjacente à lesão (medial e lateral) e neoestriado: ipsilateral e contralateral em relação à lesão (Figura 13). Calculou-se a média por animal em respectivas áreas e, em seguida, a média para cada grupo experimental que foi plotada para as análises estatísticas. O percentual de fibras axônicas foi computado com base no número de axônios identificados por unidade de área de campo visual.

Os dados experimentais que objetivaram investigar o efeito do tratamento das MSC e MNMO na indução de brotamento axonal nas projeções córtico-corticais e córtico-estriatais e a recuperação funcional motora foram submetidos ao ANOVA *one-way*, seguido pelo *post hoc* de Tukey.

Os dados comportamentais, provenientes do teste do cilindro, foram submetidos as análises de variâncias *two-way* medidas repetidas seguida pelo *post hoc* de Tukey. Valores foram representados em média e erro padrão da média (EPM). P-values < 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

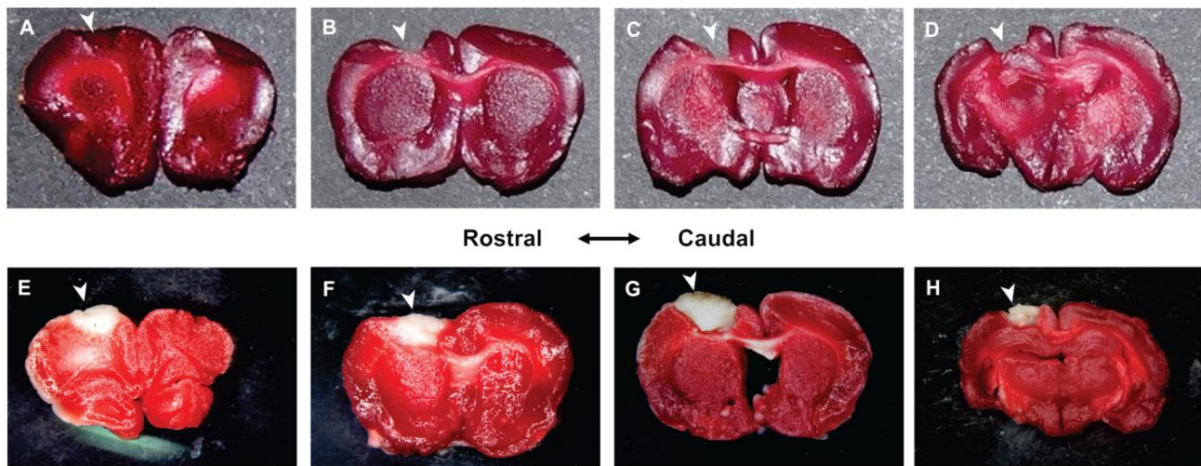


**Figura 13 - Representação da técnica de neurotraçamento.** As fotomicrografias de cortes transversais do cérebro murino representam um animal do grupo NAÏVE, demonstrando, à direita, a injeção do traçador anterógrado (NeuroTrace® BDA – 10.000 - *Neuronal Tracer Kit. Life Technologies*) com uma seringa Hamilton nos pontos estereotáxicos obtidos de um atlas de encéfalo de rato (eixo ântero-posterior, +1,2 mm, eixo médio-lateral, -2,7 mm). A partir da eficácia do neurotraçamento, em cada dois cortes por animal, foram analisados 3 campos: Córtex circunjacente à lesão (medial e lateral) e corpo estriado situado ipsilateral e contralateralmente à lesão (áreas delimitadas pelos quadrados).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterização histoquímica da lesão cortical

Utilizando o TTC, foi demonstrado que as lesões corticais foram restritas a área neocortical de interesse (Paxinos & Watson, 2005) e os limites da isquemia e da ablação foram caracterizados. Todos os animais lesados, 72h após o procedimento cirúrgico, apresentavam em região sensório-motora, quando submetidos à ablação a perda do tecido neocortical restrito à área sensório-motora, e a inviabilidade do tecido neocortical após a isquemia, conforme demonstrado na figura 14



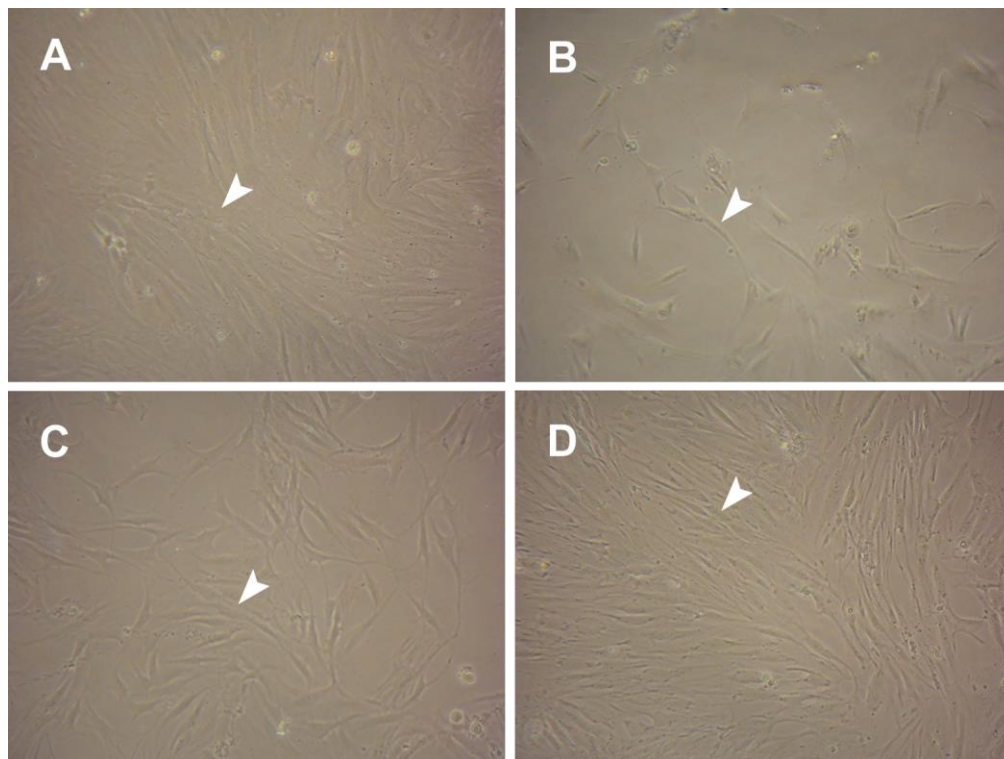
**Figura 14 - Extensão da lesão isquêmica induzida por termocoagulação e da lesão por ablação cortical.** . A figura apresenta cortes coronais sequenciais (2 mm) de encéfalos de animais após 72 horas da lesão cortical, submetidos à reação histoquímica com 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), que cora em vermelho o tecido viável. A – D: Cortes histológicos de encéfalo, marcados com TTC após a ablação, mostrando a remoção da área sensório-motora (cabeça de seta branca). E – F: Cortes transversais histológicos de encéfalo marcado com TTC após a isquemia cortical, mostrando uma grande degeneração no córtex afetado, representada pela área branca (cabeça de seta branca).



## 4.2. Aspectos morfológicos das células extraídas da medula óssea até a 4ª passagem

Ao se analisarem os aspectos morfológicos das células de medula óssea (figura 15), se observou-se que até a 4ª passagem, estas demonstraram a capacidade de aderir à superfície plástica da garrafa de cultivo, de formar colônias e de se replicarem.

No decorrer do cultivo, com a troca de meio e a expansão da população celular, o número de células não aderentes foi reduzido, predominando, ao final uma população de células aderentes à superfície plástica, fusiformes e com potencial de auto renovação de formação de colônias. A partir da 4ª. passagem, não mais se observaram células não aderentes.

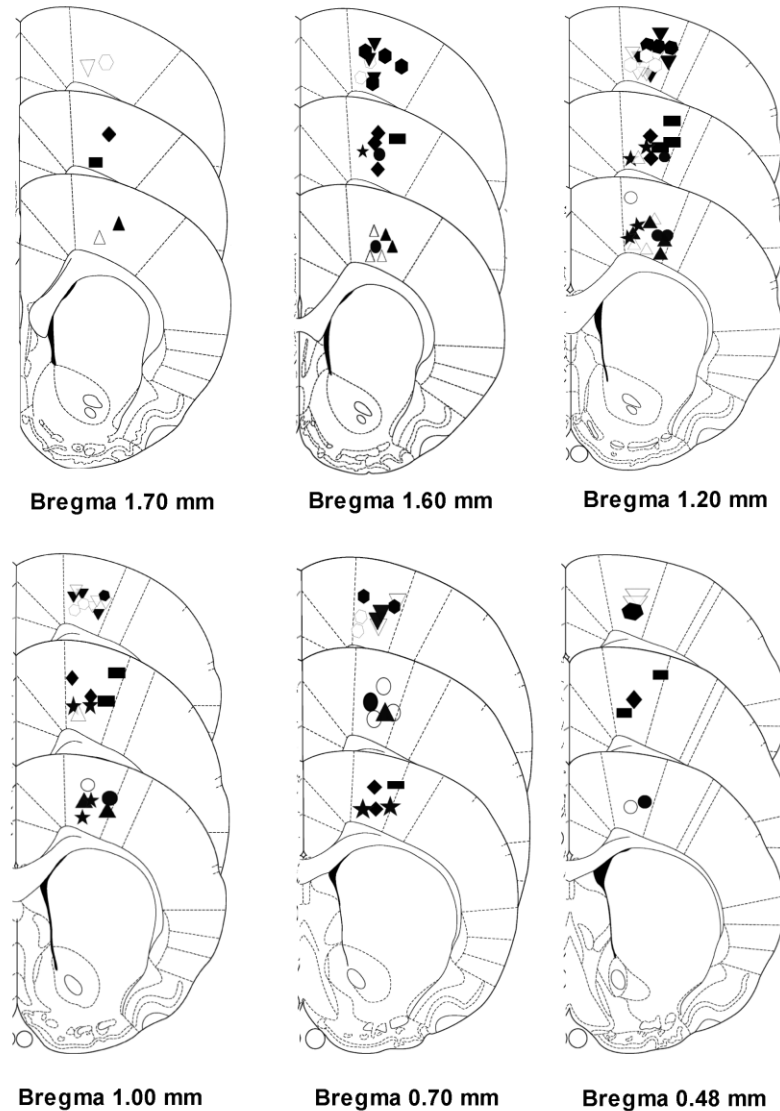


**Figura 15 - Aspectos morfológicos das células extraídas da medula óssea até a 4ª passagem**

(A) Primeira passagem; (B) segunda passagem; (C) terceira passagem; (D) quarta passagem. Nota-se na 4ª passagem, uma população de células fusiformes (cabeça de seta) e aderentes à superfície plástica.

### 4.3. Confirmação histológica dos sítios de microinjeção

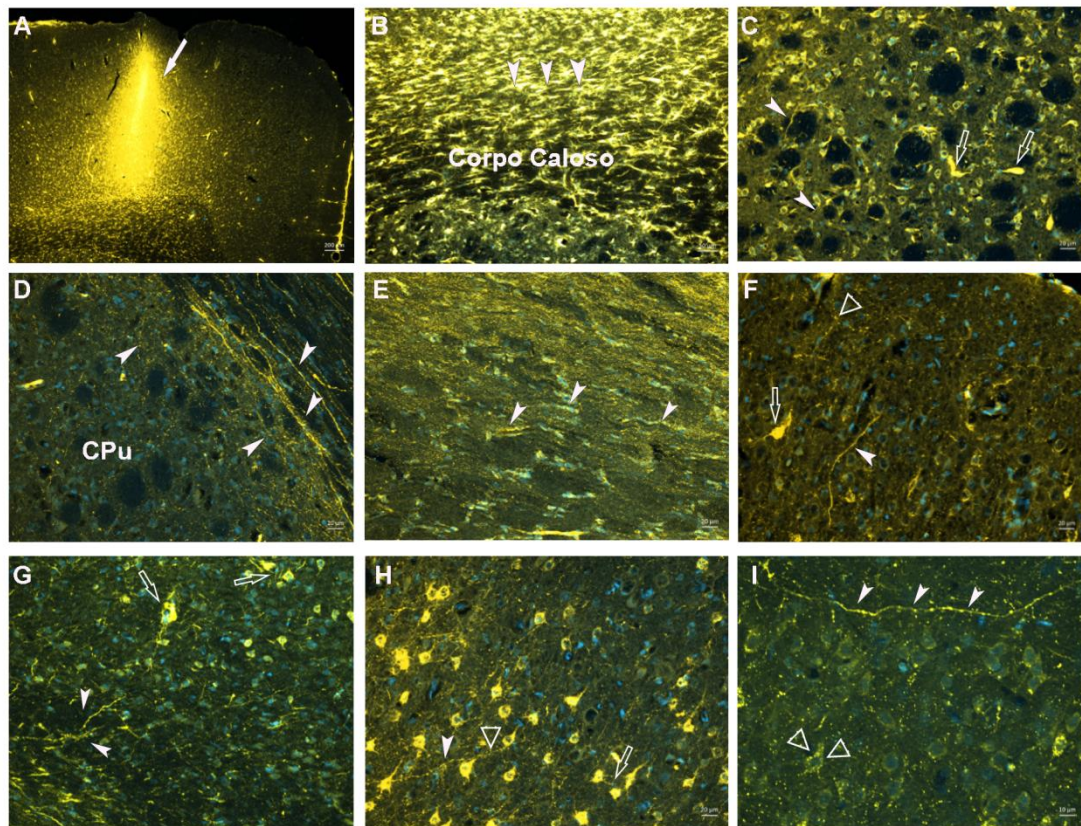
No presente trabalho, todos os ratos utilizados receberam microinjeção de traçador anterógrado em M1, no hemisfério direito, contralateral à lesão cortical, conforme mostrado na figura 16.



**Figura 16 - Representação esquemática dos sítios confirmados histologicamente de microinjeção do neurotraçador anterógrado no córtex motor primário (M1) de ratos Wistar em diagramas modificados de cortes de cérebros de ratos do atlas estereotático de Paxinos e Watson. Microinjeções realizadas no hemisfério cerebral direito de ratos (★) naïve, e submetidos à (△) ablação + salina fisiológica, (▲) ablação + MNMO, (■) ablação + MSC, (○) isquemia + salina fisiológica, (●) isquemia + MNMO, (◆) isquemia + MSC, (▽) ablação aguda + salina fisiológica, (▼) ablação aguda + MNMO, (◉) isquemia aguda + salina fisiológica, (●) isquemia aguda + MNMO.**

#### **4.4. Distribuição de corpos neurônicos e eferências axônicas em neocórtex circunjacente à lesão e no neostriado de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais, tratados com MNMO ou veículo.**

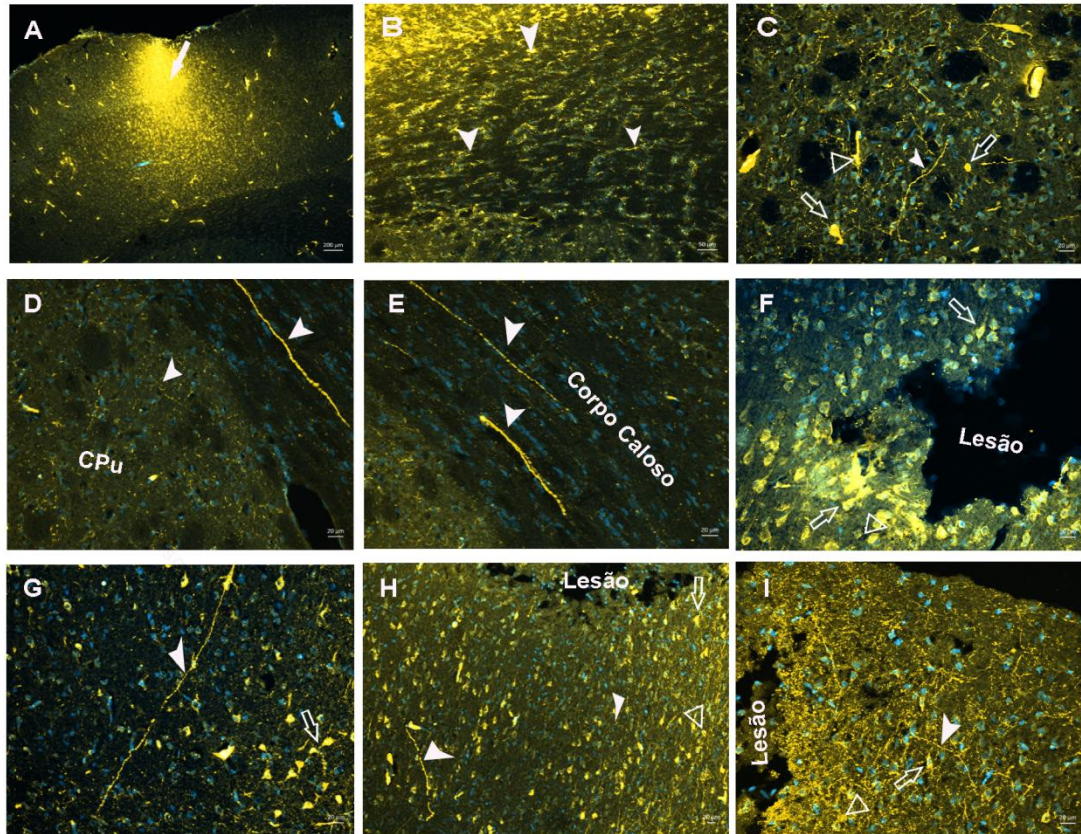
Imagens do cérebro de ratos Wistar “**NAÏVE**” são mostradas na **figura 17**, onde se identificam um sítio representativo de microinjeção do neurotraçador em M1 (Fig. 17A), fibras positivas para o BDA profusamente distribuídas no corpo caloso ipsilateral e contralateral à microinjeção (Fig. 17 B, D e E), no neostriado ipsilateral (Fig. 17C) e contralateral (Fig. 17D) e nas camadas molecular (Fig. 17F), granular externa (Fig. 17F), fusiforme (Fig. 17G), piramidais interna (Fig. 17H e I). Notaram-se pericários (figura 17 - C,D e G), botões terminais (figura 17I) e neurônios interconectados com a área cortical em que foi depositado o neurotraçador. Estes achados histológicos são condizentes com o encéfalo sem lesão.



**Figura 17 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar “NAÏVE”, submetidos à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran (BDA; PM 10000; 0,5 $\mu$ L) conjugado a Alexa-Fluóor 546 no neocórtex.** (A) Sitio de injeção do neurotraçador no córtex motor primário (M1) (seta branca). (B) Corpo caloso e (C) caudado-putamen ipsilateral à microinjeção. (D) Caudado-putamen e (E) corpo caloso contralateral à microinjeção. (F) Camada molecular e camada granular externa contralateral à microinjeção. (G) Camada fusiforme, (H) camada piramidal interna e (I) camada molecular/camada piramidal interna contralateral à microinjeção. Notar fibras (ponta de seta branca), varicosidades sugestivas de botões sinápticos (ponta de seta transparente), e pericários (setas transparentes) positivos para o neurotraçador situados em diferentes estruturas. Em G e I, podem ser notadas também aferências provenientes de neurônios de projeção córtico-cortical atingindo a camada fusiforme contralateral à microinjeção do neurotraçador anterógrado. (n=3). Barra de Escala: 200 $\mu$ m no painel A; 50 $\mu$ m no painel B; 20 $\mu$ m nos paineis C,D,E,F e H; 10 $\mu$ m no painel I.

As análises morfológicas de cortes transversais do cérebro de *Rattus norvegicus* do grupo “**ABL CONT**” (figura 18), composto por animais submetidos à **ablação do córtex sensório-motor e tratados com veículo** (PBS; 10Mm), mostraram, que o depósito intracortical de um neurotraçador anterógrado (figura 19A), evidenciou aferências passando pelo corpo caloso ipsilateral (Fig. 18B) e contralateral (Fig. 18D e E) ao sítio da injeção do neurotraçador e direcionando-se ao neocórtex ipsilateral à lesão. Neurônios e fibras positivas para o BDA foram identificados no neocórtex ipsilateral (Fig. 18C) e contralateral (Fig. 18D) ao sítio de depósito intracortical do neurotraçador anterógrado, sugerindo conexões recíprocas com o neocórtex, principalmente ipsilaterais. Células, fibras e botões terminais positivos para o neurotraçador foram também identificados na camada granular externa do córtex cerebral circunjacente à lesão cortical (Fig. 18F). Na camada fusiforme do córtex cerebral ipsilateral à lesão (Fig. 18G) identificaram-se também fibras e neurônios interconectados com o neocórtex contralateral. As camadas piramidal e granular externas ipsilaterais à lesão (Fig. 18H - I) mostraram uma profusão de aferências conectando neurônios situados abaixo (C) e lateralmente (D) à lesão cortical.

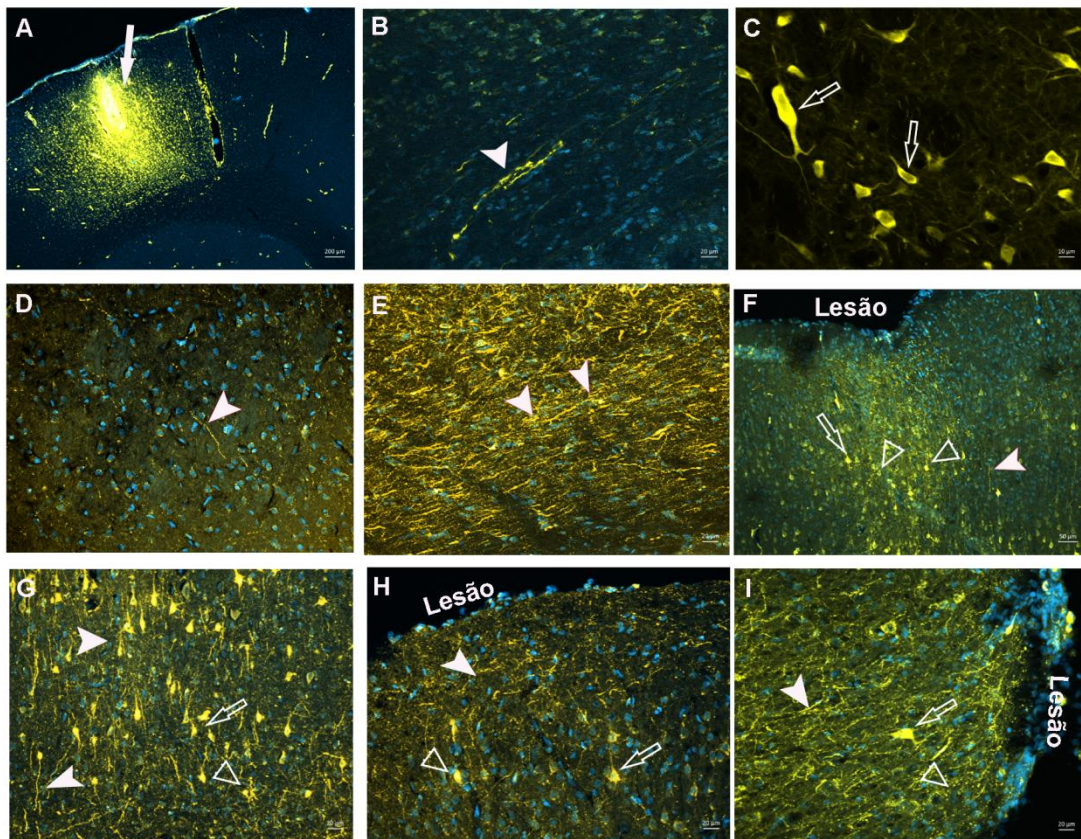




**Figura 18 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar “ABL CONT”, submetidos à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran (BDA; PM 10000; 0,5μL) conjugado a Alexa-Flúor 546 no neocórtex.** (A) Sitio de injeção do neurotraçador no córtex motor primário (M1) (seta branca). (B) Fotomicrografias de cortes transversais do corpo caloso e do (C) caudado-*putamen* ipsilateral ao sítio de microinjeção de BDA. (D) Caudado-*putamen*, (E) corpo caloso, (F) camada granular externa, (G) camada fusiforme, (H) camada granular externa e camada piramidal interna contralaterais ao depósito intracortical de BDA. (I) Córtex cerebral lateral à lesão. Notar fibras (ponta de seta branca), varicosidades sugerindo botões sinápticos (ponta de seta transparente), e pericários (seta transparente) positivos para o neurotraçador (n=3). Barra de Escala: 200μm no painel A; 50μm no painel B; 20μm nos paineis C,D,E,F,G, H e I.

A figura 19 representa ratos Wistar do grupo “**ABL MNMO**” submetidos à ablação do neocórtex e tratados com injeção endovenosa de  $30 \times 10^6/0,5\text{ml}$  de células mononucleares, uma análise qualitativa que mostra o efeito da microinjeção do neurotraçador biodextran (BDA, PM 10000; 0.5 ml) conjugado a Alexa-Flúor – 546 no neocórtex contralateral à lesão (Fig 19A). Em 4B, corpo caloso ipsilateral à microinjeção do BDA mostrando (ponta de seta) fibras positivas para o neurotraçador. 19C e 19D: Neostriado ipsilateral e contralateral (19D) à microinjeção de BDA, mostrando

pericários e fibras conectados com o neocórtex íntegro. E: fibras positivas para o BDA (pontas de setas) percorrendo o corpo caloso ipsilateral à lesão. F: camada piramidal externa e granular externa, mostrando pericários e fibras positivas para o BDA, situados contralateralmente ao sítio de microinjeção do neurotraçador. G-I: camadas molecular e granular externa circunjacentes à lesão cortical mostrando pericários, fibras e botões terminais (puncta amarelas) positivos para o neurotraçador, situados nas camadas receptoras do neocórtex lesado.

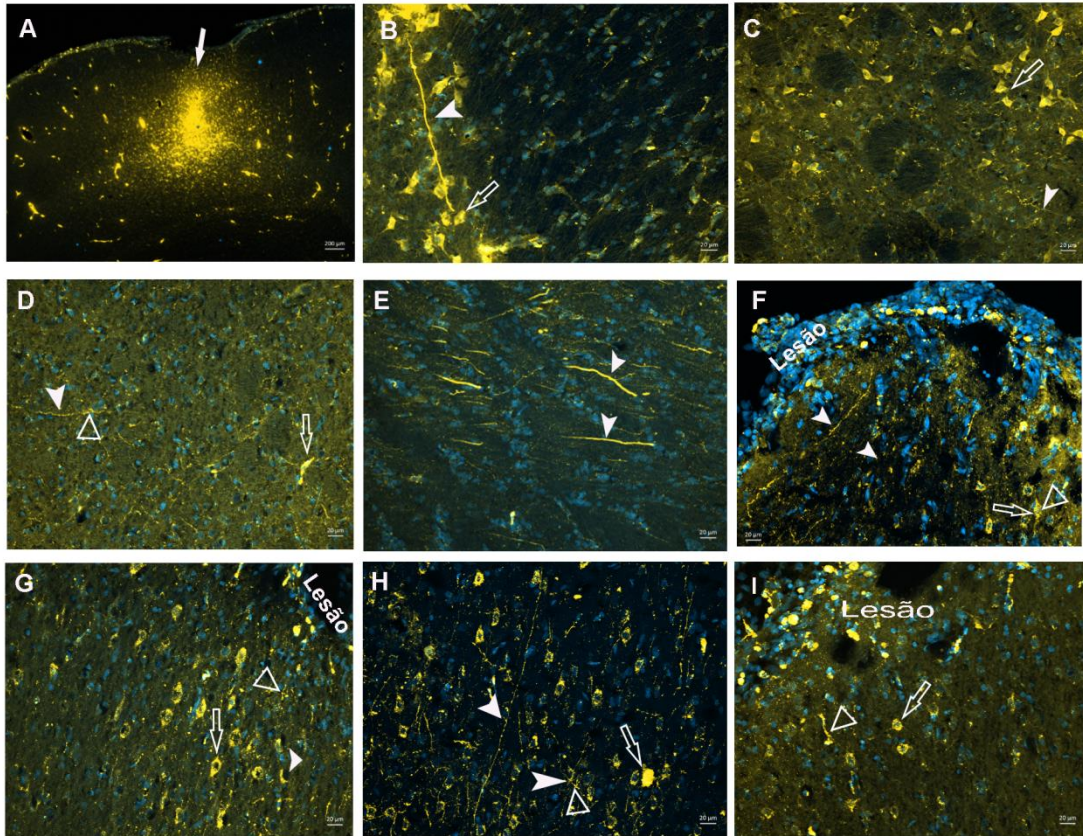


**Figura 19 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ABL MNMO”, submetidos à ablação do córtex sensório-motor, tratados com injeções de células mononucleares de medula óssea ( $30 \cdot 10^6$  células/0,5mL) por via endovenosa e submetidas à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran (BDA; PM 10000; 0,5 $\mu$ L) conjugada ao fluoróforo Alexa-Flúor 546 no neocórtex contralateral à lesão. (A) Sítio de microinjeção (seta branca) do BDA no córtex motor primário (M1). (B) Corpo caloso e (C) caudado-putamen ipsilaterais ao sítio de depósito intracortical de BDA. (D) Caudado-putamen, (E) corpo caloso contralaterais ao sítio de depósito intracortical de BDA. (F - I) Córtex cerebral adjacente à lesão. Note fibras (ponta de seta branca), botões sinápticos (pontas de setas transparentes), sugerindo sinapses, e pericários (setas transparentes) positivos para o BDA (n=3). Barra de Escala: 200 $\mu$ m no painel A; 50 $\mu$ m no painel F; 20 $\mu$ m nos painéis B,D,E,G,H e I; 10 $\mu$ m no painel C.**



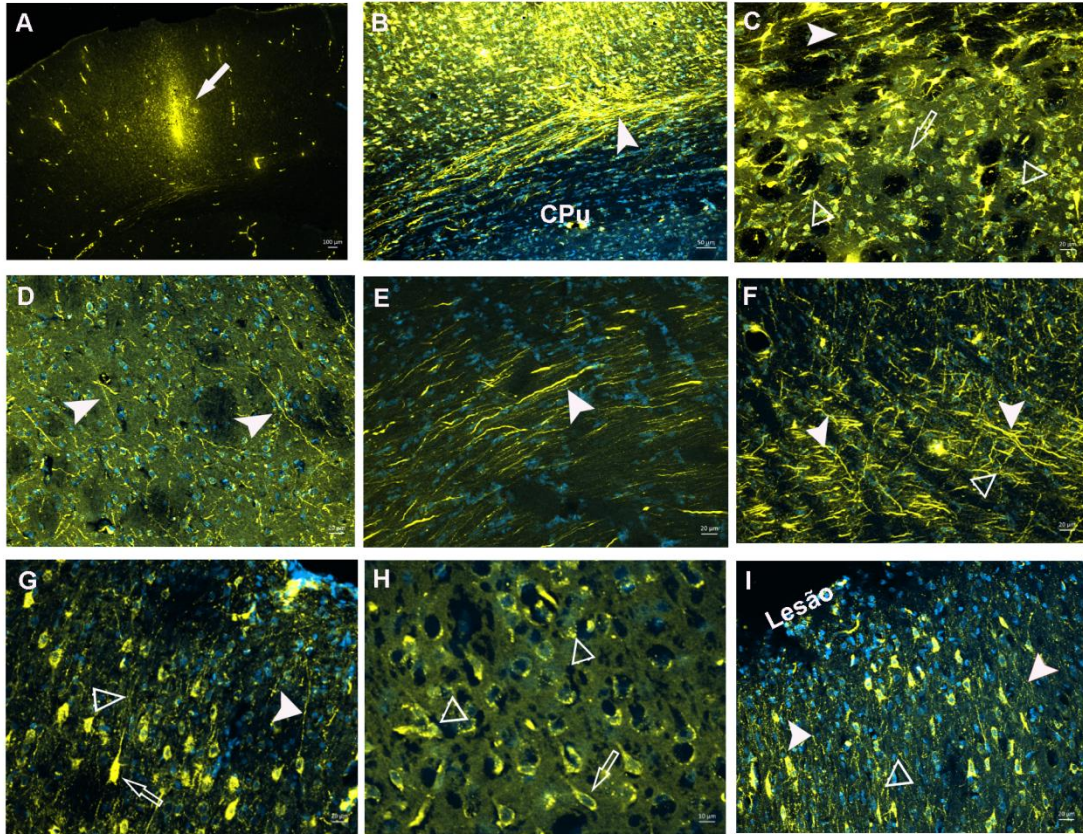
A figura 20 apresenta as fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “**ISQ CONT**”, submetidos à **lesão isquêmica** do córtex sensório-motor, tratados com injeções endovenosas de veículo (PBS, 10mM). A microinjeção do neurotraçador conjugado com Alexa-Flúor 546 no córtex M1 mostrou um axônio positivo para o BDA abandonando a camada fusiforme (à esquerda) e ganhando o corpo caloso (à direita) ipsilateral ao sítio da microinjeção do neurotraçador anterógrado. Identificaram-se pericários (Fig. 20C) e fibras (Fig. 20D) positivas para o BDA, situados no neocórtex ipsilateral (Fig. 20C) e contralateral (Fig. 20D) ao sítio de microinjeção intracortical de BDA, sugerindo neurônios neocorticais conectados bilateralmente ao sítio de injeção do neurotraçador. Observaram-se, ainda, fibras trafegando no corpo caloso contralateralmente (Fig. 20E), destacando-se uma profusa rede conectiva contralateral (Fig. 20F), com neurônios, fibras e botões terminais (puncta amarelas) sugerindo sinapses situadas em torno da lesão. Ainda nas adjacências da área lesada, observou-se nas camadas granular externa e piramidal externa, neurônios, fibras varicosas e terminações nervosas positivas para o neurotraçador.





**Figura 20 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ISQ CONT”, submetidos à lesão isquêmica do córtex sensório-motor, tratados com injeções endovenosas de veículo (PBS, 10mM), e submetidos à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran (BDA; PM 10000; 0,5 $\mu$ L) conjugado a Alexa-Flúor 546 no neocórtex. (A) Sitio de injeção (seta branca) de BDA no córtex motor primário (M1). (B) Corpo caloso e (C) caudado-*putamen* ipsilaterais à microinjeção de BDA. (D) Caudado-*putamen*, (E) corpo caloso, (F - I) camada granular externa e camada piramidal externa contralaterais ao depósito intracortical de BDA. Note fibras (pontas de setas brancas), botões sinápticos (ponta de seta transparente), sugerindo contatos sinápticos locais, e pericárdios (setas transparente) positivos para BDA (n=3). Barra de Escala: 200 $\mu$ m no painel A; 20 $\mu$ m nos painéis B a I.**

Considerando ratos Wistar do grupo **“ISQ MNMO” (Fig 21)**, submetidos à isquemia do neocórtex e tratados com injeção endovenosa de  $30 \times 10^6/0,5\text{ml}$  de células mononucleares, uma análise qualitativa mostrou que a microinjeção do neurotraçador biodextran (BDA, PM 10000; 0.5 ml) conjugado a Alexa-Flúor – 546 no neocórtex contralateral à lesão permitiu a identificação de profusas fibras eferentes situadas no corpo caloso ipsilateral à microinjeção do BDA (Fig. 21B) dirigindo-se ao neostriado bilateralmente e ao neocórtex contralateral. Pericários (Fig. 21C) e fibras (Fig. 21D) positivas para o BDA foram largamente identificadas tanto ipsi como contralateralmente, mostrando conexões recíprocas entre o neocórtex e o neostriado, com predomínio ipsilateral. Uma riqueza de axônios foi encontrada no corpo caloso ipsilateral à lesão (Fig. 21E), abandonando-o e dirigindo-se ao neocórtex contralateral ao sítio de depósito intracortical de BDA (Fig. 21F), envolvendo primeiramente neurônios da camada fusiforme ipsilateral à lesão e projetando-se às camadas piramidais externa (Fig. 21G) e interna (Fig 21H) ipsilaterais à lesão (Fig. 21I). De particular interesse, identificaram-se também no córtex cerebral ipsilateral à lesão (Fig. 21G-I), especificamente nas camadas molecular (acima) e granular externa (abaixo) circunjacentes à lesão cortical, pericários, fibras e botões terminais (puncta amarelas) positivos para o neurotraçador, situados nas camadas receptoras do neocórtex lesado.



**Figura 21 - Fotomicrografias de cortes transversais do cérebro de ratos Wistar do grupo “ISQ MNMO”, submetidos à ablação do córtex sensório-motor, tratados com injeções de células mononucleares de medula óssea ( $30 \cdot 10^6$  células/ $0,5\mu\text{L}$ ) por via endovenosa e submetidas à microinjeção do neurotraçador anterógrado biodextran (BDA; PM 10000;  $0,5\mu\text{L}$ ) conjugada ao fluoróforo Alexa-Fluór 546 no neocórtex contralateral à lesão. (A) Sítio de microinjeção (seta branca) do BDA no córtex motor primário (M1). (B) Corpo caloso e (C) caudado-putamen ipsilaterais ao sítio de depósito intracortical de BDA. (D) Caudado-putamen, (E) corpo caloso contralaterais ao sítio de depósito intracortical de BDA. (F - I) Córtex cerebral adjacente à lesão. Note fibras (ponta de seta branca), botões sinápticos (pontas de setas transparentes), sugerindo sinapses, e pericários (setas transparentes) positivos para o BDA ( $n=3$ ). Barra de Escala:  $200\mu\text{m}$  no painel A;  $50\mu\text{m}$  no painel F;  $20\mu\text{m}$  nos painéis B,D,E,G,H e I;  $10\mu\text{m}$  no painel C.**

A partir desta análise, tornou-se evidente que em casos de lesões cortical (ablação e isquemia), com grandes perdas neuroniais em áreas circunjacente à lesão, o sistema nervoso tende a compensar as perdas neuroniais com aumento da rede conectiva, para minimizar os déficits, sobretudo funcionais causados pela lesão.



Aparentemente, fibras, pericários e botões sinápticos se reorganizam a fim de permitir uma reconexão com a área lesada.

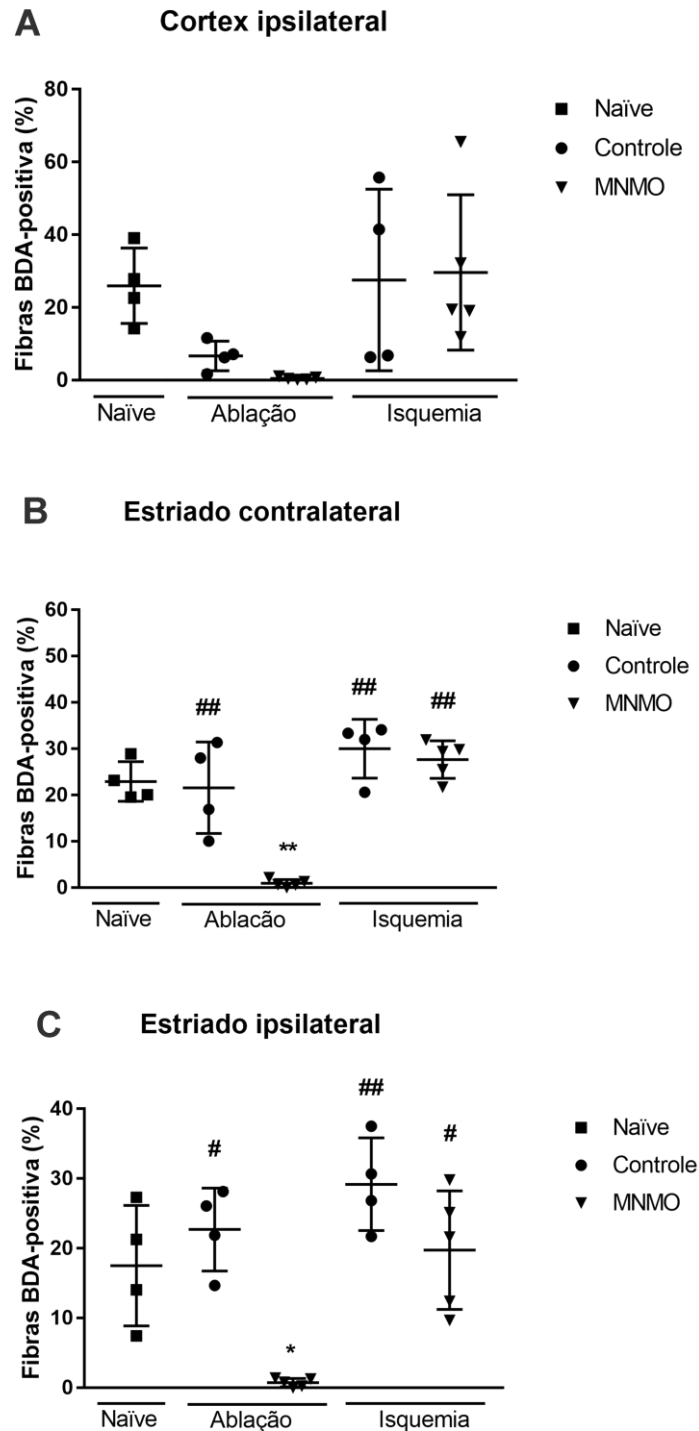
#### **4.5. Análise quantitativa das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais, tratados com MNMO em fase aguda.**

Em relação às análises morfológicas quantitativas do tecido neural ipsilateral adjacente à lesão cortical, de acordo com ANOVA *one-way*, houve um efeito significativo do tratamento ( $F_{4,17} = 3.484$ ,  $p = 0.0298$ ). Em camadas corticais circunjacentes à lesão, a isquemia por termocoagulação unilateral ocasionou um aumento do número de fibras positivas ao BDA, embora, não apresentando diferenças significativas, quando comparada a lesão por ablação cortical em animais tratados com MNMO e com veículo (teste *post hoc* de Tukey;  $p > 0.05$  em ambos os casos). Esses achados são mostrados na figura 22A.

Em caudado-putamen contralateral à lesão, de acordo com ANOVA *one-way*, houve um efeito significativo do tratamento ( $F_{4,17} = 20.26$ ;  $p = 0.0001$ ). O tratamento endovenoso de MNMO induziu um efeito significativo na redução de fibras positivas ao BDA em animais submetidos à lesão por ablação cortical, quando comparado aos demais grupos experimentais (teste *post hoc* de Tukey;  $p < 0.001$ ). Esses dados são mostrados na figura 22B.

No caudado-putamen ipsilateral à lesão, de acordo com ANOVA *one-way*, houve um efeito significativo do tratamento ( $F_{4,17} = 11,75$ ;  $p = 0.0001$ ). Igualmente ao caudado-putamen contralateral à lesão, o tratamento endovenoso de MNMO induziu um efeito significativo na redução de fibras positivas ao BDA em animais submetidos à lesão por ablação cortical, quando comparado aos demais grupos experimentais (teste *post hoc* de Tukey;  $p < 0.05$ ). Esses dados são mostrados na figura 22C.

Valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 2.



**Figura 22 – Efeito de diferentes lesões encefálicas no número de fibras axônicas de projeções córtico-corticais e córtico-estriatais, em fase aguda.** O efeito do tratamento com MNMO no brotamento axônico de camadas corticais circunjacentes à lesão encefálica (A) e no neocórtico contralateral (B) e ipsilateral (C) à lesão foram demonstrados. Dados foram representados como média e  $\pm$  erro padrão da média. (n= 4-5 ratos por grupo). \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , em comparação ao grupo NAÏVE, ## $p < 0.0001$ , # $p < 0.01$ , em comparação ao grupo ABL MNMO, de acordo com ANOVA *one-way*, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

**Tabela 2:** Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais da fase aguda.

GRUPO	CÓRTEXL IPSILATERAL		ESTRIADO CONTRALATERAL		ESTRIADO IPSILATERAL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
NAÏVE	25.98	5.18	22.95	2.15	17.53	4.32
ABL CONT	6.70	2.03	21.60	4.93	22.70	2.97
ABL MNMO	0.53	0.18	0.95	0.37	0.75	0.27
ISQ CONT	27.60	12.48	30.02	3.17	29.20	3.33
ISQ MNMO	29.64	9.56	27.69	1.81	19.74	3.80

EPM: erro padrão da média. ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey.

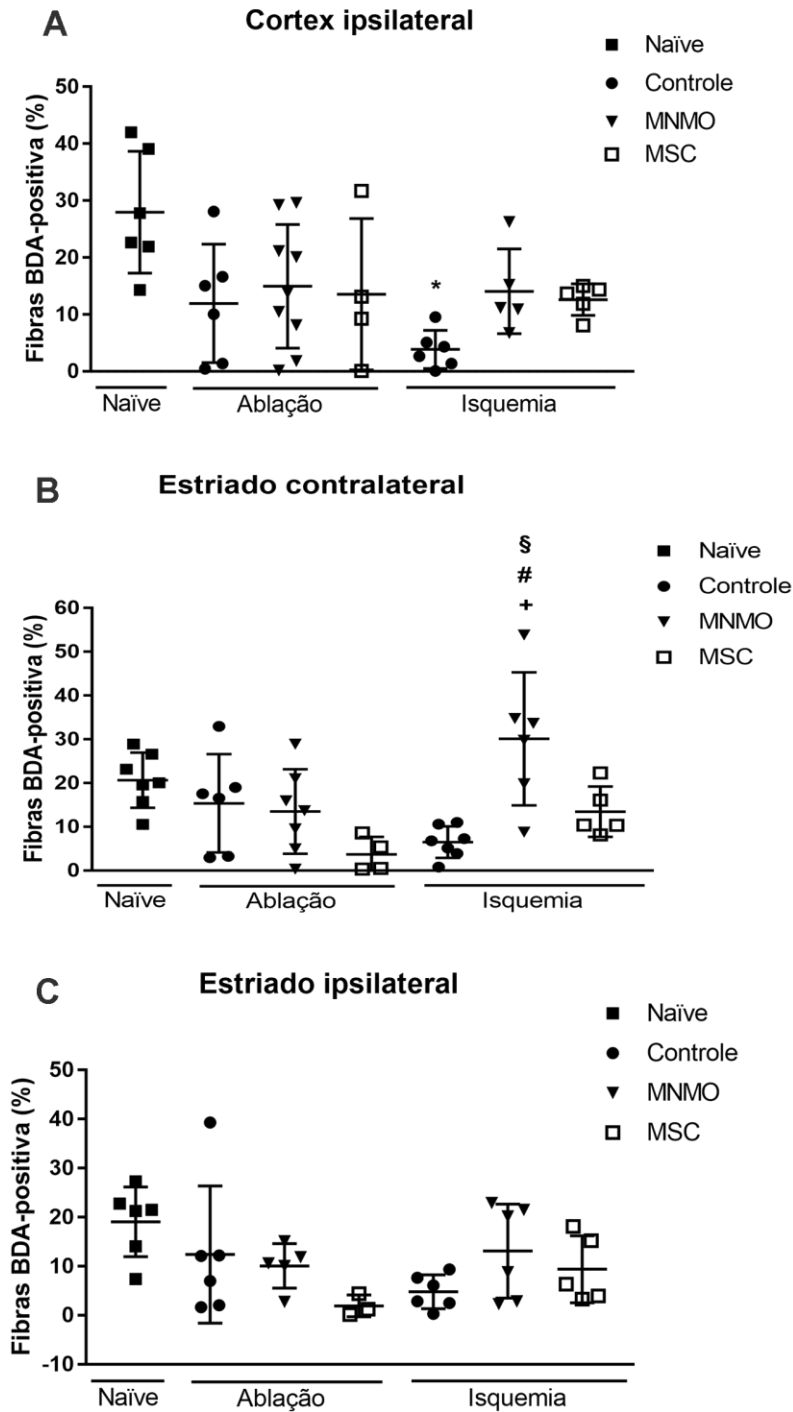
#### 4.6. Análise quantitativa das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais, tratados com MNMO e MSC em fase crônica

A lesão neocortical causada pela isquemia por termocoagulação unilateral mostrou uma diminuição significativa do número de fibras positivas ao BDA em camadas corticais adjacentes à lesão cerebral (teste *post hoc* de Tukey;  $p = 0,0013$ ). Interessantemente, essa diminuição do número de fibras positivas ao BDA em camadas corticais adjacentes à lesão encefálica, em comparação aos roedores saudáveis (grupo NAÏVE) foi revertida pelo tratamento endovenoso com MNMO e MSC, embora, não foram encontradas diferenças significativas em grupos tratados em comparação para cada respectivo controle (teste *post hoc* de Tukey;  $p > 0.05$  em ambos os casos). Esses achados são mostrados na figura 23A.

Em relação ao caudado-putamen contralateral à lesão, de acordo com ANOVA *one-way*, houve um efeito significativo do tratamento ( $F_{6,35} = 5.404$ ;  $p = 0.0005$ ). Animais com lesão isquêmica tratados com MNMO mostrou um significativo aumento de fibras positivas ao BDA quando comparados ao grupo isquêmico controle (teste *post hoc* de Tukey;  $p = 0.0007$ ). O efeito do tratamento endovenoso com MNMO no grupo isquêmico foi também diferentemente significativo em comparação aos grupos submetidos à ablação tratados com MNMO e MSC. (teste *post hoc* de Tukey;  $p = 0.0320$  e  $p < 0.0012$ , respectivamente). Esses dados são mostrados na figura 23B.

Com respeito ao neostriado ipsilateral circunjacente à lesão, de acordo com ANOVA *one-way* não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ( $F_{6,30} = 2.272$ .  $p = 0.0631$ ), conforme mostrado na figura 23C.

Valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 3.



**Figura 23 – Efeito de diferentes lesões encefálicas no número de fibras axônicas de projeções córtico-corticais e córtico-estriatais, em fase crônica.** O efeito do tratamento com MNMO e MSC no brotamento axônico de camadas corticais circunjacentes à lesão encefálica (A) e no neoestriado contralateral (B) e ipsilateral (C) à lesão foram demonstrados. Dados foram representados como média e  $\pm$ erro padrão da média. (n= 5-7 ratos por grupo). \* $p < 0.01$ , em comparação ao grupo NAÏVE, # $p < 0.05$ , em comparação ao grupo ABL MNMO, + $p < 0.001$ , em comparação ao grupo ISQ CONT e § $p < 0.01$  em comparação ao grupo ABL MSC, de acordo com ANOVA *one-way*, seguido test *post hoc* de Tukey.



**Tabela 3:** Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais da fase crônica.

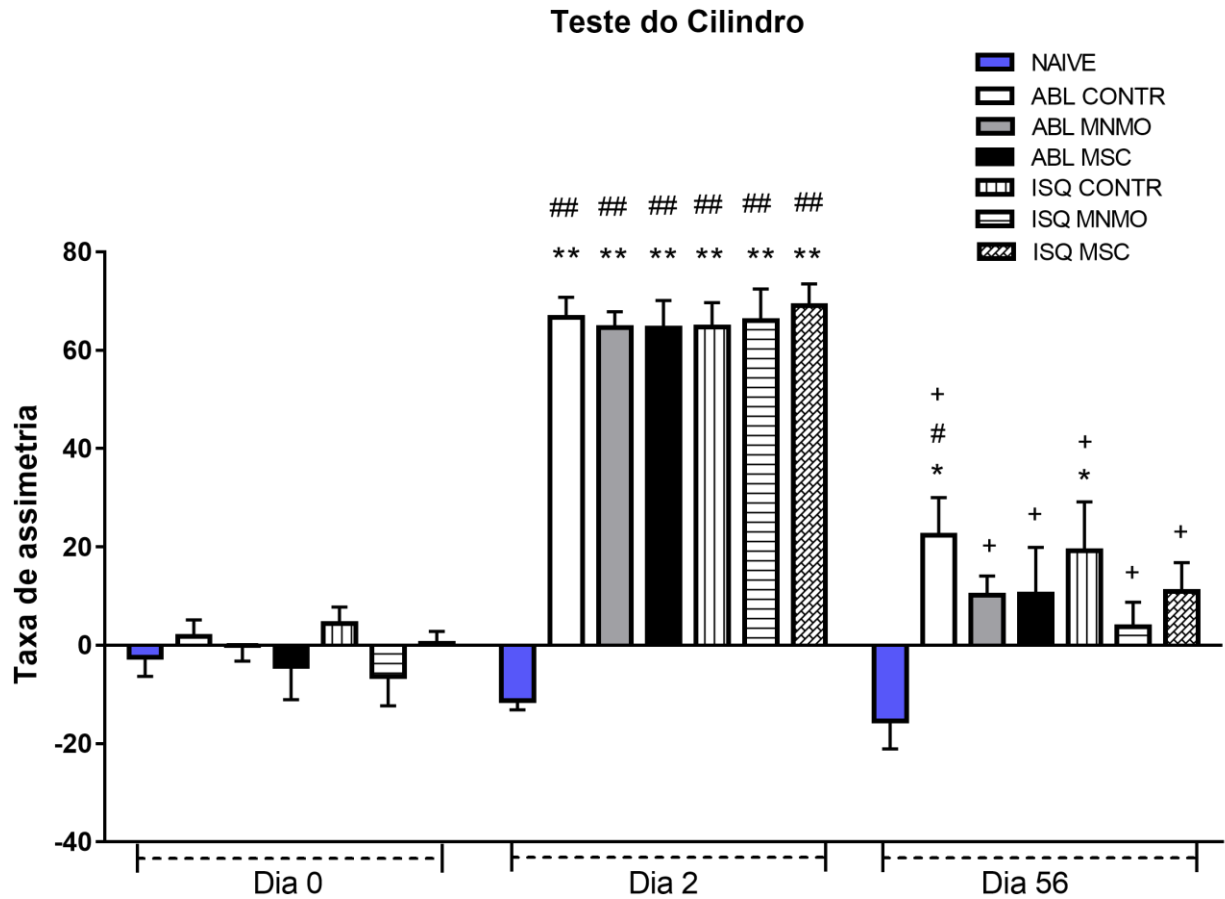
GRUPO	CÓRTEXL IPSILATERAL		ESTRIADO CONTRALATERAL		ESTRIADO IPSILATERAL	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
NAÏVE	27.98	±4.37	20.69	±2.38	19.07	±2.90
ABL CONT	11.95	±4.24	15.39	±4,58	12.41	±5.71
ABL MNMO	14.96	±3.62	13.52	±3,65	10.09	±2.03
ABL MSC	13.55	±6.64	3,73	±2,00	1.95	±1.28
ISQ CONT	3.88	±1.37	6.52	±1,37	4.82	±1.42
ISQ MNMO	14.08	±3.32	30.13	±6.21	13.10	±3.90
ISQ MSC	12.62	±1.24	13.49	±2.56	9,40	±3,04

EPM: erro padrão da média. ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey.

#### 4.7. Efeito do tratamento endovenoso de MNMO e MSC no desempenho funcional motor causado por diferentes lesões neocorticais em ratos Wistar submetidos ao teste do cilindro.

De acordo com a ANOVA *two-way* de medidas repetidas, houve efeito significativo do tratamento ( $F_{4,111} = 24.31$ ,  $p < 0,0001$ ), do tempo ( $F_{2,111} = 120.3$ ,  $p < 0,0001$ ) e da interação tratamento vs tempo ( $F_{8,111} = 8.59$ ,  $p < 0,0001$ ). Todos os grupos experimentais mostraram uma alta taxa de assimetria no segundo dia após as lesões cerebrais, exceto o grupo NAÏVE, demonstrada pela redução do uso da pata contralateral durante a exploração vertical, sugerindo uma perda de função como resultado de isquemia ou ablação neocortical (teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,0001$  em todos os casos). No 56º dia após as lesões corticais, houve melhora significativa do desempenho motor apresentado pelos ratos Wistar previamente lesados, no teste do cilindro (teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$  em todos os casos), embora animais

submetidos à ablação cortical sem tratamento com MNMO (ABL CONT) não conseguiram demonstrar uma melhoria funcional motora completa no teste do cilindro (teste *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$  em comparação com a linha de base). Não houve diferença significativa entre os grupos em cada janela temporal (teste *post hoc* de Tukey,  $p > 0,05$  em todos os casos). Na avaliação pré-lesão (Dia 0) do desempenho motor, não houve diferença significativa entre os grupos, indicando que todos os animais, antes do procedimento cirúrgico, apresentavam as mesmas condições funcionais de simetria das patas dianteiras (teste *post hoc* de Tukey,  $p > 0,05$  em todos os casos). Esses achados são mostrados na figura 24 e os valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 4.



**Figura 24 – Efeito do tratamento endovenoso de MNMO e MSC no desempenho funcional motor causado por diferentes lesões corticais em ratos Wistar submetidos ao teste do cilindro.** Lesões cerebrais feitas por isquemia por termocoagulação (ISQ) e por ablação por aspiração cortical (ABL). O comportamento motor foi avaliado no dia 0 (avaliação pré-lesão), no segundo dia e no 56º dia após as lesões corticais. Dados foram representados como média,  $\pm$  erro padrão da média. #p < 0.05, ##p < 0.0001, em comparação a linha de base (dia 0); \*p < 0.05; \*\*p < 0.001, em comparação ao grupo NAÏVE na mesma janela terapêutica, +p < 0.0001, em comparação ao respectivo grupo controle no dia 2, de acordo com ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo *post hoc* de Tukey. NAÏVE: roedores controle saudáveis (n=7); ABL CONTR: ablação cortical + salina fisiológica por via endovenosa (n=9); ABL MNMO: ablação cortical + MNMO por via endovenosa ( $3 \cdot 10^7$  células/0.5mL; n=8); ABL MSC: ablação cortical + MSC ( $3 \cdot 10^6$  células/0.5mL; n=8); ISQ CONTR: isquemia cortical + salina fisiológica por via endovenosa (n=10); ISQ MNMO: isquemia cortical + MNMO por via endovenosa ( $3 \cdot 10^7$  células/0.5mL; n=8); ISQ MSC: isquemia cortical + MSC ( $3 \cdot 10^6$  células/0.5mL; n=11).

**Tabela 4:** Representação de valores de média e erro padrão da média dos grupos experimentais no teste do cilindro.

GRUPO	DIA 0		DIA 2		DIA 56	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>NAÏVE</b>	-2,45	3,88	-11,24	1,88	-15,36	5,74
<b>ABL CONT</b>	1,78	3,33	66,66	4,09	22,37	7,62
<b>ABL MNMO</b>	-0,03	3,20	64,61	3,24	10,18	3,88
<b>ISQ CONT</b>	4,44	3,31	64,71	4,98	19,25	9,87
<b>ISQ MNMO</b>	-6,33	6,01	66	6,44	3,8	4,93
<b>ABL MSC</b>	-4,25	6,81	64,44	5,67	10,44	9,43
<b>ISQ MSC</b>	1,10	2,49	69,12	5,45	12,05	6,32

EPM: erro padrão da média. ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com estudos prévios, a isquemia cerebral produzida por termocoagulação e a ablação cortical em áreas sensório-motoras são danos que causam déficits motores unilaterais e diferentes padrões de remodelamento axônico (SZELE *et al.*,1995; NAPIERALSKI *et al.*,1998; URYU *et al.*,2001; CARMICHAEL, 2003; RIBAN *et al.*,2006; FREITAS *et al.*, 2015; KOLB *et al.*, 2014). Considerando esses relatos, esses diferentes modelos de lesões corticais foram escolhidos no presente trabalho para investigar a recuperação funcional motora pós-lesão e a neuroplasticidade induzida pelo tratamento com células-tronco mesenquimais e células mononucleares da medula óssea.

### **5.1. Efeito do tratamento endovenoso com MNMO nas reconexões córtico-corticais e córtico-estriatais em ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais em fase aguda**

Os dados em fase aguda das lesões corticais, demonstraram que o tratamento endovenoso de MNMO em animais submetidos à ablação cortical foi capaz de reduzir o número de fibras axônicas, em neocórtex circunjacente à lesão e no neoestriado ipsilateral e contralateral à lesão.

Em estudos prévios, mostrou-se que lesões isquêmicas e ablação cortical apresentam diferentes respostas à plasticidade (SZELE *et al.*,1995; NAPIERALSKI *et al.*,1998; URYU *et al.*,2001; CARMICHAEL, 2003; RIBAN *et al.*,2006; KOLB *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares, específicos à isquemia por termocoagulação e à ablação cortical, que podem atuar na indução ou no bloqueio da neuroplasticidade, são desconhecidos. Interessantemente, não foram encontradas abordagens terapêuticas semelhantes a este estudo, no qual se avaliou os efeitos do tratamento de células MNMO na indução de neuroplasticidade córtico-cortical e córtico-estriatal, em dois modelos de lesões cortical em fase aguda.

Células mononucleares de medula óssea vêm favorecendo a indução de brotamento axônico, neovascularização e neuroproteção em modelos de AVE (SHEN *et al.*, 2002; HONMOU *et al.*, 2012). No entanto, neste trabalho, a redução significativa das fibras axônicas nos grupos de animais submetidos à ablação cortical e tratados com MNMO, sugeriu que a eficiência da terapia pode depender de mecanismos moleculares, celulares e do tempo de lesão, visto que com 68 dias de lesão, este resultado não foi observado. Considerou-se que, o fato dessas células terem efeitos parácrinos apontados como vantajosos a uma terapia celular, não reduziram a possibilidade de que, associadas a outros fatores e a mecanismos intrínsecos de uma lesão, de um dado núcleo e de um microambiente neural, as células possam mediar ações diferenciadas, ora facilitando, ora inibindo os brotamentos axônicos, segundo cada situação específica.

Alguns estudos podem corroborar o pressuposto de que a atuação das MNMO pode depender do microambiente a ela estabelecido. Dados de uma análise proteômica de Gomes (2017), para a identificação de proteínas diferencialmente expressas na região cortical sensório-motora adjacente à lesão isquêmica ou ablação, em fase aguda, permitiram discussões exequíveis por apresentar uma metodologia muito semelhante à deste estudo. Diante de uma gama de proteínas nesta amostra em questão, as análises revelaram que as proteínas C3 e C4 do Complemento foram negativamente reguladas nos animais isquêmicos e tratados com MNMO, enquanto nos animais submetidos à ablação e também tratados com MNMO, essas proteínas foram reguladas positivamente. Sugeriu-se que MNMO no cérebro com ablação cortical ativam o sistema complemento, resultando na expressão das proteínas C3 e C4 que, aparentemente, confrontando-se com os dados deste artigo, atuariam negativamente à neuroproteção de fibras córtico-corticais e córtico-estriatais.

As proteínas C3 e C4 são polipeptídeos relacionadas ao Sistema Complemento. Diversos estudos realizados em modelos animais têm mostrado o envolvimento deste sistema na modulação de inflamações no SNC, inclusive com estratégias que bloqueiam o recrutamento de neutrófilos e resultam em efeitos benéficos para muitos tipos de inflamação (STEINBACH *et al.*, 2013). Utilizando células MSC em ratos submetidos à isquemia causada por oclusão da artéria cerebral média (OACM), Jung *et*

*al.* (2016) reportaram uma neuroproteção do tecido cerebral danificado e associaram esse efeito ao tratamento com MSC, o que induziu a redução da expressão de C3 tanto no cérebro, como no sangue.

Stokowska *et al.* (2017) descreveram que proteínas do complemento estejam envolvidas na plasticidade neural induzida por isquemia, incluindo a reposição celular, a reorganização dos circuitos neurais e, conseqüentemente, a regulação da entrada sináptica. Porém, o papel do sistema complemento na lesão cerebral isquêmica é complexo e parece depender não apenas de fatores, tais como o tipo de lesão isquêmica e o estágio de desenvolvimento do cérebro, mas também o tempo após a lesão.

Dessa forma, baseando-se em dados científicos já descritos, pode ser que a célula MNMO num animal com ablação, por algum mecanismo não esclarecido, ative o sistema complemento e, conseqüentemente, não forneça a neuroproteção ao tecido danificado pela lesão, e isso contribuiria para uma perda de fibras axônicas córtico-corticais e córtico-estriatais, conforme foi mostrado neste trabalho.

## **5.2. Efeito do tratamento endovenoso de MNMO e MSC nas reconexões córtico-corticais e córtico-estriatais e no desempenho funcional motor de ratos naïve e submetidos a lesões corticais unilaterais em fase crônica.**

Embora os benefícios das MSC e MNMO sejam apontados na recuperação funcional motora em modelos experimentais de isquemia e ablação cortical (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; DE VASCONCELOS *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2015), a relação entre a recuperação funcional e o brotamento axônico não é bem compreendida. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma avaliação funcional motora de ratos lesados por isquemia e ablação cortical, além de investigar os efeitos do tratamento com MSC e MNMO nas reconexões córtico-corticais e córtico-estriatais desses animais.

De acordo com outros estudos (CARMICHAEL, 2003; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*; 2012; OVERMAN *et al.*, 2014; CARMICHAEL, 2017), as análises morfológicas corticais demonstraram que em ambos os casos de procedimentos corticais isquêmicos e de ablação houve importantes perdas de integridade neuronal nas áreas corticais centrais e no tecido neural adjacente, seguidas por uma tentativa de compensação local com reconexões intra e inter-hemisféricas, aumentando a rede neural. Aparentemente, as fibras axônicas e os contatos sinápticos mostraram uma reorganização para permitir uma reconexão com as áreas danificadas, sugerindo que esse fenômeno de neuroplasticidade é ativado para minimizar déficits neurais causados pelas lesões cerebrais.

Na tentativa de correlacionar a presente investigação com outros estudos realizados por nossa equipe (FREITAS *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2013; COELHO *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2015), os presentes achados referem-se à fase crônica dos danos cerebrais, realizando-se sessenta e oito dias após cada lesão cortical. Interessantemente, abordagens semelhantes usando esse período de tempo terapêutico ainda não foram realizadas.

Nessa fase crônica, a investigação do efeito da MSC e da MNMO mostrou uma tendência à efetividade do tratamento com tais células no remodelamento do tecido cortical ipsilateral à lesão encefálica, nos animais isquêmicos e com ablação cortical, em comparação aos animais saudáveis. Entretanto, no neocórtex contralateral à lesão cortical, o tratamento com MNMO foi significativo apenas em animais isquêmicos, sugerindo que a neuroplasticidade é diferentemente estabelecida em cada tipo de lesão cerebral realizada no presente trabalho. Achados semelhantes, realizados por Carmichael e Chesselet (2002), também foram encontrados para isquemia por termocoagulação e ablação cortical, usando a injeção de neurotraçador no córtex frontal contralateral à lesão, 28 dias após o procedimento cirúrgico, mostraram um aumento de fibras marcadas tanto na área medial do córtex frontal quanto no neocórtex ipsilateralmente à lesão cerebral apenas em animais submetidos à isquemia induzida por termocoagulação. Esses achados, juntamente com os presentes dados desse trabalho, sugerem que a reorganização cerebral é dependente do tipo de lesão realizada em animais experimentais. Esses resultados também corroboram dados



anteriores obtidos por Szele (1995), que realizaram análises experimentais 21 dias após a lesão cerebral, demonstrando que as lesões produzidas pela aspiração do tecido neural promovem maior inibição da neuroplasticidade estrutural, em comparação àquelas observadas nas lesões isquêmicas corticais.

Com relação às bases neurais e neuro-humorais da neuroplasticidade, sabe-se que os mecanismos celulares e moleculares desempenham um papel crítico nesse fenômeno morfológico e farmacológico. De fato, Carmichael (2017) destacou o papel crucial das citocinas inflamatórias que direta ou indiretamente inibem o brotamento axônico, através de proteoglicanas de sulfato de condroitina ou Efrina-A5. No entanto, diante a ativação da citocina GDF10 no tecido cortical circunjacente à área enfartada, um efeito oposto foi observado, resultando em um aumento do brotamento axonal e recuperação funcional em seres humanos, roedores e macacos. Esses achados pressupõem que o processo inflamatório associado à ativação de citocinas pode orquestrar tanto a indução do brotamento axônico, quanto à indução de inibidores de crescimento para bloqueá-lo, para modular e controlar esse fenômeno de neuroplasticidade. Por essa razão, esperamos que tanto a lesão isquêmica quanto a ablação cortical produzam diferentes respostas relacionadas à neuroplasticidade.

Em relação ao desempenho na recuperação de fibras axonais atribuídas aos efeitos do transplante de MSC e MNMO, neste trabalho, observou-se que no neocórtex ipsilateral e contralateral à lesão, o tratamento com MNMO mostrou uma tendência ao aumento de fibras positivas ao BDA. Embora muito mais deva ser descoberto sobre os mecanismos pelos quais essas células atuam, ambas, MSC e MNMO, têm facilitado a indução de brotamento axônico, neovascularização e neuroproteção após acidente vascular encefálico, devido à capacidade dessas células de modular um determinado microambiente patológico e através da liberação de fatores tróficos e citocinas (CAPLAN *et al.*, 2006; BACIGALUPPI *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2012; DING *et al.*, 2013; CASTILLO-MELENDZ *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017; JASMIN *et al.*, 2017)

As MNMO são enriquecidas com diferentes populações de células-tronco e tipos celulares, como células imaturas e maduras das linhagens mieloide e linfóide e, vantajosamente, quando isoladas da medula óssea, não requerem cultivo e podem ser

agudamente administradas, sendo, portanto, adequadas para um transplante autólogo na fase aguda de uma dada doença (SAVITZ, 2013; MONICHE *et al.*, 2016). Alguns autores mostraram, por exemplo, que os efeitos antiinflamatórios, mecanismos de neuroproteção e recuperação funcional são mais intensos quando o transplante é realizado no corpo estriado em fase aguda, considerando que a MNMO atinge o parênquima cerebral, num período entre 6 a 12 horas após a isquemia encefálica (SOUZA *et al.*, 2017).

Parece que essas células, MSC e MNMO, podem mediar ações diferenciadas associadas a outros mecanismos neuroquímicos intrínsecos a cada lesão cerebral, inerentes a um determinado núcleo ou a um microambiente neural, facilitando ou inibindo o brotamento axônico de acordo com cada situação e tempo de sobrevivência.

Em relação à recuperação funcional motora de ratos lesados e tratados submetidos ao teste motor do cilindro, verificou-se que a intervenção cirúrgica provocou déficits funcionais motores severos, em todos os animais experimentais no segundo dia após as lesões cerebrais.

Cinquenta e seis dias após os danos cerebrais, nem os animais isquêmicos não tratados, nem os não tratados, submetidos à ablação cortical, demonstraram recuperação motora funcional completa apresentada no teste do cilindro. Animais tratados com transplante de MSC e MNMO mostraram uma tendência para um melhor desempenho motor de suas patas dianteiras em comparação aos animais lesados não tratados. Esses achados são corroborados pela literatura, na qual o papel potencial da terapia celular na recuperação sensório-motora tem sido demonstrado em diversos modelos experimentais (MAHMOOD *et al.*, 2003; DELCROIX *et al.*, 2010; FREITAS *et al.*, 2012; SAVITZ, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2013).

Não podemos descartar a possibilidade de recuperação funcional espontânea ao longo do período de tempo utilizado. No entanto, nossos achados suportam uma suposta correlação, entre os achados de recuperação funcional e morfológicos, relacionados à reorganização das vias neural córtico-corticais, em córtex ipsilateral, considerando que a recuperação das reconexões axonais e a melhora do desempenho da pata dianteira no teste do cilindro foram mostradas em ratos isquêmicos e

submetidos à ablação tratados com MSC e MNMO, em comparação aos ratos lesados não tratados.

## 6. CONCLUSÕES

- As análises das projeções córtico-corticais e córtico-estriatais, a partir do neurotraçamento com injeção de BDA, permitiram concluir que:

Em Fase Aguda:

- ✓ Animais isquêmicos (controles e tratados) tenderam a responder melhor à recuperação de fibras axônicas que constituem as projeções córtico-corticais e córtico-estriatais.
- ✓ O transplante de células MNMO em ratos wistar submetidos à ablação resultou em redução de fibras axônicas em córtex ipsilateral e no neostriado, ipsilaterais e contralaterais à lesão.
- ✓ Ratos Wistar submetidos à ablação e não tratados com células MNMO apresentaram uma redução de fibras axônicas apenas em córtex ipsilateral à lesão.

Em Fase Crônica:

- ✓ Aparentemente, as fibras axônicas e os contatos sinápticos mostraram uma reorganização para permitir uma reconexão com áreas danificadas, sugerindo que esse fenômeno de neuroplasticidade é ativado para minimizar déficits neurais causados pelas lesões cerebrais.
- ✓ Entre os animais isquêmicos, a terapia com MNMO foi a que ofereceu melhores resultados, visto que tais animais tenderam a responder com o aumento de fibras axônicas.

- Com a análise da *performance* motora dos grupos experimentais, através do teste do cilindro, se concluiu:

- ✓ Animais não tratados com células derivadas de medula óssea, MSC ou MNMO, não foram capazes de atingir a *performance* motora observada em animais saudáveis.

- ✓ Animais tratados com transplante de MSC e MNMO mostraram uma tendência para um melhor desempenho motor de suas patas dianteiras em comparação aos animais lesados não tratados
- ✓ Nossos achados suportam uma suposta correlação entre os achados de recuperação funcional e morfológicos relacionados à reorganização das vias neural córtico-corticais, em córtex ipsilateral.

Os resultados apontados neste trabalho sugeriram que a eficiência da terapia em prover um remodelamento da circuitaria neural, pode depender do tipo e do tempo de lesão, de mecanismos moleculares e celulares que, sendo intrínsecos de uma lesão, de um dado núcleo e de um microambiente neural, possam mediar ações diferenciadas, ora facilitando, ora inibindo os brotamentos axônicos, segundo cada situação específica. Estudos adicionais precisam ser realizados a fim de se conhecer melhor o potencial terapêutico com MSC e MNMO na indução de neuroplasticidade e a sua relação com a recuperação funcional motora.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, K., Yamashita, T., Takizawa, S., Kuroda, S., Kinouchi, H., Kawahara, N., 2012. Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 32:1317–31.

Adkins, A.L., Boychuk, J., Remple, M.S., Kleim, J.A., 2006. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *Journal of Applied Physiology*. 101:1776-1782.

Andres, R.H., Horie, N., Slikker, W., Keren-Gill, H., Zhan, K., Sun, G., Manley, N.C., Pereira, M.P., Sheikh, L.A., McMillan, E.L., Schaar, B.T., Svendsen, C.N., Bliss, T.M., Steinberg, G.K., 2011. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain*. 134(Pt 6):1777-89.

Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Peruzzotti-Jametti, L., Kilic, E., Kilic, U., Salani, G., Brambilla, E., West, M. J., Comi, G., Martino, G., Hermann, D. M., 2009. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain a Journal of Neurology*, 132, 2239–2251.

Baker, E.W., Platt, S.R., Lau, V.W., Grace, H.E., Holmes, S.P., Wang, L., Duberstein, K.J., Howerth, E.W., Kinder, H.A., Stice, S.L., Hess, D.C., Mao, H., West, F.D., 2017. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cell Therapy Enhances Recovery in an Ischemic Stroke Pig Model. *Scientific Reports*. 7(1):10075.

Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H., Lee, G., 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*. 57(6):874–82.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., 2002. *Neurociências – Desvendando o sistema nervoso*. Artmed. 2ed.

Benowitz, L.I., Carmichael, S.T., 2010. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiology of Disease*. 37 (2):259–266.

Brandão, ML., 2004. Noções Básicas de Neurofisiologia. In: Marcus Lira Brandão. (Org.). *As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência*. 1ed.São Paulo: Editora Pedagógica Universitária, v. 1, p. 29-46.

Brouns, R., De Deyn, P.P., 2009. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 111:483-495.

Brown, D.L., Boden-Albala, B., Langa, K.M., Lisabeth, L.D., Fair, M., Smith, M.A., Sacco, R.L., Morgenstern, L.B., 2006. Projected costs of ischemic stroke in the United States, *Neurology*, 67, 1390-1395.

Brumm, A.J., Carmichael, S.T., 2012. Not just a rush of blood to the head. *Nature Medicine*. 18(11):1609–10.

Caplan, A.I., Dennis, J.E., 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. 98:1076–1084.

Carmichael, S.T., 2003. Plasticity of Cortical projections after stroke. *The Neuroscientist*, 9:64-75.

Carmichael, S.T., Chesselet, M.F, 2002. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult. *The Journal of Neuroscience*. 22:6062-70.

Carmichael, S.T., Kathirvelu, B., Schwepp, C.A, Nie, E.H., 2017. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Experimental Neurology*. 287:384-394.

Carmichael, S.T., 2003. Plasticity of Cortical projections after stroke. *The Neuroscientist*, 9, 64-75.

Carmichael, S.T., Wei, L., Rovainen, C.M., Woolsey, T.A., 2001. New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiology of Disease*. 8 (5):910–922.

Case, L. C., Tessier-Lavigne, M., 2005. Regeneration of the adult central nervous system. *Current Biology*, 15(18):R749-R753.

Castellan-Baldan, L., da Costa Kawasaki, M., Ribeiro, S.J., Calvo, F., Corrêa, V.M.A., Coimbra, N.C., 2006. Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in their ferior colliculus involved with panic-like emotions. *J.Chem. Neuroanat.* 32,1–27.

Castillo-Melendez, M., Yawno, T., Jenkin, G., Miller, S.L., 2013. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Frontiers in Neuroscience*. 7:194.

Castro-Alamancos, M.A., Borrell, J., 1995. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of córtex. *Neuroscience*, 68(3):793 – 805.

Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X., Chopp, M., 2001. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Journal of the Neurological Sciences*. 189:49–57.



Chen, L., Zhang, G., Khan, A.A., Guo, X., Gu, Y., 2016. Clinical efficacy and meta-analysis of stem cell therapies for patients with brain ischemia. *Stem Cells International*. 2016:6129579.

Chen, S.J., Chang, C.M., Tsai, S.K., Chang, Y.L., Chou, S.J., Huang, S.S., et al., 2010. Functional improvement of focal cerebral ischemia injury by subdural transplantation of induced pluripotent stem cells with fibrin glue. *Stem Cells*. 19:1757–67.

Cheng, M.Y., Wang, E.H., Wyatt, J.W., Wang, S., Guohua, S., Lee, A.G., Arac, A., Lief, E.F., Deisseroth, K., Steinberg, G.K., 2014. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(35):12913-12918.

Chopp, M., Li, Y., 2002. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*. 1:92-100.

Coelho, B.P, Giral-di-Guimarães, A., 2014. Effect of age and gender on recovery after stroke in rats treated with bone marrow mononuclear cells. *Neuroscience Research*. 88:67-73.

Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., Papalopulu, N., 2012. MicroRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nature Neuroscience*. 15: 697–699 .

Dancause, N., Barbay, S., Frost, S.B., Plautz, E.J., Chen, D., Zoubina, E.V., Stowe, A.M., Nudo, R.J., 2005. Extensive cortical rewiring after brain injury. *Journal of Neuroscience*. 25 (44):10167–10179.

De Vasconcelos dos Santos, A, Reis, J.C., Paredes, B.D., Moraes, L., J, giraldi-guimarães, A., Mendez-Otero, R, 2010. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Research*. 1306:149-158.

Dean, S.K., Yulyana, Y., Williams, G., Sidhu, K.S., Tuch, B.E., 2006. Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation. *Transplantation*. 82:1175–84.

Delcroix, G.J.R.; Schiller, P.C.; Benoit, J.P.; Montero-menei, C.N. 2010. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 8, p.2105-2120.

Deller, T; Haas, C.A.; Freiman, T. M.; Phinney, A.; Jucker, M.; Frotscher, M. 2006. Lesion-induced axonal sprouting in the central nervous system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 557, 101-21.

Detante, O., Moisan, A., Hommel, M., Jaillard, A., 2017. Controlled clinical trials of cell therapy in stroke: meta-analysis at six months after treatment. *International Journal of Stroke*. 12(7):748–51.

Ding, X; Li, Y; Liu, Z.; Cui, Y; Chen, X; Chopp, M., 2013. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33, 1015–1024.

Durukan, A., Tatlisumak, T., 2007. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent model , pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 87:179-197.

Epstein, D., Mason, A., Manca, A., 2008. The hospital costs of care for stroke in nine European countries. *Health Economics*, 17, Suppl, S21-31.

Filip, S; Mokry, J.; Horacek, J.; English, D., 2008. Stem cells and the phenomena of plasticity and diversity: a limiting property of carcinogenesis. *Stem Cells and Development*, v. 17, p. 1031-1038.

Franco, E. C.; Cardoso, M. M.; Gouveia, A.; Pereira, A and Gomes-Leal, W.; 2012. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. *Neuroscience Research*, 73, 122–132, 2012.

Franco S.J., Müller, U., 2013. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron*. 77(1):19-34

Freitas, H. T.; Da Silva, V. G.; Giral-di-guimarães, A., 2012. Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats. *Behavioral and Brain Functions*, v. 8, p. 58.

Freitas, H. T., Rebel, M. G., Coelho, B. P., Silva, V.G., Galaxe-Almeida, G. G. C., Giral-di-Guimarães, A., 2015. Effect of the treatment of focal brain ablation in rat with bone marrow mesenchymal stromal cells on sensorimotor recovery and cytokine production. *Journal of the Neurological Sciences*, 348, 166-173.

Fuchs, E; Segre, J.A., 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, v. 100, n.1, p. 143-145.

Gertz, K., Kronenberg, G., Kälin, R.E., Baldinger, T., Werner, C., Balkaya, M., Eom, G.D., Hellmann-Regen, J., Kröber, J., Miller, K.R., Lindauer, U., Laufs, U., Dirnagl, U., Heppner, F.L., Endres, M., 2012. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain*. 135(Pt 6):1964–80.

Giral-di-Guimarães, A., Rezende-Lima, M., Bruno, F.P., Mendez-Otero, R., 2009. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. *Brain Research*. 1266:108-120.

Giraldi-Guimarães, A., Sampaio, M.F.S., Rodrigues, A.M.G., Freitas, H.T., Silva, V.G., Marcilio, F.S., Coelho, B.P., Soares, M.A.M., Rebel, M.G., 2012. Estudos sobre abordagens terapêuticas para AVE em modelo animal: uso de células derivadas de medula óssea e de flavonóides. *Perspectivas online*. 6: 20-24.

Gleichman, A.J., Carmichael, S.T., 2014. Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke. *Neuroscience Letters*. 565:47–52.

Gomes, V. S. Análise proteômica da região perilesional após o tratamento com células mononucleares de medula óssea em dois modelos de lesão focal cortical. Tese de doutorado. 91p. 2017

González-Piña, R, Bueno-Nava, A., Alfaro-Rodríguez, A. Durand-Rivera, J.A., 2008. Caracterización de la conducta motora en ratas con ablación cortical, *Revista de Neurología*, 47, 304-309.

Gross, C. 2007. The Discovery of Motor Cortex and its Background. *Journal of the History of the Neurosciences*, 16(3), 320-331

Guo, S., Zhen, Y., Wang, A., 2017. Transplantation of bone mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and improves neurological function after traumatic brain injury in mouse. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 13, 2757–2765.

Handley, A., Medcalf, P., Hellier, K., Dutta, D., 2009. Movement disorders after stroke. *Age and Ageing*. 38:260-266.

Hogan, R.E; Kaiboriboon,K. 2004. John Hughlings-Jackson's writings on the auditory aura and localization of the auditory cortex. *Epilepsia*, 45(7), 834-7.

Holschneider, D.P., Yang, j., Guo, Y., Maaresk, J.M.I., 2007. Reorganization of functional brain maps after exercise training: Importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway. *Brain Research*. 1184:96-107.

Honmou. O., Onodera, R., Sasaki, M., Waxman, S.G., Kocsis, J.D., 2012. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends in Molecular Medicine*. 18:292–7.

Huang W., Mo X., Qin C., Zheng J., Liang Z., Zhang C., 2013. Transplantation of differentiated bone marrow stromal cells promotes motor functional recovery in rats with stroke. *Neurological Research*. 35 (3):320–8.

Hubener, M., Bonhoeffer, T., 2014. Neuronal plasticity: Beyond the critical period. *Cell*. 159:727-737.

Ilhoshi, S., Honmou, O, Houkin, K., Hashi, K., Kocsis, J.D., 2004. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Research*. 1007:1-9.

Ishibashi, S., Sakaguchi, M., Kuroiwa, T., Yamasaki, M., Kanemura, Y., Shizuko, I., et al., 2004. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *Journal of Neuroscience Research*. 78:215–23.

Ishida, A, Isa, K., Umeda, T., Kobayashi, K., Kobayashi, K, Hida, X., Isa, X., 2016. Causal link between the Cortico-Rubral pathway and functional recovery through forced impaires limb use in rats with Stroke. *The Journal of Neuroscience*. 36:455– 467.

Johansson, B. B., 2004. Brain plasticity in health and disease. *Keio Journal of Medicine*, 53(4):231-46.

Julius-Harris, L.; Almerigi, J.B. 2009. Probing the human brain with stimulating electrodes: The story of Roberts Bartholow's (1874) experiment on Mary Rafferty. *Brain and Cognition*, v, 70, 92-115.

Jung, H.; Jeong, S.; Yang, J.; Kim, S.; Zhang, B.; Yoo, H. S.; Song, S. U.; Jeon, M.; Song, Y. S.. 2016. Neuroprotective effect of mesenchymal stem cell through complement component 3 downregulation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience Letters*. V. 633, p. 227-234.

Jasmin, G.T.S., Louzada, R.A., Rosado-de-Castro, P.H., Mendez-Otero, R., Carvalho, A.C.C., 2017. Tracking stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: perspectives and considerations. *12:779-793*.

Kamiya, N., Ueda, M., Igarachi, H.P., Nishiyama, Y., Suda, S., Inaba, T., Katayama, Y., 2008. Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rat. *Life Science*. 83:433-437.

Kan, I.E.; Melamed, E.; Offen, D., 2005. Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Current Drug Targets*, v. 6,n. 1, p. 1-11.

Kandel, E.R., Schawwrtz, J.H., Jessell, T.M, 2000. *Principles of neural science*. 4 ed. McGraw-Hill.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J., 2014. *Princípios da Neurociência*. Artmed. 5ª. ed.

Kawai, H., Yamashita, T., Ohta, Y., Deguchi, K., Nagotani, S., Zhang, X., et al., 2010. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 30(8):1487–93.

Kessler, R.L., 2010. Transcriptômica de Trypanossoma cruzi em resposta a inibidores da síntese de esteróis. Dissertação de Mestrado.

Kim, W.R., Christian K., Ming, G.L., Song, H., 2012. Time-dependent involvement of adult-born dentate granule cells in behavior. Behavioral Brain Research. 227(2):470-479.

Kinoshita, K., 2016. Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. Journal Intensive Care. 4: 29.

Kleim, J.A., Barbay, S., Nudo, R.J., 1998. Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning. Journal of Neurophysiology. 80:3321-3325.

Kolb, B; Brown, R; Witt-Lajeunesse, A.; Gibb, R., 2001. Neural Compensations After Lesion of the Cerebral Cortex. Neural Plasticity, 8, 1-16.

Kolb, B., Muhammad, A., 2014. Harnessing the power of neuroplasticity for intervention. Frontiers in Human Neuroscience. 8:1-13.

Krueger, E., Manczak, T., Wilson, E.M.H., Da Silva, W.J., Nohama, P., 2012. Optogenética e estimulação óptica neural: estado atual e perspectivas. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica. 28 (3):294-307.

Kurcgant, D; Pereira, M.E.C. 2003. A teoria de John Hughlings Jackson sobre evolução e dissolução do sistema nervoso: observações clínicas, influências e repercussões. Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental , 1, 148-153.

Lee, J.S., Hong, J.M., Moon, G.J., Lee, P.H., Ahn, Y.H., Bang, O.Y., 2010. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. Stem Cells. 28:1099–106.

Li, S., Nie, E.H., Yin, Y., Benowitz, L.I., Tung, S., Vinters, H.V., Bahjat, F.R., Stenzel-Poore, M.P., Kawaguchi, R., Coppola, G., Carmichael, S.T, 2015. GDF10 Is a Signal for Axonal Sprouting and Functional Recovery after Stroke. *Nature Neuroscience* In press. 18:1737–1745.

Li, S., Overman, J.J., Katsan, D., Kozlov, S.V., Donnelly, C.J., Twiss, J.L., Giger, R.J., Coppola, G., Geschwind, D.H., Carmichael, T., 2010. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nature Neuroscience*. 13(12):1496-1504.

Li, Z., Shu, Q., L., Lingzhi, L., Maolin, G., Zhang, Y., 2014. Sequential expression. Of cyclooxygenase-2, glutamate receptor-2, and platelet activating factor receptor in rat hippocampal neurons after fluid percussion injury. *Neural Regeneration Research*. 9(9):978-985.

Li, Y; Chen, C.H.; Yin, Y.; Mao, W.W.; Hua, X.M. and Cheng, J., 2016. Neuroprotection by intravenous transplantation of bone marrow mononuclear cells from 5-fluorouracil pre treated rats in a model of ischemic stroke. *Neurological Research*, 38, 921–928.

Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H., Lian,Q., 2014. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy: Current Status and Perspectives. *Cell Transplantation*. 23:1045–1059.

Lindau, N.T., Bänninger, B.J., Gullo, M., Good, N.A., Bachmann, L.C., Starkey, M.L., Schwab, M.E., 2014. Rewiring of the corticospinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy. *Brain*. 137 (Pt 3):739–756.

Liu X., Tonegawa S., 2010. Optogenetics 3.0. *Cell*. 141:22-24.

Lopes, L. S. Neuroanatomia. 2016. Acesso em <https://edisciplinas.usp.br/>.



Lundy-Ekman, L., 2007. Neurociência. Fundamentos Para Reabilitação. Saunders. Elsevier. 3ª ed.

Machado, A., 2000. Neuroanatomia Funcional. Atheneu. 2ª edição. 359 p.

Mahmood, A.; Lu, D.; Lu, M.; Chopp, M. Treatment of Traumatic Brain Injury in Adult Rats with Intravenous Administration of Human Bone Marrow Stromal Cells. Neurosurgery. 2003; v. 53, n. 3, p.697-703. PMID: 12943585

Mang, C.S., Campbell, K.L., Ross, C.J.D., Boyd, L.A., 2013. Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: Considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on Brain-Derived Neurotrophic Factor. Physical Therapy. 93(12):1707-1716.

Marei, H.E., Hasan, A., Rizzi, R., Althani, A., Afifi, N., Cenciarelli, C., Caceci, T. Shuaib, A., 2018. Potencial of stem cell-based therapy for ischemic stroke. Frontiers in Neurology. 9:1-7.

Markus, H.S., 2008. Stroke: causes and clinical features. Medicine (Baltimore). 32(10):57-61.

Mcneill, T.H., Mori, N., Cheng, H.W., 1999. Differential regulation of the growth-associated proteins, GAP-43 and SCG-10, in response to unilateral cortical ablation in adult rats. Neuroscience. 90:1349-1360.

Meng, Y., Chopp, M., Zhang, Y., Zhongwu, I., An, A., Mahmood, A., Xiong, Y., 2014. Subacute intranasal administration of tissue plasminogen activator promotes neuroplasticity and improves functional recovery following traumatic brain injury in rats. Plos One. 9(9):1-14.

Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., et al. 2009. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology*. 27:743–5.

Monfils, M.H., Plautz, E.J., Kleim, J.A., 2005. In search of the motor Engram: Motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *The Neuroscientist*. 11:471-483.

Moniche, F., Rosado-de-Castro, PH., Escudero, I., Zapata, E., de la Torre Laviana, FJ., Mendez-Otero, R., et al., 2016. Increasing dose of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation is related to stroke outcome: results from a pooled analysis of two clinical trials. *Stem Cells International*. 1 - 8.

Murphy, T. H., Corbett, D., 2009. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Neuroscience*. 10:861-872.

Nakagawa, H, Ueno, M.; Itokazu, T; Yamashita, T., 2013. Bilateral movement training promotes axonal remodeling of the corticospinal tract and recovery of motor function following traumatic brain injury in mice. *Cell Death & Disease*.4e:534.

Napieralski, J.A., Banks, R.J.A., Chesselet, M.F., 1998. Motor and somatosensory deficits following uni- and bilateral lesions of the cortex induced by aspiration or thermocoagulation in the adult rat. *Experimental Neurology*. 154:80-88.

Okabe, N., Himi, N., Nakamura, M.E., Hayashi, N., Kazuhiko, N., Miyamoto, O., 2017. Rehabilitative skilled forelimb training enhances axonal remodeling in the corticospinal pathway but not the brainstem-spinal pathways after photothrombotic stroke in the primary motor cortex. *Plos One*. 12:1-20.

Omura, T., Omura, K., Tedeschi, A., Riva, P., Painter, M.W., Rojas, L., Martin, J., Lisi, V., Huebner, E.A., Latremoliere, A., Yin, Y., Barrett, L.B., Singh, B., Lee, S., Crisman, T., Gao, F., Li, S., Kapur, K., Geschwind, D.H., Kosik, K.S., Coppola, G., He, Z.,

Carmichael, S.T., Benowitz, L.I., Costigan, M., Woolf, C.J., 2015. Robust Axonal Regeneration Occurs in the Injured CAST/Ei Mouse CNS. *Neuron*. 86(5):1215–27.

Overman, J. J., Carmichael, S.T., 2014. Plasticity in the injured brain: more than molecules matter. *The Neuroscientist*, 20:15-28.

Overman, J.J., Clarkson, A.N., Wanner, I.B., Overman, W.T., Eckstein, I., Maguire, J.L., Dinov, I.D., Toga, A.W., Carmichael, S.T., 2012. A role for ephrin-A5 in axonal sprouting, recovery, and activity-dependent plasticity after stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(33):E2230–9.

Palomero-gallagher, N., Zilles, K., 2004. Isocórtex. In: *The rat nervous system*. Elsevier. 3<sup>a</sup> ed., p. 728-747.

Pascual-Leone, A, Amedi, A., Fregni, F., Merabet, L.B., 2005. The plastic human brain córtex. *Annual Review of Neuroscience*, 28:377-401.

Paxinos, G, Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (5th ed.), Elsevier Academic Press, San Diego.

Pontes-Neto, O.M., Silva, G.S, Feitosa, M.R., Figueiredo, N.L., Fiorot, J.A., Rocha, T.N., Massaro, A.R., Leite, J.P., 2008. Stroke awareness in Brazil: alarming results in a community-based study. *Stroke*, 39:292-296.

Raineteau, O.; Schwab, M.E. 2001. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, v.2, p.263-273.

Riban, V., Chesselet, M.F., 2006. Region-specific sprouting of crossed corticofugal fibers after unilateral cortical lesions in adult mice. *Experimental Neurology*. 197:451-457.

Ribas, G.C., 2006. Considerações sobre a evolução filogenética do sistema nervoso, o comportamento e a emergência da consciência. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 28(4)323-338.

Ribeiro, S.J.; Ciscato Jr., J.G.; de Oliveira, R.C.; D'Ângelo-Dias, R.; Carvalho, A.D.; Felippotti, T.T.; Rebouças, E.C.; Castellan-Baldan, L.; Hoffmann, A.; Corrêa, S.A.L; Moreira, J.E.; Coimbra, N.C.C. , 2005. Functional and ultrastructural neuroanatomy of interactive intratectal/tectonigral mesencephalic opioid inhibitory links and nigrotectal GABAergic pathways: Involvement of GABA and m1-opioid receptors in the modulation of panic like reaction elicited by electrical stimulation of the dorsal midbrain. *J.Chem. Neuroanat.* 30,184–200.

Rodrigo, J., Fernández, A.P., Serrano, J., Peinado, M.A., Martinez, A., 2005. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology & Medicine*. 39:26-50.

Rosamond, W., Flegal, K., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S.M., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., Mcdermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'donnell, C., Roger, V., Sorlie, P., Steinberger, J., Thom, T., Wilson, M., Hong, Y., 2008. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 117(4):e25-146.

Sabbatini, R.M.E. A História da Estimulação Elétrica Cerebral. 2004. *Cérebro e Mente*. v18. [http://www.cerebromente.org.br/n18/history/stimulation\\_p.htm](http://www.cerebromente.org.br/n18/history/stimulation_p.htm)

Sampaio, M.F.S., Marcilio, F.S., Giral-di-Guimarães, A., 2013. Does treatment with bone marrow mononuclear cells recover skilled motor function after focal cortical ischemia? Analysis with a forelimb skilled motor task in rats. *Brain research*. 1492:130-139.

Sanberg, P.R., Eve, D.J., Metcalf, C., Borlongan, C.V., 2011. Advantages and challenges of alternative sources of adult-derived stem cells for brain repair in stroke. *Progress in Brain Research*. 201:99–117.

Savitz, S.I., 2013. Cell therapies: careful translation from animals to patients. *Stroke*. 44(1):S107–S109.

Schallert, T., 2006. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx*, 3, 497-504.

Schaar, K.L; Brenneman, M.M.; Savitz, S.I., 2010. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental Translational Stroke Medicine*, 2, 1-11.

Schindelin, J. et al., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 9:676–682.

Shen, L.H.; Li, Y.; Chen, J.; Zhang, J.; Vanguri, P.; Borneman, J.; Chopp, M. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*, v. 137, p. 393-399, 2006.

Shen, L., Li, Y., Chopp, M., 2010. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia*. 58:1074–81.

Souza, C. C; Silva, M.C; Lopes, R.T.; Cardoso, M.M; Souza, L.L.; Santos, A.G.; Santos, I.R.; Franco, E.S.S.; Gomes-Leal, W., 2017. Comparative Therapeutic Effects of Minocycline Treatment and Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation following Striatal Stroke. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-16.

Starkey, M.L., Schwab, M.E., 2014. How plastic is the brain after a stroke? *The Neuroscientist*. 1-13.

Steinbach, K.; Piedavent, M.; Bauer, S.; Neumann, J. T. and Friese. M. A. 2013. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *The Journal of Immunology*. Doi:10.4049/jimmunol.1202613.

Steinberg, G.K., Kondziolka, D., Wechsler, L.R., Lunsford, L.D., Coburn, M.L., Billigen, J.B., et al., 2016. Clinical outcomes of transplanted modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in stroke: a phase 1/2a study. *Stroke*. 47(7):1817–24.

Stokowska, A, Atkins, A.L., Tulen, J.M., Bulmer, P. I., Pascoe, M.C., Barnum, S.R., Wetsel, R.A., Nilsson, J.A., Dragunow, M., 2017. Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia. *Brain*, 140, 353-369.

Suárez-Monteagudo, C., Hernández-Ramírez, P., Álvarez-González, L., García-Maeso, I., de la Cuétara-Bernal, K., Castillo-Díaz, L., et al., 2009. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 27:151–61.

Szele, F.G., Alexander, C., Chesselet, M.F., 1995. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *Journal Neuroscience*. 15:4429-4448.

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663–76.

Tanaka, E. M., Ferretti, P., 2009. Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 10:713-723.

Tedeschi, A., Omurab, T., Costiga, M., 2017. CNS repair and axon regeneration: Using genetic variation to determine mechanisms. *Experimental Neurology*, 287:409-422.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., et al., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145–7.

Toda, H., Takahashi, J., Iwakami, N., Kimura, T., Hoki, S., Mozumi-Kitamura, K., et al., 2001. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neuroscience Letters*. 316:9–12.

Tohill, M., Mantovani, C., Wiberg, M., Terenghi, G., 2004. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neuroscience Letters*. 362 (3):200–3.

Urban, E.T., Bury, S.D., Barbay, H.S., Guggenmos, D.J., Dong, Y., Nudo, R.J., 2012. Gene expression changes of interconnected spared cortical neurons 7 days after ischemic infarct of the primary motor cortex in the rat. *Molecular Cell Biochemistry*. 369(0): 267–286.

Uryu, K, Mackenzie, L., Chesselet, M.F., 2001. Ultrastructural evidence for differential axonal sprouting in the striatum after thermocoagulatory and aspiration lesions of the cerebral cortex in adults rats. *Neuroscience*. 105:307-316.

Vanputte, C., Regan, J., Russo, A., 2016. *Anatomia e Fisiologia de Seeley*. 10<sup>a</sup> ed. Mc Graw Hill/ Bookman.

Wahl, A.S., Büchler, U., Brändli, A., Brattoli, B., Musall, S., Kasper, H., Ineichen, B.V., Helmchen, B.O., Schwab, M.E., 2018. Optogenetically stimulating intact rat corticospinal tract post-stroke restores motor control through regionalized functional circuit formation. *Nature Communications*. 1187:1-16.

Wahl, A.S., Omlor, W., Rubio, J.C., Chen, J.L., Zheng, H., Schröter, A., Gullo, M., Weinmann, O., Kobayashi, K., Helmchen, F., Ommer, B., Schwab, M.E., 2014. Neuronal repair. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science*. 344 (6189):1250–1255.

Waxman, S.G., 2013. *Clinical Neuroanatomy*. 27ed. <http://accessmedicine.mhmedical.com>.  
Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J.A., Jessell, T.M., 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*. 110:385–97.

Williams, P.L., Warwick, R., editors, 1980. *Gray's anatomy*. 36th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 753 p.

Yang, Z., Zhu, L., Li, F., Wang, J., Wan, H., Pan, Y., 2014. Bone marrow stromal cells as a therapeutic treatment for ischemic stroke. *Neuroscience Bulletin*, 30: 524-534.

Yoo, K.H., Jang, I.K., Lee, M.W., Kim, H.E., Yang, M.S., Eom, Y., et al. 2009. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. *Cellular Immunology*. 259(2):150–6.

Zacharek, A., Chen, J., Cui, X., Li, A., Li, Y., Roberts, C., et al., 2007. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/FIk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 27:1684–91.

Zandonella, C. The first wave. 2005. *Nature*, v. 435, p. 877–878.

Zatz, M. 2004. Clonagem e células-tronco. *Estudos Avançados*, 18 (51), 247- 256.

Zhang, F., Gradinaru, V., Adamantidis, A.R., Durand, R., Airan, R.D., De Lecea, L., Deisseroth, K., 2010. Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*. 5(3):439-56.