

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Tratamento com células mononucleares de medula óssea em modelos de
lesão cortical unilateral: Densidade neuronal na camada V do córtex
motor primário contralateral**

Elisa Marozzi Cruz

Campos dos Goytacazes

Março de 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Tratamento com células mononucleares de medula óssea em modelos de
lesão cortical unilateral: Densidade neuronal na camada V do córtex
motor primário contralateral**

Elisa Marozzi Cruz

Orientador: Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Campos dos Goytacazes

Março de 2019

Tratamento com células mononucleares de medula óssea em modelos de lesão cortical unilateral: densidade neuronal na camada V do córtex motor primário contralateral

Elisa Marozzi Cruz

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 29 de março de 2019

Banca examinadora:

Profº Drº João Carlos de Aquino Almeida (UENF/CBB/LFBM)

Profª Drª Renato Augusto Damatta (UENF/CBB/LBCT)

Profª Drª Viviane Gomes da Silva (UFRJ-Macaé/Depto. de Med e Anat)

Profº Drº Arthur Giraldi Guimarães (UENF/CBB/LBCT) (Orientador)

AGRADECIMENTOS

À minha família, em quem pude me apoiar no momento mais crítico. Agradeço especialmente pelos conselhos, por me encorajarem a continuar e também por me acalmarem quando achei que estava tudo perdido.

Ao Vinícius, que foi meu porto seguro durante esses dois anos. Mesmo nas piores horas, sempre foi meu maior apoiador, me impulsionando e me ajudando a ver o lado bom de tudo. Sou eternamente grata por ter você na minha vida.

Aos amigos de Campos que se tornaram uma segunda família longe de casa. Obrigada a Bárbara, Luisa, Gabriel, Matheus, Thayssa, Thaline, Jorge e a todos que participaram dos momentos bons e ruins no meu caminho na UENF.

Ao pessoal do laboratório do professor Renato DaMatta. Gisela, Pedro, Felipe, Arielli, Tâmara, obrigada por me acolherem e pelas risadas!

À Marina e Beatriz, que são mais irmãs do que amigas. Mesmo de bem longe sempre formamos um grupinho baseado em risada, amor, sermões e planos. Obrigada!

À Viviane, que foi co-orientadora no laboratório e na vida. Amiga-irmã que a UENF me deu e que rendeu momentos de risada e choro dentro e fora do laboratório. Obrigada!

À Olivia, por seu carinho silencioso e pela felicidade peluda que trouxe para minha vida. Adotar é amor!

Ao professor João Almeida, que além de ter aceitado ser membro da banca, me ajudou bastante com palavras de calma e por me lembrar que é melhor rir que chorar.

Ao professor Renato, que além de seu papel como membro da banca, me aceitou no seu laboratório e me ajudou sempre que pode.

Ao professor Arnaldo Façanha, que me deu o suporte para finalizar este trabalho.

À Bia, técnica do PAM do LBCT e Arthur, técnico do LBCT.

Ao professor Arthur Giraldi Guimarães, por todos os anos de orientação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Lesões do Sistema Nervoso Central.....	11
1.2. Plasticidade no Sistema Nervoso Central.....	13
1.2.1. Mecanismos Efetores de Plasticidade no Sistema Nervoso Central.....	17
1.3. Terapia Celular em Lesões do Sistema Nervoso Central.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Modelo Animal.....	24
3.2. Procedimentos Cirúrgicos.....	24
3.2.1. Isquemia Focal Unilateral por Termocoagulação.....	25
3.2.2. Ablação Focal Unilateral por Aspiração.....	25
3.3. Obtenção e Transplante de Células Mononucleares de Medula Óssea.....	26
3.3.1. Contagem e Injeção das Células Mononucleares de Medula Óssea.....	26
3.4. Preparo das Amostras e Obtenção dos Cortes Referentes a Camada Cortical V do Córtex Motor Primário Contralateral.....	27
3.4.1. Obtenção dos Blocos para Corte e Visualização em Microscópio Óptico.....	27
3.5. Contagem de Partículas pelo Método do Dissector.....	28
3.5.1. Densidade Neuronal.....	29
3.5.2. Quantificação do Volume do Núcleo de Neurônios.....	32
3.5.3. Análise dos Núcleos e Nucléolos dos Neurônios.....	32
3.6. Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34

5. DISCUSSÃO.....	40
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE – Acidente Vascular Encefálico

SNC – Sistema Nervoso Central

NMDA – N-metil D-aspartato

GAP-43 – *Growth Associated Protein 43*

M1 – Córtex Motor Primário

S1 – Córtex Somestésico Primário

SVZ – Zona subventricular

SGZ – Zona granular

CMMO – Célula Mononuclear de Medula Óssea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte coronal indicando a localização de M1 e S1.....	14
Figura 2. Organização estrutural de M1.....	15
Figura 3. Padrão de projeções cortico-corticais normal.....	16
Figura 4. Padrão de projeções cortico-corticais alterado.....	17
Figura 5. Corte sagital de cérebro de roedor.....	19
Figura 6. Cortes coronais de cérebro de rato indicando localização e extensão da lesão.....	25
Figura 7. Esquema da montagem de um par de dissector.....	29
Figura 8. Montagem do campo de contagem.....	30
Figura 9. Corte semifino de área contralateral à lesão do córtex motor.....	31
Figura 10. Comparação do tamanho dos corpos celulares e dos núcleos em micrografias representativas de cada grupo experimental.....	34
Figura 11. Quantificação da densidade neuronal.....	35
Figura 12. Quantificação do volume nuclear neuronal.....	36
Figura 13. Análise de correlação entre densidade neuronal e volume nuclear.....	37
Figura 14. Micrografia representativa do grupo Abl-control.....	38
Figura 15. Quantificação do percentual de volume dos nucléolos em relação ao volume nuclear.....	39

Resumo

Lesões encefálicas geram extensos danos sensorimotores e cognitivos, estando entre as principais causas de morte e incapacitação pelo mundo. O ambiente da lesão, além de causar danos por meio de processos inflamatórios e citotóxicos, induz mecanismos intrínsecos de recuperação do Sistema Nervoso Central (SNC). A terapia celular é considerada uma alternativa para o tratamento de injúrias deste tipo devido a sua ação neuroprotetora já comprovada. Propusemos neste trabalho verificar o efeito do tratamento com células mononucleares de medula óssea (CMMOs) na densidade neuronal em dois tipos de lesão. Ratos Wistar machos de 3 a 4 meses foram submetidos a dois tipos de lesão cortical focal na região do córtex sensorimotor primário esquerdo: isquemia por termocoagulação e ablação por aspiração. Os animais foram divididos em grupos tratados com as CMMOs ou controles (injetados com salina), além do grupo normal, não lesionado e não tratado. Todos os cinco grupos tiveram cinco animais. A partir de cada animal foram obtidas porções referentes à camada V do córtex motor primário contralateral à lesão cortical, da qual, após o devido processamento, cortes semifinos ($0,85\ \mu\text{m}$) foram obtidos para análise de densidade neuronal, volume nuclear e volume dos nucléolos. Foi observada significativa diminuição no número de neurônios em todos os grupos quando comparados com o grupo Normal. Esta redução deveu-se ao aumento do volume neuronal, uma vez que a correlação entre densidade e volume nuclear foi significativamente inversamente proporcional. A análise dos volumes dos nucléolos não mostrou diferenças entre os grupos. Estes resultados sugerem que o tratamento com as CMMOs não afeta a densidade e crescimento neuronais, que são igualmente induzidos pelos dois tipos de lesão. Este aumento de volume neuronal pode estar relacionado com o já descrito aumento de neurogênese e sinaptogênese que ocorre nos neurônios da camada V do córtex contralateral homólogo ao córtex motor primário lesionado focalmente no hemisfério oposto.

Palavras-chave: Neuroplasticidade, Terapia Celular, Densidade Neuronal, Isquemia Cerebral, Ablação por aspiração.

Abstract

Brain lesions generate extensive sensorimotor and cognitive damage, standing among the leading causes of death and disability worldwide. The injury environment, in addition to causing damage through inflammatory and cytotoxic processes, induces intrinsic recovery mechanisms of the Central Nervous System (CNS). Cell therapy is considered an alternative for the treatment of such injuries due to its proven neuroprotective action. We propose in this work to verify the effect of treatment with bone marrow mononuclear cells (BMMCs) on neuronal density in two lesion types. Male Wistar rats aged 3 to 4 months were submitted to two types of focal cortical lesions in the region of the left primary sensorimotor cortex: thermocoagulation ischemia and aspiration ablation. The animals were divided into groups treated with BMMCs or controls (injected with saline), in addition to the normal, uninjured and untreated group. All five groups had five animals. From each animal, portions corresponding to the V-layer of the primary motor cortex contralateral to the cortical lesion were obtained, after which, semifinuous sections (0.85 μm) were obtained for analysis of neuronal density, nuclear volume and volume of the animals. nucleoli. A significant decrease in the number of neurons was observed in all groups when compared to the Normal group. This reduction was due to the increase in neuronal volume, since the correlation between density and nuclear volume was significantly inversely proportional. Analysis of the nucleolus volumes showed no differences between the groups. These results suggest that treatment with CMMOs does not affect neuronal density and growth, which are also induced by both types of lesions. This increase in neuronal volume may be related to the already described increase of neuritogenesis and synaptogenesis that occurs in neurons of the V layer of the contralateral cortex homologous to the primary motor cortex that is injured in the opposite hemisphere.

Key-words: Neurplasticity, Cell Therapy, Neuronal Density, Cerebral Ischemia, Aspiration Ablation.

1. Introdução

1.1. Lesões do Sistema Nervoso Central

O acidente vascular encefálico (AVE) representa um importante problema de saúde pública mundial. Sua alta incidência gera graves implicações sociais, clínicas e econômicas por ser uma das principais causas de morte e incapacitação grave em adultos. Grande porcentagem dos pacientes acometidos sofrem com a diminuição de sua independência, sendo impedidos de trabalhar e realizar atividades rotineiras, enquanto parte deles necessitam de cuidados diários (Mozaffarian *et al.*, 2016). O único tratamento existente na atualidade se baseia na administração de trombolíticos (rt-PA) na fase aguda do AVE, havendo uma janela ótima de tempo para melhor resultado observado (Hacke *et al.*, 2008; Roth, 2011). A eficácia desse tratamento é baixa, devido a limitação de acesso do paciente ao medicamento a tempo e risco de indução de hemorragia cerebral decorrente da administração do trombolítico (Chia *et al.*, 2016; Chopp e Li, 2002).

Danos ao Sistema Nervoso Central (SNC), causados por lesão encefálica traumática, isquêmica ou injúria à medula espinhal causam extensiva morte celular e conseqüentemente, perda estrutural e funcional (Wieloch e Nikolich, 2006). Os primeiros estágios do processo da lesão encefálica, se caracterizam pelo dano tecidual local e deficiência no aporte sanguíneo, tendo como consequência o comprometimento do metabolismo celular, além da liberação de neurotransmissores excitotóxicos, perda do gradiente iônico das células e produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em morte celular apoptótica e necrótica (Deb *et al.*, 2010). Após um período de tempo, o processo patofisiológico da lesão evolui, ativando uma segunda cascata de sinalização, inculindo em maior destruição tecidual e deterioração neurológica (Freeman *et al.*, 2010). Esse processo de destruição tecidual e perda funcional pode ter duração variável, de horas a semanas, aumentando progressivamente o dano neurológico (Kriz, 2006).

Assim como em qualquer lesão, o dano ao tecido do SNC ativa uma série de cascatas de sinalização que resultam em uma resposta inflamatória. Células gliais no cérebro e células imunes periféricas são ativadas em resposta ao dano tecidual. A inflamação resultante da interação dessas células tem conseqüências negativas para o tecido, resultando em dano secundário ao SNC (Wang *et al.*, 2018). Os

insultos primário e secundário da lesão induzem a liberação de citocinas, prostaglandinas, radicais livres, entre outras moléculas da resposta inflamatória (Werner e Engelhard, 2007). Do mesmo modo que a inflamação é necessária no processo patológico da injúria, já foi demonstrado que os mesmos fatores envolvidos na resposta inflamatória estão relacionados com a severidade da injúria encefálica, extensão da lesão e influência na patogênese do cérebro isquêmico (Pluchino *et al.*, 2008). A neuroinflamação controlada e por um breve período de tempo sustenta a neurogênese e possibilita a sobrevivência de neurônios recém-formados. O tecido que sofreu o insulto primário passa a sofrer a influência de fatores de crescimento, proteínas e genes relacionados com plasticidade, sendo que a regeneração tecidual é induzida (Kipnis *et al.*, 2001).

A área da lesão pode ser categorizada em duas regiões diferenciadas pelo nível de dano tecidual e resposta a tratamentos e mecanismos intrínsecos de recuperação. O núcleo lesado corresponde a região da lesão propriamente dita, o foco de dano tecidual e morte celular, classificado como irreversivelmente danificado (Yu *et al.*, 2016). A penumbra é caracterizada como a área circundante ao núcleo lesado, a qual sofreu com os danos teciduais do núcleo lesado, porém se mantém recuperável e responsiva a processos regenerativos e terapias. A perfusão nessa região é baixa, mal sendo suficiente para manter o metabolismo energético e o gradiente iônico na ausência de sinais elétricos e de síntese proteica normal (Moskowitz *et al.*, 2010). Essa região perilesional apresenta um perfil de tecido no estágio de ontogênese (Cramer e Chopp, 2000), com elevação na expressão de proteínas relacionadas com modificações na matriz extracelular e estrutura da glia, crescimento neuronal, apoptose, diferenciação celular e angiogênese (Duarte *et al.*, 2012; Uzdensky *et al.*, 2017), além de quimioatração de células derivadas de medula óssea e células-tronco neurais para o local da lesão (Issa *et al.*, 2005). A penumbra é suscetível a sinaptogênese (formação de novas sinapses), neurogênese (formação de neurônios), angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), neuritogênese (formação de brotamentos axonais, arborização dendrítica), entre outros (Navarro-Sobrino *et al.*, 2011; Sandvig *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2005), refletindo uma capacidade inerente de regeneração desta região. A organização e estrutura da região da penumbra e seu potencial de regeneração é mantido por tempo limitado, estando suscetível aos mecanismos

patofisiológicos da lesão. Por isso, o enfoque das terapias está na recuperação da penumbra durante essa janela ótima de tempo, fazendo com que esta região se destaque como um alvo para tratamentos e terapias (Xing *et al.*, 2012).

1.2. Plasticidade no Sistema Nervoso Central

Mecanismos endógenos de recuperação funcional do SNC são ativados em resposta a lesão tecidual. Estudos apontam que células progenitoras do sistema nervoso central são responsáveis pela liberação de fatores que agem no remodelamento dos neurônios e conexões nervosas sobreviventes (Chen *et al.*, 2014). O uso de áreas afetadas ativa áreas adjacentes a região lesionada, acontecendo a sobreposição de funções entre elas, levando à recuperação funcional tardia, sendo essa atribuída ao aprendizado de novas funções (Murphy e Corbett, 2009). Tal processo é conhecido como plasticidade, ou seja, a reconfiguração estrutural e fisiológica dos circuitos neuronais em resposta a estímulo (Carmichael, 2003). Tais propriedades intrínsecas do SNC têm como finalidade a redução do dano tecidual e recuperação funcional e podem ser induzidos por diversos tratamentos, entre eles, a terapia celular (Zhang e Chopp, 2013).

Comparando-se duas lesões encefálicas diferentes - isquemia por termocoagulação e ablação por aspiração - observou-se divergência na indução de plasticidade em geral e sinaptogênese, constatada com o uso de marcadores proteicos como a GAP-43 (do inglês *Growth Associated Protein 43*). GAP-43 é uma fosfoproteína de 43kDa com papel no crescimento axonal e formação de novas conexões entre neurônios, distribuída em diversas regiões do encéfalo, com grande expressão no SNC, sendo *up*-regulada no córtex encefálico em situações de surgimento de novas sinapses (Benowitz *et al.*, 1988; Benowitz e Routtenberg, 1997).

Em modelos de lesões isquêmicas, foi observado aumento desse marcador em resposta a lesão, sendo que GAP-43 foi *up*-regulada 14 dias após a indução da lesão, indicando a presença de brotamento axonal (Liu *et al.*, 2013). Estímulos ao lado ipsilateral à lesão levaram ao aumento de expressão de BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) e de GAP-43, indicando indução de recuperação (Cheng *et al.*, 2014). Fazendo a comparação entre os dois modelos de lesão citados, no

modelo isquêmico foi notado brotamento axonal, enquanto que nos modelos de ablação isso ocorre em níveis mínimos (Uryu *et al.*, 2001). A ablação por aspiração causa a destruição total dos neurônios na região lesada, enquanto a isquemia gera uma perda lenta e progressiva de células nervosas (Napieralski *et al.*, 1998). Isso resulta na manutenção da quantidade da proteína GAP-43 e possibilitando sua redistribuição para regiões afetadas. No caso da lesão por aspiração (ablação), é observada uma diminuição nos níveis de GAP-43 (Szele *et al.*, 1995) apresentando menor capacidade de indução de neuroplasticidade nesse modelo de lesão (Carmichael, 2003; Voorhies e Jones, 2002). O modelo de injúria por aspiração é menos usado em experimentos se comparado com a isquemia ou lesão encefálica traumática. A ablação é um modelo que mimetiza uma condição de remoção tecidual cirúrgica (De Freitas *et al.*, 2015).

O córtex motor primário (M1) se localiza no lobo frontal de mamíferos próximo ao corte somestésico primário (S1), apresentando um mapa do corpo do indivíduo, responsável pelo controle e indução de movimentos (Figura 1).

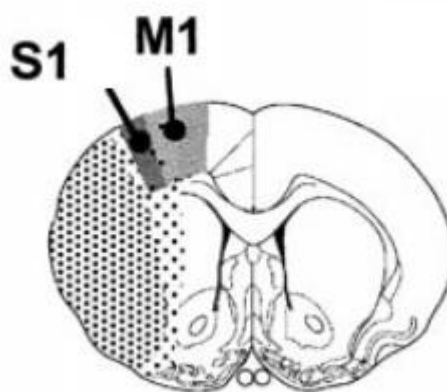


Figura 1. Corte coronal indicando a localização de M1 e S1.

O mapa arquitetônico representando essa área em ratos foi apresentado por Paxinos e Franklin, (2008), possibilitando um acesso e conhecimento preciso desta região específica. Originalmente, pensava-se que o córtex encefálico se organizava em cinco camadas celulares diferenciadas (Kolb *et al.*, 2010), omitindo a camada IV. De acordo com a caracterização da camada IV como uma porção de células granulares (Grandel e Brand, 2013), a caracterização de M1 como agranular não é

correta, já que Yamawaki e seu grupo (2014) conseguiram demonstrar a presença da camada IV por diversas abordagens, configurando M1 como tendo seis camadas corticais (Figura 2).

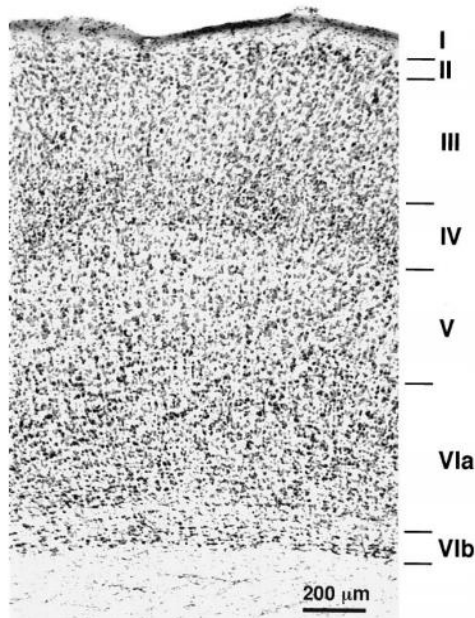


Figura 2. Organização estrutural de M1. As camadas corticais estão indicadas por números romanos a esquerda. Deschenes e Zhang, 1997.

Essa estruturação em camadas do córtex se relaciona com a especificação de funções e sinalização. Em encéfalos saudáveis, o padrão de conexão cortico-estriatal normal é ipsilateral, ou seja, intra-hemisférico, havendo a comunicação entre as camadas corticais II/III e V, principalmente (Weiler *et al.*, 2008). Foi demonstrado também uma comunicação entre as camadas similar à das vias presentes no córtex somatossensorial primário (Lefort *et al.*, 2009) porém de maneira modificada, pela presença de células não compactas na camada IV granular (Yamawaki *et al.*, 2014). A comunicação é vertical, ou seja, intracortical, havendo evidências de processamento em camadas superiores antes da sinalização ser encaminhada pelas camadas inferiores (Papale e Hooks, 2018).

As regiões afetadas pela lesão sofrem alterações locais a longo prazo, acontecendo também desorganização de regiões distantes a elas (Pekna *et al.*, 2012). Em áreas corticais adjacentes e próximas acontece a indução à excitabilidade das células nervosas principalmente por meio da ação do neurotransmissor glutamato via receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (5-metil-4-propionato) gerando influxo de Na⁺ ou Ca⁺, levando a destruição de

membranas dos neurônios por meio do processo de excitotoxicidade (Deb *et al.*, 2010). O processo degenerativo da injúria pode também danificar áreas distantes e deplecionar suas funções. O dano a regiões remotas é presumivelmente causado por hipometabolismo tecidual, desacoplamento neurovascular, neurotransmissão aberrante, entre outros processos (Wieloch e Nikolich, 2006).

Neurônios piramidais da camada cortical V, formadores de projeções cortico-espinais e cortico-estriatais têm diversos alvos (Figura 3). Eles são importantes para o controle motor, configurando as origens corticais de sistemas motores imprescindíveis (Anderson *et al.*, 2010; Papale e Hooks, 2018).

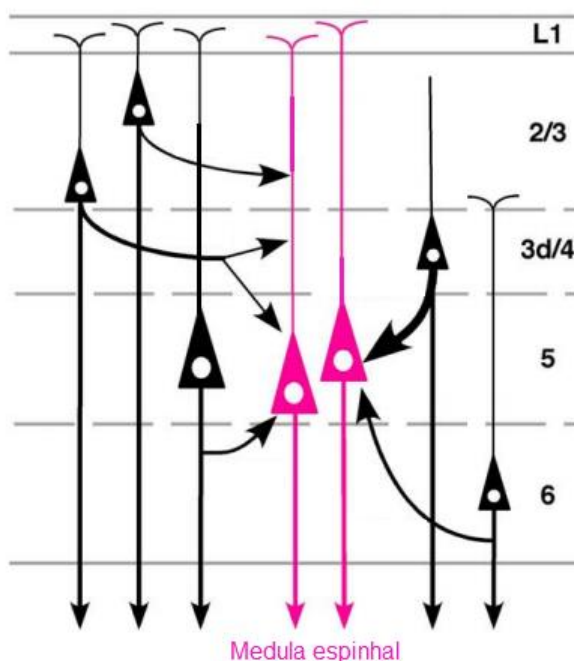


Figura 3. Padrão de projeções cortico-corticais normal. O esquema indica o padrão de conexões feitas pelos neurônios da camada V cortical (em rosa), mostrando o padrão intra-hemisférico dessas projeções em situações normais. Traduzido de Kaneko, 2013.

A mudança do padrão de projeções provenientes da camada V de M1 em situação de lesão cortical mostra a formação de conexões inter-hemisféricas a partir da região homóloga e contralateral a região que sofreu a injúria tecidual (Kolb *et al.*, 2010). Sabe-se que em casos de lesões corticais que não afetam o estriato, o padrão normal de conexões é modificado, assumindo um perfil inter-hemisférico, com projeções provenientes do lado ipsilateral inervando o córtex contralateral (Carmichael e Chesselet, 2002; Napieralski *et al.*, 1998) (Figura 4).

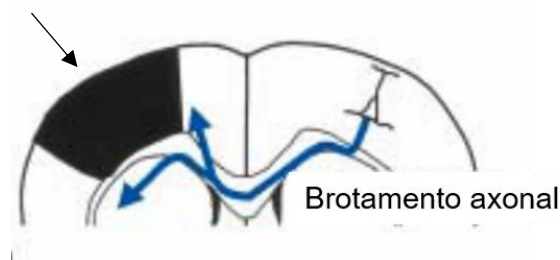


Figura 4. Padrão de projeções cortico-corticais alterado. Após lesão (indicada por seta preta), as projeções cortico-corticais provenientes da camada V de M1 passam a inervar o hemisfério contralateral a lesão, na região homóloga a ela. Traduzido de Carmichael, 2003.

A influência das lesões e tratamentos nas projeções cortico-estriatais provenientes da camada V e sua ação sobre processos de regeneração e plasticidade ainda não são completamente compreendidos. Essa lacuna abre espaço para a investigação das conexões realizadas pelo encéfalo lesionado e tratado e as consequências dessa conectividade na plasticidade e em seus mecanismos efetores.

A recuperação tecidual e funcional de regiões lesadas é um processo espontâneo, promovido pelo ambiente da injúria e ocorre em fases: a primeira, caracterizada pela recuperação física e metabólica do tecido e interrupção da sua destruição; a segunda, na qual acontece crescimento axonal, ativação e remodelamento das espinhas dendríticas, caracterizando conhecidos mecanismos de remodelamento celular; e a terceira, quando ocorre o estabelecimento de novas conexões neurais (Wieloch e Nikolich, 2006). Tal remodelamento e plasticidade estrutural neural pode ser influenciada pelo surgimento de novas células nervosas, assim como por alterações na morfologia dendrítica dos neurônios da penumbra, brotamento axonal e sinaptogênese (Carmichael, 2003; Murphy e Corbett, 2009; Nudo, 2007; Zhang *et al.*, 2005).

1.2.1. Mecanismos Efetores de Plasticidade no Sistema Nervoso Central

A plasticidade do SNC se dá por diversos mecanismos endógenos. A ativação deles se dá decorrente da cascata patofisiológica e inflamatória gerada pela lesão e dano tecidual. Tais modificações dos componentes do SNC gera

alterações e remodelamento das células nervosas e suas conexões, possibilitando assim, uma recuperação funcional e regeneração tecidual. Entre os principais processos que participam do modelamento da plasticidade neuronal, podemos citar a sinaptogênese, a neurogênese, angiogênese e alterações gliais.

O processo de sinaptogênese é definido como a formação de novas sinapses entre neurônios no SNC. Tal processo pode ser desencadeado por interações dependentes de contato entre diferentes neurônios e, entre neurônios e astrócitos, mediado por proteínas de adesão celular e induzido por fatores solúveis (Nelson e Alkon, 2014). Em casos de lesão do SNC, é observada também variação no número de sinapses e indução de sinaptogênese. Os mesmos mecanismos responsáveis pela alteração das conexões nervosas nas situações de aprendizado e execução de atividades motoras como já extensamente demonstrado (Ding *et al.*, 2002; Kleim *et al.*, 2004) também estão presentes em situações de lesão, acontecendo a indução de processos relacionados com a neuroplasticidade. O microambiente gerado favorece tais mecanismos. Já se foi demonstrado que o remodelamento de axônios se inicia de duas a três semanas após a injúria. Estudos apontaram o aumento de conexões e projeções axonais tanto do córtex contralateral para o corpo estriado ipsilateral e região de penumbra, quanto projeções provenientes da região perilesional em locais distantes da lesão, sendo essas projeções intracorticais e inter-hemisféricas. Tais modificações foram acentuadas com o tratamento utilizando células-tronco e se refletiram em recuperação funcional (Carmichael e Chesselet, 2002; Liu *et al.*, 2010; Napieralski *et al.*, 1998).

A neurogênese, caracterizada como o surgimento de novas células nervosas, é um processo endógeno do SNC, assim como a sinaptogênese. A neurogênese no SNC adulto acontece em níveis baixos, estando restrita a sítios neurogênicos estabelecidos (Figura 5). Em mamíferos, os sítios neurogênicos canônicos se resumem a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (SZG) do giro denteado do hipocampo (Bonfanti, 2016).

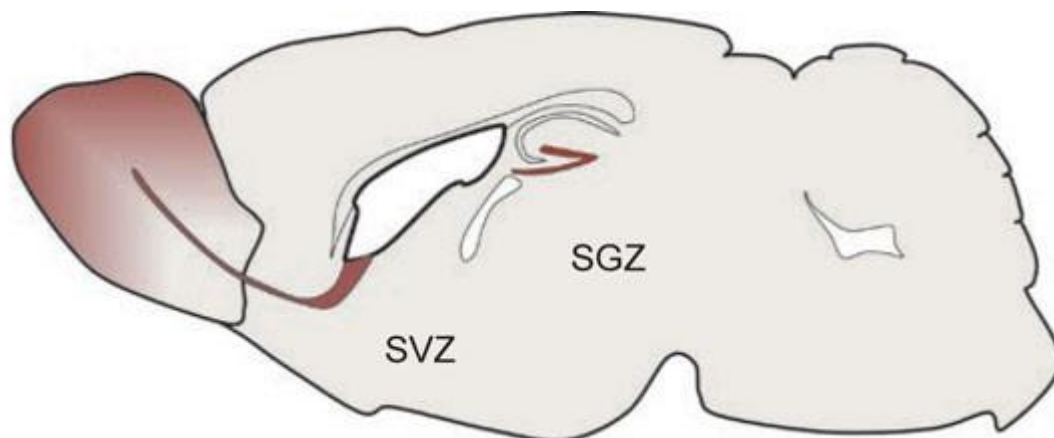


Figura 5. Corte sagital de cérebro de roedor, indicando a localização da SVZ e SGZ, os dois sítios neurogênicos canônicos em mamíferos. Adaptado de Ma *et al.*, 2009.

Essa capacidade inerente do SNC de gerar novas células neurais se dá pela manutenção de uma população residente de células-tronco neurais nesse local. Tais células se remodelam para gerar novas células neurais e da glia (Capilla-Gonzalez *et al.*, 2015) gerando uma resposta de substituição de células perdidas ou danificadas. Outra possibilidade de indução de neurogênese no SNC é o remodelamento de astrócitos reativos. Em respostas inflamatórias, astrócitos sofrem alterações morfológicas, funcionais e de expressão gênica (Gomes *et al.*, 2013) assumindo um estado reativo o qual pode sofrer plasticidade e se “desdiferenciar” em células-tronco neurais (Steindler e Laywell, 2003).

A angiogênese, o surgimento de novos vasos sanguíneos, é imprescindível para a regeneração da estrutura saudável do tecido. A recuperação da rede de vascularização do local perilesional provê o tecido com os fatores e nutrientes necessários para a manutenção das células locais e de sua sinalização para células próximas. Em modelos de AVE, diversos tratamentos têm como objetivo a indução da angiogênese, como por exemplo, a administração de células derivadas de medula-óssea (Chen *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2012), tratamento pós-lesão com agonistas de vias de sinalização (Jin *et al.*, 2017) e estatinas (Chen *et al.*, 2003b). Por meio do surgimento de neovascularização e *up*-regulação de fatores relacionado, processos de neurorestauração são aumentados, resultando em melhores efeitos no indivíduo acometido (Navarro-Sobrino *et al.*, 2011).

Alterações no microambiente que envolve o local da lesão e a região da penumbra são importantes para a regeneração tecidual e recuperação funcional,

como já exemplificado. Tal efeito pode ser aumentado por meio de tratamentos administrados após as lesões, como por exemplo, a aplicação de terapia celular em modelos de lesões ao SNC.

1.3. Terapia Celular em Lesões do Sistema Nervoso Central

A busca por tratamentos para lesões do sistema nervoso central é contínua, sendo que diferentemente de drogas já desenvolvidas, as células-tronco têm se apresentado como uma terapia neuroprotetora eficiente (Wei *et al.*, 2017). Os tratamentos usando células promovem a plasticidade cerebral e neurológica após a injúria, fazendo com que a terapia celular se destaque como tratamento eficaz de doenças degenerativas encefálicas (Zhang e Chopp, 2013). Entre os tipos celulares passíveis de serem usados em tratamento, há preferência pelas células-tronco, por serem células com características não diferenciadas, com a capacidade de manutenção de sua população (auto-renovação) e se diferenciação em outros tipos celulares, de acordo com o microambiente em que se encontram, gerando células progenitoras e células efetoras totalmente diferenciadas (Wagers e Weissman, 2004). Células-tronco neurais, células-tronco embrionárias, células-tronco embrionárias induzidas e células tronco derivadas de medula óssea são algumas que podem ser citadas como candidatas para aplicação como tratamento para lesões ao SNC.

Supunha-se que o reparo do dano tecidual alcançado através do tratamento com células tronco se dava por meio de diferenciação e substituição de células no local da lesão (Brazelton, 2000; Mezey, 2000), o que foi desacreditado em estudos posteriores (Dailey *et al.*, 2013). Os efeitos parácrinos, baseados na produção e secreção de citocinas, fatores de crescimento e outros tipos de molécula pelas células-tronco são os mais aceitos como indutores da recuperação funcional e plasticidade no uso delas. Os transplantes autólogo e alogênico de células tronco apresenta significativas propriedades anti-inflamatórias, neuroprotetoras e restaurativas em geral (Dailey *et al.*, 2013; Gnecci *et al.*, 2008), sendo então um modelo de tratamento promissor para lesões encefálicas, incluindo o AVE.

A cascata patofisiológica decorrente da falta de oxigenação no AVE isquêmico gera um processo inflamatório local agudo que, se não tratado, torna-se crônico aumentando o dano tecidual (Borlogan *et al.*, 2012). Evidências indicam

que a mesma sinalização que atrai células inflamatórias para o tecido lesado, age sobre as células-tronco adultas, as quais, no sítio da lesão, agirão de modo a restaurar a função do tecido (Mendez-Otero *et al.*, 2007). Isso indica que o processo inflamatório resultante da injúria tecidual inicial causada pela lesão tenha uma ação no recrutamento de células que agem no microambiente da lesão (Franco *et al.*, 2012), sendo então o foco da lesão tecidual com seu processo inflamatório ativo um alvo para as células tronco. Diversos tipos de células-tronco podem ser aplicadas no tratamento de injúrias encefálicas (Bang, 2016; Chouchane e Costa, 2012; Grochowski *et al.*, 2018), sendo que as células derivadas de medula óssea surgem como candidatas seguras e de fácil obtenção para este fim.

As células mononucleares de medula óssea (CMMOs) são uma fração celular que inclui células imunes maduras, células imunes progenitoras e células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais. Estas células-tronco são multipotentes capazes de dar origem a diversas linhagens, assim como outras linhagens de células-tronco. Juntamente com as células progenitoras, elas expressam fatores tróficos e de crescimento e citocinas, apresentando tropismo para o local lesionado. Essa produção de moléculas induz a ativação de mecanismos endógenos de recuperação tecidual e é característica ao perfil do microambiente da injúria (Chopp e Li, 2002). O efeito positivo das células-tronco em lesões do SNC já foi observado, sendo inclusive vista uma recuperação funcional após a administração dessa terapia em trabalhos de diversos grupos, inclusive o nosso (Coelho e Giral-di-Guimarães, 2014; Franco *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2010; Zaverucha-Do-Valle *et al.*, 2014). Existem vantagens no uso das CMMOs em comparação com as células-tronco mesenquimais de medula óssea enriquecidas em cultura, como por exemplo: fácil obtenção e rápida obtenção, permitindo o tratamento da fase aguda do AVE, comprovada segurança e viabilidade no seu transplante, possibilidade de transplante autólogo e menor possibilidade de contaminação, já que não há a necessidade de cultivo dessas células (Giral-di-Guimarães *et al.*, 2009; Mendez-Otero *et al.*, 2007).

O sucesso da utilização de terapia celular com células derivadas de medula óssea no tratamento de lesões encefálicas já foi comprovado em diversos estudos. Tal tratamento se reflete em melhorias motoras e cognitivas (Chen *et al.*, 2014),

porém, os mecanismos pelos quais a recuperação funcional se dá não foram completamente elucidados.

2. Objetivos

Avaliar o efeito do tratamento com Células Mononucleares de Medula Óssea na densidade neuronal da camada V dos córtices motor e somestésico primários contralaterais e homólogos às lesões corticais focais (isquemia por termocoagulação e ablação por aspiração).

3. Material e Métodos

3.1. Modelo Animal

Ratos da linhagem Wistar machos com idades variando de 3 a 4 meses foram obtidos do Biotério Central Professora Teresa Kipnis - UENF e mantidos em regime claro/escuro de 12 horas, com comida e água a vontade antes e durante o experimento. Todos os procedimentos envolvendo o manuseio e uso de animais de laboratório foram feitos de acordo com normas e princípios básicos de bioética, sendo que este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética pertinente (CEUA/UENF), sob protocolo de número 86 em 2 de setembro de 2010.

3.2. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram separados em cinco grupos experimentais, cada um com n=5, de acordo com a lesão (isquemia focal unilateral por termocoagulação ou ablação focal unilateral por aspiração) e o tratamento que receberam (administração de CMMOs ou solução salina, configurando os grupos controles), além do grupo não lesionado e sem tratamento (normal). Os grupos foram os seguintes: Normal, Ablação administrado com salina (Abl-control), Ablação tratado com as CMMOs (Abl-CMMO), isquêmico tratado com o salina (Isq-control) e isquêmico tratado com as CMMOs (Isq-CMMO).

Os animais foram anestesiados antes dos procedimentos cirúrgicos com uma mistura de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina administrada por via intraperitoneal nas proporções de 90 mg/kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Com o uso do aparelho estereotático (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil), os animais tiveram suas cabeças presas para que em seguida fosse feita a exposição cirúrgica do crânio. Com base no ponto de bregma, foi feita a craniotomia nestes animais, usando-se as medidas de +2 e -8 a partir do eixo anteroposterior, expondo a área do córtex frontoparietal esquerdo. Tal procedimento foi feito de acordo com o atlas estereotático de Paxinos e Franklin (2008). Ambos os tipos de lesão causam a perda das 6 camadas do córtex, na mesma extensão e localização, sem atingir o corpo caloso (Figura 5).

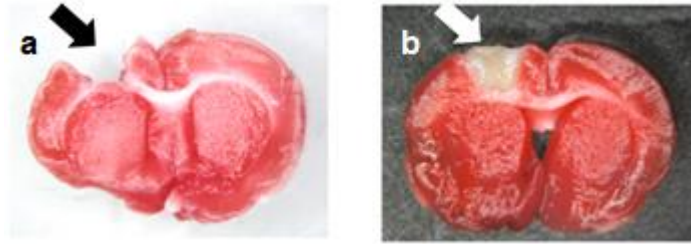


Figura 6. Cortes coronais de cérebro de rato indicando localização e extensão da lesão. A. Seta preta indica ablação por aspiração, com a retirada das 6 camadas corticais. B. seta branca indica isquemia por termocoagulação, com as 6 camadas do córtex atingidas pela lesão. Marcação por TTC. Adaptado de De Freitas *et al.*, 2012.

3.2.1. Isquemia Focal Unilateral por Termocoagulação

Com o auxílio de um ferro de solda a aproximadamente 500°C preso à haste do aparelho estereotáxico, a lesão isquêmica por coagulação foi induzida pela aproximação do ferro de solda ao cérebro, sem danificar as meninges, dando preferência a regiões com abundância de vasos. A lesão foi feita pela extensão do córtices motor e somestésico primários esquerdos, sendo que a mudança da coloração dos vasos de vermelho vivo para vermelho escuro indicou a termocoagulação nos vasos e consequente interrupção da circulação sanguínea local. Por meio desta observação dos vasos pudemos identificar o sucesso da indução da lesão e encerrar o procedimento.

3.2.2. Ablação Focal Unilateral por Aspiração

A lesão foi causada pela retirada quase completa das 6 camadas corticais da região motora e parcial da região somestésica, por meio do uso de uma bomba de vácuo com uma ponteira de 1000 µL acoplada ao tubo de sucção. Primeiramente, usando pinças ultrafinas seguida da sucção do córtex foi feita a ruptura da primeira meninge, a dura-máter. Com o cuidado de não danificar o corpo caloso e consequentemente a substância branca, que se encontra abaixo da 6ª camada cortical, a aspiração total do córtex foi feita. Após o término do procedimento, foram colocados fragmentos de esponja hemostática (Hemospon®, Technew Ltda., Brasil) para redução do sangramento.

Depois de ambos os tipos dos procedimentos cirúrgicos, os animais tiveram as cabeças suturadas e foram mantidos aquecidos sob uma lâmpada até voltarem a consciência e devolvidos ao biotério até o dia de sua eutanásia.

3.3. Obtenção e Transplante de Células Mononucleares de Medula Óssea

O transplante feito neste trabalho foi alogênico, portanto animais doadores foram eutanasiados para a obtenção das CMMOs. Após a eutanásia em câmara de CO₂, foi feita a remoção dos membros inferiores dos animais, cortando-se acima da articulação coxo-femoral para não danificar a epífise do fêmur. Os ossos foram limpos com o auxílio de lâminas de bisturi, para então serem colocados em placas de petri contendo solução salina 0,9%. A partir deste ponto, todos os procedimentos foram realizadas dentro do fluxo laminar. Os ossos então foram lavados e as epífises foram cortadas, dando acesso a medula óssea. Com o auxílio de uma seringa com 10 ml de meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, a medula óssea foi retirada e coletada em um tubo de 15 ml também contendo meio DMEM. Com uma pipeta Pasteur, foi feita a dissociação das células e em seguida, o conteúdo do tubo foi centrifugado por 5 minutos a 400 x g. O sobrenadante foi descartado e 2 ml de meio DMEM sem soro foram adicionados para que as células fossem ressuspensas. Em outro tubo de 15 ml, foram colocados 2 ml de HISTOPAQUE 1083 em temperatura ambiente, aos quais foram adicionados todo o meio com células usando uma pipeta Pasteur para nova centrifugação por 30 minutos a 400 x g. As células que se encontraram entre o HISTOPAQUE e DMEM-F12 foram retiradas e colocadas em um tubo contendo tampão PBS 10 mM para centrifugação por 5 minutos. Esse processo foi repetido mais duas vezes, até que depois da última lavagem, as células foram suspensas novamente em 1 ml de DMEM-F12.

3.3.1. Contagem e Injeção das Células Mononucleares de Medula Óssea

Foi feita a diluição de uma pequena alíquota da solução de células para sua contagem na câmara de *Neubauer* com a utilização do corante azul de Tripán (4%) para avaliação de sua viabilidade. Calculou-se então a diluição final de acordo com a quantidade de células obtidas para que a concentração de $3 \times 10^7/500 \mu\text{L}$, necessária para que a administração sistêmica fosse atingida. Decorridas 24 horas após a indução da lesão, os grupos experimentais tratados, referentes a ambos os tipos de lesão, tiveram CMMOs administradas via veia jugular, enquanto os animais

controle tiveram 500 µL de solução salina 0,9% administrado pela mesma via. Os animais foram anestesiados com base no mesmo protocolo descrito previamente, e por meio de incisão utilizando um bisturi no pescoço do animal e com o auxílio de pinças ultrafinas, tiveram sua veia jugular esquerda exposta. A injeção foi feita usando uma agulha fina na luz do vaso. O corte foi suturado e o animal foi mantido aquecido e depois devolvido para o biotério.

3.4. Preparo das Amostras e Obtenção dos Cortes Referentes a Camada Cortical V do Córtex Motor Primário Contralateral

Após o tempo de sobrevivência de 2 meses, os animais foram eutanasiados na câmara de CO₂ e preparados para perfusão padrão com solução salina 0,9% por 5 minutos e solução de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) a 4°C por 25 minutos. O encéfalo foi então removido do crânio e mantido na solução Karnovsky, desta vez contendo tampão cacodilato de sódio 0,2 M por um período de 6 a 8 horas (*overnight*) para pós-fixação. Após esse período, cada encéfalo originou um corte coronal a 6 mm da sua porção frontal, com espessura de 2 mm. A partir de cada corte coronal, foi obtida uma porção do encéfalo contralateral e homóloga à lesão, referente à quinta camada cortical. Para isso, o corpo estriado foi usado como referência, bem como descrições estereotáticas da literatura e a granulação do córtex somestésico primário como referência para a altura da camada V (Figura 1). Os vinte e cinco blocos resultantes foram mantidos armazenados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M para posterior processamento.

3.4.1. Obtenção dos Blocos para Corte e Visualização em Microscópio Óptico

Cada porção do encéfalo obtida pós-fixação passou por uma sequência de três lavagens por uma hora cada em tampão cacodilato de sódio, fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por uma hora seguida de outras três lavagens de mesma duração com o mesmo tampão. Depois disso, foi feita uma série de desidratação em acetona de concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90%) por uma hora cada e 100%, por uma hora, três vezes. Em seguida, foi seguido o protocolo de infiltração com resina Epon, em diferentes diluições em

acetona por 24 horas cada, e Epon puro por mais 24 horas. Os cortes foram então colocados na matriz com a resina Epon e deixados em estufa a 60°C por 48 horas. Foram feitos 20 cortes seriados semifinos de 0,85 µm no ultramicótomo, os quais foram corados com Azul de Toluidina 1% para contagem dos núcleos, de seu tamanho e tamanho do nucléolo em microscopia de luz. Para determinação da densidade neuronal, foi aplicado um método diferenciado de contagem, a técnica estereológica do dissector.

3.5. Contagem de Partículas pelo Método do Dissector

A técnica do dissector consiste em um método que permite a contagem de partículas de interesse (Q^-) igualmente representadas em um modelo 3D virtual, formado por duas imagens consecutivas separadas por uma determinada distância (Sterio, 1984). Ou seja, a contagem é feita em um modelo virtual montado por cortes sucessivos de uma mesma amostra em um mesmo campo visual. Apenas as partículas que aparecem no primeiro corte (sessão de referência) e não aparecem no segundo (sessão *look-up*) são contadas, evitando assim que uma mesma partícula seja contada duas vezes, ou que uma partícula não seja contada (Figura 6). Esse método permite a determinação do número de partículas em um determinado volume de amostra, independente da sua forma, tamanho e orientação (Kaplan et al., 2012).

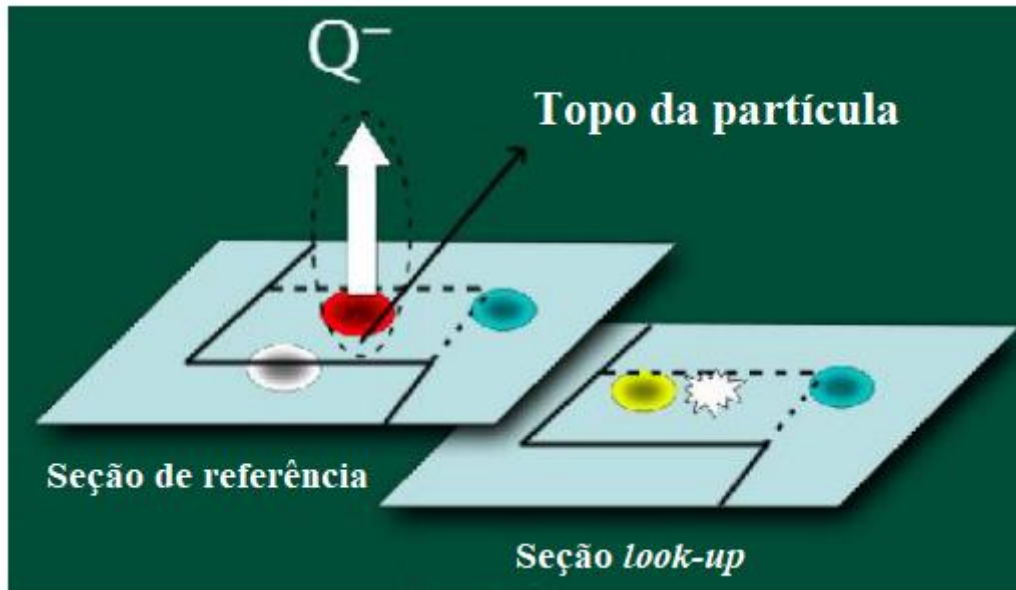


Figura 7. Esquema da montagem de um par de dissecor. São ilustradas partículas a serem contadas (Q^-), em duas seções (de referência e *look up*). Traduzido de Kaplan et al., 2012.

A partir da contagem pelo método do dissecor, torna-se possível a estimativa dos valores de densidade neuronal.

3.5.1. Densidade Neuronal

A partir de 20 cortes semifinos ($0,85 \mu\text{m}$ de espessura) consecutivos dos blocos mencionados, imagens foram obtidas em Microscópio Óptico. Nessas imagens, campos de contagem de aproximadamente $15.000 \mu\text{m}$ foram selecionados utilizando o *software AxioVision 4.8* (um campo por corte, sempre na mesma região). Dentro de cada imagem a região de contagem foi demarcada utilizando a regra de contagem de partículas cortadas pelas linhas superior e esquerda enquanto partículas cortadas pelas linhas inferior e direita não são contadas (Figura 7). Isso permite uma amostragem ampla e homogênea da partícula de interesse, que no caso, é o núcleo do neurônio.

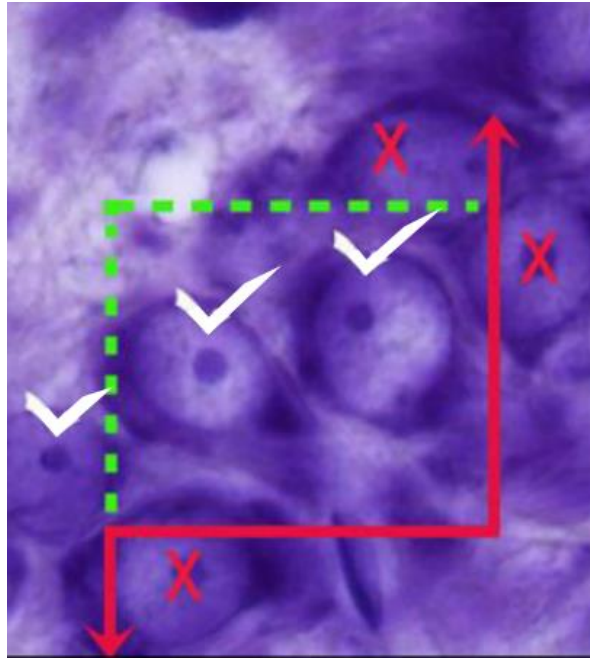


Figura 8. Montagem do campo de contagem. Partículas cortadas pelas linhas vermelhas não são contadas, enquanto partículas cortadas pelas linhas verdes são contadas. Adaptado de Kaplan et al., 2012.

A identificação dos núcleos dos neurônios foi feita pelo formato ovalado, grande tamanho e evidente presença de um nucléolo, características que não ocorrem nos núcleos das células gliais. O nucléolo é um sítio de biogênese de ribossomos e é a maior estrutura no núcleo celular. Sabendo que os neurônios possuem somente um núcleo contendo um nucléolo, estabelecemos essa estrutura como um bom parâmetro para identificação do neurônio. O núcleo do neurônio em tecido corado com Azul de Toluidina apresenta-se pálido com nucléolo hiperacorado, sendo possível sua identificação mesmo na ausência do nucléolo (Figura 8).

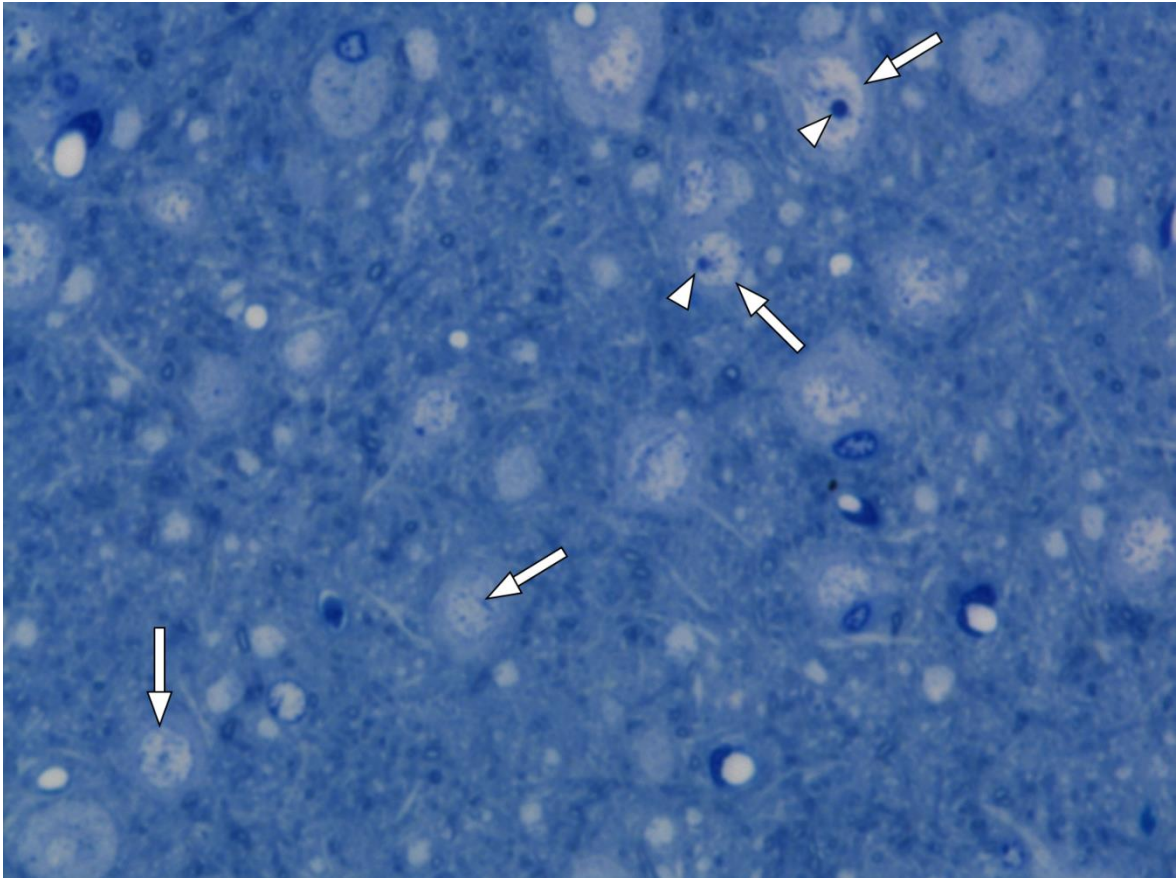


Figura 9. Corte semifino de área contralateral à lesão do córtex motor. Setas indicam núcleo de neurônios e cabeças de setas indicam nucléolo. Marcação com Azul de Toluidina.

A densidade neuronal é obtida por meio do cálculo da quantidade de partículas de interesse, no caso, neurônios ($Q1^-$), encontrados no volume na totalidade de cortes semifinos. O volume (V_{sem}) é calculado, de acordo com a equação 1:

$$V_{sem} = (A_{campo}) \cdot (H)$$

Equação 1. Volume de cada grupo de dissectores obtidos

onde A_{campo} é a área delimitada para contagem em cada imagem e H é a espessura do corte multiplicada pelo número de cortes no dissector. A densidade neuronal (D_{neur}) é então determinada como descrito na equação 2, sendo feita a divisão dos neurônios contados pelo volume obtido no grupo de imagens contadas:

$$D_{neur} = \frac{Q1^-}{V_{sem}}$$

Equação 2. Representação da quantificação de densidade neuronal

O valor final plotado foi "neurônios/mm³".

3.5.2. Quantificação do Volume do Núcleo de Neurônios

As imagens obtidas a partir dos cortes semifinos utilizados na estimativa da densidade neuronal também foram utilizadas para a quantificação do tamanho do núcleo de neurônios de maneira virtual. A obtenção da representatividade da área de núcleos em relação a área total do tecido gera o dado de aumento ou diminuição de tamanho da célula nervosa.

Neurônios possuem somente um núcleo, sendo esse facilmente identificado em secções coradas com Azul de Toluidina, apresentando-se pálido e de morfologia oval, como apresentado anteriormente. A morfologia dessa organela nos neurônios possibilita a sua contagem e quantificação. A partir da medida de área por meio do contorno da circunferência de todos os núcleos de neurônios por observados nas imagens através do *software* ImageJ (NIH, EUA), pudemos estimar a porcentagem representativa do volume de núcleos de neurônios em relação com o volume da amostra total (P_n) como ilustrado na Equação 3:

$$P_n = 100 \times \frac{A_n}{A_{sem}}$$

Equação 3. Porcentagem do volume total de núcleos em relação ao volume da amostra

onde A_n é a área quantificada e somada de todos os núcleos de neurônios observados, e A_{sem} é a área total do campo de contagem dos vinte cortes selecionado da amostra.

3.5.3. Análise dos Núcleos e Nucléolos dos Neurônios

Para a avaliação da proporção do tamanho de nucléolos em relação aos seus respectivos núcleos foram feitas novas imagens dos cortes seriados em maior aumento. Utilizando ferramentas do *software* ImageJ (NIH, EUA) foi medida a área

total dos núcleos e dos respectivos nucléolos, chegando ao valor final do percentual de volume total dos nucléolos em relação ao volume total dos núcleos.

3.6. Análise estatística

Para as análises de todas as variáveis estudadas (densidade neuronal, % volume nuclear e % volume nucléolo/volume nuclear) foi feita a ANOVA com os cinco grupos experimentais inclusos. Quando foi observada diferença significativa entre os grupos, foi aplicado o pós-teste de Tukey para as múltiplas comparações. Para todos os testes, foi determinado nível de significância $p < 0,05$. Foi feita a análise de correlação (regressão linear) entre as variáveis "densidade neuronal" e "% volume nuclear". Toda a análise estatística foi feita no *software* GraphPad Prism 8, onde os gráficos também foram gerados.

4. Resultados

A análise qualitativa das imagens mostrou diferenças no tamanho dos corpos celulares e dos respectivos núcleos dos neurônios entre os grupos, sendo os do grupo normal claramente menores que os dos demais grupos (Figura 9).

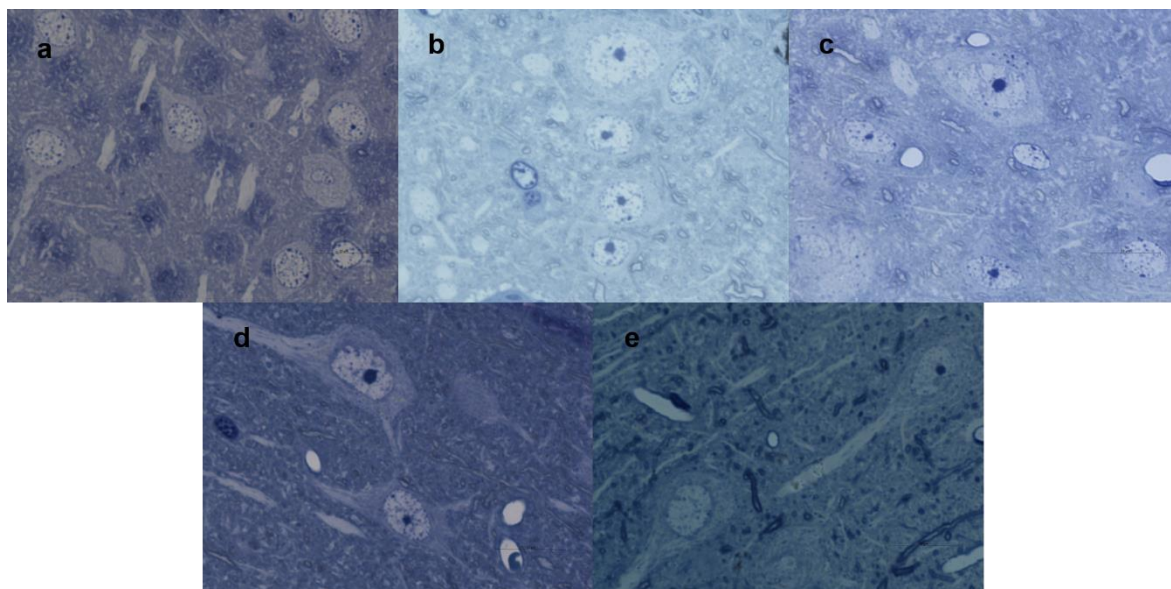


Figura 10. Comparação do tamanho dos corpos celulares e dos núcleos em micrografias representativas de cada grupo experimental. Note que os corpos celulares e os núcleos neuronais do grupo Normal são menores que os dos demais grupos. A, grupo Normal; B, grupo Ablado controle; C, grupo Ablado tratado; D, grupo Isquêmico controle; E, grupo Isquêmico tratado.

Na análise quantitativa da densidade neuronal, houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0.0001$; $F = 30,2$), e as múltiplas comparações mostraram que o grupo Normal teve valor significativamente maior que os demais grupos, sendo estes não significativamente variantes entre si (Figura 10).

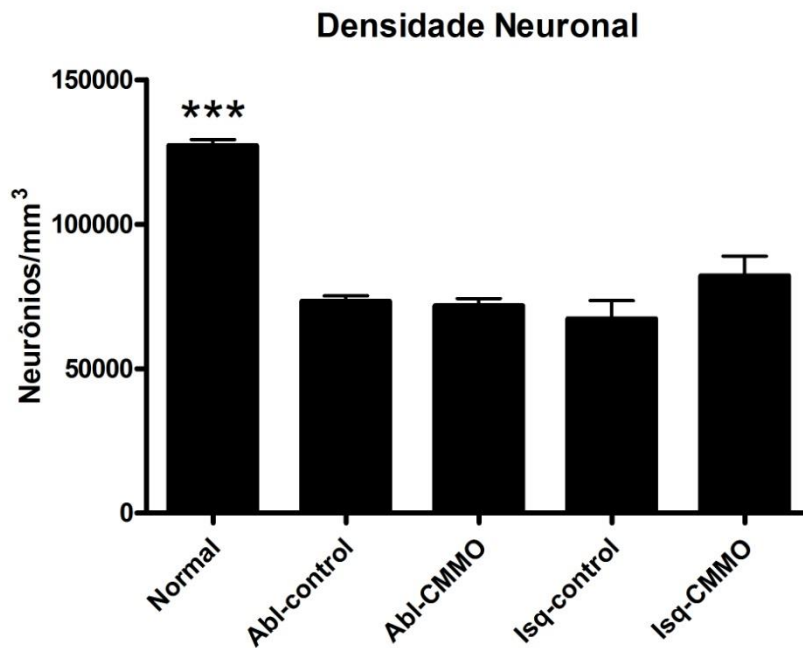


Figura 11. Quantificação da densidade neuronal. As barras no gráfico representam média±SEM. A análise estatística mostrou que o grupo Normal é significativamente diferente dos demais grupos, os quais não diferiram significativamente entre si.

*** = $p < 0,001$ (Tukey).

A quantificação apenas da densidade neuronal é insuficiente para saber o motivo da sua alteração entre os grupos, uma vez que pode ter ocorrido por morte neuronal ou por crescimento neuronal. A análise qualitativa sugere que houve aumento dos volumes neuronal e nuclear nos grupos lesionados em relação ao grupo Normal (Figura 8). Isto sugere que o resultado da densidade neuronal é devido ao crescimento celular dos neurônios. Para avaliar esta hipótese, foi feita a quantificação do percentual dos volumes nucleares neuronais em relação ao volume tecidual. Houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0.0001$; $F = 24,2$), e as múltiplas comparações mostraram que o grupo Normal apresentou percentual de volume nuclear significativamente menor que os demais grupos, e o grupo Abl-control apresentou percentual de volume nuclear maior que os demais grupos (Figura 11).

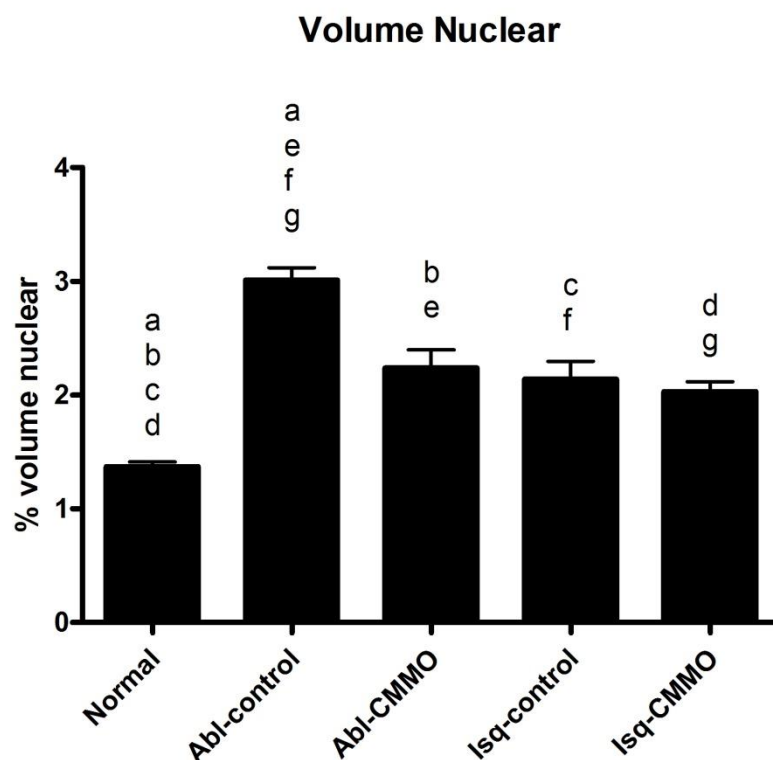


Figura 12. Quantificação do volume nuclear neuronal. As barras no gráfico representam média±SEM. A análise estatística mostrou que o grupo Normal é significativamente menor que os demais grupos, e o grupo Abl-control é significativamente maior que os demais grupos. Letras iguais indicam diferença significativa entre o par de grupos.

a, b, f, g = $p < 0,001$; c, d, e = $p < 0,01$; (Tukey).

Estes resultados sugerem que a redução observada na densidade neuronal nos grupos lesionados se deve ao aumento do volume neuronal nestes grupos. Para melhor avaliar esta hipótese, foi feita uma análise de correlação para verificar se a densidade neuronal é de fato significativamente inversamente proporcional ao volume neuronal, inferido pelo volume nuclear. A análise de correlação confirmou esta hipótese (Figura 12).

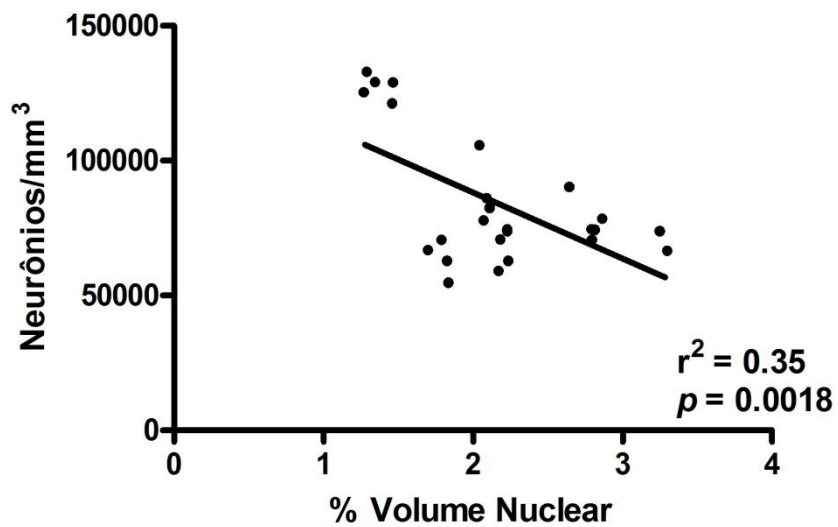


Figura 13. Análise de correlação entre densidade neuronal e volume nuclear. Os pontos no gráfico representam os dados de cada variável para cada animal do experimento. A curva representa a regressão linear. A correlação foi estatisticamente significativa e mostrou que a densidade neuronal foi inversamente proporcional ao volume nuclear.

Ao analisar as mesmas micrografias obtidas, a observação do nucléolo hipercolorado, como vemos na figura 13, levou ao questionamento da variação do seu volume em relação ao volume nuclear dos neurônios.

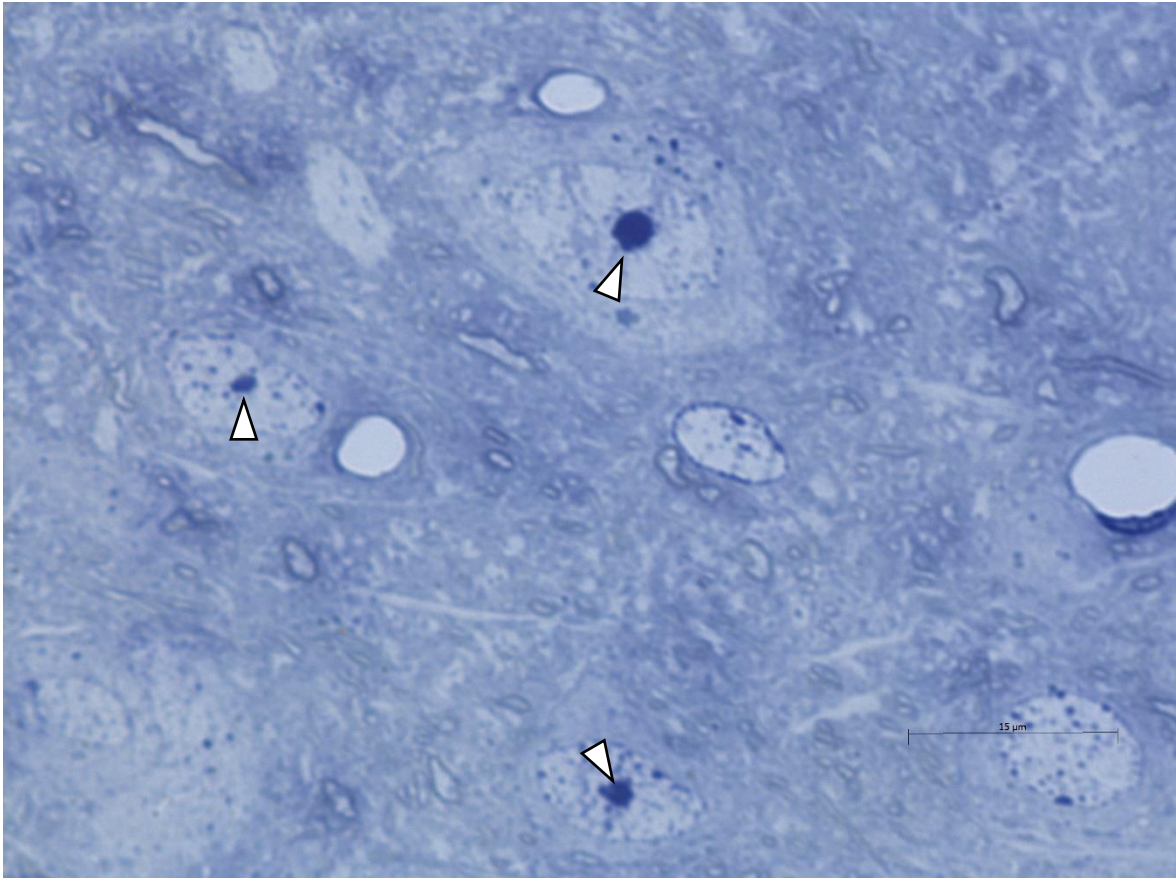


Figura 14. Micrografia representativa do grupo Abl-control. Mostra a proporção entre os volumes nucleares e os volumes dos nucléolos (pontas de setas).

Utilizando a mesma fórmula para cálculo da proporção de área de núcleos pela área total do campo de contagem, calculamos a relação entre área somada de nucléolos e área total de núcleos de neurônios. Não obtivemos diferença significativa fazendo a comparação entre os cinco grupos experimentais por meio da aplicação de ANOVA (Figura 14). Tal achado indicou que a alteração da área dos núcleos, ou seja, o aumento do tamanho dos núcleos em indivíduos lesados, não foi acompanhado por alteração na área do nucléolo. Isso mostra que a alteração de tamanho do núcleo é acompanhada pela alteração do volume dos nucléolos, sendo que as duas estruturas mantêm sua proporção estável.

Proporção volumes nucléolos/núcleos

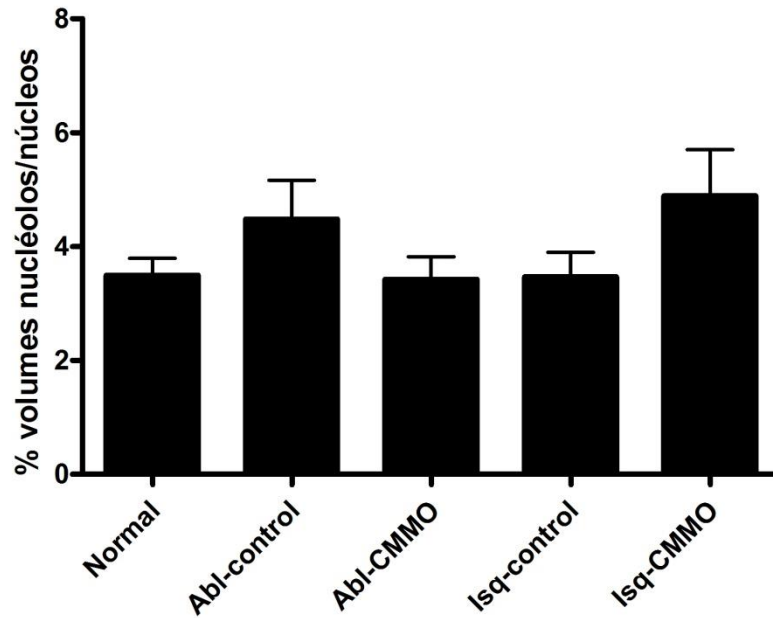


Figura 15. Quantificação do percentual de volume dos nucléolos em relação ao volume nuclear. As barras no gráfico representam média \pm SEM. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos.

5. Discussão

O efeito de injúrias teciduais é extremamente danoso e gera consequências sérias para o indivíduo acometido por AVE, lesões traumáticas, lesões espinhais ou qualquer outro tipo de lesão ao SNC. A busca por tratamentos é constante, sendo que as células-tronco surgiram como uma ótima alternativa terapêutica nesses casos (Grochowski *et al.*, 2018). A eficácia desses tratamentos já foi comprovada em diversos estudos (Chen *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014), inclusive em trabalhos do nosso grupo (Coelho e Giral-di-Guimarães, 2014; De Fátima dos Santos Sampaio *et al.*, 2013; De Freitas *et al.*, 2012). Porém, os mecanismos pelos quais as células-tronco agem na recuperação funcional do indivíduo e regeneração do tecido lesionado ainda não foram completamente compreendidos. Sabe-se que o principal efeito das células-tronco se dá por meio de mecanismos parácrinos, através da liberação de fatores específicos responsáveis por modular a resposta tecidual ao microambiente da lesão (Dulak *et al.*, 2015; Gneccchi *et al.*, 2008). No SNC, os principais mecanismos observados durante a recuperação tecidual após uma lesão são a neurogênese, angiogênese, sinaptogênese, entre outros.

Como já citado, a neurogênese em indivíduos adultos é observada em baixos níveis. Os sítios neurogênicos canônicos em mamíferos se resumem a SVZ e SGZ (Kemperman, 2012), com a manutenção de populações de células-tronco e progenitoras com capacidade de renovar a população de células nervosas de todo encéfalo (Sun *et al.*, 2015). Fora destes locais, o surgimento de novos neurônios acontece, porém de maneira reduzida. O remodelamento de expressão gênica, morfologia e funções dos astrócitos (Gomes *et al.*, 2013) em decorrência de uma lesão pode causar a alteração do perfil destas células, que assumem características de células-tronco, podendo agir de todas as maneiras usuais delas (Gabel *et al.*, 2015; Michelucci *et al.*, 2016). Devido ao baixo potencial neurogênico do SNC maduro, espera-se que a recuperação funcional e a plasticidade aconteçam por intermédio de outros mecanismos.

O resultado obtido nos experimentos apresentados neste trabalho indicam baixa indução de neurogênese, condizendo com os conhecimentos já estabelecidos sobre o assunto. Como esperado, o processo pelo qual acontece o surgimento de novas células nervosas não é o principal mecanismo indutor de

plasticidade. Quando a densidade de neurônios é avaliada nos diferentes grupos experimentais, é clara uma diferença significativa entre o grupo normal e os grupos lesados tratados e controle, indicando que as lesões induzidas nos animais gerou uma diminuição no número de neurônios. A possibilidade da alteração do volume das células surge, já que a partir da análise de regressão feita, vimos que o aumento do tamanho dos núcleos está relacionado com a diminuição de densidade neuronal, indicando que a partir da alteração morfológica observada, menos células são contadas.

O efeito do transplante de CMMOs para tratamento de ambas as lesões não gerou efeito no sentido de indução de neurogênese. Isso se dá devido a característica da cascata patofisiológica do AVE que afeta as células-tronco residentes dos nichos canônicos de neurogênese, levando-as a morte. Isso diminui o potencial neurogênico em situações de lesão (Koh e Park, 2017). Todas essas evidências coletadas indicam que o papel na modulação da plasticidade está reservado a outros mecanismos que não a neurogênese, como arborização dendrítica, sinaptogênese, entre outros.

A ausência de alterações na densidade neuronal e conseqüentemente baixa neurogênese nos modelos de ablação reflete o reduzido poder indutor de plasticidade e regeneração dessa lesão no tecido nervoso (De Freitas *et al.*, 2015). A retirada completa das 6 camadas do córtex impede a progressão de uma resposta tecidual adequada e benéfica ao dano tecidual (Uryu *et al.*, 2001). Para que o tecido se recupere de maneira que induza uma regeneração refletindo em melhora de funções motoras e cognitivas, é necessário todo o suporte proveniente da glia e matriz extracelular circundando os neurônios. Como já mencionado, a manutenção da expressão e presença de proteínas relacionadas com crescimento axonal, formação de novas sinapses, arborização dendríticas e muitos outros é necessária para a plasticidade pós-lesão (Szele e Alexander, 1995). Mesmo com o tratamento com CMMOs, não se obteve melhora em relação a densidade neuronal, já que não há manutenção da estrutura tecidual básica. Nos nossos modelos, os indivíduos submetidos a este tipo de lesão obtiveram os menores valores de densidade neuronal, o que reflete esta perda tecidual.

Da mesma maneira que o modelo de ablação impede que mecanismos indutores de plasticidade aconteçam em níveis adequados para a recuperação

funcional do indivíduo lesado, tal modo de injúria tecidual causa consequências biologicamente importantes. A partir da análise das imagens obtidas por microscopia óptica, foi possível observar que entre os cinco grupos experimentais utilizados neste trabalho, havia uma diferença clara entre o tamanho dos núcleos dos neurônios observados.

A análise da relação entre o volume calculado de núcleos no tecido pelo volume total do campo de contagem selecionado, gerou um dado interessante indicando a diferença entre os dois tipos de lesão aplicados neste trabalho analisando este parâmetro (Figura 11). No grupo ablação controle, observamos um grande aumento desta relação quando comparados ao normal, indicando que neurônios de animais submetidos a lesões de retirada completa das cinco camadas corticais, sofrem alterações morfológicas aumentando o volume de seus núcleos. Um aumento significativo dos núcleos neuronais também foi observado na comparação entre o grupo de ablação tratado com CMMOs com normal, mas em menor significância. Quando analisamos os grupos isquêmicos, o aumento da relação entre áreas de núcleos e área total do campo de contagem é menor, o que se reflete estatisticamente. O aumento notado no grupo isquêmico tratado com CMMOs é ainda menor em comparação.

O controle do tamanho do núcleo de uma célula é fundamental para a regulação de suas funções fisiológicas. Uma grande quantidade de mecanismos trabalham com a finalidade de modificar e controlar a forma e tamanho do núcleo, mantendo suas atividades e funções de forma ótima (Revisado em Jevtic *et al.*, 2015). Variações na morfologia nuclear indicam metabolismo alterado, indução de apoptose, resposta inflamatória e também é indício de diversas doenças importantes (Revisado em Webster *et al.*, 2009). Diversas doenças estão relacionadas com alterações morfológicas no núcleo, como por exemplo câncer (Okudela, 2013; Zeimet *et al.*, 2011), doenças neurodegenerativas (Rinne *et al.*, 1987; Wideman *et al.*, 2014), autismo (Wegiel *et al.*, 2015), entre outras. Não se sabe se alterações morfológicas do núcleo contribuem para a patologia de doenças ou se são uma consequência delas. Diversos fatores estão envolvidos nas alterações de forma e volume do núcleo. Vários estudos analisam os fatores que levam a essas alterações, como por exemplo, a composição do complexo de poros

nucleares (Titus *et al.*, 2010), expressão de laminas (Shumaker *et al.*, 2005), entre outros.

Em neurônios, o efeito da deficiência em laminas específicas leva a defeitos no desenvolvimento e formato nuclear anormal (Young *et al.*, 2011), assim como em ratos cronicamente desidratados, os núcleos sofreram aumento de área significativo em relação aos controles (Lafarga *et al.*, 1992). Em indivíduos idosos, notou-se um aumento no tamanho dos núcleos, acompanhado de metabolismo aumentado nestas células (Ishunina, 2015). Todas essas evidências indicam que insultos que resultem em algum nível de dano tecidual podem se refletir em alterações no tamanho e morfologia geral do núcleo neuronal.

Uma lesão encefálica gera uma resposta inflamatória local com consequências graves para a sobrevivência e função das células neuronais. Em modelos de AVE, a liberação de mediadores inflamatórios leva a destruição tecidual e conseqüentemente, causa alterações importantes nas células (Tobin *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2007). A resposta inflamatória leva a um inchaço osmótico da célula, o que causa morte celular necrótica (Berghe *et al.*, 2014). Tal alteração morfológica, chamada de “edema citotóxico”, acontece devido ao influxo descontrolado de cátions (especialmente Na⁺), pelos diversos canais iônicos presentes nas células nervosas (Liang *et al.*, 2009). Esse fenômeno pode acontecer também devido ao acúmulo de ácidos graxos por meio de sinais quimiotáticos que ativam uma fosfolipase específica que causa tensão física no envelope nuclear (Enyedi *et al.*, 2016). O tratamento com CMMOs tem efeito na diminuição de tal consequência, devido a sua função anti-inflamatória (Song *et al.*, 2018). No caso deste trabalho, o tempo decorrido após a indução da lesão é muito longo para que uma resposta inflamatória seja mantida por dois meses, além de que esse tipo de resposta tecidual geralmente é vista na região perilesional ipsilateral (Del Zoppo, 2009). Por essas razões, esta explicação para o aumento do volume nuclear não é sustentada com base nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

Uma segunda hipótese que pode explicar o aumento dos núcleos neuronais é a ocorrência de alterações de transcrição e expressão proteica. Pensava-se que o volume nuclear era variável de acordo com a quantidade de material genético contido neste compartimento celular. Sabendo que neurônios corticais podem apresentar poliploidia (Sigl-Glöckner e Brecht, 2017), esta seria uma boa hipótese

para a variação de tamanho nuclear. Porém, estudos com levedura mostraram que o aumento progressivo de DNA contido no núcleo não alterou o tamanho nuclear (Neumann e Nurse, 2007), anulando essa hipótese. Nesse sentido de investigar alterações morfológicas nucleares, estudos anteriores mostraram a correlação do nível de transcrição de RNA, tamanho do núcleo e tamanho da célula (Sato *et al.*, 1994; Schmidt e Schibler, 1995), indicando que a alteração do volume nuclear possa ter a função de sustentar a expressão aumentada de genes em células maiores. Isso acontece para que a razão citoplasma/núcleo seja mantida, o que é indício de células maduras e saudáveis (Yamamoto *et al.*, 2004). Além disso há evidências de que um núcleo maior tenha suporte para mais proteínas e enzimas sensíveis a grande presença de outras moléculas (Sasaki *et al.*, 2006).

Na situação avaliada neste trabalho, o aumento da transcrição que leve ao aumento do volume nuclear pode ser explicado por meio da sustentação da expansão de projeções dos neurônios de modo a formar novas sinapses. O modelamento de novas sinapses com neurônios pré-existentes em animais lesionados de forma semelhante à deste trabalho acontece na região contralateral e homóloga a lesão, mais precisamente, na camada V cortical (Allred e Jones, 2004; Luke *et al.*, 2004). Para que o processo de sinaptogênese aconteça, as células nervosas devem sofrer alterações morfológicas para que, por meio do brotamento axonal, alcancem as células com quem formarão conexões. Comparando os dois modelos de lesão aqui utilizados, é vista a diferença na formação desses prolongamentos. Modelos isquêmicos são conhecidos por ter a capacidade de induzir o brotamento axonal, enquanto em modelos de ablação isso não acontece (Carmichael e Chesselet, 2002). Inferir que o aumento do núcleo e do citoplasma leva a formação de brotos axonais e consequente modulação de novas conexões sináptica a fim de configurar uma resposta de neuroplasticidade faz sentido quando usamos o modelo isquêmico como exemplo. Porém, o aumento de volume nuclear e possível aumento de volume neuronal observado nos grupos abladados não pode ser explicado dessa maneira. Não pudemos entender o motivo de tal alteração significativa neste tipo de lesão, já que esperaríamos que víssemos uma resposta deste tipo nos modelos de isquemia por termocoagulação. Em todos os trabalhos publicados sobre a lesão de ablação por aspiração é mostrado que a ocorrência de brotamento axonal e qualquer outro mecanismo relacionado com a

neurplasticidade é baixo (Uryu *et al.*, 2001), o que gera a dúvida sobre a causa dessa alteração.

A sustentação da expansão de projeções neuronais também é dada pela estrutura do nucléolo. Como apresentado nos resultados obtidos, o nucléolo dos neurônios acompanharam o aumento de volume nuclear, mantendo uma proporção entre as duas estruturas. Conhecido como um sítio de biogênese ribossomal e também por participar da regulação do ciclo celular, através da ação de genes como p53, o nucléolo apresenta morfologia variável em fases do ciclo celular (Boisvert *et al.*, 2007). A estabilidade da relação de áreas entre o núcleo e nucléolo já foi comprovada em estudos em outros modelos, indicando que o aumento de volume nuclear leva ao aumento de volume do nucléolo em condições normais. Essa relação só é alterada quando é feita a manipulação de expressão de proteínas específicas com RNAi (Weber e Brangwynne, 2015). Da mesma maneira, o volume do nucléolo é proporcional ao volume da célula, sendo que neurônios ganglionares com nucléolos maiores apresentavam corpos celulares maiores (Berciano *et al.*, 2007). Além da relação com aumento celular em si, a ausência de aumento do volume do nucléolo de maneira extrema pode indicar metabolismo saudável das células (Tiku *et al.*, 2016).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a terapia com as CMMOs não influenciou na densidade e volume neuronais. Isto sugere que este parâmetro não deve ser importante para o efeito de recuperação destas células. Entretanto, o aumento de densidade neuronal e de redução de volume neuronal é independente do tipo de lesão, uma vez que não foi observada diferença entre os grupos isquêmicos e ablados. Os resultados indicam que este efeito promovido pelas lesões não se deve à neurogênese. Outros mecanismos como neuritogênese e sinaptogênese devem estar envolvidos no aumento de volume neuronal observado nos grupos lesionados, uma vez que envolvem aumento de transcrição e tradução gênicas. A razão pela qual os modelos ablados tiveram maior aumento de volume nuclear é desconhecida, devido a característica desse tipo de lesão não ser indutor de plasticidade.

Este trabalho abre um nicho para que novos projetos sejam desenvolvidos nessa área para que um melhor entendimento do processo de neuroplasticidade e do efeito das CMMOs seja alcançado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2017. 1464 p.
- ALLRED, R. P.; JONES, T. A. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: Forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex. **Experimental Neurology**, v. 190, n. 2, p. 433–445, 2004.
- ANDERSON, C. T. et al. Sublayer-specific microcircuits of corticospinal and corticostriatal neurons in motor cortex. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 739–44, 2010.
- BANG, O. Y. Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke. **Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)**, v. 12, n. 1, p. 14–20, jan. 2016.
- BENOWITZ, L. I. et al. Anatomical Distribution of the Growth-Associated in the Adult Rat Brain Protein. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 8, n. January, p. 339–352, 1988.
- BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG, A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 84–91, fev. 1997.
- BERCIANO, M. T. et al. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. **Journal of Structural Biology**, v. 158, n. 3, p. 410–420, 2007.
- BERGHE, T. VANDEN et al. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 135–147, 2014.
- BOISVERT, F. M. et al. The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 574–585, 2007.
- BONFANTI, L. **Adult neurogenesis 50 years later: Limits and opportunities in mammals** **Frontiers in Neuroscience**, 2016.
- BORLONGAN, C. V et al. Permeating the Blood Brain Barrier and Abrogating the Inflammation in Stroke: Implications for Stroke Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 25, p. 3670–3676, 2012.
- BRAZELTON, T. R. From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1775–1779, 1 dez. 2000.
- CAPILLA-GONZALEZ, V.; HERRANZ-PÉREZ, V.; GARCÍA-VERDUGO, J. M. The aged brain: genesis and fate of residual progenitor cells in the subventricular zone. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, n. September, p. 1–11, 2015.
- CARMICHAEL, S. T. Plasticity of cortical projections after stroke. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 64–75, 2003.
- CARMICHAEL, S. T.; CHESSELET, M.-F. Synchronous Neuronal Activity Is a Signal for Axonal Sprouting after Cortical Lesions in the Adult. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 14, p. 6062–6070, 15 jul. 2002.
- CHEN, J. et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. **Circulation Research**, v. 92, n. 6, p. 692–699, 2003a.
- CHEN, J. et al. Statins Induce Angiogenesis, Neurogenesis, and Synaptogenesis after Stroke. p. 743–751, 2003b.
- CHEN, J. et al. Neurorestorative therapy for stroke. **Frontiers in human**

neuroscience, v. 8, n. June, p. 382, 2014.

CHENG, M. Y. et al. Optogenetic neuronal stimulation promotes functional recovery after stroke. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. 12913–12918, 2014.

CHIA, N. H. et al. Determining the Number of Ischemic Strokes Potentially Eligible for Endovascular Thrombectomy. **Stroke**, v. 47, n. 5, p. 1377–1380, maio 2016.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurology**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2002.

CHOUCHANE, M.; COSTA, M. R. Cell therapy for stroke: use of local astrocytes. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 6, n. October, p. 1–6, 2012.

COELHO, B. P.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. Effect of age and gender on recovery after stroke in rats treated with bone marrow mononuclear cells. **Neuroscience Research**, v. 88, n. C, p. 67–73, 2014.

CRAMER, S. C.; CHOPP, M. Recovery recapitulates ontogeny. **Trends in Neurosciences**, v. 23, n. 6, p. 265–271, jun. 2000.

DAILEY, T. et al. An Update on Translating Stem Cell Therapy for Stroke from Bench to Bedside. **Journal of Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 220–241, 2013.

DE FÁTIMA DOS SANTOS SAMPAIO, M.; MARCILIO, F. D. S.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. 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**, v. 1492, p. 130–9, 25 jan. 2013.

DE FREITAS, H. T. et al. 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**, v. 348, n. 1–2, p. 166–173, 2015.

DE FREITAS, H. T.; DA SILVA, V. G.; GIRALDI-GUIMARÃES, A. 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 : BBF**, v. 8, p. 58, 2012.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology**, v. 17, p. 197–218, 2010.

DEL ZOPPO, G. J. Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 972–82, 6 fev. 2009.

DESCHÊNES, M.; ZHANG, Z. W. Intracortical axonal projections of lamina VI cells of the primary somatosensory cortex in the rat: a single-cell labeling study. **The Journal of neuroscience**, v. 17, n. 16, p. 6365–79, 1997.

DING, Y. et al. Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus. **Neurological Research**, v. 24, n. 8, p. 829–836, 19 nov. 2002.

DUARTE, E. P. et al. Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. **Growth Factors**, v. 30, n. 4, p. 242–257, 7 ago. 2012.

DULAK, J. et al. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. **Acta biochimica Polonica**, v. 62, n. 3, p. 329–37, jan. 2015.

ENYEDI, B.; JELCIC, M.; NIETHAMMER, P. The cell nucleus serves as a mechanotransducer of tissue damage-induced inflammation. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1160–1170, 2016.

FRANCO, E. C. S. et al. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear

cell transplantation after cortical ischemia. **Neuroscience Research**, v. 73, n. 2, p. 122–132, 2012.

FREEMAN, W. D.; DAWSON, S. B.; FLEMMING, K. D. The ABC's of Stroke Complications. **Seminars in Neurology**, v. 30, n. 5, p. 501–510, 2010.

GABEL, S. et al. Inflammation Promotes a Conversion of Astrocytes into Neural Progenitor Cells via NF- κ B Activation. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 8, p. 5041–5055, 2015.

GIRALDI-GUIMARÃES, A. et al. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain research**, v. 1266, p. 108–20, 17 abr. 2009.

GNECCHI, M. et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1204–1219, 2008.

GOMES, F. A. C.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.

GRANDEL, H.; BRAND, M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. **Development Genes and Evolution**, v. 223, n. 1–2, p. 131–147, 2013.

GROCHOWSKI, C.; RADZIKOWSKA, E.; MACIEJEWSKI, R. Neural stem cell therapy—Brief review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 173, p. 8–14, 2018.

GUO, F. et al. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. **Cell Biology International**, v. 36, n. 11, p. 997–1004, 2012.

HACKE, W. et al. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 13, p. 1317–1329, 25 set. 2008.

ISHUNINA, T. A. Sizes of neuronal nuclei and pericytes in the nucleus basalis of Meynert and the posterior hypothalamus in different age groups. **Advances in Gerontology**, v. 5, n. 2, p. 117–120, 2015.

ISSA, R. et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in the human brain following ischaemic stroke. **Angiogenesis**, v. 8, n. 1, p. 53–62, mar. 2005.

JEVTIC, P. et al. Sizing and shaping the nucleus: mechanisms and significance. **Current Opinion in Cell Biology**, p. 16–27, 2015.

JIN, Y. et al. Post-stroke shh agonist treatment improves functional recovery by enhancing neurogenesis and angiogenesis. **Stroke**, v. 48, n. 6, p. 1636–1645, 2017.

KANEKO, T. Local connections of excitatory neurons in motor-associated cortical areas of the rat. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, n. May, p. 1–17, 2013.

KAPLAN, S. et al. The disector counting technique. **NeuroQuantology**, v. 10, n. 1, p. 44–53, 2012.

KEMPERMANN, G. New neurons for “survival of the fittest”. **Nature Reviews**, v. 13, p. 727–736, 2012.

KIPNIS, J. et al. Neuronal Survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 13, p. 4564–4571, 2001.

KLEIM, J. A. et al. Cortical Synaptogenesis and Motor Map Reorganization Occur during Late, But Not Early, Phase of Motor Skill Learning. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 3, p. 628–633, 21 jan. 2004.

KOH, S. H.; PARK, H. H. Neurogenesis in Stroke Recovery. **Translational Stroke Research**, v. 8, n. 1, p. 3–13, 2017.

KOLB, B.; TESKEY, G. C.; GIBB, R. Factors influencing cerebral plasticity in the normal and injured brain. **Frontiers in human neuroscience**, v. 4, n. November, p. 12, 2010.

KRIZ, J. Inflammation in Ischemic Brain Injury: Timing is Important. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 18, n. 1–2, p. 145–157, 2006.

LAFARGA, M. et al. Fos-like expression and nuclear size in osmotically stimulated supraoptic nucleus neurons. **Neuroscience**, v. 50, n. 4, p. 867–875, 1992.

LEFORT, S. et al. The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. **Neuron**, v. 61, p. 301–316, 2009.

LI, Y. et al. Neuroprotective effects of intravenous transplantation of bone marrow mononuclear cells from 5-fluorouracil pre-treated rats on ischemic stroke. **Behavioural Brain Research**, 2015.

LIANG, D. et al. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. **Neurosurgery Focus.**, v. 22, n. 5, 2009.

LIU, Z. et al. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 30, p. 1288–1295, 2010.

LIU, Z. et al. Axonal remodeling of the Corticospinal tract in the spinal cord contributes to voluntary motor recovery after stroke in adult mice. **Stroke**, v. 44, n. 7, p. 1951–1956, 2013.

LUKE, L. M.; ALLRED, R. P.; JONES, T. A. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage induces contralesional synaptogenesis and enhances skilled reaching with the ipsilateral forelimb in adult male rats. **Synapse**, v. 54, n. 4, p. 187–199, 2004.

MA, D. K. et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. **Cell Research**, v. 19, n. 6, p. 672–682, 2009.

MENDEZ-OTERO, R. et al. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. **Regenerative medicine**, v. 2, n. 4, p. 417–23, 2007.

MEZEY, E. Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1779–1782, 1 dez. 2000.

MICHELUCCI, A. et al. The Neurogenic Potential of Astrocytes Is Regulated by Inflammatory Signals. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 3724–3739, 2016.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181–98, 29 jul. 2010.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. e38-60, 2016.

MURPHY, T. H.; CORBETT, D. Plasticity During Stroke Recovery: From Synapse to Behaviour. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 12, p. 861–872, 2009.

NAPIERALSKI, J. A.; BANKS, R. J.; CHESSELET, M. F. Motor and somatosensory deficits following uni- and bilateral lesions of the cortex induced by aspiration or thermocoagulation in the adult rat. **Experimental neurology**, v. 154, n. 1, p. 80–8, nov. 1998.

NAVARRO-SOBRINO, M. et al. A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 1, p. 205–211, 1 maio 2011.

NELSON, T. J.; ALKON, D. L. Molecular regulation of synaptogenesis during associative learning and memory. **Brain Research**, 2014.

NEUMANN, F. R.; NURSE, P. Nuclear size control in fission yeast. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 4, p. 593–600, 2007.

NUDO, R. J. Postinfarct cortical plasticity and behavioral recovery. **Stroke**, v. 38, n. 2 PART 2, p. 840–845, 2007.

OKUDELA, K. An association between nuclear morphology and immunohistochemical expression of p53 and p16INK4A in lung cancer cells. **Medical Molecular Morphology**, v. 47, n. 3, p. 130–136, 2013.

PAPALE, A. E.; HOOKS, B. M. Circuit changes in motor cortex during motor skill learning. **Neuroscience**, v. 368, p. 283–297, 2018.

PEKNA, M.; PEKNY, M.; NILSSON, M. Modulation of neural plasticity as a basis for stroke rehabilitation. **Stroke**, v. 43, n. 10, p. 2819–2828, 2012.

PLUCHINO, S. et al. Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. **Brain**, v. 131, n. 10, p. 2564–2578, 1 out. 2008.

RINNE, J. O.; PALJÄRVI, L.; RINNE, U. K. Neuronal size and density in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 79, n. 1–2, p. 67–76, 1987.

ROTH, J. M. Recombinant Tissue Plasminogen Activator for the Treatment of Acute Ischemic Stroke. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 24, n. 3, p. 257–259, 11 jul. 2011.

SANDVIG, I. et al. **Neuroplasticity in stroke recovery. The role of microglia in engaging and modifying synapses and networks** *European Journal of Neuroscience* Wiley/Blackwell (10.1111), , 1 jun. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/ejn.13959>>. Acesso em: 6 dez. 2018

SASAKI, Y.; MIYOSHI, D.; SUGIMOTO, N. Effect of molecular crowding on DNA polymerase activity. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 4, p. 440–446, 2006.

SATO, S.; BURGESS, S. B.; MCILWAIN, D. L. Transcription and motoneuron size. **Journal of neurochemistry**, v. 63, n. 5, p. 1609–15, 1994.

SCHMIDT, E. E.; SCHIBLER, U. Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. **The Journal of Cell Biology**, v. 128, n. 4, p. 467–483, 1995.

SHUMAKER, D. K. et al. Functions and dysfunctions of the nuclear lamin Ig-fold domain in nuclear assembly, growth, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15494–15499, 2005.

SIGL-GLÖCKNER, J.; BRECHT, M. Polyploidy and the Cellular and Areal Diversity of Rat Cortical Layer 5 Pyramidal Neurons. **Cell Reports**, v. 20, n. 11, p. 2575–2583, 2017.

SONG, C.-G. et al. Stem cells: a promising candidate to treat neurological disorders. **Neural Regeneration Research**, v. 13, n. 7, p. 1294, 2018.

STEINDLER, D. A.; LAYWELL, E. D. Astrocytes as stem cells: Nomenclature, phenotype, and translation. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 62–69, 2003.

SUN, G. J. et al. Latent tri-lineage potential of adult hippocampal neural stem cells revealed by Nf1 inactivation. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 12, p. 1722–1724, 2015.

SZELE, F. G.; ALEXANDER, C. Expression of Molecules Striatum after Aspiration Cerebral Cortex in Adult Associated with Neuronal Plasticity in the and Thermocoagulatory Lesions of the Rats. **Animals**, n. June, 1995.

TIKU, V. et al. Small nucleoli are a cellular hallmark of longevity. **Nature**

Communications, v. 8, n. May, 2016.

TITUS, L. C. et al. Members of the RSC Chromatin-Remodeling Complex Are Required for Maintaining Proper Nuclear Envelope Structure and Pore Complex Localization. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 1546–1555, 2010.

TOBIN, M. K. et al. Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: What is known and where we go from here. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 34, n. 10, p. 1573–1584, 2014.

TSAI, M.-J. et al. Recovery of neurological function of ischemic stroke by application of conditioned medium of bone marrow mesenchymal stem cells derived from normal and cerebral ischemia rats. **Journal of biomedical science**, v. 21, p. 5, 2014.

URYU, K.; MACKENZIE, L.; CHESSELET, M.-F. Ultrastructural evidence for differential axonal sprouting in the striatum after thermocoagulatory and aspiration lesions of the cerebral cortex in adult rats. **Neuroscience**, v. 105, n. 2, p. 307–316, jul. 2001.

UZDENSKY, A. et al. **Protein Profile and Morphological Alterations in Penumbra after Focal Photothrombotic Infarction in the Rat Cerebral Cortex** **Molecular Neurobiology**, 21 ago. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-016-9964-5>>. Acesso em: 6 dez. 2018

VOORHIES, A. C.; JONES, T. A. The behavioral and dendritic growth effects of focal sensorimotor cortical damage depend on the method of lesion induction. **Behavioural Brain Research**, v. 133, n. 2, p. 237–246, jul. 2002.

WAGERS, A J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639–648, 2004.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1–2, p. 53–68, 2007.

WANG, X. et al. **The evolving role of neuro-immune interaction in brain repair after cerebral ischemic stroke** **CNS Neuroscience and Therapeutics**, dez. 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/cns.13077>>. Acesso em: 6 dez. 2018

WEBER, S. C.; BRANGWYNNE, C. P. Inverse size scaling of the nucleolus by a concentration-dependent phase transition. **Current Biology**, v. 25, n. 5, p. 641–646, 2015.

WEBSTER, M.; WITKIN, K. L.; COHEN-FIX, O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 10, p. 1477–1486, 2009.

WEGIEL, J. et al. Neuronal nucleus and cytoplasm volume deficit in children with autism and volume increase in adolescents and adults. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 3, n. 1, p. 1–17, 2015.

WEI, L. et al. **Stem cell transplantation therapy for multifaceted therapeutic benefits after stroke** **Progress in Neurobiology**, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603356/pdf/nihms863080.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018

WEILER, N. et al. Top-down laminar organization of the excitatory network in motor cortex. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 360–366, 2008.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **British Journal of Anaesthesia**, v. 99, n. 1, p. 4–9, 2007.

WIDEMAN, T. H.; ZAUTRA, A. J.; EDWARDS, R. R. Huntington's disease (HD): Degeneration of select nuclei and widespread occurrence of neuronal nuclear and axonal inclusions in the brainstem. **Brain Pathology**, v. 154, n. 11, p. 2262–2265,

2014.

WIELOCH, T.; NIKOLICH, K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury.

Current opinion in neurobiology, v. 16, n. 3, p. 258–64, jul. 2006.

XING, C. et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. 2012.

YAMAMOTO, N. et al. Cellular dynamics visualized in live cells in vitro and in vivo by differential dual-color nuclear-cytoplasmic fluorescent-protein expression.

Cancer Research, v. 64, n. 12, p. 4251–4256, 2004.

YAMAWAKI, N. et al. A genuine layer 4 in motor cortex with prototypical synaptic circuit connectivity. **eLife**, v. 3, p. e05422, 2014.

YOUNG, S. G. et al. Deficiencies in lamin B1 and lamin B2 cause neurodevelopmental defects and distinct nuclear shape abnormalities in neurons.

Molecular Biology of the Cell, v. 22, n. 23, p. 4683–4693, 2011.

YU, Y. et al. Defining Core and Penumbra in Ischemic Stroke: A Voxel- and Volume-Based Analysis of Whole Brain CT Perfusion. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2016.

ZAVERUCHA-DO-VALLE, C. et al. Sustained effect of bone marrow mononuclear cell therapy in axonal regeneration in a model of optic nerve crush. **Brain Research**, v. 1587, n. 1, p. 54–68, 2014.

ZEIMET, A. G. et al. DNA ploidy, nuclear size, proliferation index and DNA-hypomethylation in ovarian cancer. **Gynecology Oncology**, v. 121, n. 1, p. 24–31, 2011.

ZHANG, J.; CHOPP, M. Cell-based therapy for ischemic stroke. **Expert opinion on biological therapy**, v. 13, n. 9, p. 1229–40, set. 2013.

ZHANG, R.; ZHANG, Z.; CHOPP, M. Neurogenesis in the Adult Ischemic Brain : Generation , Migration , Survival , and. **The Neuroscientist**, v. 11, p. 408, 2005.