

ANÁLISE PROTEÔMICA DA REGIÃO PERILESIONAL APÓS O
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM DOIS MODELOS DE LESÃO FOCAL CORTICAL

VIVIANE GOMES DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2017

ANÁLISE PROTEÔMICA DA REGIÃO PERILESIONAL APÓS O
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM DOIS MODELOS DE LESÃO FOCAL CORTICAL

VIVIANE GOMES DA SILVA

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

Orientador: Dr. Arthur Giraldi Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2017

ANÁLISE PROTEÔMICA DA REGIÃO PERILESIONAL APÓS O
TRATAMENTO COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM DOIS MODELOS DE LESÃO FOCAL CORTICAL

VIVIANE GOMES DA SILVA

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

Aprovada em: 06 / 04 / 2017

Banca Examinadora:



Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (Dr. em Biotecnologia e Biociências) –
UENF/CBB/LBT



Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciências) – UENF/CBB/LBCT



Prof. Wagner Baetas da Cruz (Dr. em Biologia Celular e Molecular) - UFRJ



Prof. Arthur Giraldi Guimarães (Dr. em Ciências Biológicas - Biofísica) -
UENF/CBB/LBCT(Orientador)

Dedico aos meus pais e
ao meu marido...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e além de tudo não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais Sidinei e Sueli e ao meu irmão Rafael, pelo apoio incondicional nesses 10 anos da minha formação acadêmica. Obrigada por serem exemplo de pais e seres humanos maravilhosos e por todo amor e confiança em mim. Sem vocês eu não teria chegado onde cheguei. Amo vocês!

Ao Renato, que como meu namorado, noivo ou marido sempre foi um dos meus maiores incentivadores e companheiro fiel nessa jornada nem sempre fácil. Obrigada por ser calma na tempestade, por ser a pessoa maravilhosa que é e por todo apoio que sempre me deu. Que essa seja somente mais uma das muitas conquistas juntos! Te amo!

Às queridas madrinhas e amigas Brunna e Pâmela por serem e estarem presente nos momentos de extrema alegria e/ou de tristeza e dificuldades. Obrigada pelas palavras amigas em momentos necessários, e por compartilharem comigo uma das melhores fases das nossas vidas. Estarão pra sempre no meu coração.

Aos amigos do laboratório pelos momentos compartilhados e pela harmonia no laboratório.

À Elisa por ser antes de co-orientada uma grande amiga e irmãzinha com que a vida se encarregou de me presentear. Te agradeço pela ajuda nos experimentos, pelas fugidas para o shopping e livraria, pelos açaís, almoços no bandeirão e principalmente pela presença na minha vida.

À Gisela, pela amizade que pudemos construir e que ao longo desses anos só se fortaleceu. Muito obrigada por toda ajuda nos experimentos, por dividir comigo momentos de estresse e nervosismo principalmente nessa nossa reta

final de mestrado e doutorado, pelos momentos felizes marcados por crises de riso no laboratório e também fora dele. Obrigada por tudo. Vou levar você pra sempre no coração.

Ao Professor Arthur por ter me acolhido por quase 10 anos no laboratório e por fazer parte de toda a minha vida acadêmica me capacitando para ser uma boa profissional. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e experiência comigo.

Ao Professor Vanildo por ser colaborador desse trabalho, por ceder seu espaço e tempo para que todos os experimentos fossem realizados e minhas dúvidas fossem sanadas. Obrigada por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço ainda ao Lucas pela ajuda com todo experimento do massas. Muito obrigada pelos momentos divertidos no laboratório, pela paciência em me ensinar e por tudo que fez por mim.

Aos professores Gonçalo Apolinário, Renato DaMatta e Wagner Baetas, membros da banca, por terem aceitado fazer parte da finalização desse trabalho e contribuído para melhoria do mesmo.

Agradeço à FAPERJ pelo fomento para a realização desse trabalho.

Agradeço também à UENF pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	xi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- O Controle Motor.....	1
1.2- Lesões no Sistema Nervoso Central.....	5
1.3- Ablação e isquemia: uma comparação da plasticidade neural em modelos animais de lesões no Sistema Nervoso Central.....	14
1.4- Terapia Celular	17
1.5- As Terapias Celulares e os efeitos neurorestaurativos pós-lesões	19
1.6- A espectrometria de massas como abordagem para o descobrimento de biomarcadores proteicos a serem alvo de terapias	21
2- OBJETIVOS	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1- Modelo Animal.....	24
3.2- Procedimentos Cirúrgicos.....	24
3.3- Ablação focal unilateral por sucção	24
3.4- Isquemia focal unilateral por termocoagulação	25
3.5- Obtenção das CMMOs	27
3.6- Administração sistêmica das CMMOs	27
3.7- Extração e quantificação de proteínas.....	28
3.8- Digestão de proteínas.....	29
3.9- Análises por espectrometria de massas	29
3.10- Bioinformática.....	30
4- RESULTADOS.....	32
5- DISCUSSÃO	50
6- CONCLUSÃO	54
7- MATERIAL SUPLEMENTAR	55
8-REFERÊNCIAS.....	72

RESUMO

O uso de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) para o tratamento de doenças que atingem o Sistema Nervoso Central (SNC) tem sido sugerido como uma das abordagens terapêuticas mais promissora. Vários resultados anteriores mostraram neuroproteção pós-lesão, recuperação tecidual e neurológica após administração sistêmica destas células. Alguns mecanismos celulares e moleculares têm sido propostos para explicar os efeitos terapêuticos dessas células, mas ainda estão longe de serem completamente elucidados. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do tratamento com as CMMOs nos modelos de ablação e isquemia focais corticais na expressão diferencial de proteínas relacionadas com neuroplasticidade e com resposta imune/inflamatória e ao estresse oxidativo. A análise proteômica foi realizada para identificação de proteínas diferencialmente expressas na região cortical perilesional sensorio-motora de cérebros 7 dias após terem sido submetidos à isquemia ou ablação focal cortical unilateral. Os animais lesionados foram tratados intravenosamente com células mononucleares de medula óssea ($3,0 \times 10^7$ células) em 500 μ L de solução salina 0,9% ou PBS 24h após a indução da lesão. Animais normais foram usados como padrão normal de expressão de proteínas. Os cérebros foram dissecados e o córtex medial perilesional foi removido para extração de proteínas. A espectrometria de massas foi utilizada para análise quantitativa e qualitativa entre as seguintes comparações: isquêmico-mononuclear x isquêmico-controle, ablação-mononuclear x ablação-controle, isquêmico-controle x ablação-controle, isquêmico-controle x normal e ablação-controle x normal. Foram identificadas um total de 2268 proteínas. Quanto ao efeito do tratamento, a comparação entre os grupos isquêmicos mostrou 56 proteínas com expressão aumentada no grupo tratado com as células, e 127 proteínas apresentaram diminuição da expressão. Nos grupos ablados, 86 proteínas foram reguladas positivamente e 83 foram reguladas negativamente. Quanto à comparação entre os dois tipos de lesão cortical, 293 proteínas apresentaram aumento da expressão no grupo isquêmico em relação ao grupo ablado, e 240 proteínas apresentaram diminuição da expressão. Nossos resultados mostraram um grande número de proteínas diferencialmente expressas como efeito do tratamento em ambos os modelos de lesão cortical e sugerem que as vias funcionais que são afetadas por cada tipo de lesão, bem como os mecanismos moleculares envolvidos na promoção de recuperação tecidual e neurológica pelo tratamento com as células mononucleares são bastante diferentes entre lesão isquêmica e lesão por ablação, mesmo que sejam feitas na mesma região e atingindo a mesma extensão.

Palavras-chave: Isquemia; Ablação; Córtex Cerebral; Terapia Celular; Proteômica; Neuroplasticidade

ABSTRACT

The use of bone marrow mononuclear cells to treat stroke has been suggested as one of the most promising therapeutic approaches. Several previous results have shown post-stroke neuroprotection, tissue rescue, and neurological recovery following systemic administration of these cells. Some cellular and molecular mechanisms have been proposed to explain the therapeutic effects of these cells, but they are still far from being completely elucidated. Thereby, the purpose of this study was to verify the effect of the treatment with the CMMOs in the models of focal cortical ablation and ischemia in the differential expression of proteins related with neuroplasticity, immune/inflammatory response and oxidative stress. Proteomic analysis was performed to identify differentially expressed proteins in the perilesional cortical region of brains seven days after the induction of unilateral cortical focal ischemia or ablation, both in the sensorimotor cortical area. Lesioned animals were intravenously treated with bone marrow mononuclear cells or vehicle 24h after lesion induction. Naive animals were used as the normal pattern of proteins expression. The brains were dissected and the perilesional medial cortex was removed for protein extraction. Mass spectrometry was used for quantitative and qualitative analysis

, between the following comparisons: ischemic-mononuclear x ischemic-control, ablation-mononuclear x ablation-control, ischemic-control x ablation-control, ischemic-control x normal, and ablation-control x normal. A total of 2268 proteins were identified. Regarding the effect of the treatment, the comparison among the ischemic groups showed 56 proteins with increased expression in the group treated with the cells, and 127 proteins had decreased expression. In the ablated groups, 86 proteins were increased and 83 were decreased. Regarding the comparison among the two types of cortical lesion, 293 proteins had increased expression in the ischemic group in relation to the ablated group, and 240 proteins had decreased expression. The gene expression of some markers of neuroplasticity that were found in the list of differentially expressed proteins was evaluated by quantitative real time PCR. Our results showed a large number of differentially expressed proteins as an effect of the treatment in both models of cortical lesion. It suggests that the functional pathways that are affected by each type of lesion, as well as the molecular mechanisms involved in the promotion of tissue and neurological recovery by the treatment with the mononuclear cells are quite different among ischemic lesion and loss of tissue by ablation, even if they are made with the same extension and in the same region.

Key Words: Ischemia; Ablation; Cerebral Cortex; Cell Therapy; Proteomics; Neuroplasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA** – do inglês α -amino-3-hidroxido-5-metil-4-isoxazol propionato
- AMS**- área motora suplementar
- APM**- área pré-motora
- AVC**- Acidente Vascular Cerebral
- BDA**- do inglês *biotinylated dextran amine*
- BHE**- barreira hematoencefálica
- CEUA – UENF**- Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense
- CMMOs**- Células Mononucleares de Medula Óssea
- CTH**- célula-tronco hematopoiética
- CTM**- célula tronco mesenquimal
- DMEM-F12**- DMEM: Dulbecco's modified eagle medium e Mistura de Nutrientes de Ham F12
- Fr**- isocórtex frontal
- GAP-43**- do inglês growth associated protein-43
- i.p**- Intraperitoneal
- MMP**- Metaloprotease de Matriz Extracelular
- NaCl**- Cloreto de Sódio
- NMDA**- N-metil-D-aspartato)
- PBS**- Solução Salina Tamponada por Fosfato
- RNS**- espécies reativas de nitrogênio
- ROS**- espécies reativas de oxigênio
- SIDA**- síndrome da imunodeficiência adquirida
- SNC**- Sistema Nervoso Central
- VEGF**- do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama esquemático simplificado das conexões dos gânglios da base.	2
Figura 2. Divisão do Córtex Motor em humanos.	3
Figura 3. Figura esquemática mostrando áreas que compõem o córtex de roedores.	4
Figura 4. Esquema representativo da localização do córtex sensorimotor em roedores. (Modificada de Hall e Lindholm, 1974)	5
Figura 5. Eventos moleculares no tecido afetado por hipóxia.	13
Figura 6. Experimento que utilizou injeção do traçador aterógrado Dextrana Amina Biotinilada (BDA) para evidenciar brotamento axonal em dois modelos de lesão: isquemia e ablação.	16
Figura 7. Desenho representativo da área em que será realizada a lesão.	25
Figura 8. Análise da extensão das lesões por ablação e isquemia em cortes coronais rostro-caudais.	26
Figura 9. Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato mostrando a região que foi dissecada para análise por espectrometria de massas.	28
Figura 10. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas diferencialmente abundantes na comparação entre grupos tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical.	33
Figura 11. Rede funcional das proteínas diferencialmente abundantes em comparação entre grupo isquêmico tratado vs. grupo isquêmico controle.	35
Figura 12. Rede funcional das proteínas diferencialmente abundantes em comparação entre grupo ablação tratado vs. grupo ablação controle.	37
Tabela 1. Lista das proteínas diferencialmente abundantes, na comparação entre tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical, com alguma função neuronal/ axonal /sináptica descrita e potencialmente envolvidas em algum mecanismo de neuroplasticidade.	39
Tabela 2. Lista das proteínas diferencialmente abundantes, na comparação entre tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical, com alguma função geral na resposta imune/ inflamatória e/ou resposta ao estresse oxidativo.	43
Tabela 3. Análises Go term de proteínas diferencialmente abundantes que apresentaram efeitos opostos no tratamento em cada tipo de lesão.	48
Tabela S1. Lista das proteínas reguladas positivamente observadas na comparação Isq (M) vs. (C).	55
Tabela S2. Lista de proteínas reguladas negativamente observadas na comparação Isq (M) vs. (C).	60
Tabela S3. Lista de proteínas reguladas positivamente observadas na comparação Abl (M) vs. (C).	65
Tabela S4. Lista de proteínas negativamente reguladas observadas na comparação Abl (M) vs. (C).	68

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Controle Motor

O sistema motor é um sistema altamente dinâmico e influenciado por fatores externos e internos que modulam a percepção sensorial, atenção e comportamento motor. Nele, as populações neuronais interagem entre si através de mecanismos excitatórios e inibitórios. O sistema motor é composto por um conjunto de três unidades: unidade de comando, unidade de controle e de ordenação. (Kandel et al., 2003).

Constituída pelos núcleos da base e cerebelo, a função da unidade de controle é supervisionar a idealização, planejamento e controle dos movimentos desempenhados pelo córtex. Esse sistema de controle de movimento se dá através de uma alça de retroalimentação que leva a informação sobre o movimento pretendido até as estruturas de controle que irão corrigir, adequar e aperfeiçoar, reenviando essas informações para as estruturas corticais (Handley et al., 2009).

Um modelo simplificado da circuitaria dos núcleos da base pode ser vista na figura 1. Por ela, podemos observar mais facilmente como se dá os mecanismos que levam ao início do movimento. Primeiramente, o córtex envia estímulos excitatórios para o corpo estriado; o estriado por sua vez manda estímulos inibitórios para o globo pálido que inibe a tálamo. O efeito líquido da atividade cortical é provocar o estriado para liberar o tálamo de inibição do globo pálido, permitindo assim que o tálamo excite o córtex. Essas vias diretas são moduladas também por outras alças a partir da substância negra (dopaminérgicas) e núcleo subtalâmico. Em repouso, os neurônios do estriado são quiescentes e os do globo pálido são ativos, inibindo assim, a excitação do tálamo do córtex motor. Antes e durante o movimento, o corpo estriado torna-se ativo e inibe o globo pálido, permitindo maior excitação dos núcleos talâmicos e córtex motor (Barr e Williams, 2005).

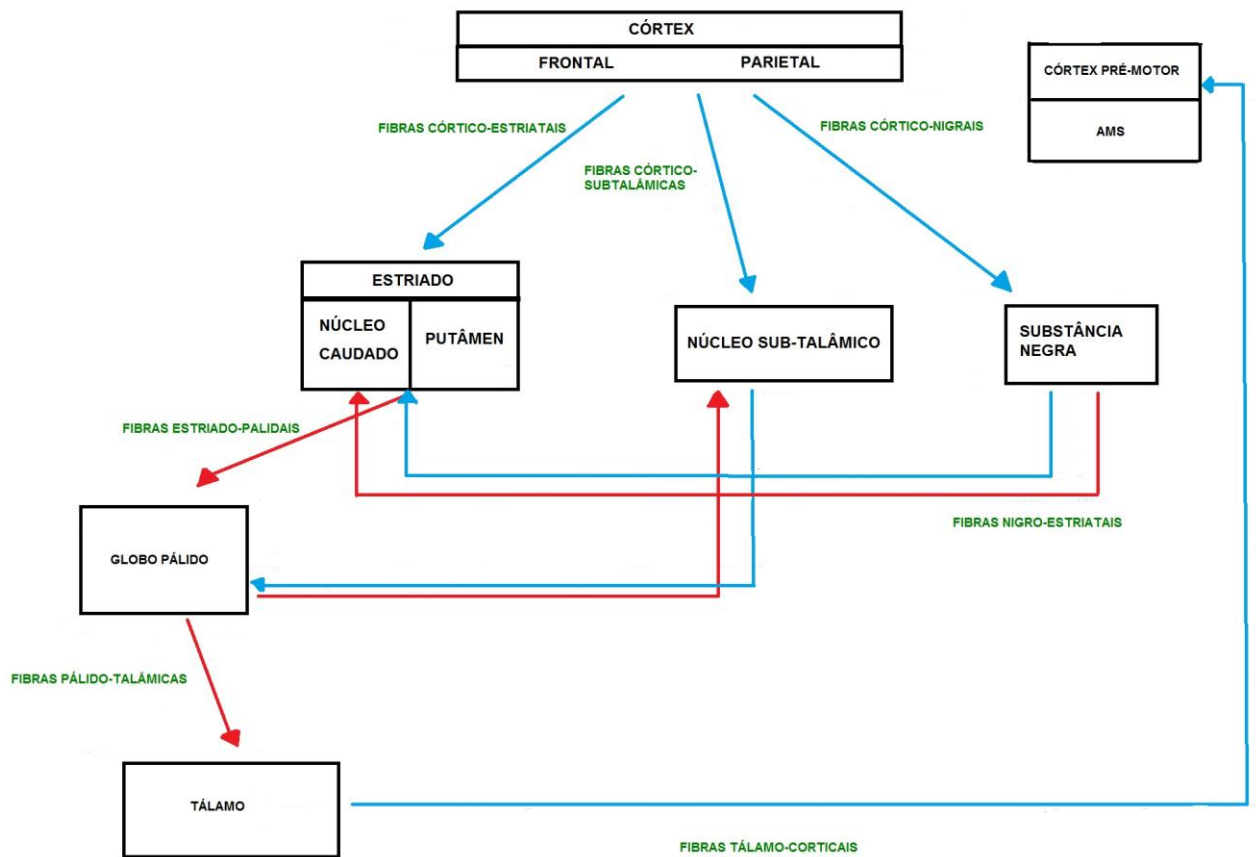


Figura 1. Diagrama esquemático simplificado das conexões dos gânglios da base. As vias excitatórias são representadas em azul e inibitórias em vermelho AMS: área motora suplementar. Adaptado de (Handley et al., 2009).

Os sinais partem do córtex e são transmitidos por meio do estriado, globo pálido e tálamo de volta ao córtex (Handley et al., 2009). O cerebelo, por sua vez, possui uma grande densidade de aferências as quais provêm informações sobre sensibilidade somestésica, vestibular, visual e auditivas, além de aferências de origem cortical (Proske e Gandevia, 2009). A partir do córtex, o cerebelo recebe então as informações sensorio-motoras por meio do trato cortico-pontino-cerebelar. A resposta de correção de movimento parte então dos núcleos cerebelares profundos para o núcleo centro-lateral do tálamo e deste retorna ao córtex (Horne e Butler, 1995). A informação é então transmitida, após adequação e correção do movimento, para a unidade de ordenação, que é constituída por motoneurônios da medula e tronco encefálico que controlam a excitabilidade muscular por meio de potenciais de ação transmitidos pelos pares de nervos cranianos e espinais (Kandel et al., 2003).

O córtex motor em humanos é dividido em córtex motor primário (M1), córtex motor secundário incluindo o córtex parietal posterior, córtex suplementar ou área motora suplementar (AMS) e córtex pré-motor ou área pré-motora (APM) (Figura 2). Da área M1, que possui o menor limiar de estimulação para a produção de movimentos e projeta densos feixes axonais pelas vias descendentes, partem os comandos para a realização de movimentos voluntários responsáveis pelo início da locomoção e dos movimentos de integração sensorimotora. Já as áreas AMS e APM são mais associadas ao planejamento de movimentos voluntários do que ao comando de sua execução (Lent, 2005).

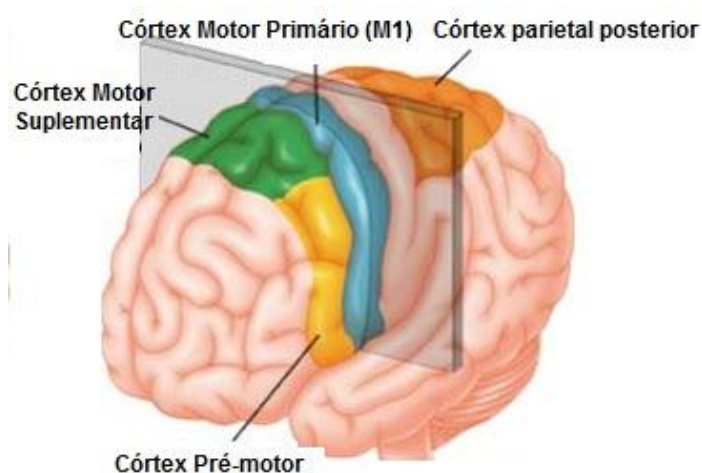


Figura 2. Divisão do Córtex Motor em humanos. Localização das quatro principais partes do córtex motor. Córtex Pré-motor em amarelo, Córtex motor primário representado pela cor azul, Córtex Parietal Posterior na região laranja e na verde o Córtex Motor Suplementar (Imagem fonte: www.lookfordiagnosis.com).

No caso de roedores, o córtex sensorimotor é denominado isocórtex frontal (Fr), uma estrutura que apresenta grande heterogeneidade celular, podendo ser dividida de acordo as suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexões em três áreas: Fr1 (M1), Fr2 (M2) e Fr3 (Figura 3). A área Fr1 corresponde ao córtex motor primário de primatas, a área Fr2 corresponde a APM e AMS, enquanto Fr3 seria uma sub-região da representação somatotópica (Palomero-Gallagher e Zilles, 2004; Paxinos e Watson, 2004).

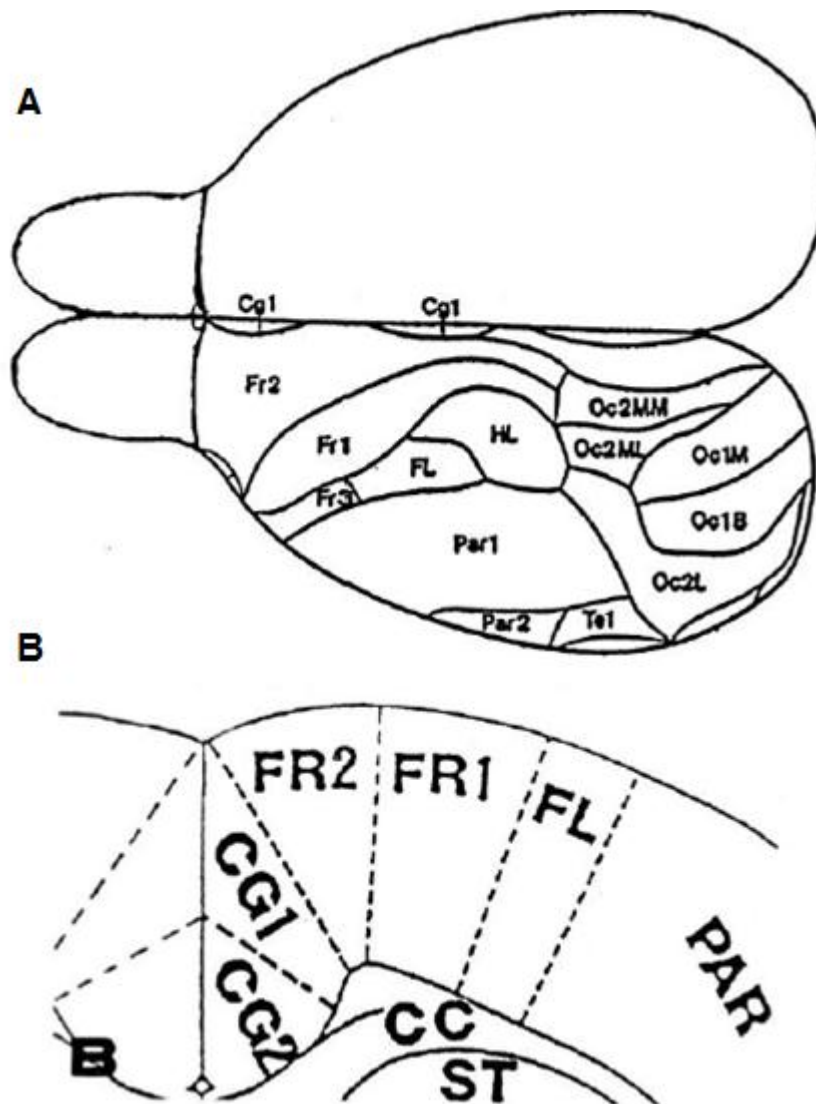


Figura 3. Figura esquemática mostrando áreas que compõem o córtex de roedores. (A) Representação esquemática de uma vista dorsal do mapa neocortical do cérebro de rato com base em estudos citoarquitetônicos. Cg1, córtex cingulado; Fr1-3, áreas corticais frontais; Oc1B, Oc1M, Oc2L, Oc2MM e Oc2ML, áreas corticais occipitais; Par1-2, FL, HL, áreas corticais parietais. (B) Diagrama esquemático de um corte coronal do córtex cerebral de ratos. CC, corpo caloso; CG1, área 1 do córtex cingulado; CG2, área 2 do córtex cingulado; FL, área dos membros anteriores; FR1, área 1 do córtex frontal;

FR2, área 2 do córtex frontal; PAR, córtex parietal; ST, corpo estriado. Extraído e modificado de McNeill et al. (1999).

Podemos observar através de uma representação do córtex sensorimotor de roedores (figura 4) que o córtex sensorimotor desses animais é composto por uma sobreposição de regiões motoras (MI) e somestésicas (SI).

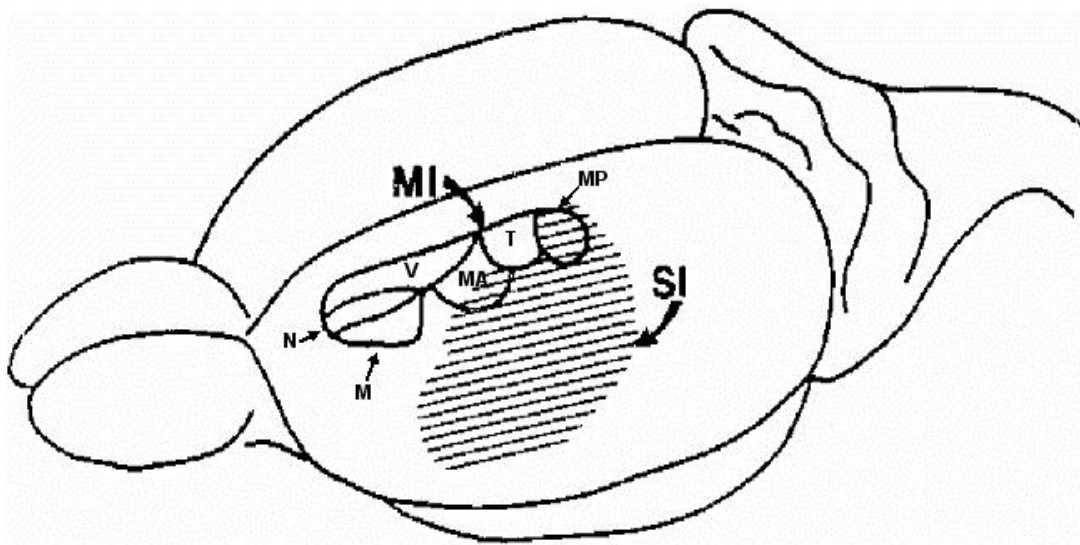


Figura 4. Esquema representativo da localização do córtex sensorimotor em roedores. (Modificada de Hall e Lindholm, 1974)

Frequentemente, lesões encefálicas atingem o córtex motor ou o trato cortico-espinhal, afetando a capacidade de gerar e coordenar movimentos (Duff, 2005). Assim, o indivíduo afetado poderá apresentar paralisia no lado oposto à lesão (contralateral). Em alguns casos, uma recuperação de movimentos após uma lesão é observada ao longo do tempo (Murphy *et al.*, 2009).

1.2- Lesões no Sistema Nervoso Central

As lesões que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) estão entre as principais causas de incapacitação e óbito tanto no Brasil quanto no mundo (Ministério da Saúde, 2011; Organização Mundial da Saúde, 2014).

Embora o encéfalo seja protegido pelo crânio e pelo fluido cérebro espinal e isolado de uma variedade de moléculas hidrofílicas como patógenos e toxinas de alto peso molecular, pela barreira hematoencefálica, este órgão é extremamente suscetível a lesões tanto de forma natural quanto induzidas (Parent e Carpenter, 1995).

Independente da etiologia da lesão encefálica, poucos minutos após o início desta é disparada uma cascata de eventos, 'cascata isquêmica', que culmina em uma via comum final resultando em lesão neuronal isquêmica (Harukuni e Bhardwaj, 2006). A isquemia (do grego *ισχαιμία*; *isch-* restrição, *hema* sangue) se caracteriza como uma condição onde as reservas energéticas estão esgotadas, ou seja, há falta de glicose e de oxigenação nos tecidos (hipóxia).

A lesão pode ser dividida em duas fases: a primária e a secundária. Estas diferem entre si de acordo com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos (Mustafa e Al-Shboul, 2013). A injúria primária é caracterizada por representar danos mecânicos focais e difusos ocasionados no cérebro pela lesão propriamente dita que poderá levar à ruptura de vasos sanguíneos e axônios (Smith-Seemiller et al., 1997). Uma vez que a maior parte dos danos cerebrais não ocorre ao mesmo tempo em que a injúria primária acontece e não resulta diretamente do insulto primário, a deterioração progressiva nas funções cerebrais seguidas do insulto primário resulta principalmente de danos secundários: uma cascata de danos neurais progressivos e morte celular neural que é dirigida pela lesão inicial. Estes danos secundários geralmente ocorrem tanto no sítio da lesão quanto em outras regiões encefálicas distantes deste e possivelmente continua por horas até meses. É a grande responsável pela morte e perda neuronal no tecido afetado e é composta pelos seguintes mecanismos (Chen, 2012; Park et al., 2008): edema cerebral, inflamação, excitotoxicidade, estresse oxidativo e nitrossativo, rompimento da barreira hematoencefálica e finalmente pela morte celular.

Edema cerebral

Condição caracterizada por um acúmulo excessivo de água nos espaços intra ou extracelulares do cérebro que eleva a pressão intracraniana e pode ser

gerado por uma diversidade de lesões cerebrais (Unterberg et al., 2004). Pode ser um indicador para injúria neural progressiva e morte celular neuronal.

Existem dois tipos de edemas cerebrais: o edema vasogênico e o edema citotóxico. O edema vasogênico é causado principalmente pela quebra da barreira hematoencefálica que permite que proteínas intravasculares e água entrem e se acumulem no espaço parenquimal extracelular. É geralmente observado em injúrias cerebrais agudas como trauma, Acidente Vascular Cerebral (AVC), envenenamento químico e infecções por micro-organismos patogênicos (Bothe et al., 1984). Já no edema cerebral citotóxico há acúmulo de água ocasionado pela disfunção nas bombas de sódio e potássio na membrana das células neurais e pode ser causado por toxinas, resposta imune a infecções por micro-organismos, uso de drogas e doenças neurodegenerativas (Agrawal e Fehlings, 1996).

Inflamação

A inflamação é uma resposta imunológica do organismo, mediada por componentes moleculares e celulares, que o protege contra infecção ou lesão e inicia o processo de cicatrização de tecidos. Pode apresentar propriedades pró e anti-inflamatórias e seus efeitos podem ser benéficos ou nocivos ao organismo (Emsley e Tyrrel, 2002; Trowbridge e Emling et al., 1996).

Quando o cérebro é lesionado pela injúria inicial e conseqüentemente acontece a hipóxia por falta de suprimento sanguíneo, ocorre o recrutamento de leucócitos, sua ativação e adesão ao endotélio da microvasculatura cerebral obstruindo-a (del Zoppo et al., 1991). Tem-se então a transmigração de neutrófilos e monócitos/ macrófagos para a região lesionada (Garcia et al., 1994) que torna-se possível devido ao envolvimento de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) que permite a interação destas células de defesa com o endotélio vascular (Jin et al., 2010a; Brouns e Deyn, 2009).

A ativação leucocitária induz a expressão e liberação de alguns mediadores inflamatórios como citocinas, eicosanóides e moléculas do sistema complemento estimulando o início da complexa sinalização que regula a resposta inflamatória tardia (Allan e Rothwell, 2001).

Além disso, quando o cérebro é lesionado pelo insulto primário ocorre a ativação de células da microglia e essas começam a produzir e secretar uma série de citocinas pró inflamatórias como interleucina IL-1 β , interferon e fatores necróticos tumorais (TNF- α) que fazem a reação neuroinflamatória se tornar exacerbada na região afetada pela lesão resultando em destruição neuronal progressiva (Frank et al., 2012; Wagner et al., 1998).

Excitotoxicidade

É um mecanismo neurodegenerativo extremamente importante para o desenvolvimento de lesões secundárias que envolve a liberação de aminoácidos excitatórios como dopamina, glutamato, serotonina e acetilcolina em regiões sinápticas e extra-sinápticas (espaço intersticial), a ponto de agir como neurotoxinas que podem, potencialmente, contribuir para a morte celular neuronal por apoptose e necrose através de estimulação ou inibição de receptores de membrana (Lynch e Dawson, 1994; Maas et al., 2008; Mehta et al., 2013 e Zipfel et al., 2000).

O principal neurotransmissor excitatório envolvido no processo de excitotoxicidade é o glutamato, uma vez que ele é o mais abundante e mais rapidamente liberado no cérebro após uma lesão (Faden et al., 1989) e por esse motivo será o neurotransmissor citado nos eventos que levam a excitotoxicidade.

Quando ocorre um dano ou lesão no tecido encefálico e conseqüentemente uma deficiência energética, há a inibição da recaptura do neurotransmissor glutamato pelos receptores pré-sinápticos da fenda sináptica e também da atuação dos astrócitos na absorção fisiológica deste no parênquima tecidual (Hazell, 2007; Harukuni e Bhardwaj, 2006). Esse acúmulo de glutamato estimula os receptores glutaminérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato), Cainato e AMPA (α -amino-3-hidroxido-5-metil-4-isoxazol propionato) (Doyle et al., 2008; Bear et al. 2002) e acaba por levar a despolarização persistente de células neuronais acompanhada por influxos iônicos (principalmente de Cálcio, no caso do receptor NMDA) que acabam por

perturbar o balanço iônico através das membranas celulares neuronais (Faden et al., 1989).

A perda da homeostase do Cálcio desencadeada por mecanismos de excitotoxicidade vai levar a lesão axonal e culminará na morte celular neuronal através da sua contribuição para eventos como o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Deng et al., 2007 ; Greve e Zink, 2009) uma vez que as células danificadas começam a tentar restaurar seus gradientes iônicos normais aumentando a demanda metabólica do cérebro para produzir mais ATP para o funcionamento de ATPases responsáveis por restaurar a homeostase iônica. Porém, a geração de mais ATP pela célula fica impossibilitada devido ao reduzido fluxo sanguíneo cerebral e conseqüentemente menor oxigenação tecidual, falência metabólica, estresse oxidativo e progressivo comprometimento de função mitocondrial (Bullock et al., 1995; Park et al., 2008), e posterior danos celulares e morte neuronal (Ankarcrona et al., 1995).

Estresse Oxidativo e Nitrossativo

Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell, 1987).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluindo os radicais livres e compostos que podem gerar radicais livres, são produzidos por diversas vias de transdução de sinais após injúria cerebral e podem infligir danos aos tecidos vasculares cerebrais, principalmente, através da indução de peroxidação lipídica de membrana (Chan, 1996).

A peroxidação lipídica de membrana pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos que resultam da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados que compõem as membranas celulares culminando com a geração de radicais alquila ($L\bullet$), alcoxila ($LO\bullet$) e peroxila ($LOO\bullet$) (Barber e Bernheim, 1967; Change et al., 1979) que leva à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do

DNA, comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) e em uma condição mais extrema, à morte celular (Baber e Harris, 1994; Benzie, 1996 ; Vaca et al., 1988).

Rompimento da barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é composta por células endoteliais, astrócitos, pericitos, macrófagos perivasculares e pela lâmina basal (De Vries, 1997) e possui como função proteger a integridade do microambiente neuronal (Brouns e Deyn, 2009), mantendo a homeostase do Sistema Nervoso Central (SNC) (Rubin e Staddon, 1999; De Vries, 1997) separando o cérebro da circulação sanguínea sistêmica.

Sua existência foi descoberta através de estudos desenvolvidos por Ehrlich (1885) que descreveram que a BHE permaneceu sem marcação após a injeção de um corante vital na circulação arterial sistêmica de ratos. Porém, após a injeção direta de azul de tripano no sistema ventricular do cérebro, o tecido foi corado evidenciando a existência de uma espécie de barreira no local dos microvasos do cérebro (Goldmann, 1909).

Em uma condição de injúria ao tecido nervoso, os danos à BHE são aparentemente divididos em duas fases. A primeira tem início em cerca de 2 horas após o dano (Hamann et al., 1995) e caracteriza-se pela dissolução da lâmina endotelial basal seguida de aumento na permeabilidade da BHE (Belayev et al., 1996). A perda da BHE pode ser resultado do acúmulo de bradicinina (Kamiya et al., 1993; Aschner et al., 1997), fator de crescimento endotelial vascular (Abumiya et al., 1999), trombina (Okada et al., 1994), metaloproteases de matriz e outras proteases (Gidday et al., 2005; Heo et al., 2005; Rosell et al., 2008). O estresse oxidativo é um estímulo inicial para lesão na BHE e pode desencadear liberação de MMP-9 (Metaloprotease de Matriz Extracelular-9) pelos neurônios, glia e células endoteliais, resultando em danos na BHE através da digestão da lâmina basal endotelial (Heo et al., 1999; Gasche et al., 2001; Wagner et al., 2003). A segunda fase acontece após 24-72 horas do início da lesão (Kastrup et al., 1999; Lorberboym et al., 2003) e resulta em maiores danos teciduais através da infiltração de leucócitos e liberação de MMP-9 por neutrófilos que migraram para o tecido lesionado (Gidday et al.,

2005; Rossel et al., 2008). A quebra da BHE permite o extravazamento de proteínas de alto peso molecular no parênquima cerebral seguido de água, devido ao processo de osmose, e leva a formação de edema vasogênico. Por fim, há a transmigração de células inflamatórias através da BHE danificada promovendo uma resposta inflamatória (Del Zoppo e Hallenbeck, 2000).

Morte Celular

Morte celular é um processo biológico que é relevante para a histogênese normal, à cinética de estado estacionário de tecidos adultos saudáveis e para a patogênese de danos teciduais e doenças (Glücksman, 1951; Kerr, 1971; Kerr et al., 1995; Mergner et al., 1990).

A morte celular fisiológica normal ou morte celular programada acontece de forma contínua em populações celulares que sofrem proliferação lenta (como fígado e glândula adrenal) ou rápida (epitélio das criptas intestinais) (Wyllie et al., 1980), e ocorre como um evento normal na deleção de certos clones de linfócitos sequência de uma resposta imune (Shi et al., 1989). Além disso, a morte celular programada tem um papel importante no crescimento normal e na diferenciação de órgãos em vertebrados (Saunders, 1966) e invertebrados (Glücksman, 1951).

Em configurações fisiopatológicas, a supressão inadequada de morte celular pode resultar em câncer (Bursch et al., 1990; Kerr et al., 1972), e a incapacidade de controlar a extensão da morte celular pode ocorrer na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Shi et al., 1989) e em algumas doenças neurodegenerativas da infância, tais como atrofia muscular espinhal (Lefebvre et al., 1995; Roy et al., 1995). Outras formas de morte celular patológica resultam de hipóxia/isquemia, e injúrias tóxicas e térmicas (Dean, 1987; Farber et al., 1981; Wyllie et al., 1980).

A morte celular tem sido classificada em dois tipos distintos: apoptótica ou necrótica. Esses dois tipos diferem entre si nas suas características morfológicas e bioquímicas (Kerr, 1971; Kerr et al., 1972).

O processo de morte celular fisiológica é geralmente considerado como apoptótico e é considerado uma morte celular programada organizada,

mediada por mecanismos intrínsecos ativos. Entretanto, a modulação da apoptose ocorre de forma exógena (Gerschenson e Rotello, 1992). Esse tipo de morte celular é mais limpo, uma vez que após uma série de mudanças morfológicas, como condensação da cromatina e segmentação do núcleo, e bioquímicas, como a fragmentação do DNA, há a formação de corpos apoptóticos que serão reconhecidos e fagocitados, sem extravasamento de conteúdo intracelular e geração de um processo inflamatório subsequente (Johnson e Deckwert, 1993; Lee et al., 1999; Leist e Nicotera, 1998).

A morte celular patológica ou acidental é considerada necrótica, e resultante de uma perturbação ambiental abrupta (insultos extrínsecos) e um desvio de condições fisiológicas da célula. A necrose pode ser causada por comprometimento da homeostase iônica celular, que leva à dilatação do retículo endoplasmático, alterações mitocondriais, inchaço celular, ruptura da membrana plasmática e dissolução da célula (Johnson e Deckwert, 1993; Martin et al., 1998). Entretanto, ao contrário da apoptose, na necrose há liberação de glutamato e toxinas no ambiente, além de conteúdo intracelular, que afetará as células neuronais vizinhas. Ocorrerá então um processo inflamatório e paralelamente a isso muitas células serão induzidas à apoptose que permitirá que a morte destas na morram na presença de uma inflamação mínima ou pela liberação de material genético.

Neurônios e células glias podem apresentar características próprias de apoptose, e também exibir adicionalmente algumas das características morfológicas de necrose (Lee et al., 1999, Martin et al., 1998) em processos de isquemia/hipóxia.

Na figura 5 a seguir, pode-se observar a integração de todos os aspectos a respeito da fisiopatologia das lesões encefálicas citados anteriormente nesse tópico.

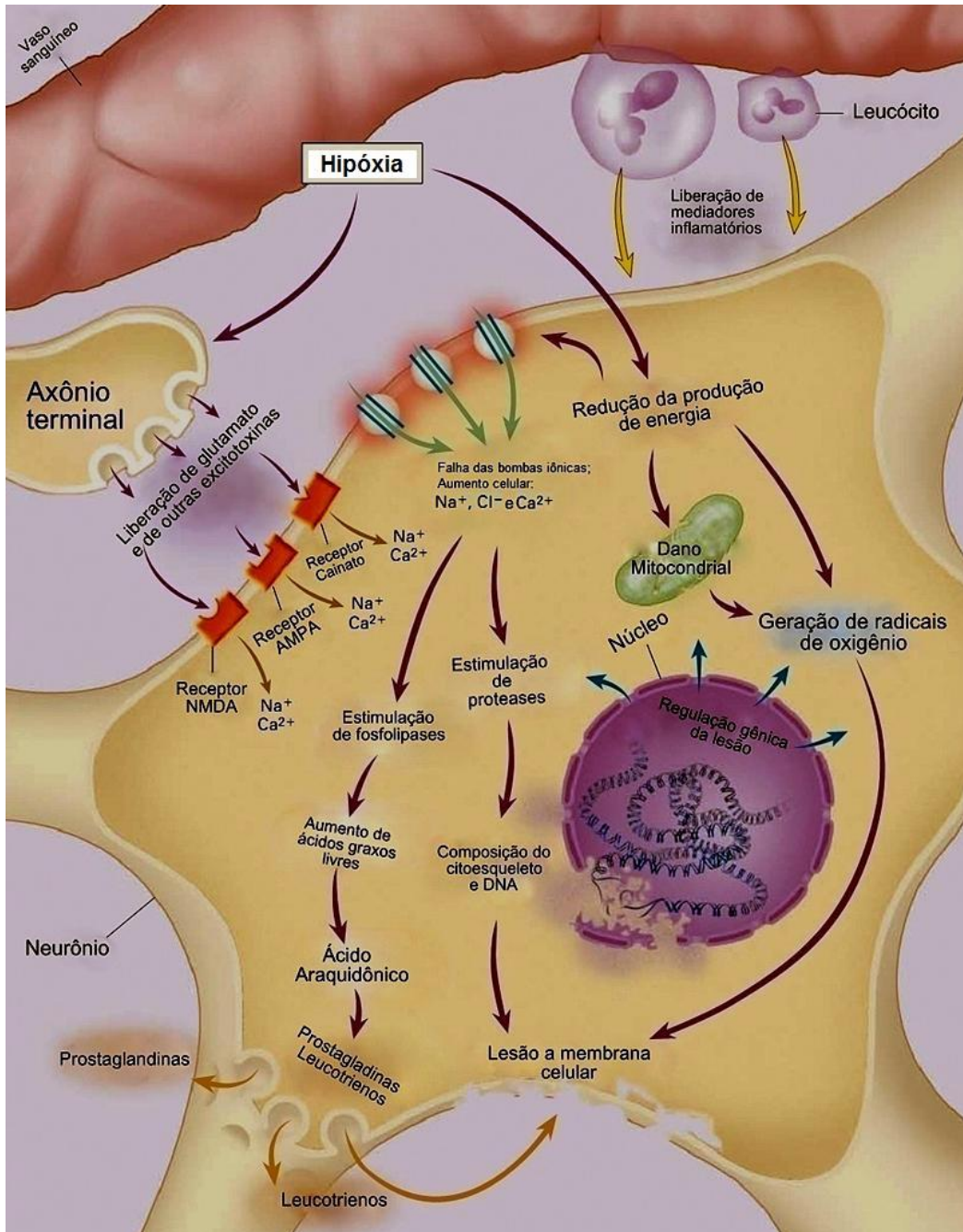


Figura 5. Eventos moleculares no tecido afetado por hipóxia. A interrupção do fluxo sanguíneo diminui a produção energética, que por sua vez provoca insuficiência das bombas iônicas, lesão mitocondrial, ativação de leucócitos, liberação de mediadores inflamatórios, geração de radicais de oxigênio e liberação de excitotoxinas. O aumento dos níveis celulares de Na^+ , Cl^- e Ca^{2+} resulta na estimulação de fosfolipases e proteases, seguido por geração e liberação de prostaglandinas e leucotrienos, desarranjo do DNA e do citoesqueleto, e em seguida, dano a membrana celular. Alterações de componentes genéticos que regula elementos da cascata alteraram o grau da lesão. Adaptado de Brott e Bogousslavsky, 2000.

1.3- Ablação e isquemia: uma comparação da plasticidade neural em modelos animais de lesões no Sistema Nervoso Central

Uma das alternativas ao desenvolvimento de novos tratamentos para doenças ou injúrias que afetam o SNC é o uso de animais como modelo dessas lesões. A utilização de modelos animais tem sido importante por mimetizar a patologia das doenças e lesões e auxiliar no entendimento de mecanismos básicos da recuperação funcional. O principal modelo utilizado tem sido os roedores, justamente pela sua similaridade aos humanos na patogenia e por possuir uma organização cerebral anatomicamente semelhante ao homem (Gonzalez e Kolb, 2003; Jin et al., 2010a; Graham, 2004).

Sabe-se que a recuperação após uma lesão encefálica envolve pelo menos três processos: resolução do dano tecidual agudo (provocado pela injúria inicial), compensação comportamental e neuroplasticidade. Melhorias iniciais na função neurológica ocorrem durante o estágio agudo, dias após a lesão. Essa melhora inicial está atribuída à resolução do dano tecidual: edema, micro ou macro-hemorragias e inflamação. Além disso, melhoras funcionais tardias ocorrem através de compensação comportamental que ocorre em semanas a meses após a lesão inicial. Entretanto, essa compensação comportamental, que melhora a resposta funcional após a injúria, não pode ser atribuída totalmente à mudanças na circuitaria do tecido em questão e sim à padrões de atividades que foram aprendidos. Ainda ocorrem várias mudanças na estrutura e fisiologia de circuitos corticais (neuroplasticidade), e existem evidências que mostram que há a reconexão do cérebro adulto com áreas encefálicas danificadas parcialmente (Carmichael, 2003; Hallett, 2001).

Segundo Gonzalez e Kolb (2003), há razões para acreditar que diferentes modelos de lesões e métodos utilizados para induzir lesões resultarão em uma resposta patológica distinta pós injúria. No caso de danos isquêmicos no cérebro induzidos por termocoagulação (cauterização superficial de vasos, com auxílio de uma sonda quente, sem que haja destruição da dura-máter) do córtex motor comparados aos danos de lesões por aspiração (ablação) da mesma região encefálica, observou-se diferenças no brotamento

axonal e na expressão de moléculas associadas com plasticidade neural a exemplo da proteína associada ao crescimento GAP-43 (Stroemer et al., 1995; Li et al., 1998; Uryu et al., 2001). Estudos anteriores mostraram que a imunomarcagem para GAP-43 diminuiu no corpo estriado dorsolateral após remoção do córtex por aspiração (Szele et al., 1995), o que não foi visto na termocoagulação, sugerindo que a última induz a uma redistribuição desta proteína.

Normalmente, em um encéfalo saudável (sem lesão) a projeção cortico-estriatal é ipsilateral com pequena projeção contralateral cruzada. Observou-se então que a partir de um experimento desenvolvido por Carmichael em 2003 onde animais que sofreram ablação e isquemia foram submetidos à injeção de BDA (do inglês *biotinylated dextran amine*), esse padrão de projeções foi alterado. Em lesões por isquemia, o brotamento axonal partiu do córtex homotípico do hemisfério oposto a lesão para o estriado (Napieralski *et al.*, 1996), e para a região periférica à lesão (Carmichael e Chesselet, 2002). O brotamento axonal no estriado dorsolateral pode resultar tanto de um aumento na colaterização local de axônios existentes no estriado dorsolateral ou de brotamento axonal de longa distância que normalmente não inervam o estriado (McGeorge e Faull, 1987, 1989; Napieralski *et al.*, 1996).

Entretanto, nenhum ou mínimo brotamento axonal foi observado no estriado dorsolateral denervado após lesões por aspiração o que leva a consideração de que o brotamento axonal é lesão-específico (Carmichael, 2003). Além disso, lesões por aspiração não resultam em aumento da arborização dendrítica cortical contralateral encontrada depois de lesões por isquemia de mesmo tamanho e localização (figura 6.) (Voorhies e Jones, 2002).

Neuroplasticidade

(conexões cortico-corticais e cortico-estriatais)

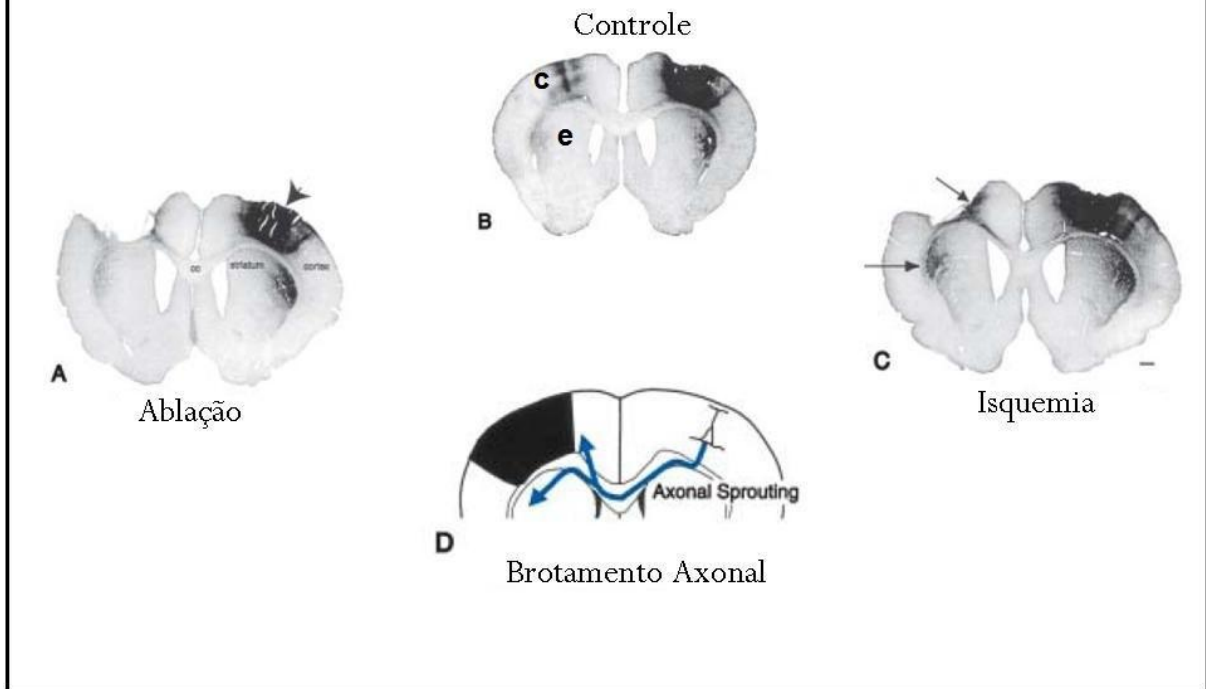


Figura 6. Experimento que utilizou injeção do traçador aterógrado Dextrana Amina Biotinilada (BDA) para evidenciar brotamento axonal em dois modelos de lesão: isquemia e ablação. A cabeça de seta em A representa o ponto em que foi realizada a injeção do BDA. Nessa região, evidencia-se marcação de terminais axonais dos neurônios que encontram-se no sítio da injeção. Em B, pode-se observar no padrão normal destas conexões, terminais axonais no córtex motor primário contralateral e no corpo estriado (ipsolateral). No córtex de animais submetidos à isquemia (C), houve um importante aumento em projeções axonais em direção ao estriado contralateral e ainda na periferia da lesão, mostrado pelas setas em (C). Já em animais submetidos à isquemia, pode-se observar que na região cortical houve um importante aumento em projeções axonais estriado contralateral (seta inferior) e ainda na periferia da lesão, no córtex contralateral (seta superior). Figura modificada de Carmichael et al., 2003.

Diferenças nas perdas sensoriomotoras também são observadas em lesões do córtex causadas por ablação e por isquemia (atingindo a mesma

região cortical e mesma extensão). Na ablação observou-se maior perda de função sensorimotora da pata dianteira induzida por estimulação tátil (Napieralski *et al.*, 1998). Na lesão por isquemia, a maior perda foi observada no uso espontâneo da pata dianteira durante os comportamentos de exploração e apoio (Napieralski *et al.*, 1998). Tal diferença nas perdas funcionais pode ser devida à diferença no potencial indutor de alterações nas conexões entre os dois modelos de lesão.

Além disso, as intervenções e terapias pós injúria cerebral podem apresentar também efeitos diferentes dependendo do método de indução de lesão. Estudo realizado por (Zeng *et al.*, 2000) demonstrou que conexões enxerto-hospedeiro apresentaram melhores resultados quando o tecido neocortical fetal foi transplantado em cavidades infartadas em comparação com o enxerto em cavidades que foram realizadas por aspiração.

1.4- Terapia Celular

O termo 'terapia celular' define-se como os métodos e abordagens tecnológicas baseadas no conhecimento de várias ciências, que visam a utilização de células para tratamento de doenças (Zandonella, 2005).

Durante muito tempo, devido ao conceito de não regeneração das células nervosas, as terapias direcionadas às lesões eram consideradas não-curativas e tinham como finalidade apenas diminuir a inflamação causada pela injúria tecidual (Ramon Y Cajal, 1928).

Atualmente, o campo da terapia celular evoluiu significativamente. Tem crescido a procura por alternativas na tentativa de minimizar e eliminar as perdas e danos causados por lesões no SNC. Na fase aguda, essas terapias visam proteger os neurônios em risco e na fase crônica almejam aumentar a capacidade de regeneração endógena pré-existente do SNC, buscando a substituição de células ou tecidos lesados, senescentes ou perdidos, a fim de reduzir sequelas funcionais. Nesse panorama, as terapias celulares estão

sendo consideradas como alternativas terapêuticas para o tratamento dessas lesões e enfermidades (Mendez-Otero et al., 2007).

Dentre os tipos celulares, as células-tronco tem sido as mais procuradas para estudos de terapia celular pela comunidade científica, uma vez que são células especializadas que possuem a capacidade de se replicar dando origem a outras células idênticas (autorenovação), preservando a sua população própria de forma constante e ativa nos tecidos. Além disso, essas células podem originar diversos outros tipos celulares de várias linhagens e se diferenciar de acordo com o microambiente em que se encontram e dos estímulos que recebem do mesmo (Schwindt et al., 2005; Tuan et al., 2002). Têm sido ainda descritas como capazes de serem quimioatraídas para os tecidos lesionados e de liberarem citocinas e fatores tróficos que além de atuarem no recrutamento de um maior número de células para o local de lesão (Crain et al., 2005; Shyu et al., 2006), também auxiliam na regeneração e remodelamento do tecido em questão através indução de angiogênese, neurogênese, sinaptogênese e diminuição da inflamação resultando então em melhora funcional (Bao et al., 2011; Chen et al., 2014a; Gutiérrez-Fernández et al., 2013; Hao et al., 2014).

Lesões como ablação e isquemia requerem terapias celulares que atuem não somente na substituição de células e na recuperação funcional como também na reconstrução de vasos danificados pela lesão (Liu et al., 2014). Os principais tipos celulares utilizados como terapias nesses modelos são as células derivadas da medula-óssea, como as células-tronco mesenquimais (CTMs) e a fração mononuclear da medula óssea (CMMOs).

As Células-Tronco Mesenquimais são células caracterizadas pela sua aderência quando cultivadas, podendo também ser chamadas de células-tronco estromais (Mezey, 2007). Essas células são multipotentes e podem se diferenciar em tipos celulares de linhagens mesenquimais como músculo, gordura e cartilagem, e linhagens neural e cardíaca (Doeppner e Hermann, 2010). Por necessitar de cultivo, essas células podem demorar a ser administradas e uma vez que a rapidez com que uma terapia é realizada é extremamente importante e muitas vezes essencial para o regeneração

tecidual, essa janela de tempo entre a obtenção e administração das células seria prejudicial (Brenneman et al., 2010). Além disso, há o risco de contaminação ao longo do período em que essas células são mantidas em cultura.

A Fração Mononuclear da Medula Óssea corresponde a uma fração da medula com constituição heterogênea que contém dois tipos de células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais (CTMs) que correspondem a cerca de 0,001-0,01% das células nucleadas de medula, e as células-tronco hematopoiéticas (CTH) que representam cerca de 0,0001% do total de células constituintes. Além das células-tronco adultas, encontramos também nessa fração as células progenitoras hematopoiéticas (CPH), células progenitoras endoteliais (CPE) e células hematopoiéticas diferenciadas (CH) (Krause et al., 2001; Orkin, 2000; Wang et al., 2008; Weissman et al., 2001). Essa fração celular, ao contrário das mesenquimais, permite uma administração mais segura (uma vez que não necessita ser cultivada, diminuindo o risco de contaminação) e rápida (podendo ser administrada nas fases aguda e subaguda). Além disso, por possuir uma constituição bastante heterogênea de células, a fração mononuclear pode vir a apresentar uma maior gama de quimiocinas e citocinas produzidas pelos diversos tipos celulares que a compõem, o que é interessante para uma possível amplificação do efeito parácrino da mesma.

1.5- As Terapias Celulares e os efeitos neurorestaurativos pós-lesões

Embora se tenha conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais as células derivadas de medula óssea induzem à regeneração neuronal, as informações sobre esses mecanismos ainda não estão completamente elucidadas (Doepfner and Hermann, 2010). A princípio, pensava-se que essas células agiam através do mecanismo de transdiferenciação podendo dar origem a células de diferentes tipos de tecidos como neurônios e células gliais. Embora alguns estudos tenham reportado a transdiferenciação de células transplantadas em células neurais maduras (Chen et al., 2008) ou a indução de

neurogênese endógena através do aumento nas taxas de proliferação e diferenciação de células precursoras neurais derivadas da zona subventricular (Li et al., 2005), hoje já se sabe que a capacidade que as células tem de se transdiferenciar em células do tecido nervoso e se fundir com neurônios, por exemplo, é muito limitada uma vez que na maioria das vezes somente uma pequena proporção dessas células expressam proteínas fenotípicas de células parênquimais. Além disso, a expressão destas proteínas não necessariamente indica diferenciação real e/ou função neuronal e glial (Chopp and Li, 2002; Doeppner and Hermann, 2010). Deste modo, os mecanismos de fusão e transdiferenciação podem não ser os principais responsáveis pelos efeitos benéficos observados com o uso das células derivadas de medula óssea.

A explicação mais aceitável para os benefícios proporcionados pelas células derivadas de medula óssea é a que as últimas são quimioatraídas para os locais de lesão e ativam mecanismos de reparo e regeneração endógenos no cérebro uma vez que produzem e liberam uma série de citocinas e fatores tróficos e de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (*do inglês: vascular endothelial growth factor-VEGF*) (Chen et al., 2003), fator de crescimento do nervo (*do inglês: nerve growth factor-NGF*) (Chen et al., 2001; Hu et al., 2005; Mahmood et al., 2002), fator neurotrófico derivado do cérebro (*do inglês: brain-derived neurotrophic factor-BDNF*) (Chen et al., 2005 e Hu et al., 2005) e outros que agirão sobre vários mecanismos de lesão de forma a contribuir para a recuperação do tecido afetado e de funções perdidas (Dormady et al., 2001; Chen et al., 2003; Li et al., 2002; Song et al., 2012). A produção e liberação desses fatores pelas células é influenciada e ajustada diretamente pelas necessidades do tecido. Assim, o nível de dano tecidual do microambiente irá estabelecer a produção de fatores tróficos e a quantidade deste a ser liberada pelas células, além também da quantidade de células a ser direcionada para o tecido em questão (Chopp and Li, 2002).

Tem sido descrito que a quimioatração e a liberação de fatores tróficos são os principais meios pelos quais as células promovem a recuperação funcional e melhorias teciduais. Esse efeito terapêutico tem sido atribuído à ação das células na regulação positiva dos processos restaurativos endógenos indutores de plasticidade como a angiogênese, neurogênese, sinaptogênese e

arborização dendrítica, além da redução da inflamação e da morte celular por apoptose (Andres et al., 2011; Chopp and Li, 2002; Maltman et al., 2011).

O potencial de terapias com transplantes de células-tronco no tratamento de doenças que afetam o SNC tem sido comprovado. Alguns trabalhos demonstraram significativa recuperação funcional em diversos modelos experimentais (Delcroix et al., 2010; De Freitas et al., 2012; Mahmood et al., 2013; Sampaio et al., 2013; Savitz et al., 2002) e relacionam tal recuperação funcional com a indução de neuroplasticidade. Entretanto, recuperação funcional também foi observada na ablação (De Freitas et al., 2012), um modelo já caracterizado como não indutor de neuroplasticidade de conexões-cortico-corticais e cortico-estriatais (Carmichael, 2003). Assim, nem sempre há uma relação direta entre neuroplasticidade e recuperação funcional induzida.

1.6- A espectrometria de massas como abordagem para o descobrimento de biomarcadores proteicos a serem alvo de terapias

Poucos trabalhos abordaram o efeito da terapia celular na expressão de proteínas relacionadas com neuroplasticidade nos modelos de isquemia e ablação (Li et al., 1998; Stroemer et al., 1995; Szele et al., 1995; Uryu et al., 2001). Podemos citar entre eles o artigo realizado por Giraldo-Guimarães et al., 2009 que verificou o efeito do tratamento com as CMMOs na expressão de duas proteínas: a GAP-43 (envolvida nos processos de crescimento axonal) e a sinaptofisina (relacionada com a formação de sinapses e endocitose de vesículas sinápticas) na região perilesional de ratos submetidos a isquemia por termocoagulação com sobrevida de 7 dias após as lesões utilizando como metodologia o Western Blot. Observou-se então que a expressão da proteína GAP-43 foi diminuída no lado ipsilateral de animais tratados com as CMMOs e também nos animais controle quando comparados com animais normais (naive). Já para a proteína sinaptofisina, nenhuma alteração na sua expressão foi observada.

Uma vez que pouco se sabe sobre a indução de proteínas relacionadas com neuroplasticidade nos modelos de isquemia e ablação e sobre como a

terapia celular estaria modificando ou não a expressão destas proteínas, o estudo nessa área poderia prover a descoberta de possíveis alvos a serem focos de terapias, como biomarcadores proteicos. Nesse contexto, a espectrometria de massas se apresenta como uma melhor metodologia para o estudo do proteoma uma vez que a partir dela podemos estimar complexos de proteínas, vias de sinalização e modificações proteicas, sendo uma valiosa fonte de entendimento da patogênese, interações drogas-proteínas, terapias celulares-proteínas além de vias metabólicas.

Alguns estudos já foram conduzidos utilizando a metodologia da espectrometria de massas em modelos animais de isquemia (Brea et al., 2015; Chen et al., 2007; Chen et al., 2014b; Chen et al., 2015; Di Domenico et al., 2012; He et al., 2016; Koh, 2010; Jin et al., 2004; Campos-Martorell et al., 2014; Scornavacca et al., 2012; Seo et al., 2013; Sung et al., 2009; Sung et al., 2016; Zgavc et al., 2013) e somente um, que seja de nosso conhecimento, verificou o efeito da terapia celular neste mesmo modelo (He et al., 2016). Entretanto, mesmo envolvendo o modelo da isquemia, esse trabalho utiliza as células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano o que difere da nossa proposta no seguinte trabalho para o uso das CMMOs. Além disso, até o presente momento não temos conhecimento sobre algum estudo conduzido com espectrometria de massas que aborde terapia celular em modelo de ablação.

2- OBJETIVOS

O objetivo foi verificar o efeito do tratamento com as CMMOs nos modelos ablação e isquemia focais corticais na expressão diferencial de proteínas relacionadas com neuroplasticidade e com resposta imune/inflamatória e ao estresse oxidativo na região perilesional em animais com sobrevida de 7 dias após a indução das lesões.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Modelo Animal

Ratos Wistar machos com idade variando de 2 a 5 meses e pesando entre 250-550 gramas foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os procedimentos no qual os animais foram submetidos obteve aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Instituição (CEUA – UENF), sob o protocolo no 86 em 02/09/2010. Os animais permaneceram mantidos no mesmo local com água e comida ad libitum, em um ciclo de 12 horas em claro:12 horas em escuro, antes e durante o experimento.

3.2- Procedimentos Cirúrgicos

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (70 mg/kg) intraperitonealmente e tiveram então a cabeça fixada no aparelho estereotáxico. Após terem seu crânio exposto cirurgicamente, realizou-se uma craniotomia a fim de expor o córtex frontoparietal esquerdo (de +2 a -8 mm a partir do bregma no eixo anteroposterior; de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1986). Nesse momento, animais foram separados conforme o tipo de lesão que deveriam receber: isquemia focal unilateral por termocoagulação ou ablação focal unilateral por sucção. Ambos os tipos de lesão resultaram em remoção das seis camadas de córtex. Além disso, posteriormente à cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos sob uma lâmpada de forma que se recuperem da administração do anestésico. Assim que os animais atingem a recuperação, são levados de volta ao biotério onde lá permanecem até terminarem os experimentos.

3.3- Ablação focal unilateral por sucção

A lesão por ablação foi induzida através da sucção de maior parte do córtex motor e de parte do córtex somestésico (figura 7) com o auxílio de uma

bomba de vácuo. Após incisão da pele que recobre o crânio e obtenção das medidas para exposição da área de interesse, se realizou o rompimento da dura-mater com auxílio de pinças ultrafinas de forma cuidadosa, a fim de evitar danos ao encéfalo. A parte exposta do córtex pode então ser sugada com uma bomba de vácuo.

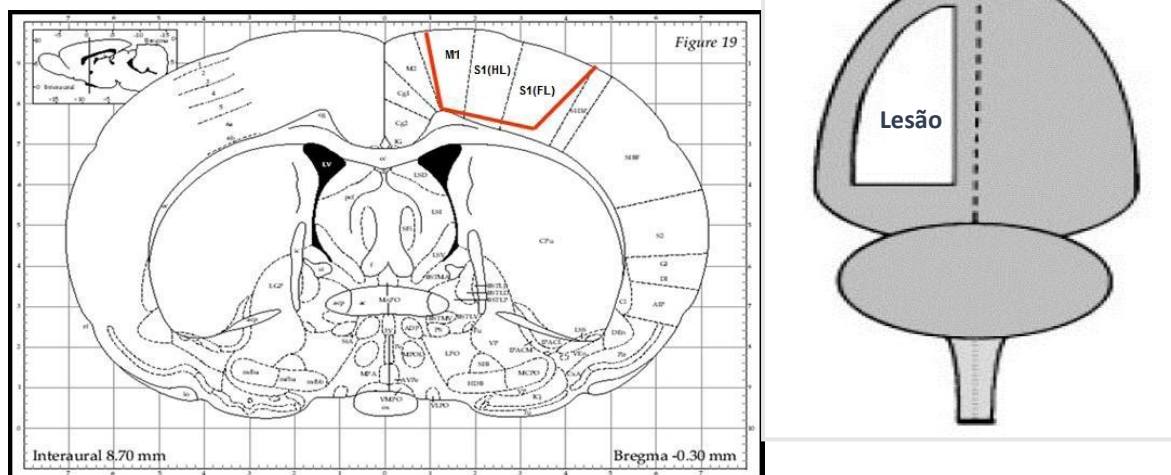


Figura 7. Desenho representativo da área em que será realizada a lesão.

Na figura da esquerda destacada em vermelho se encontra a área onde foram realizadas as lesões por isquemia e ablação. Vale ressaltar que a injúria provocada ocorreu no córtex motor primário (M1) e em parte do córtex somestésico (S1(HL) e S1(FL)). A figura da esquerda mostra um esquema da visão dorsal da área em que a lesão foi realizada (Adaptada de Paxinos e Watson, 1986 e Napieralski et al., 1998).

3.4- Isquemia focal unilateral por termocoagulação

Com o auxílio de um ferro de solda (40w, 450-550 °C), a lesão isquêmica foi realizada atingindo também a maior parte do córtex motor e de parte do córtex somestésico (figura 7). O ferro de solda fixado na haste do aparelho estereotáxico foi aproximado do encéfalo, dando preferência às regiões com presença de vasos sanguíneos. Estes vasos serão cauterizados sem necessidade de rompimento da dura-máter com pinças ultrafinas e o procedimento foi interrompido quando os vasos sanguíneos passaram de uma tonalidade vermelho vivo para um tom de vermelho mais escuro. Vale ressaltar que tanto na ablação quanto na isquemia a extensão da lesão compreende as seis camadas que compõem o córtex (ver figura 8).

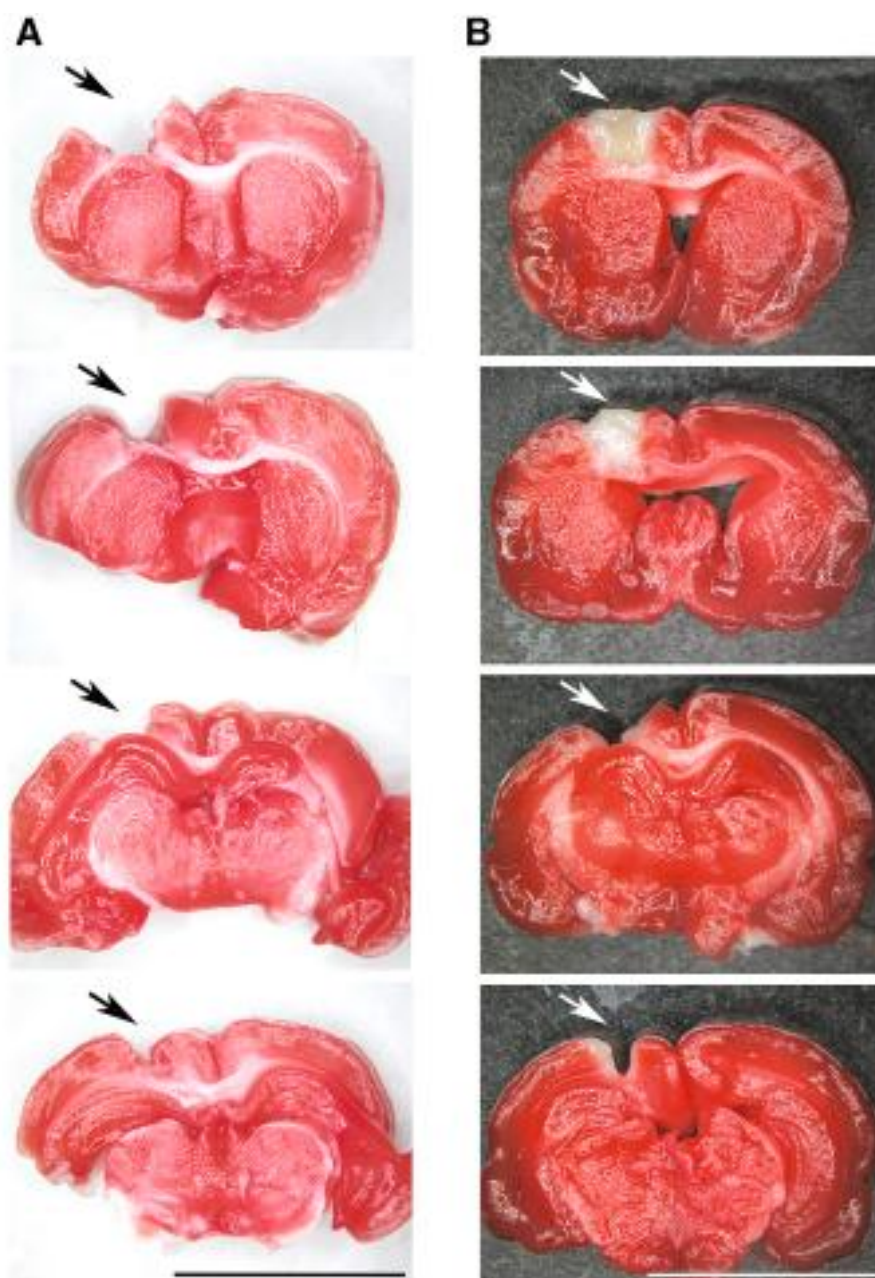


Figura 8. Análise da extensão das lesões por ablação e isquemia em cortes coronais rostro-caudais. Para a reação foi utilizado TTC (cloreto de trifetil tetrazólio) nos encéfalos dos animais 24 horas após a indução de lesão por ablação (A) e isquemia (B). O TTC cora de vermelho o tecido viável. Na fotografia podemos observar a área branca na região do encéfalo submetido à isquemia (região de tecido morto). Note que as duas lesões (localizadas no hemisfério esquerdo) atingem a mesma área e extensão, poupando o corpo caloso e estriato. (Retirada de De Freitas et al., 2012)

3.5- Obtenção das CMMOs

Animais adultos foram eutanasiados na câmara de CO₂ e seus fêmures e tíbias foram extraídos e separados dos tecidos adjacentes. Os ossos obtidos foram cortados de forma a permitir o acesso à medula com uma seringa contendo 10 ml de meio de cultura (DMEM F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Assim, o conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis. O material obtido foi centrifugado por 5 minutos com velocidade de 8,5, e o precipitado recolhido e novamente suspenso em meio de cultura (2 ml de DMEM F12 sem soro). Este material foi então submetido à centrifugação por 30 minutos em Ficoll para a extração das MNMOs. As células que ficaram na interfase entre a fração aquosa (DMEM F12) e o Ficoll foram retiradas e submetidas à primeira lavagem em um tubo contendo PBS 10mM. Posteriormente foram ressuspensas e centrifugá-las por 5 min (velocidade de 8,5) e em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 3 ml de PBS para uma segunda lavagem. Novamente realizou-se a 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 DMEMN F12 sem soro. São injetadas $3,0 \times 10^7$ células/500 μ L por animal.

3.6- Administração sistêmica das CMMOs

Com relação ao transplante das células, os animais que sofreram ambos os tipos de lesão foram vinte e quatro horas após submetidos à injeção de cerca de 30 milhões de células ($3,0 \times 10^7$ células) em 500 μ L de solução salina 0,9% pela veia jugular de animais pertencentes ao grupo de tratamento. Além disso, 500 μ L de solução salina 0,9 % foi injetada em animais controle.

A técnica de injeção pela veia jugular requer a exposição da mesma por uma incisão cirúrgica da pele próxima ao pescoço com o auxílio de um bisturi. Com pinças ultrafinas, a veia de interesse foi localizada para que assim a administração fosse realizada através da introdução de uma seringa com agulha ultrafina na luz do vaso sanguíneo. Em seguida a incisão foi suturada, os animais observados e após a recuperação anestésica, foram devolvidos ao Biotério.

3.7- Extração e quantificação de proteínas

Os animais foram perfundidos intracardiacamente com solução gelada de NaCl 0.9% e seus cérebros foram rapidamente removidos do crânio. Como descrito previamente (Giraldi-Guimarães et al., 2009), a região ipsilateral à lesão (porção medial) foi dissecada (figura 9) e congelada em -70°C até que o procedimento de extração de proteínas fosse realizado. A mesma região foi obtida de animais naive, que não foram submetidos aos experimentos cirúrgicos, e eles foram considerados o “grupo normal”. O método utilizado para a extração proteica foi o já descrito por Balbuena et al., 2009. Três replicatas biológicas foram utilizadas para as análises. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido utilizando um gral com pistilo. A amostra resultante foi colocada em um microtubo de 2 ml e a ele foi adicionado 500 μL do tampão de extração contendo 7M de urea (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), 2 M de tiurea (GE Healthcare), 1% DTT (Bio-Rad Laboratories), 2% Triton-100 (GE Healthcare), e 1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) (Sigma-Aldrich) e agitados por 60 min à 4°C até que as amostras fossem completamente ressuspendidas. Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo por 30 min e então centrifugadas a 16000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram então coletados e armazenados a -20°C . A concentração de proteína total foi determinada usando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare).

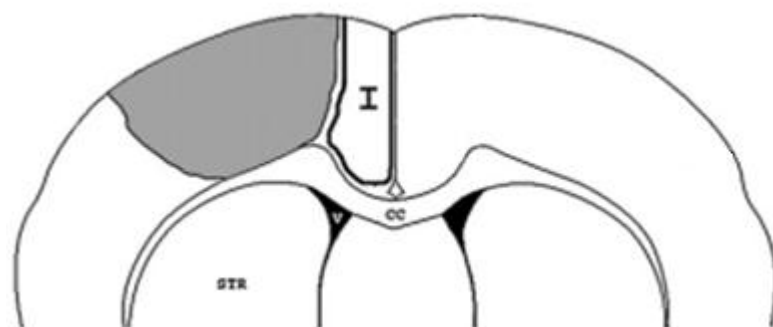


Figura 9. Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato mostrando a região que foi dissecada para análise por espectrometria de massas. A região em cinza mostra a área em que as lesões foram realizadas. A região dissecada para análise foi o córtex cingulado periférico à lesão (I). A figura mostra ainda: STR-corpo estriado ipsilateral à lesão; CC – corpo caloso e ventrículo (v). (Adaptada de Giraldi-Guimarães et al.,2009).

3.8- Digestão de proteínas

Antes da digestão de proteínas as amostras contendo as proteínas totais (100 µg) de cada amostra biológica foram dessalinizadas em Amicon Ultra-0.5 mL usando 50 mM de bicarbonato de amônio (Sigma-Aldrich) (pH 8.5) como tampão. As membranas foram preenchidas até sua capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugadas em 15000 g por 20 min a 25°C. Esse procedimento foi repetido por pelo menos 3 vezes até que restasse somente aproximadamente 50 µL da amostra.

No passo da digestão proteica por tripsina, para cada amostra foram adicionados 25 µL of 0.2% (v/v) RapiGest® (Waters, Milford, CT, USA) e então as amostras foram vortexadas brevemente e incubadas em um Eppendorf Thermomixer® a 80°C for 15 min. Então, 2.5 µL de 100 mM DTT foi adicionado e os tubos vortexados e incubados a 60°C for 30 min com agitação. Posteriormente, 2.5 µL de iodoacetamida 300 mM (GE Healthcare) foi adicionado e amostras vortexadas e incubadas no escuro por 30 min em temperatura ambiente. A digestão foi realizada adicionando 20 µL da solução de tripsina (50 ng/µL; V5111, Promega, Madison, WI, USA) preparada em bicarbonato de amônio 50 mM e então incubadas overnight a 37°C. Para a precipitação do RapiGest®, 10 µL de 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma-Aldrich) foi adicionado e as amostras foram incubadas a 37°C por 90 min e então centrifugadas em 16000 g por 30 min. As amostras foram transferidas para Total Recovery Vials (Waters) para uso na análise por espectrometria de massas.

3.9- Análises por espectrometria de massas

Um UPLC nanoAcquity conectado a um espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, Manchester, UK) foi usado para análises ESI-LC-MS/MS 9 (de acordo com Reis et al., 2016). O passo da cromatografia foi realizado injetando 1 µL das amostras digeridas a fim de normalizá-las antes da quantificação relativa de proteínas. Normalização entre amostras foi baseada em medidas estequiométricas do total da contagem de íons de corrida de reconhecimento anterior às análises, de forma a garantir valores molares

padronizados para todas as condições. Posteriormente, amostras foram adicionadas no nanoAcquity UPLC com coluna 5 μm C18 trap (180 μm x 20 mm) a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 3 min e então no nanoAcquity HSS T3 1.8 μm com coluna analítica de fase reversa (75 μm x 150 mm) at 350 nL/min, com temperatura da coluna em 60 °C. Para a eluição peptídica, as configurações do equipamento foram ajustadas como descrito por Reis et al, 2016. Brevemente, um gradiente binário constituído de fase A e fase B foi utilizado, sendo a fase A composta de água (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) e ácido fórmico 0.1% (Sigma-Aldrich) e a fase B composta por acetonitrila (Sigma-Aldrich) e ácido fórmico 0.1% (Sigma-Aldrich). O gradiente de eluição começou em 7% da solução B e foi mantido por 3 min. Depois subiu de 7% de B a 40% de B até 90.09 min e de 40% de B a 85% de B até 94.09 min, sendo mantido a 85% até 98.09 min e então decrescendo a 7% de B até 100.09 min e mantida a 7% B até o fim em 108.09 min. A espectrometria de massas foi realizada em modo positivo e de resolução (V mode), 35.000 FWMH, com mobilidade de íons , e no modo data-independent acquisition (DIA); Velocidade da onda IMS foi ajustada para 600 m/s; a energia de transferência de colisão subiu de 19v a 55v em modo de alta energia; voltagens de cone e capilar de 30v e 2.750v respectivamente; e fonte de temperatura de 70°C. Nos parâmetros TOF, o tempo de escaneamento foi ajustado para 0.5 s em modo contínuo com variação de 50 a 2.000 Da. O [Glu1]-fibrinopeptídeo B humano (Sigma-Aldrich) a 100 fmol/ μL foi usado como calibrador externo e bloqueio de aquisição de massas foi realizado a cada 30 s. Para a limpeza de contaminantes e estabilização do sistema, em todas as corridas, os primeiros e últimos 10 min do TIC não foram analisados.

3.10- Bioinformática

Processamento de espectros e condições de pesquisa na base de dados foram estabelecidas usando o Progenesis QI for Proteomics Software v. 2.0 (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK). A plataforma do software Progenesis usou o algoritmo (Apex3D, Waters Corporation) no qual os dados foram processados usando um limiar de baixa energia de 135 (contagens), um limiar de energia elevado de 30, e um limiar de intensidade de 750. As análises utilizaram os seguintes parâmetros: uma perda de clivagem, mínimo de fragmentos de íons por peptídeo igual a 2, mínimo de fragmentos de íon por

proteína igual a 5, mínimo de peptídeo por proteína igual a 2, modificações fixas de carbamidometil (C), modificações variáveis de oxidação (M) e fosforil (STY), e um valor de taxa de detecção de falhas padrão de 4% máximo e máximo de erros de massa de 10 ppm. Para todos os fragmentos identificados, uma análise foi realizada no score de peptídeo que variaram de 0.1 a 10. Somente os peptídeos com score maior que 5 foram considerados. A sequência de proteínas de *Rattus norvegicus* foi obtida do Uniprot (<https://www.uniprot.org>) e usada na análise. Análises quantitativas relativas label-free foram realizadas pela proporção de contagem de íons de proteínas entre os contrastes de amostras. Proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas baseadas em um fold change máximo de pelo menos 1,5 e somente proteínas com $p < 0.05$ no ANOVA foram consideradas.

Software STRING (V10.0) (Jensen et al., 2009) e Blast2GO (v. 3.4) (Conesa, 2005) foram utilizados para caracterização funcional de proteínas diferencialmente expressas, para avaliar a rede funcional entre eles e também para análises por Gene Ontology (GO). Para proteínas que não foram caracterizadas por essas ferramentas, a informação funcional foi obtida manualmente pela ferramenta do NCBI.

4- RESULTADOS

Como resultado das análises realizadas por espectrometria de massas na região de tecido perilesional em animais após um período de sobrevivência de 7 dias, foram identificadas um total de 2268 proteínas (dados não mostrados).

Com relação ao efeito do tratamento com as CMMOs sobre cada tipo de lesão, a comparação entre os grupos isquêmico tratado vs. isquêmico controle mostrou 56 proteínas com expressão aumentada no grupo tratado com as células (Tabela S1), e 127 proteínas apresentaram expressão reduzida (Tabela S2). Já na comparação entre os grupos ablação tratado vs. ablação controle, 86 proteínas tiveram sua expressão aumentada (Tabela S3) e 83 diminuíram sua expressão (Tabela S4).

A fim de verificar a sobreposição de proteínas diferencialmente abundantes entre os contrastes, todas as proteínas reguladas negativa e positivamente foram agrupadas em um diagrama de Venn. Podemos observar que não houve sobreposição entre as proteínas reguladas positivamente nos contrastes entre o grupo isquêmico tratado com CMMOs vs. isquêmico controle (Isq M/C) e entre o contraste (Abl M/C) entre os grupos ablação tratado com as CMMOs vs. ablação controle. Além disso, somente 3 proteínas em comum entre os mesmos contrastes (Isq M/C vs. Abl M/C) foram reguladas negativamente (Figura 10). Somente uma proteína foi regulada positivamente em Isq M/C e regulada negativamente em Abl M/C e vinte proteínas foram negativamente reguladas no contraste Isq M/C e positivamente reguladas em Abl M/C (Figura 10; Tabela 3).

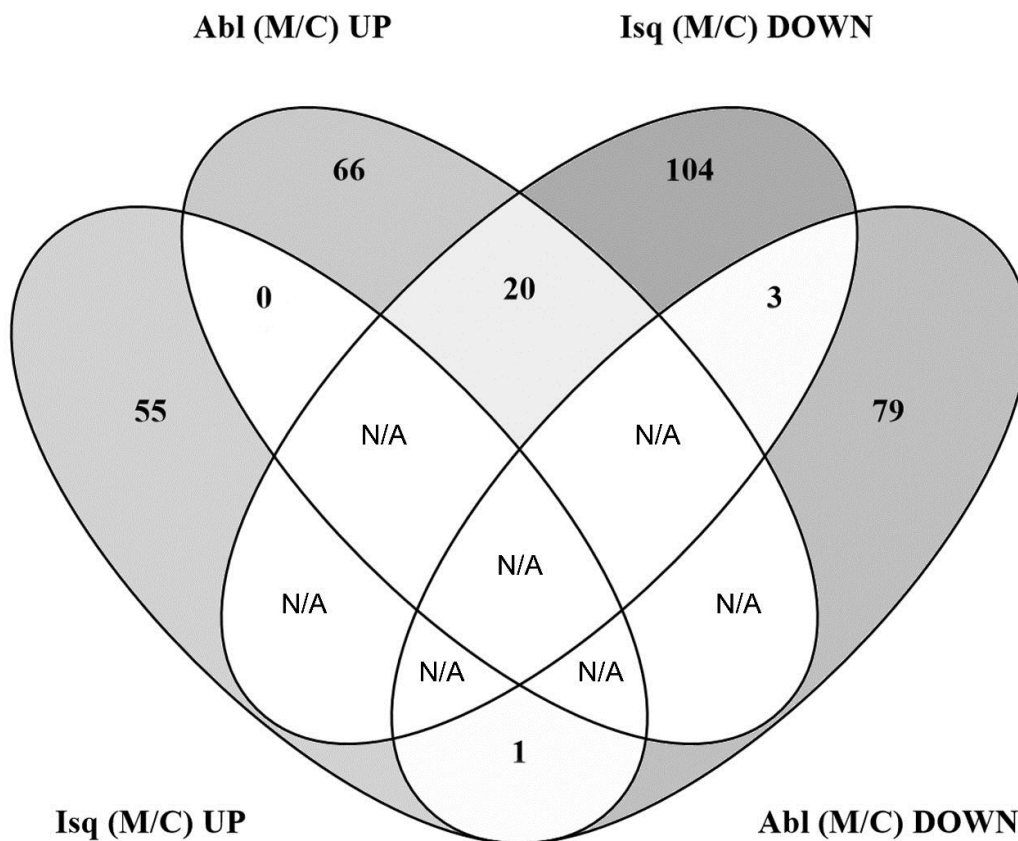


Figura 10. Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de proteínas diferencialmente abundantes na comparação entre grupos tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical. Note que não há sobreposição nas proteínas reguladas positivamente entre Isq (M/C) e Abl (M/C) e que somente três proteínas foram negativamente reguladas em comum entre eles. Interessantemente, somente uma proteína foi positivamente regulada em Isq (M/C) e negativamente regulada em Abl (M/C) e vinte proteínas foram reguladas negativamente em Isq (M/C) e reguladas positivamente em Abl (M/C). Isq (M/C), grupo isquêmico tratado com CMMOs vs. grupo isquêmico controle; Abl (M/C), grupo ablação tratado com CMMO vs. grupo ablação controle; N/A, não aplicável.

Com o objetivo de verificar as interações funcionais entre as proteínas diferencialmente abundantes, as proteínas foram agrupadas e o STRING para cada contraste (Isq M/C e Abl M/C) foi realizado. Inicialmente, agrupamos todas as proteínas diferencialmente abundantes para o contraste Isq M/C (Figura 11 - esquerda) e observamos que houve interconexões parciais entre essas proteínas mas também proteínas que não apresentaram nenhuma interação funcional com outras. Posteriormente, separamos as proteínas que foram positiva e negativamente reguladas (Figura 11 - direita) e verificamos uma alta interconexão entre as proteínas reguladas negativamente.

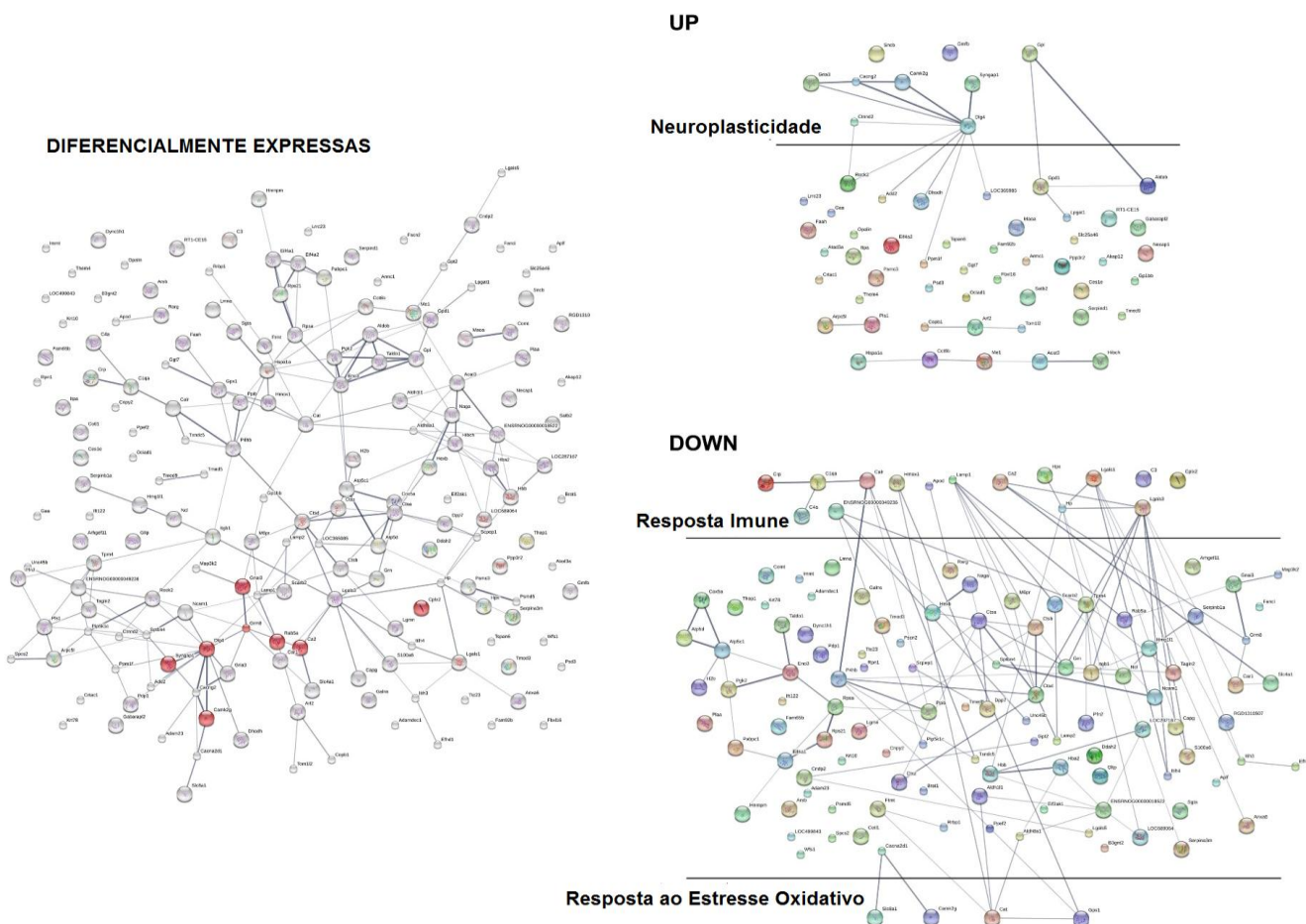
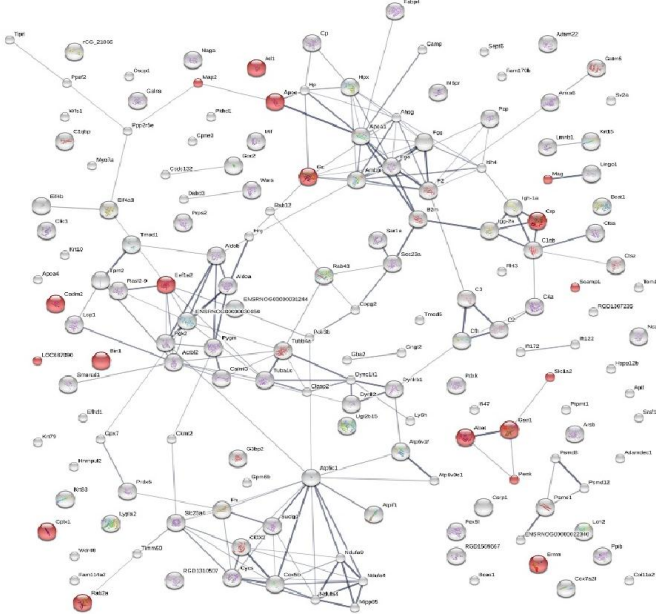


Figura 11. Rede funcional das proteínas diferencialmente abundantes em comparação entre grupo isquêmico tratado vs. grupo isquêmico controle. Cada nó representa uma proteína diferencialmente abundante identificada. Pequenos nós representam proteínas de estrutura 3D não identificada, e nós maiores são proteínas com estrutura 3D ou estrutura prevista. Cada linha entre dois nós representa uma interação funcional proteína-proteína, e não necessariamente significa que elas são fisicamente ligadas. A espessura da linha representa uma relação positiva com nível de confiança de interações funcionais. Na esquerda: proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas e proteínas com alguma função neuronal foi colorida de vermelho. Note que há interações funcionais parciais entre proteínas, mas há algumas proteínas com nenhuma interação funcional descrita com outras proteínas diferencialmente expressas. Na direita, acima: nós coloridos mostram a identificação de cada proteína positivamente regulada. Nove proteínas com papéis positivos descritos na neuroplasticidade foram identificadas e agrupadas separadamente das outras. Na direita, abaixo: nós coloridos mostram a identificação de cada proteína

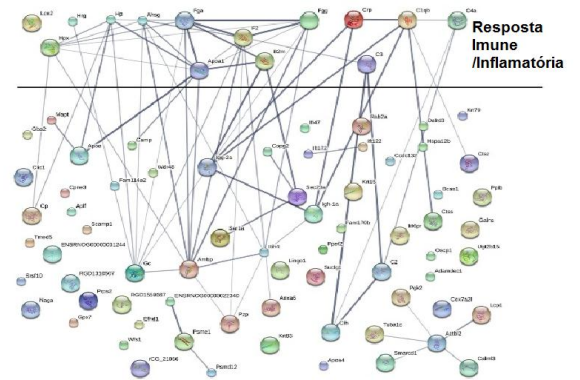
negativamente regulada. Quinze proteínas relacionadas com resposta imune e quatro relacionadas com resposta ao estresse oxidativo foram identificadas e agrupadas separadamente das outras. Em relação a todas as proteínas identificadas, houve mais interação funcional entre proteínas negativamente reguladas do que a encontrada nas reguladas positivamente.

Para o contraste Abl M/C, também agrupamos inicialmente todas as proteínas diferencialmente abundantes em uma rede de interação funcional a partir do STRING e observamos resultado similar ao contraste Isq M/C (Figura 12 - esquerda). Ao separarmos as proteínas positiva e negativamente reguladas para esse contraste, constatamos o oposto do contraste Isq M/C, uma vez que nota-se uma menor interconecção entre as proteínas reguladas negativamente (Figura 12 - direita).

DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS



UP



DOWN

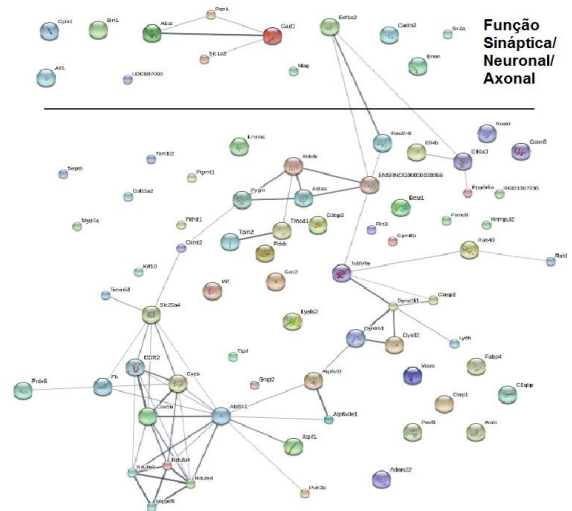


Figura 12. Rede funcional das proteínas diferencialmente abundantes em comparação entre grupo ablação tratado vs. grupo ablação controle. Cada nó representa uma proteína diferencialmente abundante identificada. Pequenos nós representam proteínas de estrutura 3D não identificada, e nós maiores são proteínas com estrutura 3D ou estrutura prevista. Cada linha entre dois nós representa uma interação funcional proteína-proteína, e não necessariamente significa que elas são fisicamente ligadas. A espessura da linha representa uma relação positiva com nível de confiança de interações funcionais. Na esquerda: proteínas diferencialmente abundantes foram agrupadas e proteínas descritas como presentes em qualquer parte neuronal estão em vermelho. Note que há interações funcionais parciais entre proteínas, mas há algumas proteínas com nenhuma interação funcional descrita com outras proteínas diferencialmente expressas. Na direita, acima: nós coloridos mostram a identificação de cada proteína positivamente regulada. Quatorze proteínas relacionadas com resposta imune/defesa/inflamatória foram identificadas e

agrupadas separadamente das outras. Em relação a todas as proteínas identificadas, houve mais interação funcional entre proteínas positivamente reguladas do que a encontrada nas negativamente reguladas. Na direita, abaixo: nós coloridos mostram a identificação de cada proteína negativamente regulada. Treze proteínas com função neuronal/axonal/neuronal foram identificadas e agrupadas separadamente das outras.

Um foco especial foi dado para proteínas de nosso interesse como as envolvidas com transmissão sináptica e neuroplasticidade assim como as envolvidas com a resposta imune, inflamatória e ao estresse oxidativo. Assim, para o contraste Isq M/C, nove proteínas com papéis positivos descritos na neuroplasticidade tiveram sua expressão aumentada (Figura 11; Tabela 1). Foram encontradas ainda quinze proteínas relacionadas com resposta imune e quatro relacionadas com resposta ao estresse oxidativo (Figura 11; Tabela 2). Além disso, sete proteínas com função descrita ou provável na neuroplasticidade foram negativamente reguladas (Figura 10; Tabela 1). Ao analisarmos o contraste Abl M/C, quatorze proteínas relacionadas a resposta imune/inflamatória/defesa foram reguladas positivamente (Figura 12; Tabela 2) e treze proteínas com funções neuronais/axonais/sinápticas descritas ou prováveis foram negativamente reguladas (Figura 12; Tabela 1). Além disso, cinco proteínas com função neuronal /axonal/ sináptica descrita ou provável foram reguladas positivamente (Figura 12; Tabela 1).

Tabela 1. Lista das proteínas diferencialmente abundantes, na comparação entre tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical, com alguma função neuronal/ axonal /sináptica descrita e potencialmente envolvidas em algum mecanismo de neuroplasticidade. Fontes para funções: UniProt, STRING e PubMed.

Nº de Acessos	Descrição	Fold change	Evidências de funções na transmissão sináptica e/ou neuroplasticidade
Isq (M) vs (C): Positivamente reguladas			
F1M787	Catenina delta-2	5,06	Pode estar envolvida na adesão de células neuronais, e na morfogênese e integridade tecidual regulando as moléculas de adesão; morfogênese de espinhas dendríticas; organização sináptica
Q71RJ2	Subunidade gama-2 do canal de cálcio dependente de voltagem	4,24	Regula as propriedades de tráfico e vazão dos receptores glutamato-seletivos AMPA (AMPA Rs); promove o seu direcionamento para a membrana celular e sinapses e modula as propriedades de vazão diminuindo suas taxas de ativação, desativação e dessensibilização
Q9QUH6	Ras/Rap proteína de ativação GTPase SynGAP	2,39	Constituinte principal da PSD essencial para sinalização pós-sináptica; podem desempenhar um papel no controle de NMDAR dependente da potenciação de AMPAR, tráfico de AMPAR de membrana e plasticidade sináptica; Pode estar envolvida em certas formas de lesão cerebral, levando a aprendizagem de longo prazo e déficits de memória
M0RDJ4	Fator de maturação da glia beta	1,81	Responsável pela diferenciação de células cerebrais, estimulação da regeneração neural; Aprendizagem; Comportamento locomotor
P31016	Disks large homolog 4 (PSD-95)	1,78	Interage com a cauda citoplasmática das subunidades do receptor NMDA e canais de potássio do tipo agitador. Necessário para a plasticidade sináptica associada à sinalização do receptor NMDA
P19492	Receptor de Glutamato 3 (AMPA 3)	1,62	Receptor de glutamato que funciona como canais de íons ativados por ligante no sistema nervoso central e desempenha um papel importante na transmissão sináptica excitatória
A0A0G2JSQ1	Beta-sinucleína	1,58	Pode estar envolvida na plasticidade neuronal; Regulação negativa do processo apoptótico neuronal; Organização de sinapses
F1LMC3	Subunidade gamma da proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina tipo II	1,57	Pode funcionar na espinha dendrítica e formação de sinapses e plasticidade neuronal

Q6P6V0	Glucose-6-fosfato isomerase	1,54	Pode funcionar como uma citocina secretada por tumor e um fator angiogênico (AMF) que estimula a motilidade celular endotelial; fator neurotrófico (Neuroleukin) para os neurônios espinhais e sensoriais
--------	-----------------------------	------	---

Isq (M) vs (C): Negativamente reguladas

A0A0G2JW12	Complemento C4	-1,61	Expresso pelos neurônios e promove a eliminação das sinapses durante a maturação dos circuitos neuronais
P84087	Complexina-2	-1,82	Regula negativamente a formação de agrupamento de vesículas sinápticas na zona ativa à membrana pré-sináptica em neurônios pós-mitóticos. Regula positivamente um passo tardio na exocitose das vesículas sinápticas; Regulação positiva da plasticidade sináptica
P31720	Subunidade A do subcomponente do complemento C1q	-2,14	C1q é expresso em sinapses e é um mediador de refinamento sináptico e plasticidade
M0RBJ7	Complemento C3	-2,23	Tem como alvo subconjuntos de sinapses e é necessário para a eliminação de sinapse por microglia durante refinamento sináptico e plasticidade
A0A0G2K0M8	Molécula de adesão celular neural 1	-3,08	É uma molécula de adesão celular envolvida na adesão neurônio-neurônio, fasciculação de neuritos, indução do crescimento de neuritos etc.
P70579	Receptor Metabotrópico de glutamato 8	-3,67	Receptor de glutamato metabotrópico do Grupo III; Inibição da liberação de glutamato pelo terminal pré-sináptico, diminuição da ativação dos receptores pós-sinápticos ionotrópicos glutamatérgicos e excitabilidade neuronal
F1M3F8	Subunidade gamma da proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina tipo II	-8,9	Pode funcionar na espinha dendrítica, na formação de sinapses e plasticidade neuronal; Plasticidade em sinapses glutamatérgicas

Abi (M) vs (C): Positivamente reguladas

M0RBJ7	Complemento C3	6,39	Destina-se a subconjuntos de sinapses e é necessário para a eliminação de sinapse por microglia durante refinamento sináptico e plasticidade
P31721	Subunidade B do subcomponente do complemento C1q	3,83	C1q é expresso em sinapses e é um mediador de refinamento sináptico e plasticidade
F1LNK0	Proteína 2 associada aos microtúbulos (MAP-2)	3,32	A função exata de MAP-2 é desconhecida, mas os MAPs podem estabilizar os microtúbulos contra a despolimerização; Parece ter um efeito de rigidez sobre os microtúbulos; Proteínas citoesqueléticas específicas de neurônios que são enriquecidas em dendritos, implicando um papel na determinação e estabilização da forma dendrítica durante o desenvolvimento do neurônio
A0A0G2JW12	Complemento C4	2,09	Expresso pelos neurônios e promove a eliminação das sinapses durante a maturação dos circuitos neuronais
P02650	Apolipoproteína E	1,66	Promove a regeneração neuronal; Diferenciação de oligodendrócitos; Regeneração do axônio do sistema nervoso periférico; Regulação positiva da extensão axonal; Regulação da liberação de beta-amilóide (Doença de Alzheimer)

Abl (M) vs (C): Negativamente reguladas

O08839	Proteína 1 de interação box-dependente Myc	-1,51	Pode estar envolvida na regulação da endocitose das vesículas sinápticas
Q1WIM2	Molécula de adesão celular 2	-1,51	Importante para a organização de sinapses, proporcionando aderência trans-sináptica regulada. Se liga preferencialmente a oligodendrócitos
P62632	Fator de alongação 1-alfa 2	-1,54	Resposta ao estímulo elétrico
P50554	4-aminobutirato aminotransferase, mitocondrial	-1,56	Processos biossintéticos e catabólicos do ácido gamma-aminobutírico (GABA); Desenvolvimento do cerebelo; Comportamento de exploração; Resposta às drogas; Resposta à hipóxia
P63041	Complexina-1	-1,56	Regula positivamente um passo tardio na exocitose de várias vesículas citoplasmáticas, tais como vesículas sinápticas e outras vesículas secretoras; Impede SNAREs de liberar neurotransmissores até que um potencial de ação chega à sinapse

P31596	Transportador de aminoácidos excitatório 2	-1,57	Transporta L-glutamato e também L- e D-aspartato. Essencial para terminar a ação pós-sináptica do glutamato removendo rapidamente o glutamato liberado da fenda sináptica
Q02563	Glicoproteína de vesícula sináptica 2A	-1,63	Desempenha um papel no controle da secreção regulada em células neurais e endócrinas, aumentando seletivamente a neurotransmissão de baixa frequência. Regula positivamente a fusão das vesículas, mantendo o conjunto prontamente liberável de vesículas secretoras
Q6PST4	Atlastina- 1	-1,66	Axonogênese
P18088	Glutamato descarboxilase 1	-2,13	Cataliza a produção de GABA
Q5RJL0	Ermina	-2,33	Desempenha um papel nos rearranjos do citoesqueleto durante as fases de envolvimento tardio e / ou compactação da mielinogênese; Manutenção e estabilidade da bainha de mielina no adulto. Pode desempenhar um papel na maturação da oligodendroglia e formação de nó de mielina / Ranvier durante o desenvolvimento do SNC; Podem estar envolvidas na manutenção e plasticidade de estruturas relacionadas no SNC maduro
P04094	Proencefalina-A	-2,44	Percepção da dor e respostas ao estresse; Libertação de glutamato; comportamento agressivo; Resposta comportamental do medo; Proliferação celular glial; Resposta à hipóxia
A8WCF8	Proteína de tumor p63-regulated gene 1-like	-2,98	Vesícula Sináptica
G3V9B3	Glicoproteína associada à mielina (MAG)	-6,68	Molécula de adesão no desenvolvimento neural pós-natal que medeia as interações célula-célula dependentes de ácido siálico entre células neuronais e mielinizantes; Inibidora do crescimento de neuritos e regeneração axonal

Tabela 2. Lista das proteínas diferencialmente abundantes, na comparação entre tratado vs. controle para cada tipo de lesão cortical, com alguma função geral na resposta imune/ inflamatória e/ou resposta ao estresse oxidativo. Fontes para funções: UniProt, STRING and PubMed.

Nº de Acessos	Descrição	Fold change	Evidências de funções na resposta imune/inflamatória e/ou resposta ao estresse oxidativo
Isq (M) vs (C): Positivamente reguladas			
P27139	Anidrase carbônica 2	-1,52	Envolvida na reabsorção óssea e na diferenciação de osteoclastos; Hidratação reversível de dióxido de carbono
A0A0H2UHM3	Haptoglobina	-1,52	Captura e combina-se com hemoglobina livre do plasma para permitir a reciclagem hepática do íon de ferro; Atua como um antioxidante e desempenha um papel na modulação da resposta de fase aguda; Influenciam as propriedades inflamatórias da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)
P18418	Calreticulina	-1,54	Regulação positiva do ciclo celular; Regulação positiva da proliferação celular; Regulação positiva da quimiotaxia das células dendríticas; Regulação positiva da sinalização NIK / NF-kappaB; Regulação positiva da fagocitose
A0A0G2JW12	Complement C4	-1,61	Ativação do complemento; Resposta pró-inflamatória
P04041	Glutathiona peroxidase 1	-1,69	Funciona na desintoxicação do peróxido de hidrogênio, e é uma das mais importantes enzimas antioxidantes
P11762	Galectina-1	-1,79	Desempenha um papel na apoptose, proliferação celular e diferenciação celular; Forte indutor da apoptose das células T; regulação negativa do desenvolvimento da projeção dos neurônios; Regulação positiva da sinalização de I-kappaB quinase / NF-kappaB; É um membro de uma família de lectinas com funções imunomoduladoras
P84087	Complexina-2	-1,82	Desgranulação de mastócitos
P20059	Hemopexina	-1,83	Vincula heme e transporta-o para o fígado para reparo e recuperação de ferro; Regulação positiva da resposta imune humoral mediada por imunoglobulina circulante; Regulação positiva da produção de imunoglobulinas; Regulação positiva da via de sinalização mediada por interferon gama; Resultados conflitantes sobre a ação anti-inflamatória

Q62812	Miosina-9	-1,87	Pode desempenhar um papel na citocinese, forma celular e funções especializadas como secreção e capsulação
P23593	Apolipoproteína D	-1,94	Regulação negativa da produção de citocinas envolvida na resposta inflamatória; Pode promover reparo no SNC
P08699	Galectina-3	-2,07	Envolvido em respostas inflamatórias agudas, incluindo a ativação de neutrófilos e adesão e quimioatração de monócitos macrófagos
P48199	Proteína C reativa	-2,12	Exibe várias funções associadas com a defesa do hospedeiro; Podem interagir com DNA e histonas e podem destruir material nuclear liberado de células circulantes danificadas; regulação negativa da produção de ânion superóxido; É um marcador para a inflamação
P31720	Complemento C1q subcomponente da subunidade A	-2,14	Ativação do complemento; O C1q tem um papel supressor fundamental na resposta imune; A interação entre a cauda de colágeno C1q e LAIR-1 impede a produção de interferon tipo I e de citocinas inflamatórias
M0RBJ7	Complemento C3	-2,23	Ativação do complemento; Resposta inflamatória; Efeitos pro inflamatórios em células neurais
P14562	Glicoproteína de membrana associada a lisossoma 1	-2,33	Apresenta ligantes de carboidratos para selectinas. Também está implicada na metástase de células tumorais
P04762	Catalase	-2,79	Ocorre em quase todos os organismos que respiram aerobicamente e serve para proteger as células dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio; Promove o crescimento de células
P06762	Heme oxigenase 1	-3,01	cliva o anel heme na ponte alfa meteno para formar a biliverdina; Exibe efeitos citoprotetores uma vez que o excesso de heme livre sensibiliza células para sofrer apoptose; Regulação negativa da via de sinalização da apoptose extrínseca via receptores do domínio de morte; Regulação negativa da produção de citocinas de mastócitos; Regulação negativa do processo apoptótico dos neurónios
M0R3V7	Permutador de sódio / cálcio 1	-3,85	Rapidamente transporta Ca (2+) durante o acoplamento excitação-contração. Ca (2+) é extrudida a partir da célula durante o relaxamento, impedindo a sobrecarga de reservas intracelulares

FM3F8	Subunidade gamma da proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina tipo II	-8,9	A proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina que funciona de forma autónoma após ligação de Ca (2 +) / calmodulina e autofosforilação
-------	---	------	--

Abl (M) vs (C): Positivamente Reguladas

M0RBJ7	Complemento C3	6,39	Ativação do complemento; Resposta inflamatória; Efeitos proinflamatórios em células neurais
P30152	Lipocalina associada a gelatinases de neutrófilos	5,55	Envolviada na imunidade inata, possivelmente por sequestrar ferro, levando a limitar o crescimento bacteriano e contribuindo para o excesso de ferro livre não se acumular no citoplasma; É expressa em neutrófilos e em nível baixo no rim; Biomarcador para doenças renais
P48199	Proteína C-reativa	5,21	Exibe várias funções associadas com a defesa do hospedeiro; Podem interagir com DNA e histonas e podem destruir material nuclear liberado de células circulantes danificadas; regulação negativa da produção de ânion superóxido; É um marcador para a inflamação
P07151	Beta-2-microglobulina	4,22	Componente do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC); Envolvidos na apresentação de antígenos peptídicos ao sistema imunitário; Tem sido demonstrado ser elevado em inflamações crónicas, e na superfície de linfócitos e monócitos são particularmente ricos em β 2M, sendo regulados por interferons e citocinas pró-inflamatórias; Não está claro se β 2M é apenas um marcador de inflamação ou se tem um efeito patogénico direto
P31721	Complemento C1q subcomponente subunidade B	3,83	Ativação do complemento; O C1q tem um papel supressor fundamental na resposta imune; A interação entre a cauda de colágeno C1q e LAIR-1 impede a produção de interferons tipo I e de citocinas inflamatórias
P24090	Alfa-2-HS-glicoproteína	3,72	Desenvolvimento do córtex cerebral; É comumente presente na placa cortical do córtex cerebral imaturo e na matriz hemopoética da medula óssea; É um mediador anti-inflamatório que participa na desativação de macrófagos
A0A0G2K3G0	Glicoproteína rica em histidina	3,16	Age regulando muitos processos, tais como complexo imunitário e clearance de patógenos, adesão celular, angiogênese, coagulação e fibrinólise; Na sépsis atua suprimindo a inflamação sistémica excessiva inibição; forte de ligação apertada de neutrófilos a vasculatura pulmonar

P20059	Hemopexina	2,79	Vincula heme e transporta-o para o fígado para reparo e recuperação de ferro; Regulação positiva da resposta imune humoral mediada por imunoglobulina circulante; Regulação positiva da produção de imunoglobulinas; Regulação positiva da via de sinalização mediada por interferão gama; Resultados conflitantes sobre a ação anti-inflamatória
P04639	Apolipoproteína A-I	2,78	Atividade transportadora de colesterol; Efeitos anti-inflamatórios sobre macrófagos e células endoteliais
P06399	Fibrinogénio cadeia alfa	2,77	Juntamente com fibrinogénio beta (FGB) e fibrinogénio gama (FGG), polimerizam-se para formar uma matriz de fibrina insolúvel, um dos componentes primários dos coágulos sanguíneos; Um papel proinflamatório para o fibrinogénio tem sido relatado em várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, lesão medular e trauma cerebral
A0A0H2UHM3	Haptoglobina	2,73	Captura e combina com hemoglobina livre de plasma para permitir a reciclagem hepática do íon ferro; Age como um antioxidante, e desempenha um papel na modulação de muitos aspectos da resposta de fase aguda; Influenciam as propriedades inflamatórias da Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)
P02680	Fibrinogênio cadeia gama	2,51	Juntamente com fibrinogênio alfa (FGA) e fibrinogênio beta (FGB), polimeriza para formar uma matriz de fibrina insolúvel, e tem uma função principal na hemostasia como um dos principais componentes de coágulos sanguíneos; Um papel proinflamatório para o fibrinogênio tem sido relatado em várias doenças, incluindo acidente vascular cerebral, lesão medular e trauma cerebral
A0A0G2JW12	Complemento C4	2,09	Ativação do complemento; Resposta pró-inflamatória
P18292	Protrombina	2,05	Regulação positiva da coagulação sanguínea; Funções na homeostase do sangue, inflamação e cicatrização de feridas

De forma a verificar uma possível relação funcional entre proteínas que apresentaram resultados opostos na sua expressão entre os contrastes Isq M/C and Abl M/C, uma análise da rede funcional foi realizada, e nenhuma relação funcional significativa foi encontrada (dados não mostrados). Além disso, análise Go term foi feita e nenhum processo biológico claro ou relação funcional foi observado (Tabela 3). Na realidade, para sete proteínas nenhum Go term foi encontrado na análise com Blast2GO.

Tabela 3. Análises Go term de proteínas diferencialmente abundantes que apresentaram efeitos opostos no tratamento em cada tipo de lesão. Fonte: Blast2GO.

Nº de Acessos	Descrição	Análises GO term*
Positivamente Regulada em Isq (M) vs (C) e Negativamente Regulada em Abl (M) vs (C)		
A0A0G2K9L2	Proteína Tom1l2	P: transporte intracelular de proteínas; C: intracelular
Negativamente Reguladas em Isq (M) vs (C) e Positivamente Reguladas em Abl (M) vs (C)		
A0A0G2JW12	Complemento C4	C: espaço extracelular; F: atividade inibidora de endopeptidase; C: membrana; C: componente integral da membrana; P: regulação negativa da atividade de endopeptidase; C: região extracelular; P: ativação do complemento, via clássica
A0A0G2JZL6	Proteína Ift122 (transporte intraflagelar 122)	C: cílio; P: processo metabólico do DNA; P: resposta ao estresse
A0A0G2K896	Proteína RGD1310507	C: membrana; C: componente integral da membrana
A0A0H2UHM3	Haptoglobina	P: proteólise; F: atividade de endopeptidase de tipo serina; F: atividade de peptidase de tipo serina; F: atividade peptidase; F: atividade da hidrolase
D3ZFC6	Proteína Itih4	Nenhum
D3ZW34	ADAM-like, decysin 1 (Previsto)	P: proteólise; C: membrana; C: componente integral da membrana; F: atividade metaloendopeptidase; F: atividade da metalopeptidase
D4A9T5	Proteína Efh1	F: ligação de íon cálcio
E9PT53	Proteína Wfs1	Nenhum
F1LSG8	Sindetina	Nenhum
F1LXY6	Proteína Não Caracterizada	Nenhum
F6Q5G6	Proteína Aplf	Nenhum
M0RBJ7	Complemento C3	C: espaço extracelular; F: atividade inibidora de endopeptidase; C: membrana; C: componente integral da membrana; P: regulação negativa da atividade de endopeptidase; C: região extracelular; P: ativação do complemento, via clássica

P20059	Hemopexina	Nenhum
P24368	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	P: processo de modificação de proteínas celulares; P: dobragem de proteínas; F: actividade de isomerase
P48199	proteína C-reativa	P: resposta de fase aguda; P: ativação do complemento, via clássica; F: ligação de partículas de lipoproteína de baixa densidade
Q32KJ6	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	P: processo metabólico
Q66H12	alfa-N-acetilgalactosaminidase	C: lisossoma; F: actividade hidrolase, atuando sobre ligações glicosil
Q6AY20	receptor de manose-6-fosfato dependente de cátion	Nenhum
Q6AYJ0	Serina / treonina-proteína fosfatase	C: citoplasma; F: actividade fosfatase; C: nucléolo
Q9R1T3	Catepsina Z	C: espaço extracelular; P: processo catabólico; F: actividade peptidase; C: lisossoma

*** P, Processo Biológico; C, Componente Celular; F, função molecular.**

5- DISCUSSÃO

O tratamento de lesões agudas do SNC com células-tronco mesenquimais (MSCs) e CMMOs derivadas da medula óssea, sangue periférico ou cordão umbilical tem sido extensamente estudados e os resultados tem mostrado efeitos positivos evidentes tanto na redução do tecido danificado quanto promovendo recuperação neurológica significativa. Esses resultados justificam o grande número de ensaios clínicos que estão em andamento por todo mundo e há uma forte expectativa de que esta terapia pode ser eficaz no tratamento de vítimas de acidente vascular cerebral (AVC) ou lesões do SNC. Entretanto, a completa compreensão de mecanismos moleculares e celulares que envolvem a promoção da recuperação tecidual e funcional resgatada por CMMOs está muito longe de ser alcançada.

Proteômica e transcriptômica são procedimentos experimentais que têm sido utilizados para auxiliar no objetivo de aumentar essa compreensão, uma vez que permite a identificação e quantificação relativa de múltiplas proteínas ou genes. Assim, deve ser possível não só identificar uma proteína específica como marcadora de um processo fisiológico específico, mas também uma via funcional completa. Existem alguns estudos proteômicos recentes em modelos de acidente vascular cerebral e lesão cerebral traumática, em que proteínas são descritas como sendo diferencialmente abundantes no tecido lesado em comparação com o tecido não afetado (Brea et al., 2015; Chen et al., 2007; Chen et al., 2014; Chen et al., 2015; Di Domenico et al., 2012; He et al., 2016; Koh, 2010; Jin et al., 2004; Campos-Martorell et al., 2014; Scornavacca et al., 2012; Seo et al., 2013; Sung et al., 2009; Sung et al., 2016; Zgavc et al., 2013). Contudo, existem poucos estudos que utilizaram estas abordagens para avaliar as proteínas ou genes expressos diferencialmente em resposta ao tratamento com MSCs. Um perfil de expressão genética foi feito num modelo de rato de lesão cerebral traumática (TCE) em resposta ao tratamento com MSC humanas (Qu et al., 2011). Além disso, foi feita uma análise proteômica em um modelo de rato submetido à isquemia cerebral também em resposta ao tratamento com MSC humanas, derivadas de cordão umbilical (He et al., 2016).

Até o momento, que seja do nosso conhecimento, esse estudo foi o primeiro a fazer uma análise proteômica a fim de verificar o efeito do tratamento com CMMOs em um modelo de isquemia cerebral. Além disso, foi o primeiro a avaliar e comparar dois tipos de lesão cerebral.

A comparação das respostas neurológicas e teciduais entre a lesão isquêmica cortical e a ablação cortical tem sido feita e têm-se mostrado que cada tipo de lesão promove diferentes respostas (Szele et al., 1995; Napieralski et al., 1998; Voorhies e Jones, 2002; Carmichael, 2003; Gonzalez e Kolb, 2003). Em geral, a lesão isquêmica promove uma maior plasticidade evidente das conexões corticais e maior excitabilidade das sinapses corticais do que a lesão por ablação, mesmo quando a região e a extensão de ambas as lesões são as mesmas (Carmichael, 2003). Nossos resultados confirmam e estendem a evidência de efeito diferencial de cada tipo de lesão no tecido cortical e sugerem que o efeito terapêutico das CMMOs funciona por diferentes mecanismos moleculares em cada tipo de lesão. Uma evidência clara deste efeito diferencial é o número muito reduzido de proteínas sobrepostas com o mesmo efeito no nível de expressão (tanto reguladas positiva quanto negativamente), e a maioria delas foram alteradas de forma exclusiva em um dos modelos. Além disso, um número significativo de vinte proteínas foi regulado negativamente pelo tratamento com as CMMOs no contraste Isq M/C mas foram regulados positivamente no contraste Abl M/C. Este resultado também reforça que os mecanismos envolvidos em cada tipo de lesão são bastante diferentes, uma vez que numa situação em que o efeito do tratamento para promover a recuperação resulta no aumento da expressão de pelo menos vinte proteínas, no outro o mesmo efeito depende da diminuição da expressão das mesmas proteínas.

Nossa análise funcional não revelou qualquer via funcional específica para esclarecer os mecanismos envolvidos e, na verdade, poucas proteínas apresentaram um papel descrito ou suposto na neuroplasticidade.

Podemos citar os complementos C3 e C4, que desempenham um papel descrito na eliminação sináptica durante o desenvolvimento, levando a um refinamento necessário das conexões sinápticas (Stevens et al., 2007;

Schafer et al., 2012). Entretanto, sua ação também pode se apresentar como deletéria, uma vez que a sua ação exacerbada é relacionada com perda sináptica patológica e doenças neuronais e psiquiátricas (Hakobyan et al., 2005; Sekar et al., 2016). Atualmente, um estudo recente sugeriu que o efeito neuroprotetor das MSCs em um modelo de isquemia cerebral focal transitente em camundongos seria através da regulação negativa de C3 (Jung et al., 2016).

Além disso, podemos citar também a proteína Efhd1 que podem desempenhar papéis na diferenciação neuronal e extensão de neuritos (Tominaga et al., 2006) e a proteína fosfatase serina/treonina, isoforma gama da unidade catalítica da calcineurina, que é ligada a receptores para alguns neurotransmissores, e relacionada com várias anormalidades características de esquizofrenia (Eastwood et al., 2005a e 2005b).

Em relação à avaliação geral das proteínas reguladas positiva e negativamente para cada contraste avaliado em relação ao tratamento vs. controle, foi encontrado um efeito oposto entre cada tipo de lesão. Pelo menos nove proteínas reguladas positivamente no contraste Isq M/C foram todas proteínas conhecidas por terem um claro efeito positivo na neuroplasticidade, envolvendo a excitabilidade glutamatérgica e a ação neurotrófica. Espera-se que esta ação promova a recuperação neurológica. Outras proteínas com funções neuronais foram reguladas negativamente na Isq M/C, mas o efeito real positivo ou negativo na neuroplasticidade causada por esta regulação negativa não está claramente definido. Em relação às proteínas relacionadas às respostas de estresse imunológico/oxidativo, somente as proteínas reguladas negativamente com esta caracterização funcional foram encontradas no Isq M/C. Assim, parece que o efeito da CMMOs no cérebro isquêmico se deve a uma diminuição geral da resposta imune, o que pode sugerir redução na resposta inflamatória. O efeito do tratamento no contraste Abl M/C foi o oposto. Em relação às proteínas relacionadas às respostas imune e ao estresse oxidativo, apenas as proteínas reguladas com esta caracterização funcional foram encontradas. Isso pode sugerir que no tecido ablado é positivo promover um aumento da resposta imune. Além disso, treze proteínas com

funções neuronais, possivelmente envolvidas na neuroplasticidade, foram negativamente reguladas. No entanto, outras cinco proteínas com funções neuronais descritas foram reguladas positivamente, incluindo as proteínas envolvidas no sistema complemento (C1q, C3 e C4). Mais uma vez, não é fácil de determinar um efeito positivo ou negativo das regulações positivas e negativas, assumindo potenciais tanto positivos quanto prejudiciais destas proteínas diferencialmente expressas no tecido nervoso. No entanto, a regulação positiva da MAP-2 deve ser sugestiva de uma correlação positiva entre um efeito protetor do tratamento e uma recuperação tecidual. MAP-2 é expressa em neuritos, especialmente na arborização dendrítica, e é usado como marcador de neurodegeneração e perda dendrítica (Johnson and Jope, 1992; Marín-Padilla, 2015). Assim, a expressão aumentada de MAP-2 pode indicar um efeito de preservação das CMMOs no tecido ablado.

6- CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram um grande número de proteínas diferencialmente expressas como um efeito do tratamento em ambos os modelos de lesão cortical. Além disso, a comparação entre tipos de lesão mostrou ainda um grande número de proteína com expressão alterada, o que está de acordo com evidências anteriores de efeito diferencial na resposta ao dano tecidual entre esses tipos de lesões, incluindo permissividade a mudanças plásticas. Nosso trabalho deve apoiar estudos futuros mais específicos focados em avaliar o efeito do tratamento em diferentes vias funcionais, assim como o efeito diferencial promovido no tecido lesionado por cada tipo de lesão.

Esperamos que nossos resultados contribuam para esclarecer os mecanismos subjacentes da ação protetora das células mononucleares da medula óssea no tecido cortical lesionado.

7- MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Lista das proteínas reguladas positivamente observadas na comparação Isq (M) vs. (C).

Nº de acesso	Contagem de peptideos	Taxa de Confidência	Descrição	Média da quantidade total de íons- Isq (M)	Média da quantidade total de íons- Isq (C)	Fold change
Q510E7	4	26,2	Proteína contendo domínio emp24 transmembranar 9	2110,7	43,3	48,80
P84082	15	196,7	Fator de ribosilação-ADP 2	5299,4	177,3	29,89
Q5XIE6	2	10,5	3-hidroxiisobutiril-CoA hidrolase, mitocondrial	465,9	33,8	13,80
A0A0G2JUB4	7	41,0	Acetil-CoA acetiltransferase, citosólica	425,6	44,8	9,50
Q63707	3	16,5	Dihidroorotato desidrogenase (quinona), mitocondrial	21066,5	3724,2	5,66
D3ZCB9	3	30,3	Proteína Fam92b	1882,1	337,2	5,58
F1M787	16	100,3	Catenina delta-2	165097,4	32644,2	5,06
Q71RJ2	2	11,5	Subunidade gamma-2 do canal de cálcio dependente de voltagem	830,6	196,0	4,24
Q6AYJ7	7	50,2	Chaperonina contendo Tcp1, subunidade 6B (Zeta 2)	383,7	104,8	3,66
G3V9K7	2	16,2	Repetição rica em leucina contendo 23, isoforma CRA_a	4822,0	1604,8	3,00
Q5XIG4	3	17,6	Proteína 1 contendo o domínio OCIA	711,4	246,2	2,89
Q99MZ4	4	27,3	Gamma-glutamyltransferase 7	15659,2	5435,6	2,88
Q63569	18	124,7	26S subunidade reguladora de protease 6A	224081,6	85479,3	2,62
D3ZW55	6	43,4	Inosina trifosfato pirofosfatase	6291,1	2410,6	2,61
M0R7U1	18	119,7	Proteína Ak5	106013,6	42760,3	2,48
F1LQP7	2	16,1	Proteína Crtac1	2611,5	1087,1	2,40
Q9QUH6	36	242,0	Ras / Rap Proteína ativadora de GTPase SynGAP	198766,8	83226,5	2,39
D3ZDH8	25	287,3	Glicoproteína plaquetária Ib cadeia beta	19244,0	8311,8	2,32
Q56A26	5	35,9	Oligodendrócito mielina paranodal e proteína do laço interno	16480,8	7187,1	2,29
Q9WVR7	5	29,6	Proteína fosfatase 1F	34724,0	15453,2	2,25
D3ZQG9	4	24,0	Proteína LOC100364500	780,8	358,7	2,18
Q3KRE0	6	33,4	Proteína 3 contendo domínio AAA da família ATPase	3995,1	1913,6	2,09
P69682	6	35,8	Adaptina proteína associada ao revestimento da ligação da orelha 1	18650,8	8984,4	2,08
D4A2Q3	17	146,6	Proteína Psd3	9079,8	4454,6	2,04
Q5EB62	3	17,4	Família portadora de solutos 25 membro 46	6870,3	3391,6	2,03
Q566R0	4	22,1	Acil-coenzima A tioesterase THEM4	15415,6	7614,6	2,02
Q63108	4	23,3	Carboxilesterase 1E	3877,2	1934,8	2,00
P23514	10	58,5	Subunidade beta Coatomer	23318,5	11709,5	1,99
O35077	20	214,3	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD (+)], citoplasmático	378934,3	192059,6	1,97
P28470	2	10,7	Subunidade B da calcineurina tipo 2	3145,3	1629,2	1,93
G3V7U8	2	13,2	Subunidade 5 da proteína 2/3 relacionada com a actina	17915,7	9318,4	1,92
D3ZJ19	4	29,0	Proteína de ligação ao ADN SATB	2533,6	1320,2	1,92
P97612	8	58,0	amida hidrolase de ácido graxo 1	5870,8	3074,7	1,91
Q5MJ12	4	23,4	F-box / LRR-repeat protein 16	6555,8	3463,0	1,89
P0DMW1	16	167,0	Proteína de 70 kDa de choque térmico 1B	74627,1	40535,1	1,84
A0A0G2QC04	6	39,7	Proteína Pls1	52589,7	28834,2	1,82
M0RDJ4	8	70,8	Fator de maturação da glia beta	73032,8	40286,0	1,81

Nº de acesso	Contagem de peptídeos	Taxa de Confidência	Descrição	Média da quantidade total de Ions- Lsq (M)	Média da quantidade total de Ions- Lsq (C)	Fold change
P31016	24	186,4	Disk grande homólogo 4	49557,5	27891,2	1,78
F1M5N4	18	152,6	Enzima málica	134165,9	76478,2	1,75
Q6P9V1	4	63,2	Tetraspanina	123649,5	70803,6	1,75
A0A0G2K9L2	13	98,8	Proteína Tom1l2	14612,0	8421,6	1,74
A0A0G2K5N6	5	35,9	Proteína quinase associada a Rho	4618,3	2679,3	1,72
B0BN83	6	50,9	Armadillo repetição contendo proteína 1	86746,9	52606,8	1,65
P19492	9	48,7	Receptor de glutamato 3	2631,7	1628,4	1,62
P60522	2	12,8	Proteína semelhante ao receptor do ácido gama-aminobutírico 2	8017,6	4988,6	1,61
A0A0G2JSQ1	12	156,6	Beta-sinucleína	219218,2	138863,1	1,58
F1LTX8	2	12,6	Proteína Lpgat1	2769,0	1757,3	1,58
Q5RK11	19	139,8	Factor de iniciação eucariótica 4A-II	4846,1	3086,9	1,57
F1LMC3	19	218,1	Subunidade gamma da proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina tipo II	35614,6	22720,9	1,57
M0R544	5	33,1	Glucosidase, alfa, ácido, isoforma CRA_a	25904,7	16564,9	1,56
Q05764	30	226,8	Beta-adducina	115623,8	74246,5	1,56
Q6P6V0	35	409,2	Glucose-6-fosfato isomerase	703536,0	455380,4	1,54
Q5QD51	3	28,3	A-quinase 12	10933,0	7196,3	1,52
P21396	11	79,9	Amina oxidase [contendo flavina] A	28382,4	18805,1	1,51
Q6AY07	21	270,7	Fructose-bisfosfato aldolase	20215,8	13422,6	1,51
P11240	11	134,2	Subunidade citocromo c oxidase 5A, mitocondrial	455258,1	686816,0	-1,51
F1LQS9	5	38,3	Fator de troca Rho guanina nucleotídeo 11	13235,0	19971,1	-1,51
Q63416	21	154,8	Inibidor da inter-alfa-tripsina cadeia pesada H3	65183,3	98464,1	-1,51
Q6MG60	12	101,7	N (G), N (G) -dimetilarginina dimetilaminohidrolase 2	59409,3	89914,3	-1,51
P27139	17	167,1	Anidrase carbônica 2	299358,0	453721,4	-1,52
A0A0H2UHM3	21	188,4	Haptoglobina	207090,8	314153,6	-1,52
F1M853	3	16,4	Proteína Rrbp1	9122,3	13899,2	-1,52
Q5XIV1	21	197,2	Fosfoglicerato-quinase	14502,6	22108,1	-1,52
A0A0G2K677	15	101,9	Proteína Sptbn4	35301,7	53849,8	-1,53
Q63910	9	91,0	Alfa globina	12967,3	19835,7	-1,53
P18418	29	297,8	Calreticulina	612547,8	942154,2	-1,54
Q4V7C6	15	96,3	GMP sintase [glutamina-hidrolisadora]	13856,3	21338,8	-1,54
Q5XFX0	16	158,3	Transgelina-2	129155,6	200154,3	-1,55
Q3MID5	8	51,5	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase tipo-1 gama	10176,6	15781,2	-1,55
A0A0G2K896	12	75,0	Proteína RGD1310507	8913,8	13925,0	-1,56
G3V8L3	32	236,5	Lamina A, isoforma CRA_b	7480,3	11697,0	-1,56
P04785	31	303,4	Proteína dissulfureto-isomerase	285279,4	449981,2	-1,58
Q9EPB1	7	47,9	Dipeptidil peptidase 2	27334,6	43443,0	-1,59
B0BNM9	3	22,0	Proteína de transferência de glicolípídeos	7073,9	11368,3	-1,61
A0A0G2JW12	50	360,7	Complemento C4	49869,4	80413,7	-1,61
P54319	8	44,5	Proteína ativadora da fosfolipase A2	37615,7	60724,3	-1,61
Q6Q0N1	22	192,6	Dipeptidase não-específica citosólica	147950,0	240674,1	-1,63
P85845	25	236,2	Fascina	60182,1	99436,0	-1,65
P14604	12	111,1	Enoil-CoA hidratase, mitocondrial	84326,0	139531,3	-1,65

Nº de acesso	Contagem de peptídeos	Taxa de Confidência	Descrição	Média da quantidade total de Ions- Lsq (M)	Média da quantidade total de Ions- Lsq (C)	Fold change
Q6IFW6	8	72,0	Queratina, tipo I citoesquelético 10	9062,0	15116,2	-1,67
Q6AYC4	10	68,8	Proteína de cobertura de macrófagos	54123,5	90530,2	-1,67
D3Z840	3	18,1	Protein Fanci	9081,9	15196,0	-1,67
P04041	4	29,9	Glutathione peroxidase 1	39748,2	67072,5	-1,69
D3ZSE0	2	13,0	40S proteína ribossomal S21	1487,0	2511,5	-1,69
A0A0G2JV84	2	10,4	Proteína Gpt2	1729,5	2953,5	-1,71
F1M0L7	28	274,6	Annexina	218479,8	373374,3	-1,71
B0BNA5	10	90,4	Proteína Coactosina-like	82689,9	141615,7	-1,71
Q9EPH8	26	187,6	Proteína de ligação a poliadenilato 1	30445,6	52433,0	-1,72
P24368	16	140,1	A peptidil-proilil cis-trans isomerase B	98393,2	169551,4	-1,72
Q3KR86	31	231,8	Subunidade complexa Micos Mic60	8368,0	14858,3	-1,78
P68101	5	28,6	Subunidade 1 do factor 2 de iniciação da tradução eucariótica	7614,8	13536,5	-1,78
P11762	8	85,9	Galectina-1	68972,4	123436,0	-1,79
A0JN30	4	24,1	Canopy 2 homólogo (peixe-zebra)	9627,7	17249,3	-1,79
P38983	6	47,3	40S proteína ribossomal SA	16241,8	29250,1	-1,80
Q9R0J8	6	45,9	Legumain	10637,4	19195,9	-1,80
P84087	7	60,4	Complexina-2	11370,3	20642,8	-1,82
E9PT53	2	11,0	Proteína Wfs1	154781,7	282258,3	-1,82
P20059	32	387,1	Hemopexina	910335,1	1668108,8	-1,83
P17046	8	68,6	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	21771,3	40186,2	-1,85
Q66H5	11	138,1	Ferritina	235245,8	436357,7	-1,85
Q62812	70	506,1	Miosina-9	4234,5	7923,4	-1,87
P49134	9	51,1	Integrina beta-1	3136,3	5897,0	-1,88
D3ZCR3	6	49,5	Proteína Hmg111	29385,3	55273,6	-1,88
P13383	10	76,9	Nucleolina	29171,9	55238,9	-1,89
D3ZT36	5	26,5	Proteína Adam23	13443,3	25507,9	-1,90
P08753	15	144,0	Guanina nucleotídeo-ligação proteína G (k) subunidade alfa	6226,3	11845,8	-1,90
Q6AY20	2	13,1	Receptor de manose-6-fosfato dependente de cátion	4750,6	9040,6	-1,90
Q9R1T3	9	68,6	Cathepsina Z	36350,8	69704,6	-1,92
Q9EQS0	17	140,4	Transaldolase	146658,6	281404,1	-1,92
B0BNN3	10	108,9	Anidrase carbonica 1	60937,5	117252,6	-1,92
P22734	6	37,9	Catecol O-metiltransferase	18626,1	35886,3	-1,93
P00787	21	235,1	Cathepsina B	295208,9	571859,9	-1,94
D3ZD11	2	12,2	Proteína Spcs2	1710,8	3316,9	-1,94
P23593	3	18,1	Apolipoproteína D	2812,7	5470,4	-1,94
Q4G075	14	129,0	Inibidor de elastase de leucócito A	164407,3	323575,7	-1,97
P01946	16	206,6	Subunidade de hemoglobina alfa-1/2	1769110,5	3482092,3	-1,97
P35434	4	40,9	ATP sintase subunit delta, mitocondrial	97658,5	194264,3	-1,99
A0A0G2K4H7	8	66,8	Proteína Krt78	3128,3	6243,8	-2,00
D3ZF61	3	21,5	Proteína Rarg	29657,2	59270,5	-2,00
P09495	15	120,2	Tropomiosina cadeia alfa-4	13438,3	26964,0	-2,01
Q62826	28	191,3	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea M	305,8	626,1	-2,05

Nº de acesso	Contagem de peptideos	Taxa de Confidência	Descrição	Média da quantidade total de ions- lsq (M)	Média da quantidade total de ions- lsq (C)	Fold change
Q920A6	6	43,3	Serina carboxipeptidase indutível por retinoide	18457,8	38076,1	-2,06
P08699	7	54,4	Galectina-3	45358,6	93787,8	-2,07
G3V8V1	13	105,1	Granulin, isoform CRA_c	41485,5	85823,9	-2,07
P07153	14	93,7	Subunidade Dolichil-difosf iligossacarídeo - proteína glicosiltransferase 1	2428,3	5025,0	-2,07
Q32KJ6	2	10,7	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	4670,0	9688,1	-2,07
D3ZFC6	36	309,2	Proteína Ith4	202564,6	427578,4	-2,11
P48199	4	40,7	Proteína C-reativa	48311,1	102418,6	-2,12
P15429	20	204,7	Beta-enolase	22174,5	47050,0	-2,12
P31720	2	22,1	Complemento C1q subcomponente subunidade A	6975,9	14925,1	-2,14
P11517	19	288,1	Hemoglobina subunidade beta-2	280232,5	606868,4	-2,17
F1LXY6	2	13,0	Proteína não-caracterizada	3409,4	7410,6	-2,17
M0RBJ7	88	953,7	Complemento C3	80947,2	180391,5	-2,23
F1M9D0	2	10,4	Proteína Map3k2	5238,1	11802,7	-2,25
M0RC99	8	56,0	Proteína Rab-5A relacionada com Ras	3209,6	7240,3	-2,26
Q6TUF3	3	16,8	LRRGT00091	2452,3	5570,2	-2,27
Q6P6T6	22	250,0	Cathepsina D	70963,1	163201,0	-2,30
A0A0G2KAW4	6	39,6	Thimet oligopeptidase	7295,5	16967,8	-2,33
P14562	5	37,2	Glicoproteína de membrana associada a lisossoma 1	2851,6	6645,1	-2,33
Q63556	3	25,1	Inibidor da serina protease A3M	1019,8	2496,1	-2,45
F7FJQ3	5	40,6	Niemann Pick tipo C2	16971,5	42781,3	-2,52
Q6AXR4	4	29,7	Subunidade Beta-hexosaminidase beta	2109,2	5327,0	-2,53
D3ZW34	2	11,2	ADAM-like, decysin 1 (Previsto)	10741,2	27128,8	-2,53
P47967	6	40,6	Galectina-5	2602,9	6634,6	-2,55
A0A0G2JZL6	2	11,5	Proteína Ift122	1373,6	3540,0	-2,58
D4A9T5	6	38,7	Proteína Efhd1	4837,2	12487,0	-2,58
A0A0G2K0D8	26	149,5	10-formiltetrahydrofolato desidrogenase	45046,3	116535,8	-2,59
Q6AYS3	2	11,7	Protective protein for beta-galactosidase	4073,7	10618,1	-2,61
A0A096MJB5	7	45,1	Proteína Unc45b	112560,1	298216,3	-2,65
P23562	10	68,3	Proteína de transporte aniônico da banda 3	11294,4	29934,4	-2,65
D3ZZC1	12	73,8	Proteína Txnc5	20780,4	55279,6	-2,66
P27615	2	20,1	Proteína de membrana de lisossoma 2	5628,4	15167,7	-2,69
O70593	7	51,2	Proteína alfa contendo proteína tetratricopeptídica rica em glutamina	9627,7	26470,5	-2,75
D3ZXY4	2	10,5	Proteína Aldh8a1	27297,6	76052,6	-2,79
P04762	5	30,3	Catalase	2358,0	6575,0	-2,79
Q00715	8	118,4	Histona H2B tipo 1	51077,5	144874,1	-2,84
A0A0G2JSW3	17	283,6	Hemoglobina subunidade beta-1	183327,9	533138,7	-2,91
D3ZEF9	2	11,0	Proteína B3gnt2	606,8	1778,6	-2,93
D3ZKP9	23	153,4	Subunidade alfa-2 / delta-1 do canal de cálcio dependente de voltagem	23715,3	71229,5	-3,00
P06762	7	72,3	Heme oxigenase 1	11500,1	34563,4	-3,01
Q7TP54	28	260,7	Proteína FAM65B	80444,0	244728,7	-3,04
A0A0G2K0M8	38	382,2	Molécula de adesão celular neural 1	27514,4	84795,5	-3,08
F1LSG8	2	10,8	Sindetina	1068,8	3364,5	-3,15

Nº de acesso	Contagem de peptideos	Taxa de Confidência	Descrição	Média da quantidade total de íons- Isq (M)	Média da quantidade total de íons- Isq (C)	Fold change
Q6AYJ0	10	66,2	Serina / treonina-proteína fosfatase	2248,2	7202,8	-3,20
Q9EPC6	6	57,7	Profilina-2	17823,6	58692,1	-3,29
Q66H12	3	18,4	Alpha-N-acetilgalactosaminidase	2640,4	8722,6	-3,30
Q6P3V8	21	175,6	Factor de iniciação da tradução eucariótica 4A1	4890,8	16318,0	-3,34
P70579	5	34,2	Receptor de glutamato metabotrópico 8	477,4	1753,5	-3,67
M0R3V7	2	11,8	Permutador de sódio / cálcio 1	1985,6	7645,2	-3,85
Q4V7F0	3	21,9	Proteína repetição tetratricopeptídeo 23	1338,9	5513,4	-4,12
A1L1J4	3	16,8	Proteína fosfatase 2C, dependente do magnésio, subunidade catalítica	486,9	2085,6	-4,28
A0A096MJ81	3	24,2	Proteína Ranbp3l	16558,9	72307,8	-4,37
P38650	189	1436,5	Dinaína citoplasmática 1 cadeia pesada 1	5483,1	24934,8	-4,55
M0RC14	3	23,5	Proteína Cchcr1	15,2	79,3	-5,20
P50430	5	33,2	Ari sulfatase B	3267,1	17848,4	-5,46
F1M3F8	18	195,0	Subunidade gamma da proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina tipo II	3012,3	26812,9	-8,90
Q6AXW2	3	18,0	Proteína Tmod3	1282,2	12455,6	-9,71
F6Q5G6	2	11,0	Proteína Ap1f	6507,6	83371,9	-12,81
G3V8G2	8	45,5	Subunidade 26S de proteasoma (Prosome, macropaina), não ATPase, 5 (Previsto), isoforma CRA_a	10417,7	141163,3	-13,55
P05964	3	23,8	Proteína S100-A6	4941,1	67334,8	-13,63
Q6PCU0	18	189,9	Subunidade ATP sintase gama	291,4	12885,0	-44,22
D3ZSM9	2	17,0	Proteína Brat1	326,2	14579,9	-44,70
Q64268	2	11,5	Heparina cofator 2	0,0	1158,4	complete

Tabela S2. Lista de proteínas reguladas negativamente observadas na comparação Isq (M) vs. (C).

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média do total da contagem de íons- Abl (M)	Média do total da contagem de íons- Abl (C)	Fold Change
D3ZC89	2	10,3	Proteína Fam114a2	48987,2	381,4	128,43
A7M746	5	50,9	LOC681126 proteína	5983,6	284,9	21,00
B2RYC9	3	15,8	Glucosilceramidase	741,0	61,7	12,01
A0A0G2JZL6	2	11,5	Proteína Ift122	6386,4	590,5	10,81
F6Q5G6	2	11,0	Proteína Aplf	18702,2	1882,6	9,93
A0A0G2JZP4	6	35,3	Proteína não caracterizada	1558,3	164,6	9,47
D3ZBS9	3	16,6	Proteína Smarcd1	2941,4	364,7	8,07
M0RBJ7	88	953,7	Complemento C3	72069,1	11270,9	6,39
Z4YNS1	6	53,2	Proteína LOC100362709	15088,9	2470,2	6,11
Q641Y9	3	16,1	DALR proteína 3 contendo domínio de ligação ao anticódon	37825,3	6425,1	5,89
P30152	2	15,0	Lipocalina associada a gelatinases de neutrófilos	438,7	79,0	5,55
D4A9T5	6	38,7	Proteína Efh1	5352,2	976,9	5,48
P48199	4	40,7	Proteína C-reativa	42498,4	8151,8	5,21
D3ZW34	2	11,2	ADAM-like, decisina 1 (Previsto)	6287,6	1257,7	5,00
A0A0G2K3A6	2	20,7	Proteína LOC100359993	2320,5	470,1	4,94
Q5U206	10	101,0	Calmodulina-like proteína 3	7317,5	1594,1	4,59
F1MAC0	2	15,7	Proteína Ifi47	419,1	96,7	4,33
P07151	2	13,3	Beta-2-microglobulina	18199,2	4314,8	4,22
F1LTN6	5	58,0	Proteína Igkc	27633,7	6686,0	4,13
Q63041	76	811,5	Alpha-1-macroglobulina	1336529,8	323660,8	4,13
P20761	8	96,1	Ig gamma-2B cadeia C região	128635,2	31270,8	4,11
Q32KJ6	2	10,7	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	2924,9	728,1	4,02
A0A0G2JW69	12	86,1	Proteína Krt79	22272,5	5564,8	4,00
Q6P9V7	5	30,7	Subunidade 1 de activador de IProteasoma (Prosome, macropaina)	5079,0	1272,6	3,99
P31721	3	27,8	Complementar subunidade B do subcomponente C1q	22259,8	5809,0	3,83
A0A0G2K896	12	75,0	Proteína RGD1310507	4673,5	1250,8	3,74
P24090	18	238,1	Alpha-2-HS-glicoproteína	135546,9	36395,6	3,72
F1LPW0	6	45,5	Proteína Ighm	35609,5	9633,6	3,70
F1LXY6	2	13,0	Proteína não caracterizada	4411,6	1264,0	3,49
A0A0G2JY82	5	30,7	Proteína secretora associada à membrana transportadora 1	13373,8	4013,6	3,33
F1LNK0	108	1035,3	Proteína associada ao microtúbulo	1298,7	390,6	3,32
F1M983	21	153,9	Proteína Cfh	78854,7	23769,6	3,32
Q6T5F3	2	11,1	UDP-glucuronosiltransferase	22625,4	6833,9	3,31
A0A0G2K3G0	11	91,6	Glicoproteína rica em histidina	30030,6	9512,1	3,16
G3V8S9	7	61,6	Peptídeo antimicrobiano de catelicidina	40092,3	12880,2	3,11
A0A0G2K531	4	27,5	Glutathion peroxidase	14659,4	4788,1	3,06

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média do total da contagem de Ions- Abl (M)	Média do total da contagem de Ions- Abl (C)	Fold Change
F1LPV8	7	39,9	Succinil-CoA ligase subunidade beta	47292,5	15550,9	3,04
G3V7K3	36	299,2	Ceruloplasmina	19413,1	6906,4	2,81
P20059	32	387,1	Hemopexina	640958,9	229890,0	2,79
P04639	19	187,2	Apolipoproteína A-I	138367,4	49711,2	2,78
P06399	24	209,6	Fibrinogênio cadeia alfa	143862,6	51916,2	2,77
A0A0H2UHM3	21	188,4	Haptoglobina	211191,4	77251,9	2,73
Q02765	3	18,7	Cathepsina S	1908,6	703,5	2,71
D3ZLA3	5	28,8	Proteína de Copina 3	1301,4	481,8	2,70
A0A0G2K4R8	7	40,8	Proteína não caracterizada	2051,3	795,5	2,58
Q4KM38	2	11,2	Proteína interativa FUS (Serina-arginina rica) 1	3162,3	1233,6	2,56
D3ZVM5	8	67,1	Proteína Hspa12b	7141,6	2791,6	2,56
F1LSG8	2	10,8	Sindetina	3415,1	1335,1	2,56
Q66H12	3	18,4	Alpha-N-acetilgalactosaminidase	5680,2	2230,6	2,55
P02680	24	273,6	Fibrinogênio de cadeia gama	201974,0	80526,4	2,51
Q6AYJ0	10	66,2	Serina / treonina-proteína fosfatase	2051,6	820,0	2,50
Q6MG61	9	62,8	Canal intracelular de Cloreto, proteína 1	27567,4	11367,4	2,43
E9PT53	2	11,0	Proteína Wfs1	128549,5	53116,3	2,42
Q6AY20	2	13,1	Receptor de manose-6-fosfato dependente de cátion	2199,8	916,6	2,40
Q9JKU3	5	31,2	Homólogo da proteína de transporte intraflagelar 172	18216,7	7704,7	2,36
P09330	8	67,3	Ribose-fosfato pirofosquinase 2	4303,8	1852,7	2,32
M0R6Y8	23	254,4	Phosphoglycerato quinase	3112,9	1386,9	2,24
D3ZYX8	2	11,7	Polipeptídeo 2 da subunidade VIIa da citocromo c oxidase como (Previsto), a isoforma CRA_e	3960,4	1787,7	2,22
D3ZFC6	36	309,2	Proteína Iih4	150942,9	69083,7	2,18
P05712	13	106,6	Proteína Rab-2A relacionada com Ras	1645,5	754,1	2,18
Q68FY4	25	233,4	Componente específico do grupo	126136,1	58950,9	2,14
G3V881	4	26,8	Leucina repetida neuronal 6A, isoforma CRA_a	3323,3	1571,2	2,12
A0A0G2JW12	50	360,7	Complemento C4	40713,1	19494,0	2,09
P18292	20	159,6	Prothrombina	61926,6	30227,0	2,05
Q64240	4	25,5	Proteína AMBP	12410,7	6068,7	2,05
A0A0G2JZM2	16	106,2	Proteína Sec23a	113403,5	55989,4	2,03
D3ZLX4	2	11,7	Proteína Fam170b	7692,8	3808,9	2,02
Q9R1T3	9	68,6	Cathepsina Z	17627,2	9150,6	1,93
A0A0H2UHV9	8	44,8	Subunidade de Coatomer gama-2	3926,3	2040,2	1,92
Q6AYZ1	41	626,5	Tubulina cadeia alfa-1C	14102,7	7577,8	1,86
D3ZRN3	22	271,7	Proteína Actb12	439621,8	237721,7	1,85
Q4QQS3	7	39,1	Proteína OSCP1	2874,7	1567,5	1,83
P20760	17	175,9	Ig gamma-2A cadeia C região	118249,9	65104,2	1,82
Q6IMZ3	35	267,3	Annexina	887,2	489,0	1,81
Q3ZB98	16	104,7	Homólogo da sequência 1 amplificada por carcinoma de mama	12129,5	6703,8	1,81

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média do total da contagem de íons- Abl (M)	Média do total da contagem de íons- Abl (C)	Fold Change
P02651	14	94,4	Apolipoproteína A-IV	70941,9	39454,2	1,80
G3V615	19	132,9	Fator de complemento B, isoforma CRA_b	17128,9	10014,9	1,71
Q5XI38	32	291,4	Proteína citosólica de linfócitos 1	60970,3	35967,5	1,70
Q6IFV3	7	55,1	Queratina, tipo I citoesquelético 15	12353,6	7358,0	1,68
P02650	30	334,4	Apolipoproteína E	689835,1	415007,2	1,66
F1M013	4	23,3	Proteína LOC100910109	5165,8	3145,5	1,64
P24368	16	140,1	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	76811,1	47650,9	1,61
A0A0G2KAW5	6	33,1	Proteína Wdr48	21425,7	13401,1	1,60
Q5U3Y8	4	21,9	Fator de transcrição BTF3	8553,9	5403,2	1,58
Q6AY18	10	84,5	Proteína Sar1a	33864,3	21421,4	1,58
Q5XIC6	9	51,4	Subunidade 26S de proteassoma (Prosome, macropaina), não-ATPase, 12	23565,5	14948,0	1,58
Q5XIF3	9	71,0	NADH desidrogenase [ubiquinona] ferro-enxofre proteína 4, mitocondrial	54933,9	82774,1	-1,51
O08839	22	210,7	Proteína 1 de interação dependente de caixa de Myc	197767,9	298033,5	-1,51
P05065	34	468,7	Fructose-bisfosfato aldolase A	541689,7	817597,0	-1,51
Q1WIM2	12	132,8	Molécula de adesão celular 2	164344,4	248917,3	-1,51
D3ZJX5	2	10,8	Proteína Timm50	6879,3	10525,8	-1,53
P62632	25	302,7	Fator de alongação 1-alfa 2	223795,5	345729,5	-1,54
Q925N3	2	10,6	Proteína relacionada com PEX5	4509,9	7005,9	-1,55
P63041	8	67,8	Complexina-1	33483,8	52072,4	-1,56
P50554	33	311,9	4-aminobutirato aminotransferase, mitocondrial	353283,7	550281,1	-1,56
P04797	31	457,4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1060171,8	1658187,8	-1,56
P31596	20	261,0	Transportador de aminoácidos excitatório 2	684279,4	1071280,6	-1,57
B4F7C2	44	631,8	Proteína Tubb4a	380240,5	603288,1	-1,59
Q53B90	11	77,9	Proteína Ras-relacionada Rab-43	8149,0	12943,9	-1,59
D4ABT8	8	42,5	Proteína Hnmpul2	30624,5	48777,5	-1,59
Q6PCU8	3	28,1	NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 3, mitocondrial	18220,2	29133,2	-1,60
Q8K586	8	57,4	Proteína nuclear de ligação a GTP Ran, isoforma específica de testículo	1980,3	3180,8	-1,61
A0A0G2K9L2	13	98,8	Proteína Tom112	12222,6	19688,9	-1,61
Q6P9Y4	25	302,2	ADP/ATP translocase 1	244057,1	395115,0	-1,62
Q6PCU2	16	147,5	Subunidade de ATPase de protões do tipo V E 1	240349,5	389528,1	-1,62
Q6MGB2	2	10,2	Procolágeno, tipo XI, alfa 2	23316,2	38009,4	-1,63
Q02563	19	186,6	Glicoproteína de vesícula sináptica 2A	145889,8	237986,0	-1,63
B5DFG5	26	242,6	Proteína Sept6	124497,6	203481,3	-1,63
Q5BK63	24	185,6	NADH desidrogenase [ubiquinona] subunidade alfa subunidade 9, mitocondrial	70868,1	117720,1	-1,66
Q6PST4	12	98,3	Atlantina-1	31844,1	52977,9	-1,66
F1LMQ3	2	11,1	Proteína Psmd8	2754,7	4585,5	-1,66
P50408	9	93,7	Subunidade de ATPase do próton do tipo V F	49142,2	83790,6	-1,71
B2RZD6	6	55,7	Proteína Ndufa4	72779,5	125515,4	-1,72

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média do total da contagem de ions- Abl (M)	Média do total da contagem de ions- Abl (C)	Fold Change
R9PXT9	22	228,9	Proteína quinase, regulador dependente de cAMP, tipo II beta, isoforma CRA_a	71458,7	125320,0	-1,75
Q8SEZ5	7	87,5	Subunidade citocromo c oxidase 2	176277,2	310033,2	-1,76
Q9Z1B2	9	88,4	Glutaciona S-transferase Mu 5	40974,0	72247,6	-1,76
P54690	14	106,2	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, citosólica	32442,3	57412,8	-1,77
P63170	4	45,8	Dineína cadeia leve 1, citoplasmática	33582,9	59549,6	-1,77
P62898	10	130,9	Citocromo c, somático	249327,8	442446,7	-1,77
D4A376	4	39,1	Proteína Ras-relacionada Rab-12	37772,1	67282,7	-1,78
A0A0F7RQL3	7	70,0	Fator inibidor da migração de macrófagos	199969,1	358190,9	-1,79
O35244	22	250,8	Peroxiredoxina-6	369563,6	663481,8	-1,80
G3V8V3	41	349,3	Alfa-1,4 glucan fosforilase	16776,4	30592,5	-1,82
P47875	9	75,0	Cisteína e proteína rica em glicina 1	23679,3	43504,5	-1,84
Q8CJE3	11	67,8	Miosina VIIA	18272,2	33998,5	-1,86
G3V8Y5	5	28,8	RNA polimerase dirigida por ADN	731,5	1375,2	-1,88
P62628	5	42,8	Dineína cadeia leve roadblock-tipo 1	10082,6	18977,5	-1,88
P12075	8	72,4	Subunidade citocromo c oxidase 5B, mitocondrial	37993,7	72858,0	-1,92
A2VCX1	3	23,6	Proteína tipo TIP41	5598,0	10933,8	-1,95
G3V8K2	5	52,3	Subunidade de proteína de ligação de nucleotídeo de Guanina gama	2578,4	5101,6	-1,98
O35796	8	64,2	Complemento componente 1 Q subcomponente-proteína de ligação, mitocondrial	30642,9	61247,8	-2,00
O35331	18	170,0	Piridoxal quinase	24356,9	48718,4	-2,00
A0A0G2JZB8	5	34,3	Glicoproteína de membrana neuronal M6-b	4017,4	8047,6	-2,00
P14408	25	224,4	Fumarato hidratase, mitocondrial	164226,1	329821,9	-2,01
Q3B8Q2	11	94,4	Fator de iniciação eucariótica 4A-III	9403,7	19452,7	-2,07
Q78P75	8	90,8	Dineína cadeia leve 2, citoplasmática	77450,8	160972,7	-2,08
P18088	15	108,0	Glutamato descarboxilase 1	19817,1	42188,9	-2,13
F1LNW6	7	66,0	Complexo de antígeno 6 de linfócito, locus H (Predito), isoforma CRA_a	70101,9	150209,8	-2,14
P07722	19	198,9	Glicoproteína associada à mielina	8151,9	17920,3	-2,20
Q9QYL8	6	55,1	Acil-proteína tioesterase 2	14573,8	32267,8	-2,21
P58775	13	108,8	Tropomiosina beta-cadeia	1866,6	4135,8	-2,22
A0A0G2JZM8	15	97,1	Proteína associada ao CLIP 2	1231,5	2870,6	-2,33
Q5RJL0	7	53,3	Ermina	8928,5	20819,3	-2,33
Q6IFW6	8	72,0	Queratina, tipo I citoesquelético 10	4900,9	11922,7	-2,43
P04094	2	10,8	Proenkefalina-A	7916,9	19345,7	-2,44
P50430	5	33,2	Arilsulfatase B	2635,0	6453,4	-2,45
G3V7B6	3	16,8	Fosfatidilglicerofosfatase e proteína-tirosina fosfatase 1	389,6	990,4	-2,54
P70615	19	114,2	Lamina-B1	866,1	2204,1	-2,54
P09605	16	120,5	Creatina quinase de tipo S, mitocondrial	5219,3	13603,6	-2,61
Q6AY21	2	12,0	Proteína de activação de proteína GTPase (domínio SH3) 2	2274,8	6094,6	-2,68
A0A0G2JTD7	4	22,1	Proteína Clasp1	3896,3	10477,9	-2,69

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média do total da contagem de íons- Abl (M)	Média do total da contagem de íons- Abl (C)	Fold Change
F1M542	24	176,3	Proteína Adam22	18135,8	51917,6	-2,86
A8WCF8	5	29,7	Proteína de tumor Proteína p63-gene 1-como proteína	2253,7	6722,8	-2,98
A0A0G2K7Q8	25	175,1	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	2815,2	9150,4	-3,25
D3ZHI9	4	24,6	Proteína Ppp2r5e	622,6	2034,1	-3,27
P70623	2	16,1	Proteína de ligação a ácido gordo, adipócito	328,0	1101,3	-3,36
D3ZJ01	12	95,2	Proteína RGD1307235	12708,2	43615,9	-3,43
D3ZZM8	12	65,7	Proteína LOC680432	722,2	3084,3	-4,27
B1H234	2	10,4	Proteína transmembranar de repetição rica em leucina FLRT3	645,4	2794,9	-4,33
Q5RKG9	10	67,2	Fator de iniciação à tradução eucariótica 4B	2376,0	13714,7	-5,77
Q6AYR6	2	10,7	Proteína 2 contendo domínio de hidrolase tipo haloácido desidrogenase	1010,5	5972,1	-5,91
G3V9B3	17	186,4	Glicoproteína associada à mielina	751,4	5016,1	-6,68
P00884	7	47,1	Fructose-bisfosfato aldolase B	500,6	5458,0	-10,90
Q6PCU0	18	189,9	Subunidade ATP sintase gama	856,6	9512,7	-11,11
Q03344	4	33,7	ATPase inibidor mitocondrial	1039,8	13623,5	-13,10
P70567	4	29,8	Tropomodulina-1	1657,7	27114,1	-16,36
A0A0G2K673	14	89,3	Triptofano - tRNA ligase, citoplasmático	144,5	4343,7	-30,06
Q5PQN0	8	71,1	Neurocalcina-delta	112,8	3808,8	-33,76
D4ABS5	2	10,9	Proteína Pithd1	78,4	3000,7	-38,29

Tabela S3. Lista de proteínas reguladas positivamente observadas na comparação Abl (M) vs. (C).

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
D3ZC89	2	10,3	Proteína Fam114a2	48987,2	381,4	128,43
A7M746	5	50,9	Proteína LOC681126	5983,6	284,9	21,00
B2RYC9	3	15,8	Glucosilceramidase	741,0	61,7	12,01
A0A0G2JZL6	2	11,5	Proteína lft122	6386,4	590,5	10,81
F6Q5G6	2	11,0	Proteína Aplf	18702,2	1882,6	9,93
A0A0G2JZP4	6	35,3	Proteína não caracterizada	1558,3	164,6	9,47
D3ZBS9	3	16,6	Proteína Smarcd1	2941,4	364,7	8,07
M0RBJ7	88	953,7	Complemento C3	72069,1	11270,9	6,39
Z4YNS1	6	53,2	Proteína LOC100362709	15088,9	2470,2	6,11
Q641Y9	3	16,1	DALR proteína 3 contendo domínio de ligação ao anticódon	37825,3	6425,1	5,89
P30152	2	15,0	Lipocalina associada a gelatinases de neutrófilos	438,7	79,0	5,55
D4A9T5	6	38,7	Proteína Efh1	5352,2	976,9	5,48
P48199	4	40,7	Proteína C-reativa	42498,4	8151,8	5,21
D3ZW34	2	11,2	ADAM-like, decysin 1 (Previsto)	6287,6	1257,7	5,00
A0A0G2K3A6	2	20,7	Proteína LOC100359993	2320,5	470,1	4,94
Q5U206	10	101,0	Proteína tipo calmodulina 3	7317,5	1594,1	4,59
F1MAC0	2	15,7	Proteína lfi47	419,1	96,7	4,33
P07151	2	13,3	Beta-2-microglobulina	18199,2	4314,8	4,22
F1LTN6	5	58,0	Proteína Igkc	27633,7	6686,0	4,13
Q63041	76	811,5	Alpha-1-macroglobulina	1336529,8	323660,8	4,13
P20761	8	96,1	Ig gamma-2B cadeia C região	128635,2	31270,8	4,11
Q32KJ6	2	10,7	N-acetilgalactosamina-6-sulfatase	2924,9	728,1	4,02
A0A0G2JW69	12	86,1	Proteína Krt79	22272,5	5564,8	4,00
Q6P9V7	5	30,7	Subunidade activadora de proteasoma (Prosome, macropaina) 1	5079,0	1272,6	3,99
P31721	3	27,8	Subunidade B do subcomponente C1q complemento	22259,8	5809,0	3,83
A0A0G2K896	12	75,0	Proteína RGD1310507	4673,5	1250,8	3,74
P24090	18	238,1	Alpha-2-HS-glicoproteína	135546,9	36395,6	3,72
F1LPW0	6	45,5	Proteína lghm	35609,5	9633,6	3,70
F1LXY6	2	13,0	Proteína não caracterizada	4411,6	1264,0	3,49
A0A0G2JY82	5	30,7	Proteína secretora associada à membrana transportadora 1	13373,8	4013,6	3,33
F1LNK0	108	1035,3	Proteína associada a microtúbulos 2	1298,7	390,6	3,32
F1M983	21	153,9	Proteína Cfh	78854,7	23769,6	3,32
Q6T5F3	2	11,1	UDP-glucuronosiltransferase	22625,4	6833,9	3,31
A0A0G2K3G0	11	91,6	Glicoproteína rica em histidina	30030,6	9512,1	3,16
G3V8S9	7	61,6	Peptídeo antimicrobiano de catelicidina	40092,3	12880,2	3,11
A0A0G2K531	4	27,5	Glutaciona peroxidase	14659,4	4788,1	3,06

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
F1LPV8	7	39,9	Succinil-CoA ligase subunit beta	47292,5	15550,9	3,04
G3V7K3	36	299,2	Ceruloplasmina	19413,1	6906,4	2,81
P20059	32	387,1	Hemopexina	640958,9	229890,0	2,79
P04639	19	187,2	Apolipoproteína A-I	138367,4	49711,2	2,78
P06399	24	209,6	Fibrinogênio cadeia alfa	143862,6	51916,2	2,77
A0A0H2UHM3	21	188,4	Haptoglobina	211191,4	77251,9	2,73
Q02765	3	18,7	Cathepsina S	1908,6	703,5	2,71
D3ZLA3	5	28,8	Proteína de Copina 3	1301,4	481,8	2,70
A0A0G2K4R8	7	40,8	Proteína não caracterizada	2051,3	795,5	2,58
Q4KM38	2	11,2	Proteína interativa FUS (Serina-arginina rica) 1	3162,3	1233,6	2,56
D3ZVM5	8	67,1	Proteína Hspa12b	7141,6	2791,6	2,56
F1LSG8	2	10,8	Sindetina	3415,1	1335,1	2,56
Q66H12	3	18,4	alfa-N-acetilgalactosaminidase	5680,2	2230,6	2,55
P02680	24	273,6	Fibrinogênio gama cadeia	201974,0	80526,4	2,51
Q6AYJ0	10	66,2	Serina / treonina-proteína fosfatase	2051,6	820,0	2,50
Q6MG61	9	62,8	Cloreto, canal intracelular, proteína 1	27567,4	11367,4	2,43
E9PT53	2	11,0	Proteína Wfs1	128549,5	53116,3	2,42
Q6AY20	2	13,1	Receptor de manose-6-fosfato dependente de cátion	2199,8	916,6	2,40
Q9JKU3	5	31,2	Homólogo da proteína de transporte intraflagelar 172	18216,7	7704,7	2,36
P09330	8	67,3	Ribose-fosfato pirofosfoquinase 2	4303,8	1852,7	2,32
M0R6Y8	23	254,4	Fosfoglicerato-quinase	3112,9	1386,9	2,24
D3ZYX8	2	11,7	Polipeptídeo 2 da subunidade VIIa da citocromo c oxidase como (Previsto), a isoforma CRA_e	3960,4	1787,7	2,22
D3ZFC6	36	309,2	Proteína Itih4	150942,9	69083,7	2,18
P05712	13	106,6	Proteína Rab-2A relacionada com Ras	1645,5	754,1	2,18
Q68FY4	25	233,4	Componente específico do grupo	126136,1	58950,9	2,14
G3V881	4	26,8	Leucina repetida neuronal 6A, isoforma CRA_a	3323,3	1571,2	2,12
A0A0G2JW12	50	360,7	Complemento C4	40713,1	19494,0	2,09
P18292	20	159,6	Protrombina	61926,6	30227,0	2,05
Q64240	4	25,5	Proteína AMBP	12410,7	6068,7	2,05
A0A0G2JZM2	16	106,2	Proteína Sec23a	113403,5	55989,4	2,03
D3ZLX4	2	11,7	Proteína Fam170b	7692,8	3808,9	2,02
Q9R1T3	9	68,6	Catepsina Z	17627,2	9150,6	1,93
A0A0H2UHV9	8	44,8	Subunidade de Coatomer gama-2	3926,3	2040,2	1,92
Q6AYZ1	41	626,5	Tubulina cadeia alfa-1C	14102,7	7577,8	1,86
D3ZRN3	22	271,7	Proteína Actb12	439621,8	237721,7	1,85
Q4QQS3	7	39,1	Proteína OSCP1	2874,7	1567,5	1,83
P20760	17	175,9	Ig gamma-2A cadeia C região	118249,9	65104,2	1,82
Q6IMZ3	35	267,3	Anexina	887,2	489,0	1,81

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de confiança	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
Q3ZB98	16	104,7	Homólogo da sequência 1 amplificada por carcinoma de mama	12129,5	6703,8	1,81
P02651	14	94,4	Apolipoproteína A-IV	70941,9	39454,2	1,80
G3V615	19	132,9	Complemento factor B, isoforma CRA_b	17128,9	10014,9	1,71
Q5XI38	32	291,4	Proteína citosólica Linfocítica 1	60970,3	35967,5	1,70
Q6IFV3	7	55,1	Keratina, tipo I citoesqueleto 15	12353,6	7358,0	1,68
P02650	30	334,4	Apolipoproteína E	689835,1	415007,2	1,66
F1M013	4	23,3	Protein LOC100910109	5165,8	3145,5	1,64
P24368	16	140,1	Peptidil-prolil cis-trans isomerase B	76811,1	47650,9	1,61
A0A0G2KAW5	6	33,1	Proteína Wdr48	21425,7	13401,1	1,60
Q5U3Y8	4	21,9	Fator de transcrição BTF3	8553,9	5403,2	1,58
Q6AY18	10	84,5	Proteína Sar1a	33864,3	21421,4	1,58
Q5XIC6	9	51,4	Subunidade 26S de proteasoma (Prosome, macropaina), não ATPase, 12	23565,5	14948,0	1,58

Tabela S4. Lista de proteínas negativamente reguladas observadas na comparação Abl (M) vs. (C).

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de Confidência	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
Q5XIF3	9	71,0	NADH desidrogenase [ubiquinona] ferro-enxofre proteína 4, mitocondrial	54933,9	82774,1	-1,51
O08839	22	210,7	Proteína 1 de interação dependente de caixa de Myc	197767,9	298033,5	-1,51
P05065	34	468,7	Frutose-bisfosfato aldolase A	541689,7	817597,0	-1,51
Q1WIM2	12	132,8	Molécula de adesão celular 2	164344,4	248917,3	-1,51
D3ZJX5	2	10,8	Proteín Timm50	6879,3	10525,8	-1,53
P62632	25	302,7	Fator de elongação 1-alfa 2	223795,5	345729,5	-1,54
Q925N3	2	10,6	Proteína relacionada com PEX5	4509,9	7005,9	-1,55
P63041	8	67,8	Complexina-1	33483,8	52072,4	-1,56
P50554	33	311,9	4-aminobutirato aminotransferase, mitocondrial	353283,7	550281,1	-1,56
P04797	31	457,4	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	1060171,8	1658187,8	-1,56
P31596	20	261,0	Transportador de aminoácidos excitatório 2	684279,4	1071280,6	-1,57
B4F7C2	44	631,8	Proteína Tubb4a	380240,5	603288,1	-1,59
Q53B90	11	77,9	Proteína Ras-relacionada Rab-43	8149,0	12943,9	-1,59
D4ABT8	8	42,5	Proteína Hnrnpul2	30624,5	48777,5	-1,59
Q6PCU8	3	28,1	NADH desidrogenase [ubiquinona] flavoproteína 3, mitocondrial	18220,2	29133,2	-1,60
Q8K586	8	57,4	Proteína nuclear de ligação a GTP Ran, isoforma específica de testículo	1980,3	3180,8	-1,61
A0A0G2K9L2	13	98,8	Proteína Tom112	12222,6	19688,9	-1,61
Q6P9Y4	25	302,2	ADP / ATP translocase 1	244057,1	395115,0	-1,62
Q6PCU2	16	147,5	Subunidade de ATPase de prótons do tipo V E 1	240349,5	389528,1	-1,62
Q6MGB2	2	10,2	Procollagen, tipo XI, alfa 2	23316,2	38009,4	-1,63
Q02563	19	186,6	Glicoproteína de vesícula sináptica 2 A	145889,8	237986,0	-1,63
B5DFG5	26	242,6	Proteína Sept6	124497,6	203481,3	-1,63
Q5BK63	24	185,6	NADH desidrogenase [ubiquinona] subunidade alfa subunidade 9, mitocondrial	70868,1	117720,1	-1,66
Q6PST4	12	98,3	Atlastina-1	31844,1	52977,9	-1,66
F1LMQ3	2	11,1	Proteína Psm8	2754,7	4585,5	-1,66
P50408	9	93,7	Subunidade de ATPase do próton do tipo V F	49142,2	83790,6	-1,71
B2RZD6	6	55,7	Ndufa4 proteína	72779,5	125515,4	-1,72
R9PXT9	22	228,9	Proteína quinase, regulador dependente de cAMP, tipo II beta, isoforma CRA_a	71458,7	125320,0	-1,75
Q8SEZ5	7	87,5	Subunidade citocromo c oxidase 2	176277,2	310033,2	-1,76
Q9Z1B2	9	88,4	Glutathione S-transferase Mu 5	40974,0	72247,6	-1,76

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de Confidência	Descrição	Média da contagem de íons totais-Abi (M)	Média da contagem de íons totais-Abi (C)	Fold change
P54690	14	106,2	Aminotransferase de aminoácidos de cadeia ramificada, citosólica	32442,3	57412,8	-1,77
P63170	4	45,8	Dineína cadeia leve 1, citoplasmática	33582,9	59549,6	-1,77
P62898	10	130,9	Citocromo c, somático	249327,8	442446,7	-1,77
D4A376	4	39,1	Proteína Ras-relacionada Rab-12	37772,1	67282,7	-1,78
A0A0F7RQL3	7	70,0	Fator inibidor da migração de macrófagos	199969,1	358190,9	-1,79
O35244	22	250,8	Peroxi-redoxina-6	369563,6	663481,8	-1,80
G3V8V3	41	349,3	Alfa-1,4 glucano fosforilase	16776,4	30592,5	-1,82
P47875	9	75,0	Cisteína e proteína rica em glicina 1	23679,3	43504,5	-1,84
Q8CJE3	11	67,8	Miosina VIIA	18272,2	33998,5	-1,86
G3V8Y5	5	28,8	RNA polimerase dirigida por DNA	731,5	1375,2	-1,88
P62628	5	42,8	Dineína cadeia leve roadblock-tipo 1	10082,6	18977,5	-1,88
P12075	8	72,4	Subunidade citocromo c oxidase 5B, mitocondrial	37993,7	72858,0	-1,92
A2VCX1	3	23,6	Proteína tipo TIP41	5598,0	10933,8	-1,95
G3V8K2	5	52,3	Subunidade de proteína de ligação de nucleotídeo de Guanina gama	2578,4	5101,6	-1,98
O35796	8	64,2	Complemento componente 1 Q subcomponente-proteína de ligação, mitocondrial	30642,9	61247,8	-2,00
O35331	18	170,0	Piridoxal quinase	24356,9	48718,4	-2,00
A0A0G2JZB8	5	34,3	Glicoproteína de membrana neuronal M6-b	4017,4	8047,6	-2,00
P14408	25	224,4	Fumarato hidratase, mitocôndrial	164226,1	329821,9	-2,01
Q3B8Q2	11	94,4	Fator de iniciação eucariótica 4A-III	9403,7	19452,7	-2,07
Q78P75	8	90,8	Dineína cadeia leve 2, citoplasmática	77450,8	160972,7	-2,08
P18088	15	108,0	Glutamato descarboxilase 1	19817,1	42188,9	-2,13
F1LNW6	7	66,0	Complexo de antígeno 6 de linfócito, locus H (Predito), isoforma CRA_a	70101,9	150209,8	-2,14
P07722	19	198,9	Glicoproteína associada à mielina	8151,9	17920,3	-2,20
Q9QYL8	6	55,1	Acil-proteína tioesterase 2	14573,8	32267,8	-2,21
P58775	13	108,8	Tropomiosina beta-cadeia	1866,6	4135,8	-2,22
Q5RJL0	7	53,3	Ermina	8928,5	20819,3	-2,33

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de Confidência	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
Q6IFW6	8	72,0	Queratina, tipo I citoesquelético 10	4900,9	11922,7	-2,43
P04094	2	10,8	Proenkephalina-A	7916,9	19345,7	-2,44
P50430	5	33,2	Arylsulfatase B	2635,0	6453,4	-2,45
G3V7B6	3	16,8	Fosfatidilglicerofosfatase e proteína-tirosina fosfatase 1	389,6	990,4	-2,54
P70615	19	114,2	Lamina-B1	866,1	2204,1	-2,54
P09605	16	120,5	Creatina quinase de tipo S, mitocondrial	5219,3	13603,6	-2,61
Q6AY21	2	12,0	Proteína de activação de proteína GTPase (domínio SH3) 2	2274,8	6094,6	-2,68
A0A0G2JTD7	4	22,1	Proteína Clasp1	3896,3	10477,9	-2,69
F1M542	24	176,3	Proteína Adam22	18135,8	51917,6	-2,86
A8WCF8	5	29,7	Proteína de tumor p63-gene 1- proteína like	2253,7	6722,8	-2,98
A0A0G2K7Q8	25	175,1	6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilação	2815,2	9150,4	-3,25
D3ZHI9	4	24,6	Proteína Ppp2r5e	622,6	2034,1	-3,27
P70623	2	16,1	Proteína de ligação a ácido graxo, adipócito	328,0	1101,3	-3,36
D3ZJ01	12	95,2	Proteína RGD1307235	12708,2	43615,9	-3,43
D3ZZM8	12	65,7	Proteína LOC680432	722,2	3084,3	-4,27
B1H234	2	10,4	Proteína transmembranar de repetição rica em leucina	645,4	2794,9	-4,33
Q5RKG9	10	67,2	Fator de iniciação à tradução eucariótica 4B	2376,0	13714,7	-5,77
Q6AYR6	2	10,7	Proteína 2 contendo domínio de hidrolase tipo haloácido desidrogenase	1010,5	5972,1	-5,91
G3V9B3	17	186,4	Glicoproteína associada à mielina	751,4	5016,1	-6,68
P00884	7	47,1	Frutose-bisfosfato aldolase B	500,6	5458,0	-10,90
Q6PCU0	18	189,9	Subunidade ATP sintase gama	856,6	9512,7	-11,11
Q03344	4	33,7	ATPase inibidor mitocondrial	1039,8	13623,5	-13,10

Nº de acesso	Contagem de Peptídeos	Nível de Confidência	Descrição	Média da contagem de íons totais- Abl (M)	Média da contagem de íons totais- Abl (C)	Fold change
P70567	4	29,8	Tropomodulina-1	1657,7	27114,1	-16,36
A0A0G2K673	14	89,3	Triptophan - tRNA ligase, citoplasmático	144,5	4343,7	-30,06
Q5PQN0	8	71,1	Neurocalcina-delta	112,8	3808,8	-33,76
D4ABS5	2	10,9	Proteína Pithd1	78,4	3000,7	-38,29

8-REFERÊNCIAS

ABUMIYA, T.; LUCERO, J.; HEO, J.H.; TAGAYA, M.; KOZIOL, J.A.; COPELAND, B.R. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 19:1038–50, 1999.

AGRAWAL, S.K.; FEHLINGS, M.G. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁺-K⁺-ATPase, the Na⁺-H⁺exchanger, and the Na⁺-Ca²⁺exchanger. **J Neurosci**, v. 16 p. 545–52, 1996.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci.** v. 2 p. 734–44, 2001.

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. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. **Brain**, v. 134, n. 6, p.1777-1789, 2011.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT, J.M.; BONFOCO, E.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S.; LIPTON, S.A. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron.** v. 15 p. 961-973, 1995.

ASCHNER, J.L.; LUM, H.; FLETCHER, P.W.; MALIK, A.B. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. **J Cell Physiol.** v.173 p.387–96, 1997.

BAO, X.; WEI, J.; FENG, M.; LU, S.; LI, G.; DOU, W.; MA, W.; MA, S.; AN, Y.; QIN, C. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1367, p.103-113, 2011.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. N. Sistemas de Neurotransmissores. In: Neurociências – Desvendando o sistema nervoso. Artmed. 2ed, p. 150-153, 2002.

BELAYEV, L.; BUSTO, R.; ZHAO, W.; GINSBERG, M.D. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. **Brain Research**, v. 739, n. 1-2, p.88-96,1996.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int.J. Food Sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.

BOTHE, H.W.; BODSCH, W.; HOSSMANN, K.A. Relationship between specific gravity, water content, and serum protein extravasation in various types of vasogenic brain edema. **Acta Neuropathol**, v. 64 p. 37–42,1984.

BREA, D.; AGULLA, J.; STAES, A.; GEVAERT, K.; CAMPOS, F.; SOBRINO, T.; BLANCO, M.; DÁVALOS, A.; CASTILLO, J.; RAMOS-CABRER, P. Study of protein expresion in peri-infarct tissue after cerebral ischemia. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.; SAVITZ, S. Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells Enhance Recovery after Acute Ischemic Stroke in Young and Middle-Aged Rats. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 1, p.140-149, 2010.

BROUNS, R.; De deyn, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery**. v. 111, p. 483-495, 2009.

BULLOCK, R.; ZAUNER, A.; MYSEROS, J.S.; MARMAROU, A.; WOODWARD, J.J.; YOUNG, H.F. Evidence for prolonged release of excitatory amino acids in

severe human head trauma. Relationship to clinical events. *Ann N Y Acad Sci.* v. 765 p. 290-298, 1995.

BURSCH, W.; PAFFE, S.; PUTZ, B.; BARTHEL, G.; SCHULTE-HERMANN, R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis.* v. 11 p. 847– 853; 1990.

CAMPOS-MARTORELL, M.; SALVADOR, N.; MONGE, M.; CANALS, F.; GARCÍA-BONILLA, L.; HERNÁNDEZ-GUILLAMON, M.; AYUSO, MI.; CHACÓN, P.; ROSELL, A.; ALCAZAR, A.; MONTANER, J. Brain proteomics identifies potential simvastatin targets in acute phase of stroke in a rat embolic model. *Journal of neurochemistry*, v. 130, n. 2, p.301-312, 2014.

CARMICHAEL, S.T. Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist.* v. 9, 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. *The Journal of Neuroscience.* v. 22, n.14, p. 6062-70, 2002.

CHAN, P.H. Role of Oxidants in schemic brain damage. *Stroke.* v. 27, p. 1124-1129, 1996.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, v.59, n.3, p. 527-605, 1979.

CHEN J.R.; CHENG G.Y.; SHEU C.C.; TSENG G.F.; WANG T.J.; HUANG Y.S. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *Journal Of Anatomy*, v. 213, n. 3, p.249-258, 2008.

CHEN, A.; LIAO, W. P.; LU, Q.; WONG, W.S.F.; WONG, P. H. Upregulation of dihydropyrimidinase-related protein 2, spectrin α II chain, heat shock cognate protein 70 pseudogene 1 and tropomodulin 2 after focal cerebral ischemia in

rats—a proteomics approach. **Neurochemistry international**, v. 50, n. 7, p. 1078-1086, 2007.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; LU, M.; ZHANG, X.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Journal Of The Neurological Sciences**, v. 189, n. 1-2, p.49-57, 2001.

CHEN, J.; VENKAT, P.; CHOPP, M. Neurorestorative therapy for stroke. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 8, p. 382, 2014a.

CHEN, J.; ZHANG, Z.G.; LI, Y.; WANG, L.; XIAN, Y.; GAUTAM, S.C.; LU, M.; ZHU, Z.; CHOPP, M. 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, 2003.

CHEN, J.H.; KUO, H.C.; LEE, K. F.; TSAI, T. H. Global proteomic analysis of brain tissues in transient ischemia brain damage in rats. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 6, p. 11873-11891, 2015.

CHEN, Y.H.; CHIANG, Y.H.; MA, H.I. Analysis of spatial and temporal protein expression in the cerebral cortex after ischemia-reperfusion injury. **J Clin Neurol**, v.10. p. 84–93, 2014.

CHEN, Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 3, p.391-400, 2012.

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

CRAIN, B.J.; TRAN, S.D.; MEZEY, E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. **Journal Of The Neurological Sciences**, v. 233, n. 1-2, p.121-123,2005.

DEAN, R. T. Some critical membrane events during mammalian cell death. In: Potten, C. S., ed. Perspectives on mammalian cell death. *New York: Oxford University Press*. p. 18 –38, 1987.

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**, v.8, p. 58, 2012. * autores contribuíram igualmente para a publicação

DELCROIX, G.J.R.; SCHILLER, P.C.; BENOIT, J.P.; MONTERO-MENEI, C.N. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p.2105-2120, 2010.

DEL ZOPPO, G.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.; MORI, E.; COPELAND, B.R.; CHANG, C.M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. **Stroke**, v. 22 p. 1276–1283, 1991.

DEL ZOPPO, G.J.; HALLENBECK, J.M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thromb Res**.v. 98 p.73–81, 2000.

DENG, Y.; THOMPSON, B.M.; GAO, X.; HALL, E.D. Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 205, n. 1, p.154-165, 2007.

DE VRIES, H.E.; KUIPER, J.; DE BOER, A.G.; Van BERKEL, T.J.C.; BREIMER, D.D. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacological Review**. v. 49, n. 2, 143-155, 1997.

DI DOMENICO, F.; CASALENA, G.; JIA, J.; SULTANA, R.; BARONE, E.; CAI, J.; PIERCE, W.M.; CINI, C.; MANCUSO, C.; PERLUIGI, M.; DAVIS, C.M.; ALKAYED, N.J.; BUTTERFIELD, A.D. Sex differences in brain proteomes of

neuron-specific STAT3-null mice after cerebral ischemia/reperfusion. **Journal of neurochemistry**, v.121, n. 4, p. 680-692, 2012.

DOEPPNER, T.R.; HERMANN, D.M. Mesenchymal Stem Cells for Ischemic Stroke: Progress and Possibilities. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 16, p.1598-1608, 2016.

DORMADY, S.P.; BASHAYAN, O.; DOUGHERTY, R.; ZHANG, X.M.; BASCH, R.S. Immortalized Multipotential Mesenchymal Cells and the Hematopoietic Microenvironment. **Journal Of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 10, n. 1, p.125-140, 2001.

DOYLE, K.P.; SIMON, R.P.; STENZEL-POORE, M.P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 310-318, 2008.

DUFF, S.V. Impact of Peripheral Nerve Injury on Sensorimotor Control. **Journal Of Hand Therapy**, v. 18, n. 2, p.277-291, 2005.

EASTWOOD, S.L.; BURNET, P.W.; HARRISON, P.J. Decreased hippocampal expression of the susceptibility gene PPP3CC and other calcineurin subunits in schizophrenia. *Biol Psychiatry*.v. 57, n.7, p.702-10, 2005b.

EASTWOOD, S.L.; SALIH, T.; HARRISON, P.J. Differential expression of calcineurin A subunit mRNA isoforms during rat hippocampal and cerebellar development. **Eur J Neurosci**, v. 22, n.12, p.3017-24, 2005a.

EMSLEY, H. C. A.; TYRRELL, P.J. Inflammation and Infection in Clinical Stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, p. 1399-1419, 2002.

EHRlich, P. Das Sauerstoffbeduerfnis des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie (Hirschwald, Berlin). v.8 p.167,1885.

FADEN, A.I.; DEMEDIUK, P.; PANter, S.S.; VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science**. v. 244 p. 798-800,1989.

FARBER, J. L.; CHIEN, K. R.; MITTNACHT, S. The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.* 102:271–281; 1981.

FRANK, M.G.; BARRIENTOS, R.M.; THOMPSON, B.M.; WEBER, M.D.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. IL-1RA injected intra-cisterna magna confers extended prophylaxis against lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory and sickness responses. **J Neuroimmunol.** v. 252 p. 33–9, 2012.

GARCIA, J.H.; LIU, K.F.; YOSHIDA, Y.; LIAN, J.; CHEN, S.; DEL ZOPPO, G.J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol*, v. 144 p.188–199, 1994.

GASCHE, Y.; COPIN, J.C.; SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; CHAN, P.H. Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood–brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab.** v.21 p.1393–400,2001.

GERSCHENSON, L. E.; ROTELLO, R. J. Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J.* v.6 p.2450 –2455; 1992.

GIDDAY, J.M.; GASCHE, Y.G.; COPIN, J.C.; SHAH, A.R.; PEREZ, R.S.; SHAPIRO, S.D. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood–brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.289 p. H558–68, 2005.

GIRALDI-GUIMARÃES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F.P.; MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, v. 1266, p.108-120, 2009.

GLÜCKSMANN, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* v.26 p. 59–86; 1951.

GOLDMANN, E. E. Die aussere and innere Sekretion des gesundes und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. *Beitr. Klin. Chir.* 64:192–265.

GONZALEZ, C. L.; KOLB, B. A comparison of different models of stroke on behaviour and brain morphology. **European Journal Of Neuroscience**, v. 18, n. 7, p.1950-1962, 2003.

GRAHAM, S.; McCULLOUGH, L.D.; MURPHY, S. Animal models of ischemic stroke: Balancing experimental aims and animal care. **Comparative Medicine**, v. 54, n.5, p. 486-492, 2004.

GREVE, M.W.; ZINK, B.J. **Pathophysiology of traumatic brain injury.** *Mt Sinai J Med.* v. 76 p. 97-104, 2009.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ-FRUTOS, B.; RAMOS-CEJUDO, J.; TERESA VALLEJO-CREMADES, M.; FUENTES, B.; Cerdán, S.; Díez-Tejedor, E. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 11, 2013.

HAKOBYAN, S.; BOYAJYAN, A.; SIM, R.B. Classical pathway complement activity in schizophrenia. **Neurosci Lett**, v. 374, p. 35–37, 2005.

HALL, R.D.; LINDHOLM, E.P. Organization of motor and somatosensory neocortex in the albino rat. **Brain Research**, v. 66, n. 1, p.23-38,1974.

HALLETT, M. Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 2-3, p.169-174, 2001.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: Some new concepts. **Faseb. J.**, v.1, p.358-364, 1987.

HAMANN, G.F.; OKADA, Y.; FITRIDGE, R.; DEL ZOPPO, G.J. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. **Stroke**. v.26 p.2120–6, 1995.

HANDLEY, A.; MEDCALF, P.; HELLIER, K.; DUTTA, D. Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 2-3, p.169-174, 2001.

HAO, L.; ZOU, Z.; TIAN, H.; ZHANG, Y.; ZHOU, H.; LIU, L. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-17, 2014.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of Brain Injury after Global Cerebral Ischemia. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 1, p.1-21, 2006.

HAZELL, A.S. Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of concepts and treatment strategies. **Neurochemistry Internacional**, v. 50, p. 941-953, 2007.

HE, D.; ZHANG, Z.; LAO, J.; MENG, H.; HAN, L.; CHEN, F.; Ye, D.; Zhang, H.; XU, Y. Proteomic Analysis of the Peri-Infarct Area after Human Umbilical Cord Mesenchymal. **Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke**, v. 7, n. 5, p. 623–634, 2016.

HEO, J.H.; HAN, S.W.; LEE, S.K. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 39, n. 1, p.51-70, 2005.

HEO, J.H.; LUCERO, J.; ABUMIYA, T.; KOZIOL, J.A.; COPELAND, B.R.; DEL ZOPPO, G.J. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**. v.19, p.624–33, 1999.

HORNE, M.K.; BUTLER, E.G. The role of the cerebello-thalamo-cortical pathway in skilled movement. **Prog Neurobiol**, v. 46(2-3) p. 199-213, 1995.

HOSP, J.A.; LUFT, A.R. Cortical Plasticity during Motor Learning and Recovery after Ischemic Stroke. **Neural Plasticity**, v. 2011, p.1-9, 2011.

HU, D.Z.; ZHOU, L.F.; ZHU, J.; MAO, Y.; WU, X.H. Upregulated gene expression of local brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor after intracisternal administration of marrow stromal cells in rats with traumatic brain injury. **Chin. J. Traumatol**, v. 8, n.1, p. 23–26, 2005.

JIN, K.; MAO, X.O.; COTTRELL, B.; SCHILLING, B.; XIE, L.; ROW, R.H.; SUN, Y.; PEEL, A.; CHILDS, J.; GENDEH, G.; GIBSON, B.W.; GREENBERG, D.D. Proteomic and immunochemical characterization of a role for stathmin in adult neurogenesis. **FASEB J**, v. 18, p. 287–299, 2004.

JIN, R.; YANG, G.; LI, GUOHONG. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal Of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 5, p.779-789, 2010.

JOHNSON, G.V.; JOPE, R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. **J Neurosci Res**, v.33, n.4, p.505-512, 1992.

JOHNSON, E.M.; DECKWERT, T.L. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annual Review of Neuroscience*, v. 16, p. 31-46, 1993.

JUNG, H.S.; JEONG, S.Y.; YANG, J.; KIM, S.D.; ZHANG, B.; YOO, H.S.; SONG, S.U.; JEON, M.S.; SONG, Y.S. Neuroprotective effect of mesenchymal stem cell through complement component 3 downregulation after transient focal cerebral ischemia in mice. **Neurosci Lett**, v. 28, n. 633, p. 227-234, 2016.

KAMIYA, T.; KATAYAMA, Y.; KASHIWAGI, F.; TERASHI, A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. **Stroke**. v. 24 p. 571–5, 1993.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Princípios da neurociência. Editora Manole; 4ª ed, 936-947, 2003.

KASTRUP, A.; ENGELHORN, T.; BEAULIEU, C.; DE CA, MOSELEY, M.E. Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood–brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. **J Neurol Sci.** v.166 p. 91–9,1999.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* v. 26 p. 239 –257; 1972.

KERR, J. F. R. Shrinkage necrosis: A distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* v.105 p.13–20; 1971.

KERR, J. F. R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. In: Schwartz, L. M.; Osborne, B. A., eds. Cell death. New York: *Academic Press.* p. 1–27, 1995.

KOH, P.O. Proteomic analysis of focal cerebral ischemic injury in male rats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 2, p. 181-185, 2010.

KRAUSE, D.S.;THEISE, N.D.; COLLECTOR, M.I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.;GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S.J. Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by a Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p.369-377, 2001.

LEE, J.M; ZIPFEL, G.J; CHOI, D.W. The Changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, v. 399 (supl.), p. A7-A14, 1999.

LEFEBVRE, S.; BURGLEN, L.; REBOULLET, S.; CLERMONT, O.; BURLET, P.; VIOLLET, L.; BENICHO, B.; CRUAUD, C.; MILLASSEAU, P.; ZEVIANI, M.; LE PASLIER, D.; FREZAL, J.; COHEN, D.; WEISSENBACH, J.; MUNNICH,

A.; MELKI, J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. v. 80 p. 155–165; 1995.

LEIST, M; NICOTERA, P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Experimental Cell Research*, v. 239, p. 183-201, 1998.

LENT, R.C. Cem Bilhões de Neurônios, conceitos fundamentais de neurociência. Sao Paulo: Atheneu, 2005.

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

LI, Y.; CHEN, J.; ZHANG, C.L.; WANG,L.; LU,D.; KATAKOWSKI,M.; GAO, Q.; SHEN, L.H.; ZHANG, J.; LU, M.; CHOPP, M. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. **Glia**, v. 49, n. 3, p.407-417, 2004.

LI, Y.; JIANG, N.; POWERS, C.; CHOPP, M. Neuronal Damage and Plasticity Identified by Microtubule-Associated Protein 2, Growth-Associated Protein 43, and Cyclin D1 Immunoreactivity After Focal Cerebral Ischemia in Rats.**Stroke**, v. 29, n. 9, p.1972-1981, 1998.

LYNCH DR, DAWSON TM. Secondary mechanisms in neuronal trauma. **Curr Opin Neurol**. v. 7 p. 510-516, 1994.

LIU, X.; YE, R.; YAN, T.; YU, S.P.; WEI, L.; XU, G.; FAN, X.; JIANG, Y.; STETLER, R.A.; LIU, G.; CHEN, J. Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. **Progress In Neurobiology**, v. 115, p.92-115, 2014.

LORBERBOYM, M.; LAMPL, Y.; SADEH, M. Correlation of 99mTc-DTPA SPECT of the blood–brain barrier with neurologic outcome after acute stroke. **J Nucl Med**. v.44 p.1898–904, 2003.

MAAS, A.I.; STOCCHETTI, N.; BULLOCK, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. **Lancet Neurol.** v. 7 p. 728-741, 2008.

MAHMOOD, A.; LU, D.; WANG, L.; CHOPP, M. Intracerebral Transplantation of Marrow Stromal Cells Cultured with Neurotrophic Factors Promotes Functional Recovery in Adult Rats Subjected to Traumatic Brain Injury. **Journal Of Neurotrauma**, v. 19, n. 12, p.1609-1617, 2002.

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**, v. 53, n. 3, p.697-703, 2003.

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

MARÍN-PADILLA, M. Human cerebral cortex Cajal-Retzius neuron: development, structure and function. A Golgi study. **Front Neuroanat**, p. 9:21, 2015.

MARTIN, L.J.; AI-ABDULLA, N.A.; BRAMBRINK, A.M.; KIRSCH, J.R.; SIEBER, F.R.; PORTERA-CAILLIAU, C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Research Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 281-309, 1998.

MCGEORGE, A.J.; FAULL, R.L. The organization and collateralization of corticostriate neurones in the motor and sensory cortex of the rat brain. **Brain Research**, v. 423, n. 1-2, p.318-324,1987.

MCGEORGE, A.J.; FAULL, R.L. The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. **Neuroscience**, v. 29, n. 3, p.503-537, 1989.

MCNEILL, T.H.; MORI, N.; CHENG, H.W. Differential regulation of the growth-associated proteins, GAP-43 and SCG-10, in response to unilateral cortical ablation in adult rats. **Neuroscience**, v. 90, n. 4, p.1349-1360, 1999.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P.L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol.** v. 698 p.6-18, 2013.

MENDEZ-OTERO, R.; DE FREITAS, G.R.; ANDRÉ, C.; DE MENDONÇA, M.L.; FRIEDRICH, M.; OLIVEIRA-FILHO, J. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. **Regenerative Medicine**, v. 2, n. 4, p.417-423, 2007.

MERGNER, W. J.; JONES, R. T.; TRUMP, B. J. Cell death: Mechanisms of acute and lethal cell injury. New York: Field & Wood; 1990.

MEZEY, E. Bone marrow-derived stem cells in neurological diseases: stones or masons? **Regenerative Medicine**, v. 2, n. 1, p.37-49, 2007.

MURPHY, T.H.; CORBETT, D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 12, p.861-872, 2009

MUSTAFA, A.G.; AL-SHBOUL, O.A. Pathophysiology of traumatic brain injury. **British Journal Of Anaesthesia**, v. 99, n. 1, p.4-9, 2007.

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.80-88, 1998.

NAPIERALSKI, J.A.; BUTLER, A.K.; CHESSELET, M.F. Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. **J Comp Neurol.** v. 373 p. 484–497, 1996.

OKADA, Y.; COPELAND, B.R.; FITRIDGE, R.; KOZIOL, J.A.; DEL ZOPPO, G.J. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes

during early focal cerebral ischemia and reperfusion. **Stroke**.v. 25 p. 1847–53, 1994.

ORKIN, S.H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p.57-64, 2000.

PALOMERO-GALLAGHER, N.; ZILLES, K. Isocórtex. In: The rat nervous system. 3.ed. Elsevier, p. 729-757, 2004.

PARENT, A.; CARPENTER, M.B. Carpenter's Human Neuroanatomy. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins p.186–92, 1995.

PARK, E.; BELL, J.D.; BAKER, A.J. Traumatic brain injury: Can the consequences be stopped? **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 9, p.1163-1170, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in the Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, 1986.

PROSKE, U.; GANDEVIA, S.C. The kinaesthetic senses. **The Journal Of Physiology**, v. 587, n. 17, p.4139-4146, 2009.

QU, C.; MAHMOOD, A.; LIU, X.S.; XIONG, Y.; WANG, L.; WU, H.; LI, B.; ZHANG, Z.G.; KAPLAN, D.L.; CHOPP, M. The treatment of TBI with human marrow stromal cells impregnated into collagen scaffold: functional outcome and gene expression profile. **Brain Res**, v. 1371, p.129-139, 2011.

RAMON Y CAJAL, S. Degeneration and Regeneration of the Nervous System (Ed. May, R.M) London: Osford University Press, 1928.

ROSELL, A.; CUADRADO, E.; ORTEGA-AZNAR, A.; HERNANDEZ-GUILLAMON, M.; LO, E.H.; MONTANER,J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood–brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. **Stroke**. v. 39 p.1121–6, 2008.

ROY, N.; MAHADEVAN, M. S.; MCLEAN, M.; SHUTLER, G.; YARAGHI, Z.; FARAHANI, R.; BAIRD, S.; BESNER-JOHNSTON, A.; LEFEBVRE, C.; KANG, X.; SALIH, M.; AUBRY, H.; TAMAI, K.; GUAN, X.; IOANNOU, P.; CRAWFORD, T. O.; DE JONG, P. J.; SURH, L.; IKEDA, J.-E.; KORNELUK, R. G.; MACKENZIE, A. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*. v.80 p. 167–178; 1995.

RUBIN, L. L.; STADON, J.M. The cell Biology of the blood-brain barrier. **Annual Review of Neuroscience**. v. 22, p. 11-28, 1999.

SAMPAIO, M.F.S.; MARCILIO, F.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.130-139, 2013.

SAUNDERS, J. W. Death in embryonic systems. *Science*. v.154 p. 604–612, 1966.

SCHAFER, D.P.; LEHRMAN, E.K.; KAUTZMAN, A.G.; KOYAMA, R.; MARDINLY, A.R.; YAMASAKI, R.; RANSOHOFF, R.R.; GREENBERG, M.E.; BARRES, B.A.; STEVENS, B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v.74, p.691–705, 2012.

SCHWINDT, T.T.; Barnabé, G.F.; Mello, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Bras Neurocirurg**, v. 16 p. 13-19, 2005.

SCORNAVACCA, G.; GESUETE, R.; ORSINI, F., PASTORELLI, R.; FANELLI, R.; DE SIMONI, M. G.; AIROLDI, L. Proteomic analysis of mouse brain cortex identifies metabolic down-regulation as a general feature of ischemic pre-conditioning. **Journal of neurochemistry**, v. 122, n. 6, p. 1219-1229, 2012.

SEKAR, A.; BIALAS, A.R.; DE RIVERA, H.; DAVIS, A.; HAMMOND, T.R.; KAMITAKI, N.; TOOLEY, K.; PRESUMEY, J.; BAUM, M.; VAN DOREN, V.; GENOVESE, G.; ROSE, S.A.; HANDSAKER, R.E. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. **Nature**, v.11, n.530(7589), p.177-183, 2016.

SEO, J.W.; KIM, Y.; HUR, J.; PARK, K. S.; CHO, Y.W. Proteomic analysis of primary cultured rat cortical neurons in chemical ischemia. **Neurochemical research**, v. 38, n. 8, p. 1648-1660, 2013.

SHI, Y.; SAHAI, B. M.; GREEN, D. R. Cyclosporin A inhibits activation induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. **Nature**. v. 339 p. 625– 626, 1989.

SHYU, W.C.; LEE, Y.J.; LIU, D.D.; LIN, S.Z.; LI, H. Homing genes, cell therapy and stroke. **Front. Biosci.** v. 11 p. 899–907, 2006.

SMITH-SEEMILLER, L.; LOVELL, M.R.; SMITH, S.; MARKOSIAN, N.; TOWNSEND, R.N. Impact of skull fracture on neuropsychological functioning following closed head injury. **Brain Inj**, v. 11 p. 191-196,1997.

SONG, M.; MOHAMAD, O.; GU, X.; WEI, L.; YU, S.P. Restoration of Intracortical and Thalamocortical Circuits After Transplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Into the Ischemic Brain of Mice. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 11, p.2001-2015, 2013.

STEVENS, B.; ALLEN, N.J.; VAZQUEZ, L.E.; HOWELL, G.R.; CHRISTOPHERSON, K.S.; NOURI, N.; MICHEVA, K.D.; MEHALOW, A.K.; HUBERMAN, A.D.; STAFFORD, B.; SHER, A.; LITKE, A.M.; LAMBRIS, J.D.; SMITH, S.J.; JOHN, S.W.; BARRES, B.A. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. **Cell**, v.131, p.1164–1178, 2007.

STROEMER, R.P.; KENT, T.A.; HULSEBOSCH, C.E. Neocortical Neural Sprouting, Synaptogenesis, and Behavioral Recovery After Neocortical

Infarction in Rats. **Stroke**, v. 26, n. 11, p.2135-2144, 1995.

SUNG, J. H.; CHO, E. H.; KIM, M. O.; KOH, P.O. Identification of proteins differentially expressed by melatonin treatment in cerebral ischemic injury—a proteomics approach. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 3, p.300-306, 2009.

SUNG, J. H.; SHAH, F. A.; GIM, S. A.; KOH, P.O. Identification of proteins in hyperglycemia and stroke animal models. **Journal of surgical research**, v. 200, n. 1, p. 365-373, 2016.

SZELE, F. G.; ALEXANDER, C.; CHESSELET, M. F. Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. **J. Neurosci**, v. 15 p. 4429-4448, 1995.

TOMINAGA, M.; KURIHARA. H.; HONDA, S.; AMAKAWA, G.; SAKAI, T.; TOMOOKA, Y. Molecular characterization of mitocalcin, a novel mitochondrial Ca²⁺-binding protein with EF-hand and coiled-coil domains. **J. Neurochem**, v. 96, p. 292-304, 2006.

TROWBRIDGE, H.O.; EMLING, R.C. *Inflamação: Uma Revisão do Processo*. São Paulo: Quintessence. p. 172, 1996.

TUAN, R.S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. **Arthritis Research and Theraphy**, v. 5, n. 1, p.32-45, 2002.

UNTERBERG, A.W.; STOVER, J.; KRESS, B.; KIENING, K.L. Edema and brain trauma. **Neuroscience**, v. 129 p. 1021–9, 2004

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, 2001.

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mut. Res.**, v.195, p.137-149.1988.

VOORHIES, AC.; JONES, TA. 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, 2002.

WAGNER, K.R.; XI, G.; HUA, Y.; KLEINHOLZ, M.; COURTEN-MYERS, G.M.; MYERS, R.E. Early metabolic alterations in edematous perihematoma brain regions following experimental intracerebral hemorrhage. **Journal of Neurosurgery**. v. 88 p. 1058-1065, 1998.

WAGNER, S.; NAGEL, S.; KLUGE, B.; SCHWAB, S.; HEILAND, S.; KOZIOL, J. Topographically graded post ischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. **Brain Res**. v.984 p. 63–75, 2003.

Wang, Q.R.; Wang, B.H.; Huang, Y.H. Dai, G.; Li, W.M.; Yan, Q. Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 1, p.21-29, 2007.

WEISSMAN, I.L.; ANDERSON, D.J.; GAGE, F.H. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. **Annual Review Of Cell And Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p.387-403, 2001.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: The significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.** v. 68 p.251–306; 1980.

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

ZENG, J.; MATTSSON, B.; SCHULZ, M.K.; JOHANSSON, B.B.; SORENSEN, J. Expression of zinc-positive cells and terminals in fetal neocortical homografts

to adult rat depends on lesion type and rearing conditions. **Exp. Neurol**, v. 164, p.176-183, 2000.

ZGAVC, T.; HU, T. T.; VAN DE PLAS, B.; VINKEN, M.; CEULEMANS, A. G.; HACHIMI-IDRISSI, S.; ARCKENS, L. Proteomic analysis of global protein expression changes in the endothelin-1 rat model for cerebral ischemia: rescue effect of mild hypothermia. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 5, p. 379-388, 2013.

ZIPFEL, G.J.; BABCOCK, D.J.; LEE, J.M.; CHOI, D.W. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. **J Neurotrauma**. v. 17 p. 857-869, 2000.