

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM MATRIZ  
TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO E SUA UTILIZAÇÃO EM MODELO DE  
LESÃO CORTICAL POR ABLAÇÃO EM RATOS

**HELDER TEIXEIRA DE FREITAS**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO - 2013

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM MATRIZ  
TRIDIMENSIONAL DE COLÁGENO E SUA UTILIZAÇÃO EM MODELO DE  
LESÃO CORTICAL POR ABLAÇÃO EM RATOS

**HELDER TEIXEIRA DE FREITAS**

Dissertação apresentada ao  
Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro como parte das  
exigências para obtenção do  
título de Mestre em  
Biociências e Biotecnologia.  
Área de concentração:  
Biologia Celular.

**Aprovada em 17 de maio de 2013.**

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. em Ciências Biológicas - Biofísica) - UENF

---

Prof. César Luis Siqueira Junior (Dr. em Biociências e Biotecnologia) - UNIRIO

---

Prof. André Lacerda de Abreu Oliveira (Dr. em Medicina - Cirurgia Geral) –  
UENF

---

Prof. Arthur Giraldi Guimarães (Dr. em Ciências Biológicas - Biofísica) – UENF  
- Orientador

Dedico este trabalho a toda minha família,  
em especial a meus pais, Rosa e  
Joaquim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pelo dom da vida. Graças pela sabedoria e perseverança proporcionadas a mim durante este projeto de pesquisa, e de fato, em toda a minha vida.

Agradeço aos meus pais, Rosa e Joaquim, por sua fé em mim que me permite ser ambicioso e obter êxito em meus objetivos. Foi sob o olhar atento deles que eu ganhei sensatez e a capacidade de enfrentar desafios. Além disso, agradeço a minha irmã Laura, por sua luta pela vida e por ser um sinal de amor. Ao meu irmão Natanael e aos meus sobrinhos, por todos bons momentos. Agradeço às minhas tias Ângela, Dalva, Graça, e Teresa por colaborarem cada uma ao seu modo para a minha formação. Sou muito grato a minha avó campista Elba, por tudo!

Gostaria de agradecer ao Professor Arthur Giraldo Guimarães por sua orientação, compreensão, paciência e mais importante, a sua amizade durante meus estudos de graduação e pós-graduação. Sua orientação foi fundamental para me fornecer uma experiência consistente com os meus objetivos de carreira. Fui incentivado não só para crescer como pesquisador e um biólogo, mas também como um instrutor e um pensador independente. Por tudo que você fez por mim, eu agradeço.

Eu também gostaria de agradecer a todos os membros do grupo de pesquisa, especialmente Mariana Rebel, Bárbara Coelho e Mayara Martins por me oferecerem a oportunidade de trabalhar com bom humor e amizade necessários para um bom desempenho nos experimentos e melhor aprendizado. Obrigado também ao excelente auxílio prestado pelas técnicas do LBCT: Rose, Adriana, Darli, Geovana e Beatriz. Agradeço, também, à Professora Elena Lassounskaia, por gentilmente ceder os kits usados no ensaio Bioplex®, deste estudo. Obrigado às técnicas do LBR, Juliana e Rita, por auxiliarem neste experimento.

Obrigado aos membros da banca avaliadora: Dr. André Lacerda, Dr. César Luis e Dr. Renato DaMatta por se disponibilizarem a avaliar este trabalho. Agradeço muito à revisora Dr<sup>a</sup> Aline Intorne pelo dedicado trabalho que tanto contribuiu na elaboração deste documento.

Agradeço a todos os meus amigos por só quererem o meu bem e me valorizarem tanto como pessoa. Obrigado pela amizade! Agradeço ao Bruno pelo seu apoio, incentivo, paciência e calma. Inegavelmente a sua tolerância aos meus humores ocasionais é uma prova por si só da sua amizade e respeito por mim. Obrigado tudo e por todos esses anos.

Finalmente, gostaria de agradecer à UENF e ao Centro de Biociências e Biotecnologia por abrirem as portas para que eu pudesse realizar este trabalho. Proporcionaram-me mais que a busca de conhecimento técnico e científico, mas um aprendizado para a vida. Também a FAPERJ pelo auxílio financeiro e a Capes pela concessão da bolsa de mestrado. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Controle motor .....	1
1.2. Lesões no sistema nervoso central.....	4
1.2.1 Modelos animais de lesões no sistema nervoso central .....	5
1.2.2 Testes comportamentais para avaliação funcional em ratos .....	8
1.2.2.1. Teste de recuperação de pílula e alcance na câmara .....	8
1.2.2.2. Teste do cilindro.....	10
1.2.2.3. Teste de remoção de adesivo.....	10
1.3. Terapia celular .....	11
1.3.1. Terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea .....	13
1.3.2. Propriedades imunológicas das células-tronco mesenquimais.....	15
1.3.3. Cultivo tridimensional.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. Animais .....	21
3.2. Ablação no córtex motor e somestésico de ratos .....	21
3.3. Obtenção e cultivo das células mesenquimais de medula óssea .....	22
3.4. Obtenção da matriz de colágeno e cultivo celular.....	24
3.5. Administração das células e da matriz.....	25
3.6. Marcação celular para rastreamento .....	27
3.7. Testes comportamentais para avaliação funcional .....	28
3.7.1 Teste de recuperação de pílula e alcance na câmara .....	28

3.7.2 Teste do cilindro.....	30
3.7.3 Teste de remoção do adesivo.....	31
3.8 Detecção de citocinas.....	32
3.9 Análise estatística.....	34
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Lesão cortical unilateral por ablação.....	35
4.2. Viabilidade e marcação das células mesenquimais de medula óssea.....	37
4.3. Avaliações funcionais .....	40
4.3.1. Teste da recuperação de pílula e alcance na câmara .....	40
4.3.2. Teste do adesivo.....	42
4.3.3. Teste do cilindro.....	44
4.4. Avaliação do volume da lesão .....	46
4.5. Correlação do volume de lesão com a recuperação funcional .....	47
4.6. Análise de citocinas .....	47
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Superfície lateral encefálica.....	2
Figura 2: Representações do sistema motor.....	3
Figura 3: Injeção do traçador anterógrado Dextrana Amina Biotinilada.....	7
Figura 4: Diferenciação das células-tronco estromais e hematopoiéticas.....	14
Figura 5: Esquema da extração.....	23
Figura 6: Esquema ilustrando o desenho experimental utilizado.....	27
Figura 7: Teste RPAC.....	29
Figura 8: Teste do Cilindro.....	31
Figura 9: Teste do Adesivo.....	32
Figura 10: Imunoensaio sanduíche BioPlex.....	34
Figura 11. Extensão da lesão.....	36
Figura 12: Viabilidade das CMMOs 3D.....	37
Figura 13: Marcação com Celltracer.....	38
Figura 14: Rastreamento das células mesenquimais de medula óssea utilizadas após ablação.....	39
Figura 15: Teste RPAC.....	41
Figura 16: Teste do adesivo.....	43
Figura 17: Teste do cilindro.....	45
Figura 18: Quantificação do volume de lesão.....	48
Figura 19: Correlações.....	49
Figura 20: Quantificação de citocinas no plasma.....	50
Figura 21: Quantificação de citocinas nos homogenatos de tecido lesado (ipsolateral).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA:** Análise de variância paramétrica
- APC:** células apresentadoras de antígeno
- ATP:** Adenosina 5'-trifosfato
- AVE:** Acidente vascular encefálico
- BDA:** Dextrana amina biotinizada (do inglês *biotinylated dextran amine*)
- BDNF:** Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês: *brain-derived neurotrophic factor*)
- BHE:** Barreira Hemato-encefálica
- CMMOs:** Células Mesenquimais de Medula Óssea
- DMEM-F12:** Meio de cultura celular Dulbecco e Mistura de Nutrientes de Ham F12 (do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DPA:** Dia pós-ablação
- EGF:** Fator de crescimento epidermal (do inglês: *epidermal growth factor*)
- EPC:** Células progenitoras endoteliais (do inglês: *endothelial progenitor cell*)
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- ESC:** Células-tronco embrionárias (do inglês: *embryonic stem cells*)
- FGF-2:** Fator de crescimento de fibroblasto 2 (do inglês: *fibroblast growth factor 2*)
- G-CSF:** Fator estimulante de colônia de granulócitos (do inglês: *granulocyte colony-stimulating factor*)
- HLA-G:** Antígeno de histocompatibilidade G
- HSC:** Células-tronco hematopoiéticas (do inglês: *hematopoietic stem cells*)
- i.p.:** Intra peritoneal
- i.v.** Intra venoso
- i.s.:** *In Situ*
- ICAM-1:** Moléculas de adesão intracelular 1 (do inglês: *intercellular adhesion molecule-1*)
- IL-1, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11:** Interleucinas 1, 7, 8, 10 e 11
- M-CSF:** fator de crescimento estimulador de macrófago
- NGF:** Fator de crescimento neural (do inglês: *nerve growth factor*)
- PBS:** Salina tamponada com fosfato (do inglês: *phosphate buffered saline*)
- PGE2:** prostaglandinas

**SCF:** Fator derivado de células-tronco (do inglês: *stem cell factor*)

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**TGF-beta:** Fator de crescimento de transformação beta (do inglês: *transforming growth factor beta*)

**TNF-alfa:** Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *tumor necrosis factor alfa*)

**TTC:** Cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (do inglês: *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*)

**VCAM-1:** Moléculas de adesão das células vasculares 1 (do inglês: *vascular cell adhesion molecule-1*). O mesmo que CD106.

**VEGF:** Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: *vascular endothelial growth factor*)

## RESUMO

As lesões do Sistema Nervoso Central (SNC) são enfermidades reconhecidas por serem as maiores causadoras de incapacitação em seres humanos. Recentes estudos têm demonstrado um grande potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais de medula óssea (CMMOs) para o tratamento de lesão do SNC. Além disso, estudos tem sugerido um aumento da eficácia terapêutica destas células quando cultivadas em matriz de colágeno, um ambiente em três dimensões (3D), quando comparado com o cultivo tradicional em superfície de plástico, um ambiente bidimensional (2D). Utilizando o modelo de lesão unilateral dos córtices cerebrais motor e somestésico por ablação, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito terapêutico das CMMOs, usando os dois protocolos de cultivo (2D e 3D). Foram testadas também as vias de administração intravenosa (iv) para as células cultivadas em 2D, e intralesional, ou *in situ* (is), para os dois tipos de cultivo. A avaliação terapêutica foi feita por meio da quantificação da recuperação sensorimotora da pata dianteira contralateral à lesão. Ratos Wistar machos (2-3 meses, 240-380g, N=6 por grupo experimental) foram submetidos à lesão cerebral focal feita pela remoção por sucção da maior parte do córtex motor primário e de parte do córtex somestésico do hemisfério esquerdo. Após 24 h os animais foram tratados, sendo separados de acordo com o tratamento recebido nos seguintes grupos experimentais: 2D CMMO iv - receberam CMMOs cultivadas em garrafa (2D) pela via de administração iv (veia jugular); 2D PBS iv - receberam o veículo (PBS) iv; 3D CMMO is - receberam CMMOS cultivadas em matriz de colágeno por 24 h pela via de administração is; 3D colágeno is - receberam colágeno is; 2D CMMO is - receberam CMMOs cultivadas em 2D pela via is; 2D PBS is - receberam veículo (PBS) is. A verificação da viabilidade das CMMOs na matriz de colágeno foi feita pela marcação com o corante azul de tripano. A visualização das CMMOs administradas is foi feita pela marcação das mesmas com o marcador fluorescente *CellTrace Far Red*. Testes sensorimotores foram realizados antes da lesão e nas semanas subsequentes à indução da lesão e do tratamento. Todos os animais foram sacrificados 60 dias após a indução da lesão para quantificação do volume de lesão. Os resultados da avaliação sensorimotora mostraram que a via de administração iv

apresentou maior efeito geral de aumento da recuperação sensorimotora comparada aos demais grupos. Não houve diferença significativa no volume de lesão entre os grupos. Além disso, a análise de correlação linear mostrou não haver correlação entre volume de lesão e nível de desempenho sensorimotor. Animais adicionais dos grupos 2D CMMO iv e PBS iv (n=3 por grupo) foram eutanasiados 24 h após no tratamento para dosagem de citocinas no sangue e no tecido encefálico lesado. No plasma foi observado redução significativa dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-2, GM-CSF, IL-4, IL-6, e IL-10 no grupo 2D CMMO iv, e no homogenato do tecido lesado não foi observada diferença entre os grupos. Nossos resultados sugerem que o cultivo em colágeno (3D) não resulta em aumento da capacidade terapêutica das CMMOs, quando comparado com o protocolo de cultivo em 2D e administração sistêmica. Entretanto, considerando apenas a via de administração *is*, o uso do cultivo em 3D demonstrou melhores resultados. A análise das citocinas sugere que a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias pode ser um dos mecanismos de ação das CMMOs. Entretanto, foi observada também redução de citocinas consideradas anti-inflamatórias. Isto mostra que o papel imunomodulador das CMMOs é complexo, e o verdadeiro papel de citocinas consideradas anti-inflamatórias no modelo usado precisam ser melhor investigados. Concluindo, nossos resultados mostram que, ao contrário do que a literatura sugere, nem sempre o cultivo das CMMOs em 3D resulta em melhoria das suas propriedades terapêuticas, sendo o protocolo de tratamento com cultivo tradicional (2D) e administração sistêmica (iv) uma melhor alternativa.

**Palavras-chave:** cultivo tridimensional, terapia celular, lesões encefálicas.

## ABSTRACT

Lesions of the central nervous system (CNS) diseases are recognized as being the main cause of disability in humans. Recent studies have shown great therapeutic potential of mesenchymal stem cells from bone marrow (BMMC) for the treatment of CNS injury. In addition, studies have suggested an increased therapeutic efficacy of these cells when cultured in collagen matrix, an environment in three dimensions (3D) as compared with traditional surface culture plastic environment (2D). Using the model of unilateral lesion of the motor and somatosensory cortices brain ablation, this study aimed to evaluate the therapeutic effect of BMMC, using both culture protocols (2D and 3D). Were also tested routes of administration, intravenous (iv) for cells cultured in 2D, and intralesional, or in situ (is) for the two types of culture. The therapeutic evaluation was performed by the quantification of sensorimotor recovery from forepaw contralateral to the lesion. Male Wistar rats (2-3 months, 240-380g, N = 6 per experimental group) were subjected to focal cerebral damage done by the removal by suction of most of the primary motor cortex and the somatosensory cortex in the left hemisphere. After 24 h, the animals were treated, separated according to treatment received the following experimental groups: 2L iv BMMC - received BMMC cultured in bottles (2D) for iv administration route (jugular vein); 2L PBS iv - received the vehicle (PBS) iv; 3D BMMC is - received BMMC cultured in collagen matrix for 24 h route of administration is, is 3D Collagen - Collagen is received; 2D BMMC is - received BMMC grown in 2D is the path; 2D PBS is - receiving vehicle (PBS) is. Checking the viability of BMMC the collagen matrix was made by staining with trypan blue dye. The preview of the BMMC was administered is done by marking the same with the fluorescent marker CellTrace Far Red sensorimotor tests were performed before the injury and in the weeks after the induction of injury and treatment. All animals were sacrificed 60 days after injury induction for quantification of lesion volume. The evaluation results showed that the sensorimotor pathway iv administration showed greater overall effect of increased sensorimotor recovery compared to the other groups. There was no significant difference in lesion volume between groups. In addition, the linear correlation analysis showed no correlation between lesion volume and sensorimotor performance level. Additional groups

of animals 2D BMMC and iv PBS iv (n = 3 per group) were euthanized 24 h after treatment for measurement of cytokines in the blood and the damaged brain tissue. In plasma it was observed a significant reduction in levels of IL-1 $\beta$ , IL-2, GM-CSF, IL-4, IL-6, and IL-10 in group IV BMMC 2D, and the injured tissue homogenate there was no difference between groups. Our results suggest that cultivation in collagen (3D) does not result in increased therapeutic ability of BMMC compared with the cultivation protocol in 2D and systemic administration. However, just considering the administration route is the use of 3D culture showed better results. Analysis of cytokines suggests that reduced expression of proinflammatory cytokines may be one of the mechanisms of action of BMMC. However, there was also a reduction of anti-inflammatory cytokines considered. This shows that the immunomodulatory role of BMMC is complex, and the role of cytokines considered true anti-inflammatory used in the model needs to be better investigated. In conclusion, our results show that, contrary to the literature suggests that not always the cultivation of BMMC 3D results in improvement of their therapeutic properties, with the treatment protocol traditional cultivation (2D) and systemic administration (iv) a better alternative.

**Keywords:** three-dimensional culture, cell therapy, brain lesions.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Controle motor

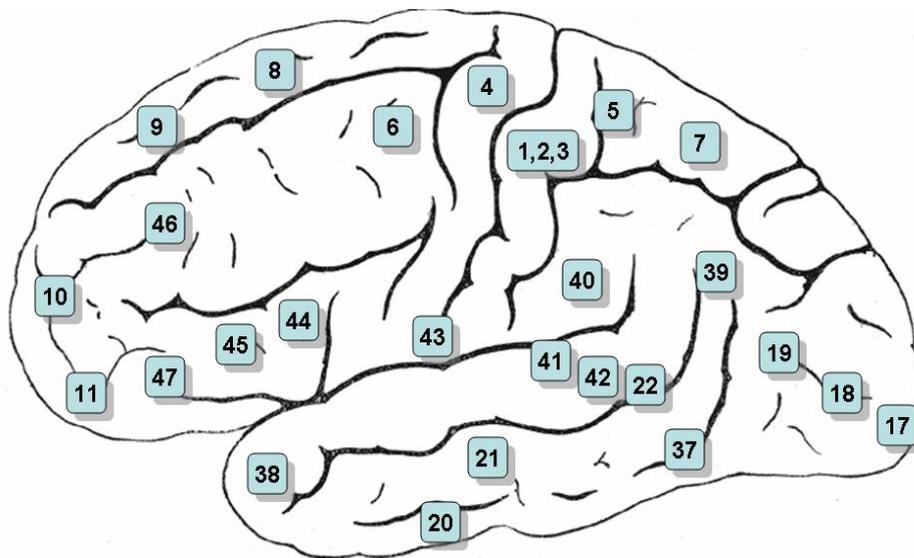
O controle motor é dependente da interconexão de várias estruturas. O primeiro passo para a inicialização de um movimento voluntário é a ativação cortical. O córtex cerebral, presente em todos os animais vertebrados, é dividido em três regiões: hipocampo, córtex olfativo e neocórtex (ou simplesmente córtex), sendo este último somente encontrado em mamíferos. Dentre as características comuns a estas três regiões, destaca-se a disposição em camadas dos corpos celulares neuronais paralelas à superfície do encéfalo, a escassez de neurônios na camada I (mais próxima à pia-máter) e a presença de células piramidais que emitem dendritos apicais, em pelo menos uma camada (KANDEL *et al.*, 2003).

O planejamento de uma ação motora tem início no neocórtex, com a chegada da informação sensorial pela identificação do estímulo ambiental. A ativação coordenada dessa rede neuronal possibilita o controle multi-articular fino e independente, que é necessário para os movimentos complexos de alcance e preensão (KANDEL *et al.*, 2003; ADKINS *et al.*, 2006).

O neocórtex possui seis camadas celulares e é o mais complexo dentre os tipos de córtex, sendo importante no processamento das informações visuais, auditivas e daquelas relacionadas às sensações somáticas e movimentos voluntários, dentre outras (BEAR *et al.*, 2008; KANDEL *et al.*, 2003). Em humanos, o sistema motor está arranjado em níveis hierárquicos de controle, com o prosencéfalo no topo e a medula espinhal na base. O nível mais alto, representado pelas áreas de associação do neocórtex e pelos núcleos basais do prosencéfalo, está envolvido com a finalidade do movimento e a estratégia que melhor alcança essa finalidade. O nível intermediário, representado pelo córtex motor e pelo cerebelo, relaciona-se com a tática, ou seja, as sequências de contrações musculares arranjadas no tempo e no espaço, necessárias para atingir, de forma suave e acurada, a meta estratégica. O nível mais baixo, formado pelo tronco encefálico e pela medula espinhal, é responsável pela execução, dada com a ativação do neurônio motor

e do conjunto de interneurônios, que geram o movimento e fazem os ajustes posturais necessários.

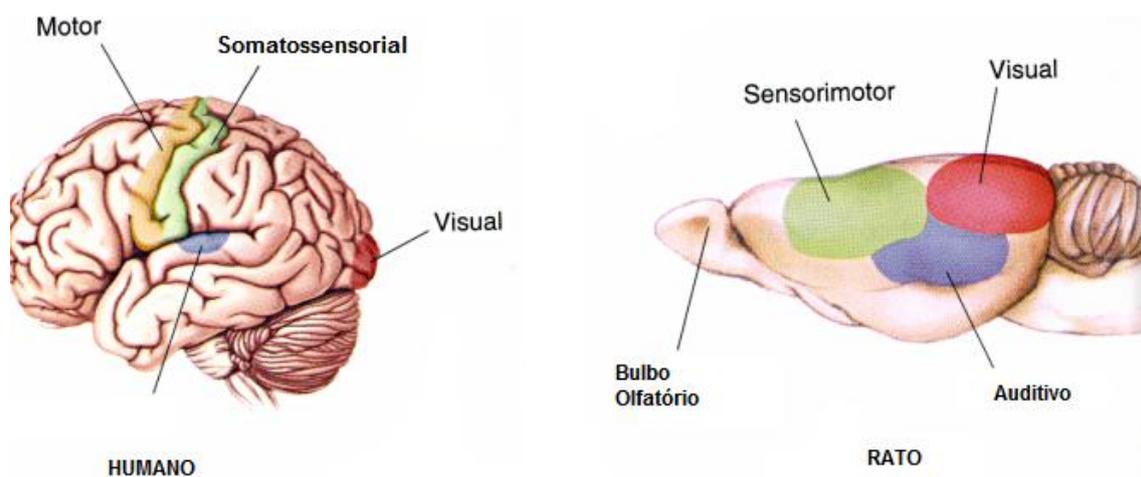
O córtex cerebral também é dividido através de uma organização citoarquitetônica amplamente conhecida, chamada áreas de Brodmann (Figura 1). Neste esquema, é observado que as áreas 4 e 6 constituem o córtex motor e córtex pré-motor e córtex motor suplementar, respectivamente (BEAR *et al.*, 2008). A área motora suplementar difere anatomicamente da pré-motora por enviar axônios para unidades motoras distais, sendo que a pré motora envia para unidades motoras proximais (BEAR *et al.*, 2008). Essas áreas estão localizadas anteriormente ao giro pré-central e são responsáveis pelo planejamento dos movimentos, apresentando diferenças em termos funcionais (KANDEL *et al.*, 2003).



**Figura 1: Superfície lateral encefálica.** Demonstração das áreas de Brodmann em números. A área 4 é também chamada de córtex motor primário (M1); Área 5: córtex de associação somatossensorial e a 6 de córtex pré-motor e córtex motor suplementar. Adaptado de BEAR, 2002.

O córtex motor primário (M1) localiza-se no giro pré-central do lobo frontal. Dele partem projeções axonais que se dirigem para regiões subcorticais, formando as vias descendentes. M1 é responsável pela força muscular necessária na execução de um movimento que se inicia, bem como pela variação dessa força, a velocidade do movimento e sua direção (LENT, 2001). M1 recebe aferências das áreas pré-motora e motora suplementar (área 6), do córtex de associação somatossensorial (área 5) e de regiões subcorticais (KANDEL *et al.*, 2003).

Em ratos, o córtex motor é denominado de isocórtex frontal (Fr). Trata-se de uma estrutura cuja marca característica é a heterogeneidade celular. Deste modo, Fr é dividido de acordo com suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexão, em 3 áreas: Fr1 ou M1, Fr2 ou M2 e Fr3. M1 corresponde ao córtex motor primário de primatas (área 4). M2 corresponde à área 6 (pré-motora e a área motora suplementar), enquanto Fr3 seria uma sub-região da representação somatotópica (Figuras 1 e 2). Essas regiões são estruturadas em camadas de células, o que lhes confere um padrão de organização laminar (PAXINOS e WATSON, 1986; PAXINOS, 2004).



**Figura 2: Representações do sistema motor.** Esquerda: representação das regiões do sistema motor em humanos. Direita: representação da localização do córtex sensorimotor em ratos. Adaptado de BEAR *et al.*, 2008.

Por meio de experimentos eletrofisiológicos, foi demonstrado que M1 de ratos se sobrepõe ao córtex somatosensorial primário nas regiões correspondentes à pata traseira e em parte da região correspondente à pata dianteira. O córtex sensorimotor primário de ratos pode então ser dividido em três partes: uma contendo exclusivamente M1, outra com o córtex somatosensorial primário e uma terceira contendo a sobreposição dos dois córtices (Figura 2). As regiões onde há sobreposição recebem aferências cutâneas e emitem projeções motoras. Danos no M1 levam a deficiências na manipulação de objetos, na velocidade da contração muscular e na produção de força (WISE e DONOGHUE, 1986).

Comumente, acidentes vasculares lesionam o córtex motor ou o trato cortico-espinhal. Logo, o indivíduo poderá apresentar paralisia no lado contralateral, mas uma recuperação considerável dos movimentos voluntários pode ocorrer com o passar do tempo (BEAR *et al.*, 2008; MURPHY e CORBETT, 2009). Devido à similaridade na organização cortical entre humanos e roedores, tem sido crescente o incentivo aos estudos de mecanismos fisiopatológicos ocasionados por lesões encefálicas em animais.

## **1.2. Lesões no sistema nervoso central**

Depois de ocorrida uma lesão no Sistema Nervoso Central (SNC), em poucos minutos o tecido encefálico sofre uma série de eventos fisiopatológicos complexos denominados 'cascata isquêmica'. Decorrente da falha energética, ocorre despolarização neuronal, excessiva liberação e falha na recaptção do neurotransmissor glutamato. Consequentemente, há um aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{+2}$  e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), seguido da depleção dos níveis de enzimas anti-oxidantes. Ocorre ainda a produção de ácido araquidônico e mediadores inflamatórios, além da ativação de mensageiros secundários envolvidos na sinalização da morte celular programada e rompimento da barreira hematoencefálica (HARUKUNI e BHARDWAJ, 2006; MEHTA *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do dano neural após a lesão envolve mecanismos, que incluem uma reforçada resposta inflamatória mediada pela liberação do fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ). Este fator se transloca ao núcleo celular e está

associado à supra-regulação de genes envolvidos nos processos inflamatórios e apoptóticos, incluindo interleucina1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fatores necróticos tumorais (TNF- $\alpha$ ) (WAGNER *et al.*, 1998). Há ativação microglial, participando de uma variedade de respostas adaptativas, que incluem a fagocitose de células necróticas e o recrutamento de leucócitos (WANG *et al.*, 2003) Ocorre também a ativação do sistema complemento, que compõe parte da resposta imunológica particularmente importante no edema pós-hemorragico (SAYAH *et al.*, 1999); e ativação de metaloproteinases de matriz – uma família de endopeptidases que degradam a matriz extracelular (ROSENBERG *et al.*, 2007). Por fim, ocorre apoptose, que inicia aproximadamente 24 h após o evento causador da lesão (MAYNE *et al.*, 2001).

Dado o caráter degenerativo das lesões, as enfermidades ocorridas no SNC ocasionam um grande problema visto a incapacitação imposta ao indivíduo. É observado forte impacto social, devido a sua prevalência, morbidade e mortalidade na população. Isto acarreta gastos elevados com o tratamento e a reabilitação do paciente, ocasionando ônus a sociedade. (LESSA, 1999). Por isso, constitui uma das maiores problemáticas da saúde pública mundial (MINELLI *et al.*, 2007), o que justifica o número de investimentos realizados em pesquisas na busca de terapias.

### **1.2.1 Modelos animais de lesões no sistema nervoso central**

A utilização de roedores como modelos para lesões encefálicas já é conhecida. Ratos possuem uma organização cerebral anatomicamente semelhante ao homem (GRAHAM *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2010). Estes modelos constituem uma ferramenta valiosa para estudar os diferentes aspectos do processo neurodegenerativo (HUNTER *et al.*, 1995).

Há vários modelos de injúria cerebral em roedores, que são classificados de acordo com o local e o meio de realização da lesão. Estes modelos podem envolver a oclusão de artérias cerebrais por meio da coagulação de vasos sanguíneos por calor (isquemia por termocoagulação) ou drogas vasoconstritoras, remoção do tecido encefálico (ablação), choques

mecânicos traumáticos, entre outros (NAPIERALSKI *et al.*, 2008; LIPTON, 1999).

Em modelos de isquemia focal por termocoagulação, a redução do fluxo sanguíneo ocorre em uma região específica do cérebro. Esta pode ser classificada em permanente, quando o bloqueio arterial é irreversível, ou temporária, com vasos obstruídos por um determinado tempo e subsequente reperfusão (HUNTER *et al.*, 1995; LIPTON, 1999; GRAHAM *et al.*, 2000). A isquemia permanente resulta em uma região densa de dano isquêmico (centro da isquemia), que apresenta alterações degenerativas. Já no caso de isquemia temporária, tem sido reportado que a lesão pode ser em consequência tanto da isquemia quanto da reperfusão.

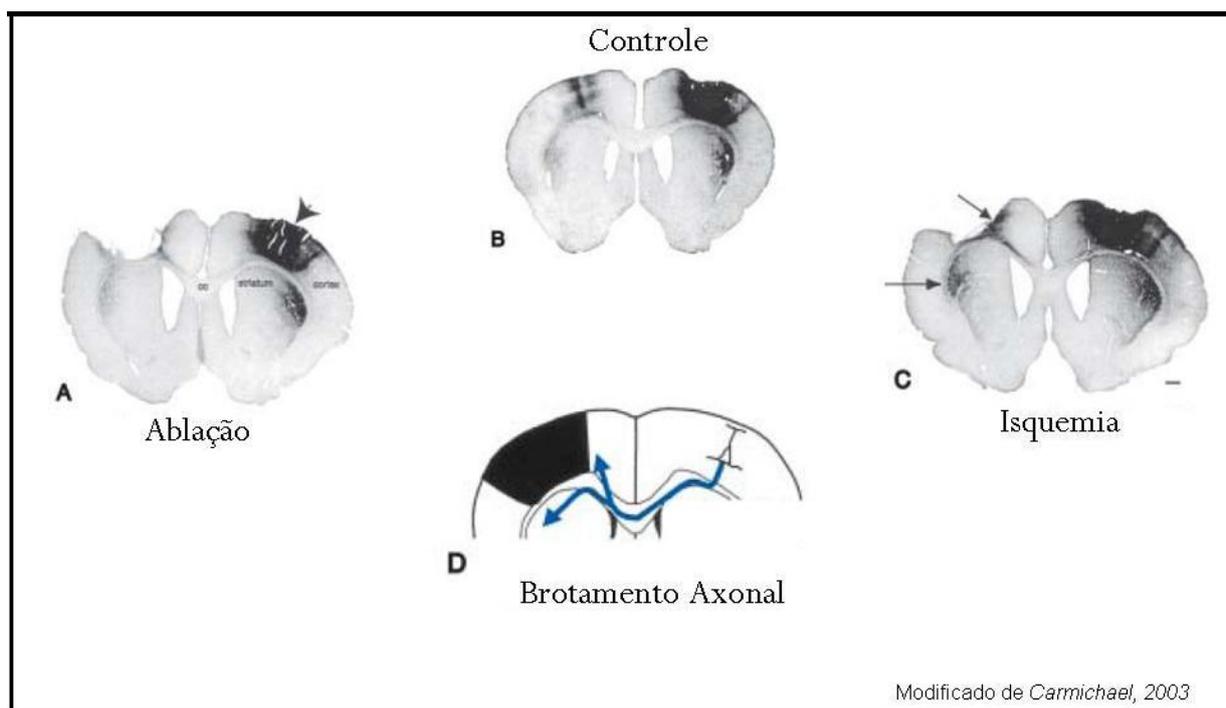
Outro tipo de lesão induzida é a ablação, onde o tecido encefálico é removido por aspiração. Este procedimento induz lesão nas seis camadas do córtex cerebral, sem acometimento da substância branca nem do corpo caloso (SCHALLERT *et al.*, 2000; NAPIERALSKI *et al.*, 1998). Se mostra interessante, pois permite que se faça a lesão em diferentes regiões da porção dorsal do córtex. Pode-se também variar a extensão do dano, abrangendo mais ou menos áreas corticais. Este modelo vem sendo utilizado em estudos sobre a plasticidade axonal, em especial nas conexões cortico-corticais e cortico-estriatais (SZELE *et al.*, 1995; URYU *et al.*, 2001).

A neuroplasticidade promove a recuperação parcial das funções após a injúria cerebral. As lesões produzem mudanças na distribuição e lateralidades das representações sensoriais, motoras e de linguagens no cérebro, que se correlacionam com a recuperação funcional. Neste sentido, o evento de neuroplasticidade vem sendo estudado por reorganizar o tecido cortical adjacente, alterar os mapas corticais (NUDO *et al.*, 1996) e modificar o perfil de expressão protéica e a morfologia dendrítica (GONZALEZ e KOLB, 2003).

Anatomicamente, em lesões isquêmicas por termocoagulação, ocorre indução de projeções axonais para o local lesionado, projeções intra-corticais e projeções inter-hemisféricas de longa distância. Estas projeções axonais pós-isquêmicas estabelecem novos modelos de conexões corticais (NAPIERALSKI *et al.*, 1998). Alterações no padrão de respostas comportamental e funcional ocorrem devido aos diferentes tipos de lesões no córtex motor. Com isso, o método utilizado para induzir a lesão em um organismo modelo, pode induzir

diferenças evidentes na plasticidade cortical e subcortical, além de diversos efeitos na perda funcional (GONZALEZ e KOLB, 2003.).

Na lesão cerebral induzida por ablação, há variações no corpo estriado diferentes daquelas induzidas por termocoagulação em áreas equivalentes do cérebro. Lesões isquêmicas do córtex sensorimotor causadas por termocoagulação provocam brotamento axonal e remodelação sináptica no córtex homotípico do hemisfério oposto a lesão. Uma densa rede axonal é observada no corpo estriado dorso ipsilateral à lesão. Isto não é visto em lesões por ablação na mesma área cortical. Nenhum ou mínimo brotamento axonal é observado no corpo estriado dorsolateral denervado após lesões por aspiração (NAPIERALSKI *et al.*, 1996), levando a considerar que o processo de brotamento axonal é distinto para cada lesão (Figura 3).



**Figura 3: Injeção do traçador anterógrado Dextrana Amina Biotinilada.** No local indicado pela cabeça de seta em (A), pode-se visualizar os terminais axonais dos neurônios localizados no local da injeção. Em (B), o padrão normal (controle) das conexões cortico-corticais no córtex motor primário contralateral, e das cortico-estriatais no corpo estriado ipsilateral. No córtex de animais submetidos à isquemia por termoregulação (C), houve um importante aumento em projeções axonais no corpo

estriado contralateral (seta de baixo) e ainda na periferia da lesão, no córtex contralateral (seta de cima). Esta mesma plasticidade anatômica não foi induzida pela lesão por ablação (A) de mesma extensão e localização. Em (D), um esquema ilustrativo do que ocorre em (C): o brotamento axonal que é induzido nos neurônios do córtex motor do lado oposto à lesão, apenas quando esta é induzida por isquemia causada por termoregulação. Adaptado de CARMICHAEL, 2003.

### **1.2.2 Testes comportamentais para avaliação funcional em ratos**

Danos unilaterais no córtex sensorimotor do cérebro do rato na região responsável pela movimentação da pata dianteira causam déficits crônicos na função somatosensorial e conseqüentemente, no uso da pata contralateral (SCHALLERT *et al.*, 2000). Estas assimetrias podem ser facilmente quantificadas através de testes comportamentais simples, sensíveis e confiáveis, amplamente usados em estudos que envolvem lesões no SNC (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHAAR *et al.*, 2010). A avaliação da função neurológica permite determinar o grau do dano ocorrido ao longo de um período de tempo (SCHAAR *et al.*, 2010). Para o sucesso da pesquisa com lesão neurológica, é fundamental considerar a capacidade dos testes de seleção, quanto à avaliação do grau de dano ocasionado pela estrutura lesionada (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHAAR *et al.*, 2010).

Como será apresentado adiante, no presente trabalho foi realizada a lesão por ablação do córtex sensorimotor de rato. As incapacidades decorrentes deste tipo de lesão estão associadas a déficits sensoriais e motores, incluindo a falta de coordenação e a paralisia ou paresia de membros (SCHALLERT *et al.*, 2000). Neste sentido, os métodos comportamentais selecionados para avaliação funcional foram os testes de Recuperação de Pílula e Alcance na Câmara (RPAC), Cilindro e Adesivo, os quais são descritos abaixo em maiores detalhes.

#### **1.2.2.1. Teste de recuperação de pílula e alcance na câmara**

A literatura relata que a complexidade da execução dos movimentos no

uso das patas dianteiras dos ratos é similar a dos primatas (ALAVERDASHVILI e WHISHAW, 2008). Com isso, testes que possibilitam avaliar a utilização das patas dianteiras em movimentos mais finos, como segurar uma pílula de ração e levá-la até a boca, têm sido utilizados a fim de investigar déficits funcionais motores após lesão encefálica unilateral em roedores (ALLRED *et al.*, 2008; SCHAAR *et al.*, 2010).

O teste de RPAC analisa o padrão de movimentos sofisticados das patas dianteiras do animal. É um teste para avaliação da função sensorimotora mais refinada (BIERNASKIE *et al.*, 2005; BRYANT *et al.*; 2007; GHARBAWIE *et al.*, 2005). Durante o experimento, o animal é colocado numa caixa transparente, que possui uma bandeja fixada à parede externa frontal. Esta parede funciona como suporte para as pílulas de ração, que são alvos a serem alcançados pela pata dianteira do animal. No interior da caixa é inserida uma placa removível, servindo como barreira e inibindo a utilização da pata ipsilateral para desempenhar a tarefa de segurar e levar até a boca a pílula de ração. (SCHAAR *et al.*, 2010). O animal deve se aproximar da janela, direcionar sua pata à bandeja externa frontal para atingir a pílula de ração, que se encontra contralateral ao seu membro, segurá-la e levá-la até boca. Durante este evento, tentativas, sucessos, fracassos e quedas são registrados a fim de determinar as deficiências estabelecidas em virtude dos danos no córtex motor. Além disto, a pata de preferência do animal e os tempos distintos para desempenhar a tarefa são avaliados (GHARBAWIE *et al.* 2005, SCHAAR *et al.*, 2010).

Para que os animais sejam suficientemente motivados a buscar a pílula de ração, eles são privados de alimentos, mantendo 85 a 95% do seu peso corporal normal (BURY e JONES, 2002, GHARBAWIE *et al.*, 2006; SCHAAR *et al.*, 2010). O RPAC exige treinamento prévio do animal para ele adquira habilidade para executá-lo. Portanto, há de se considerar que ratos treinados para desempenhar uma tarefa de aprendizagem motora complexa podem sofrer alterações anatômicas e fisiológicas nas regiões cerebrais sensorimotoras, a fim de se estudar a lesão ocorrida (KLEIM *et al.*, 1998, ADKINS, *et al.*, 2006).

### 1.2.2.2. Teste do cilindro

O comportamento exploratório em ratos fornece uma possibilidade para o estudo da base neural do comportamento espacial e motor. Logo, testes com esta estratégia são usados para investigação da função cerebral. Entre estes, podemos citar o teste do cilindro (SCHALLERT *et al.*, 2000; GHARBAWIE *et al.*, 2005; SCHAAR *et al.*, 2010; VOLKOV *et al.*, 2011).

O teste do cilindro analisa o uso das patas dianteiras do roedor durante o movimento exploratório, no momento em que o animal está no interior de um cilindro transparente de vidro. Ativamente, com as patas dianteiras e as vibrissas, o animal explora verticalmente a parede do cilindro. Então, o número de apoios nesta parede executados com a pata dianteira ipsilateral, com a pata dianteira contralateral e com ambas é contado durante um período de tempo (SCHALLERT *et al.*, 2000; HUA *et al.*, 2002; GHARBAWIE *et al.*, 2005; SCHAAR *et al.*, 2010; VOLKOV *et al.*, 2011). Este comportamento é observado e filmado para cálculo da taxa de assimetria (% de uso com a ipsilateral - % de uso com a contralateral).

Animais com danos cerebrais unilateral exibem assimetria no uso da pata dianteira durante a exploração vertical (HUA *et al.*, 2002; SCHAAR *et al.*, 2010). Isto permite concluir que quanto maior o valor da taxa de assimetria, maior é a deficiência motora da pata contralateral.

### 1.2.2.3. Teste de remoção de adesivo

A utilização do teste de remoção de adesivo é descrito na literatura para averiguar os prejuízos relacionados à extinção tátil (FRERET *et al.*, 2006; SCHAAR *et al.*, 2010). Trata-se de um teste sensorimotor comumente usado para avaliar a função das patas dianteiras em resposta a uma estimulação tátil. Durante a avaliação de assimetrias sensoriais devidas a lesões experimentais, o teste do adesivo tem sido empregado por ser altamente sensível a pequenos déficits, que envolvam danos encefálicos das áreas sensorimotoras (SCHAAR *et al.*, 2010). Para tanto, coloca-se no animal um papel adesivo em ambos os pulsos de suas patas dianteiras e se registra de qual membro (contralateral ou

ipsilateral) o adesivo é extraído primeiro, podendo ser avaliado também os tempos decorridos até o contato e a remoção deste (MODO *et al.*, 2000; BOUET *et al.*, 2007; SCHAAR *et al.*, 2010).

Com os adesivos colocados em ambos os pulsos das patas dianteiras, o animal usa a boca para removê-los (SCHALLERT, 2006; SCHAAR *et al.*, 2010). No entanto, após uma lesão no córtex sensorimotor ou no *striatum*, normalmente, ocorre uma tendência deste animal em contatar e remover primeiro o adesivo da pata ipsilateral (SCHAAR *et al.*, 2010).

### 1.3. Terapia celular

Terapia celular é o conjunto de métodos e abordagens tecnológicas com a utilização de células no tratamento de doenças como: diabetes melito, câncer, pneumopatias, doenças genéticas, cardíacas e neurodegenerativas. A terapia com células-tronco tem despertado maior interesse na comunidade científica devido à capacidade que essas células indiferenciadas possuem de preservar sua própria população, diferenciar em células dos diversos tecidos e de secretar fatores tróficos (ZAGO, 2005).

Conceitualmente, células-tronco são células progenitoras indiferenciadas, que possuem a capacidade de se transformar em uma grande variedade de células diferenciadas funcionais (LIECHTY *et al.*, 2000), possuindo ainda a capacidade de autorrenovação. As células-tronco e as células progenitoras com um pequeno grau de diferenciação estão presentes em quase todos os tecidos humanos e são fundamentais para a manutenção e resposta a lesões ou doenças. Estas células são a fonte de todos os tecidos novos formados pelos sistemas de reparo e remodelação, sendo moduladas por sinais químicos e físicos, que controlam sua ativação, proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência (BIANCO *et al.*, 2001). A célula-tronco é indiferenciada e permanece neste estado até que receba um sinal para se transformar em uma célula especializada (CAPLAN, 2005).

MINGRONI-NETTO e DESSEN (2006), propuseram uma descrição das células-tronco seguindo dois critérios de subdivisões, a potencialidade e a origem. Quanto à potencialidade, podem ser:

- Totipotentes: células mestres do corpo, pois contém a informação genética necessária para criar todas as demais células, incluindo tecidos placentários.
- Pluripotentes: capazes de diferenciar-se em todos os tecidos do corpo humano, exceto tecidos placentários.
- Multipotentes: também chamadas de células-tronco adultas, são portadoras de um potencial de diferenciação mais restrito, limitado a apenas alguns tipos celulares. São encontradas em estágios posteriores do desenvolvimento fetal e persistem após o nascimento.
- Unipotentes: capazes de gerar só um tipo de célula. Responsáveis pela regeneração de tecidos particulares, por exemplo: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônias no testículo, entre outras.

E quanto à origem podem ser:

- Embrionárias: que são células totipotentes presentes somente no embrião, tendo seu emprego cercado por discussões éticas e religiosas.
- Adultas: células pluripotentes cujo potencial de replicação é limitado, diferentemente das células embrionárias. Podem ser encontradas no sangue periférico, placenta e sangue do cordão umbilical, células perivasculares e medula óssea, sendo esta é a que mais se destaca, devido à disponibilidade imediata e reserva praticamente ilimitada. As células-tronco adultas humanas são capazes de manter, gerar e substituir células terminalmente diferenciadas em seus tecidos específicos como consequência do *turnover* celular fisiológico ou da regeneração tecidual devido à injúria.

Estudos referentes ao transplante de células-tronco hematopoiéticas foram iniciados após observar o efeito da radioatividade sobre a hematopoiese em pessoas que foram expostas a radiação. Tais efeitos consistem em anemia aplástica e falência medular (BONASSA e SANTANA, 2005). Observou-se que o transplante de medula óssea poderia ser utilizado clinicamente para a proteção contra os efeitos mieloablativos da quimioterapia, radioterapia e correção de falências medulares. Atualmente, o transplante de células-tronco hematopoiéticas é uma terapia consagrada no tratamento de doenças onco-

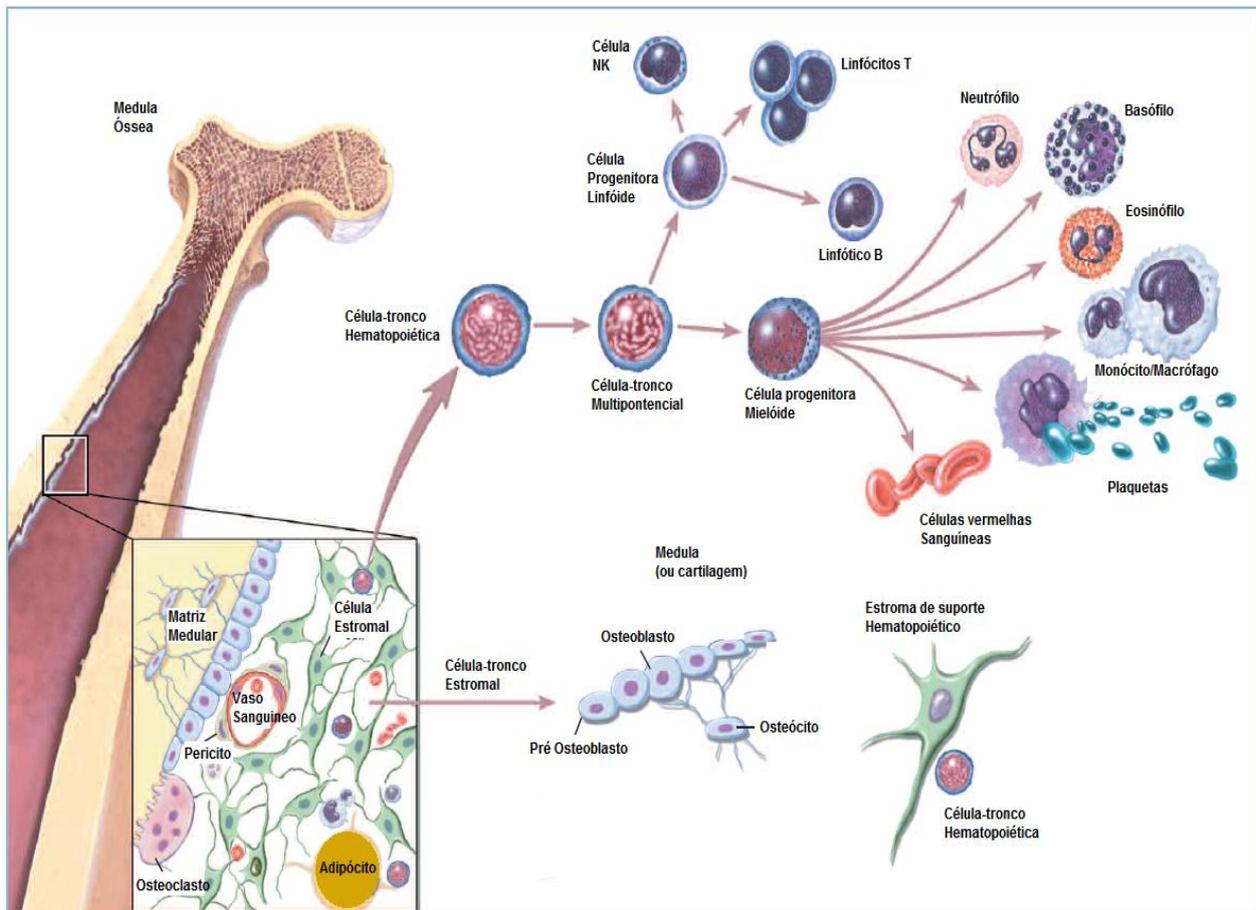
hematológicas e tem se mostrado o tratamento de maior eficácia na recaída de algumas delas, como o linfoma Hodgkin e não-Hodgkin (LANCET, *et al.*, 1998).

O potencial de terapias com transplantes de células-tronco no tratamento de doenças neurodegenerativas também tem sido comprovado. Trabalhos têm demonstrado significativas melhoras funcionais em diversos modelos experimentais (BJORKLUND E LINDVALL, 2000; SAVITZ *et al.*, 2002; DOEPPNER e HERMANN, 2010; DELCROIX *et al.*, 2010; MAHMOOD *et al.*, 2013).

### **1.3.1.Terapia com células-tronco mesenquimais de medula óssea**

Devido a restrições técnicas e ético-legais ao uso de células-tronco embrionárias, fontes alternativas de células-tronco adultas têm sido amplamente exploradas. Isto é necessário para atender o estabelecimento de uma terapia celular viável em humanos (SAVITZ *et al.*, 2002).

A medula óssea possui duas populações de células-tronco que co-existem de maneira funcionalmente interdependente: as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais da medula óssea (CMMOs) (Figura 4). A existência de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida há mais de 130 anos. No entanto, foi com os achados de FRIEDENSTEIN *et al.*, em meados de 1970, que essa teoria foi comprovada pela descoberta das CMMOs. Eles encontraram em uma cultura de células da medula óssea, uma população de células aderidas ao plástico em forma de fuso, semelhantes a fibroblastos. Observaram também que essas células possuíam capacidade para se diferenciar em colônias, que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem (PROCKOP, 1997).



**Figura 4: Diferenciação das células-tronco estromais e hematopoiéticas.**  
Adaptado de Winslow e Caitlin Duckwall, 2006.

De maneira geral, as células da medula óssea são separadas por centrifugação em gradiente de densidade descontínuo e plaqueadas em placas aderentes. Com o tempo em cultura, as células hematopoiéticas, não aderentes, são lavadas e as células mesenquimais formam uma monocamada com morfologia de fibroblastos (GREGORY *et al.*, 2005). Como as CMMOs são facilmente expandidas em cultura e capazes de diferenciar em múltiplas linhagens, há grande interesse na utilização destas células em terapias celulares.

As CMMOs têm demonstrado eficácia no resultado funcional após lesão cerebral traumática (LU *et al.*, 2001; MAHMOOD *et al.*, 2002; MAHMOOD *et al.*, 2003; MAHMOOD *et al.*, 2004) e por termocoagulação (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009). Os efeitos benéficos das CMMOs foram demonstrados após a administração intracerebral direta, bem como pela administração sistêmica (LU *et al.* 2001). DE FREITAS *et al.*, (2012) observou

no modelo de ablação focal, que a administração de células mesenquimais cultivadas em garrafas (bidimensional - 2D) apresentou significativa recuperação de função sensorimotora no grupo tratado com as CMMOs. A terapia se mostrou efetiva, principalmente, na recuperação da estimulação tátil, que é a principal função sensorimotora perdida em lesões por ablação. GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, (2009) também observou resultados semelhantes, todavia com administração de células da fração mononuclear de medula óssea.

Para melhorar a definição das CMMOs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) designou como células multipotentes mesenquimais estromais àquelas células aderentes ao plástico em condições padrão de cultivo *in vitro*. O fenótipo de superfície da cultura de CMMOs definidos pelo ISCT é negativo para os marcadores CD14 ou CD11b, CD45, CD34, CD79 ou CD19, e HLA-DR. E em geral, mas não de forma homogênea, positivo para CD73, CD90 e CD105. No entanto, não há um único marcador que possa ser utilizado para distinguir CMMOs a partir de todos os outros tipos celulares. Outro critério para designação como CMMO é a capacidade de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e cartilagem com a adição de fatores de crescimento exógenos. (SHORT *et al.*, 2003).

Embora as CMMOs possam se diferenciar em várias células maduras, a capacidade intrínseca de secretar citocinas e fatores de crescimento nos locais de lesão e tecidos inflamados contribui de forma significativa para a sua capacidade terapêutica. A produção desses fatores tróficos é definida pela sua localização, nicho e gravidade das lesões. CMMOs são reservatórios para a produção de citocinas, quimiocinas e componentes da matriz extracelular, os quais têm a capacidade de suportar a sobrevivência de células-tronco, promoverem a proliferação celular e atuarem como imunomoduladores.

### **1.3.2. Propriedades imunológicas das células-tronco mesenquimais**

CMMOs não só proporcionam apoio estromal para células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, mas também possuem potentes efeitos imunossupressores e antiinflamatórios. Elas podem também suprimir a

proliferação de células T induzida por aloantígenos ou mitógenos através do aumento do número de células T regulatórias (NADIG *et al.*, 2010). Além disso, as CMMOs podem inibir a função das células B, células natural killer e células dendríticas (CORCIONE *et al.*, 2006; SPAGGIARI *et al.*, 2008).

Há um consenso que a principal função imunossupressora das CMMOs é realizada pela liberação de fatores solúveis, incluindo Fator de Crescimento de Transformação (TGF $\beta$ ), fator de crescimento de hepatócitos, óxido nítrico, Antígeno de histocompatibilidade G (HLA-G) e indoleamina 2,3-dioxigenase. No entanto, estas células podem também exercer efeitos imunossupressores diretamente por interação célula-célula (KIM *et al.*, 2013). A capacidade imunossupressora das CMMOs é aumentada em condições inflamatórias na presença de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6. Sob condições quiescentes, as CMMOs promovem a sobrevivência de células T e induzem a ativação e proliferação de células T CD4+. (BENVENUTO *et al.*, 2007) Este papel imunomodulador sugere que fatores ambientais podem ter um papel crucial na indução da CMMOs.

Estudos recentes mostram que as CMMOs devem ser "licenciadas" para exercer seus efeitos imunomoduladores. MARIGO e DAZZI (2011) mostraram que as CMMOs não são constitutivamente inibitórias, mas requerem um passo de "licenciamento" para produzir determinadas citocinas. Se as CMMOs forem transplantadas durante a inflamação aguda, o micro-ambiente contendo "licenças" polariza as CMMOs para inibir células T efetoras, células B, natural killer e células dendríticas. Em contraste, se as CMMOs são licenciadas durante a inflamação crônica, o micro-ambiente recruta as CMMOs para o processo de fibrose (KIM *et al.*, 2013).

Em relação às células apresentadoras de antígenos, foi evidenciado que as CMMOs interferem na diferenciação, maturação e ativação dessas células por meio da produção de IL-6 e de fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). Além disso, a liberação de prostaglandinas PGE2 pelas CMMOs inibe a produção e secreção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e de interferon gama (IFN $\gamma$ ) e estimula a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (AGGARWAL e PITTENGER, 2005; NAUTA e FIBBE, 2007).

Também já foi demonstrado que as CMMOs aumentam o processo de

revascularização (angiogênese), em parte devido à liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (ZHANG *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2003) e diminuem a morte neuronal por apoptose na região periférica ao infarto (CHOPP e LI, 2002). Existe um grande direcionamento das CMMOs para regiões de lesão, sendo que estimativas sugerem que mais de 80% das CMMOs injetadas por via intravenosa após uma isquemia cerebral unilateral são encontradas no hemisfério cerebral lesado, provavelmente devido ao reconhecimento de fatores liberados pelo tecido lesionado (CHOPP e LI, 2002; BARRY e MURPHY, 2004). Este mecanismo de quimioatração permite que as CMMOs se integrem preferencialmente ao parênquima periférico à lesão e possam liberar fatores tróficos e de crescimento diretamente na região afetada.

Devido ao grande potencial terapêutico das CMMOs, a grande maioria dos estudos em modelos animais de AVE utiliza este tipo de célula-tronco. Como estas células representam apenas 0,001-0,01 % do total de células nucleadas da medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999), é necessário que elas sejam cultivadas *in vitro* para conseguir separá-las dos demais tipos celulares da medula e para que se obtenha quantidade suficiente para ter o efeito terapêutico desejado.

### **1.3.3. Cultivo tridimensional**

Muitas das descobertas realizadas na biologia celular e molecular provêm da utilização de células cultivadas *in vitro*, em monocamada ou em suspensão, sendo esta uma maneira conveniente e menos custosa em comparação aos estudos *in vivo*. Porém, cada dia mais, as limitações deste modelo de cultivo bidimensional têm sido discutidas. "Os cientistas estão começando a perceber o quanto importa o contexto em que a célula se encontra", diz Mina Bissell, uma pioneira do cultivo de tridimensional (3D) do *Lawrence Berkeley National Laboratory*, na Califórnia. Esta matriz circundante contém proteínas, como colágeno, elastina e laminina, que dão aos tecidos suas propriedades mecânicas e ajudam na organização e comunicação entre as células incorporadas na matriz. Dada a mecânica complexa e o conjunto de interações bioquímicas, é de grande interesse que não se perca nenhuma das

sutilezas biológicas destas células, que costumeiramente são cultivadas apenas em camadas planas. (ABBOTT, 2003).

O cultivo de células em ambiente 3D apresenta claras diferenças em relação ao ambiente 2D. Quando cultivadas em substratos plásticos planos, as células não transformadas se organizam em monocamadas polarizadas. Nesta condição, as células interagem entre si apenas lateralmente, enquanto suas superfícies basal e apical se estruturam bioquímica e mecanicamente em resposta a ambientes extremamente rígidos (plástico) ou maleáveis (meio de cultura solúvel). Nestas condições as estruturas naturais dos tecidos humanos não são bem representadas, mesmo os epitélios com apenas uma camada de células (o intestinal, por exemplo) não interagem com um substrato de rigidez comparável aos plásticos e vidros utilizados em culturas de células.

Esta abordagem mais próxima do observado *in vivo* vem sendo utilizada no campo da regeneração de tecidos. Um destaque é a fabricação de andaimes 3D, que suportam as células, garantindo que nutrientes e metabólitos possam se infiltrar e permitir a sua difusão livre. (LANGER e VACANTI., 1993; FREED *et al.*, 1994). Tais estruturas devem desempenhar o papel da matriz extracelular (ECM), e apresentam como resultado várias propriedades biológicas e físicas, que influenciam as atividades do comportamento celular, incluindo a fixação inicial da célula, migração e diferenciação (LEVENBERG *et al.*, 2003; HUTMACHER, 2001).

A terapia celular é uma estratégia promissora e células adultas podem ser facilmente isoladas do corpo do paciente e cultivadas em monocamada. No entanto, grandes problemas como a sobrevivência da célula e o controle da diferenciação permanecem sem respostas. A superação destes problemas pode ser obtida, utilizando estratégias da engenharia de tecidos como os suportes 3D, que garantem maior sobrevivência destas células. Desenvolvimentos recentes, tais como a abordagem biomimética que combinam o uso de andaimes com as moléculas de matriz extracelular, apresentam um melhor controle da proliferação celular, sobrevivência, migração e diferenciação das células. (DELCROIX *et al.*, 2010)

Os principais componentes estruturais de muitos tecidos são os colágenos, que representam aproximadamente 25% da massa total de proteínas em mamíferos, e em particular o colágeno do tipo I, que representa

90% da massa de colágenos no corpo (ALBERTS *et al.*, 2002). Os colágenos do tipo I utilizados na preparação de matrizes 3D para cultivo de células, geralmente, são derivados dos tendões de rabos de rato (ELSDALE e BARD, 1972) ou de cartilagens bovinas. A purificação é realizada por digestão ácida, e o colágeno gelifica sob pH neutro e temperatura de 37 °C, em densidade que usualmente varia de 1,5 a 30 mg.mL<sup>-1</sup>. Quando a solução de colágeno gelifica, os monômeros de colágeno condensam e se associam lateralmente formando fibras. Se comparados aos tecidos naturais, as matrizes colágenas são menos densas, mais hidratadas e mecanicamente mais frágeis. Os géis de colágeno do tipo I são, portanto, mecanicamente frágeis, mas biologicamente compatíveis e atuam como ambiente *in vitro* para estudos de curto prazo ou como arcabouços a serem remodelados por células em estudos mais longos (YANNAS, 2001; SACHLOS *et al.*, 2003; GLOWACKI e MIZUNO, 2008).

Para aumentar a eficácia funcional das CMMOs, andaimes de colágeno com as células têm sido utilizados para transplantes no núcleo da lesão (LU *et al.*, 2007; XIONG *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2010; QU *et al.*, 2011). Resultados prévios mostraram que esta modalidade de entrega das CMMOs aumenta significativamente os efeitos benéficos desta terapia celular. (GALINDO *et al.*, 2011; LU *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2011; XIONG *et al.*, 2009; ZENG *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico do transplante das CMMOs cultivadas em garrafas de cultivo (2D) e matrizes de colágeno (3D) em ratos submetidos a um modelo de ablação unilateral focal do córtex cerebral, na região que abrange, principalmente, os córtices motor e somestésico primários. Avaliar também as vias de administração intravenosa (iv) para as células cultivadas em 2D, e *in situ* (is), para os dois tipos de cultivo.

### 2.2. Objetivos específicos

-Observar a integração das CMMOs 3D e 2D no parênquima encefálico, quando transplantadas *in situ*.

-Avaliar o efeito dos diferentes tratamentos na recuperação sensorimotora;

-Avaliar o efeito dos diferentes tratamentos no volume de lesão;

-Avaliar se existe correlação entre a melhora funcional e o volume da lesão ao final dos testes;

-Avaliar o efeito da CMMOs na dosagem de citocinas no plasma e no tecido cortical lesado.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* albino, com idade e peso que variavam, do início ao término do experimento, entre 2 e 5 meses de vida pós-natal, e 250 e 500 gramas, respectivamente. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (Campos dos Goytacazes, RJ). Foram mantidos em condições-padrão de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e iluminação (ciclo de 12 h de luz, das 6-18 h / 12 h de escuro, das 18-6 h), com água e alimentação disponíveis *ad libitum*.

Para acompanhamento do estado geral dos animais após os procedimentos cirúrgicos descritos abaixo, observaram-se os critérios propostos pela Federação de Associações Europeias de Laboratórios de Ciência Animal para medição do nível de severidade do procedimento experimental (FELASA, 1994). Os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais da presente Instituição (CEUA – UENF), sob o número de protocolo nº 86 em 02/09/2010.

#### 3.2. Ablação no córtex motor e somestésico de ratos

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Xilazin®) ( $10 \text{ mg. kg}^{-1}$ ) e cloridrato de quetamina (Cetamin®) ( $70 \text{ mg. kg}^{-1}$ ) intraperitoneal (i.p.). Foram acomodados em uma cama cirúrgica com controle da temperatura corporal, utilizando-se luz quente e mantendo-os envolvidos em tecido. Cada animal teve sua cabeça fixada em aparelho estereotáxico. Uma incisão na pele foi feita acima da sutura sagital expondo o crânio. A partir das medidas estereotáxicas do encéfalo de rato (eixo antero-posterior, +2,0 mm a -6,0 mm do bregma) (PAXINOS e WATSON, 1986), uma craniotomia foi realizada de forma a expor o córtex motor e somestésico do lado oposto ao que o animal apresentava preferência na utilização da pata (tal preferência foi previamente

observada com o teste comportamental RPAC, que será descrito no tópico 4.8.1). Então, o tecido foi aspirado, transpassando-se a dura-máter com leves e rápidos toques, utilizando-se uma bomba de vácuo. Após a ablação, a abertura craniana foi fechada e a pele suturada, mantendo-a recoberta com esponja hemostática Hemospon®. Os animais foram mantidos sob aquecimento constante e devolvidos ao biotério somente após a recuperação da anestesia.

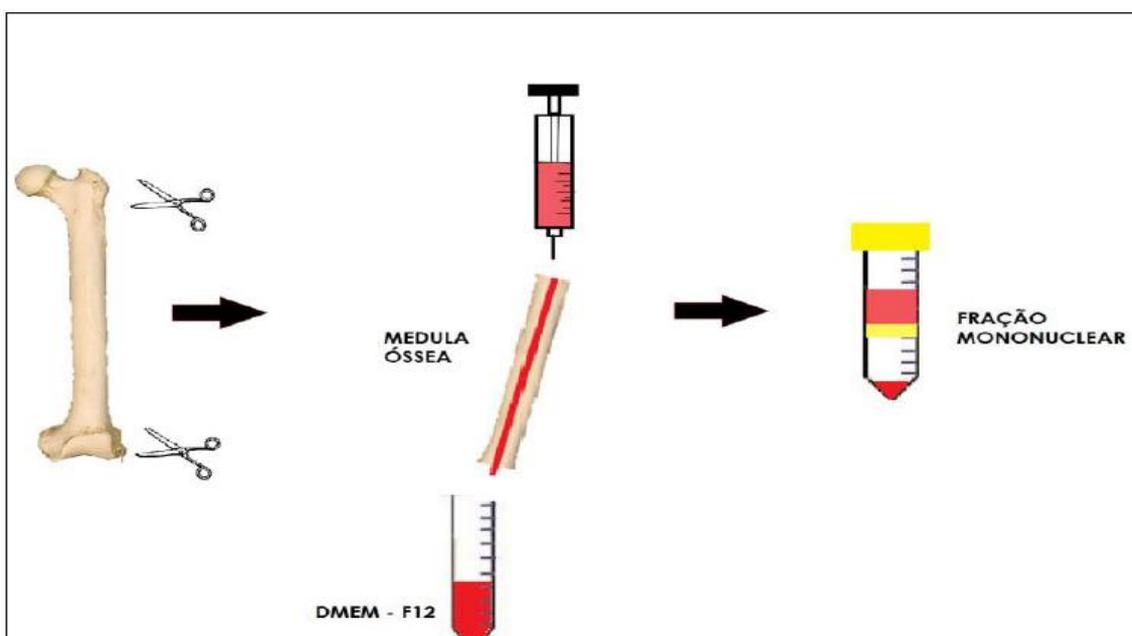
Os animais foram mantidos até o tempo de sobrevivência desejado. Aqueles animais que obtiveram o nível de severidade substancial, não respondendo bem aos testes comportamentais até o segundo dia pós-ablação (DPA), foram descartados do experimento e submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>.

Ao final de 60 dias após a ablação, todos os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, foram perfundidos com 4% de formaldeído e tiveram seus encéfalos removidos do crânio e colocados numa matriz para fatiamento de encéfalo de rato (Insight LTDA). As fatias foram feitas com 2 mm de espessura, sendo imediatamente transferidas para uma placa de 24 poços contendo 1 mL de tampão fosfato – PBS. Imagens das quatro primeiras fatias foram captadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio estereoscópico (Stemi SV11- Axiovision Zeiss®) e a um computador. A área da lesão em cada fatia foi medida a partir das imagens, utilizando-se ferramentas específicas do programa IMAGEJ (NIH). O volume foi obtido multiplicando-se a área da lesão de cada fatia pela sua espessura (2 mm). Para cada animal, o volume total de lesão utilizado para a quantificação foi obtido pelo somatório dos volumes das suas respectivas quatro fatias.

### **3.3. Obtenção e cultivo das células mesenquimais de medula óssea**

Ratos entre 400-500 g, não integrantes dos grupos experimentais, foram sacrificados em câmaras de CO<sub>2</sub>. O fêmur e a tíbia foram extraídos e separados dos tecidos adjacentes (Figura 5). Os ossos foram cortados de forma a permitir acesso à medula com uma seringa contendo 10 mL de meio de cultura DMEM/F12 Gibco® sem soro. O conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis de 15 mL, dissociados mecanicamente e centrifugados por 5 min (400 x g). Recolheu-se o precipitado e, novamente,

este foi suspenso em meio de cultura (2 mL de DMEM/F12 sem soro) e submetido à centrifugação em 2 mL de Histopaque (densidade  $1,083 \text{ g.mL}^{-1}$  - Sigma-Aldrich Inc.) durante 30 min a  $400 \times g$ . Para a extração da fração de células mononucleares, retirou-se as células que estavam entre o Histopaque e o DMEM/F12 a fim de aplicá-las no tubo com 3 mL de PBS para a primeira lavagem, ressuspensão e centrifugação por 5 min ( $400 \times g$ ). Foram feitas três lavagens (três ciclos de centrifugação por 5 min a  $400 \times g$  e ressuspensão), sendo as duas primeiras ressuspensões em 3 mL de PBS e a última em 1 mL de meio DMEM/F12 sem soro. Em seguida, foi realizada contagem das células com o auxílio da câmara de *Neubauer*, avaliando simultaneamente a viabilidade celular pela coloração do azul de tripan (4%). Esta coloração permitiu que as células mortas, que ficam coradas, fossem desconsideradas na contagem.



**Figura 5. Esquema da extração de células. Obtenção da fração de células mononucleares da medula óssea para posterior cultivo.**

As células obtidas foram plaqueadas em garrafas de cultura estéreis de  $75 \text{ cm}^2$  com 9 mL de meio DMEM/F12 suplementado com 1 mL de soro fetal bovino, além do antibiótico estreptomicina ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e do antifúngico

anfotericina B (fungizona;  $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A proporção de células por garrafa foi padronizada da seguinte forma: o material de um animal (obtido de dois fêmures e duas tíbias) para cada garrafa. As culturas foram mantidas em incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e atmosfera umedecida contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ . O meio foi trocado regularmente a cada 3-4 dias. Na primeira troca, houve a remoção das células não aderentes ao plástico. Quando as células aderentes atingiram 50-60 % de confluência, em torno de uma semana após plaqueamento, foram soltas da garrafa por tripsinização (4 mL de 2500 mg/L de tripsina e 380 mg/L de EDTA, Gibco®), lavadas e replaqueadas. Este processo foi repetido por 3-5 vezes, até que fossem obtidas culturas altamente enriquecidas em CMMOs. Ao final do processo, as CMMOs foram soltas da placa por tripsinização, lavadas e suspensas em PBS, contadas em câmara de *Neubauer* e utilizadas para transplante em animais previamente submetidos à ablação.

### **3.4. Obtenção da matriz de colágeno e cultivo celular**

Para obtenção da matriz de colágeno, foram utilizadas 8 caudas de ratos sacrificados em câmaras de  $\text{CO}_2$ . Após higienização com etanol 70%, o material foi levado ao fluxo laminar para a remoção das fibrilas de colágeno, que se encontram ao redor das vértebras caudais. As fibrilas removidas foram armazenadas em 200 mL de solução de ácido acético 1 % pelo período de 4-7 dias para solubilização e mantidas em refrigeração a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a solução contendo as fibrilas foi ultracentrifugada duas vezes a 30.000 g por 45 min, utilizando o sobrenadante e descartando o precipitado com as fibrilas não solubilizadas. O conteúdo centrifugado foi dialisado em 600 mL de clorofórmio 1% por 1 h. Feito isto, a solução de clorofórmio foi descartada e substituída por 600 mL de ácido acético estéril 0,02 M e mantido em fluxo laminar por 3 dias, trocando a solução de ácido acético a cada 24 h. Após diálise, o material foi liofilizado durante 48 h (RAJAN *et al.*, 2006) Assim, foi possível fazer o cálculo do peso seco do colágeno e ressolubilizá-lo na concentração desejada, conforme descrito por RAJAN *et al.*, (2006).

CMMOs em solução com DMEM/F12 foram suplementadas com colágeno tipo I na concentração final de  $1,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A solução foi neutralizada

com NaOH 1 N e distribuídas em alíquotas de 200 µL no fundo de placas de poliestireno de 24 poços. As amostras foram cuidadosamente transportadas para estufa seca com temperatura constante de 37°C para gelificação (polimerização) da matriz por 1 h. Em seguida, DMEM/F12 suplementado com 10% de soro foi acrescido e foi mantido o cultivo por aproximadamente 24 h. Para cada poço foram utilizadas  $3 \times 10^6$  CMMOs (GRINNELL 1999). Para a observação da viabilidade celular, foram utilizadas células marcadas com DAPI (ver item 3.6.) para a preparação da matriz. Logo após a gelificação, foi acrescentado ao poço o azul de tripano a 20% (3.600µL), mantido por 5 min e em seguida a matriz foi observada ao microscópio de fluorescência e contraste de fase.

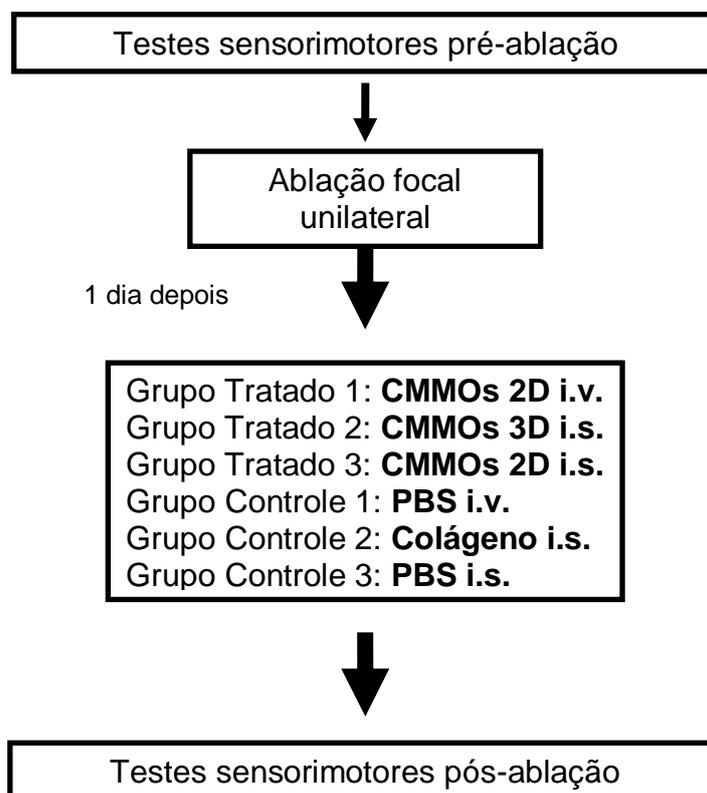
### **3.5. Administração das células e da matriz**

A administração das CMMOs e da matriz de colágeno foi realizada 24 h após a ablação. Os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina ( $10 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) e cloridrato de quetamina ( $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.p.) para a injeção pela veia jugular esquerda ou transplante da matriz com células na região onde o tecido encefálico foi removido, conforme o grupo experimental (Figura 6). Para injeção intravenosa (i.v.) foi feita uma incisão cirúrgica, onde a veia jugular foi exposta, e com o auxílio de uma pinça de ponta fina a veia foi separada do tecido conjuntivo circundante.

No caso do transplante i.v., a agulha da seringa contendo 500 µL de PBS com  $3 \times 10^6$  células foi introduzida na luz da veia. A injeção foi efetuada na veia jugular situada no lado ipsilateral à lesão isquêmica, para que não ocorressem interferências nos resultados dos testes sensorimotores. Após a administração, a incisão foi fechada com pontos cirúrgicos.

Foram utilizados seis grupos experimentais, que seguiram para as análises de comportamento, visando avaliar a melhoria no dano causado pela lesão após o tratamento com CMMOs e matriz de colágeno. Como pode ser observado na Figura 6, os grupos experimentais foram divididos em dois subgrupos, tratados e controles, contendo seis animais cada. Nos grupos tratados com CMMOs, em 1, os ratos receberam administração i.v. de 500 µL

de PBS com  $3 \cdot 10^6$  células de CMMOs cultivadas em garrafa (2D); em 2, os animais receberam transplante no local da ablação, *in situ* (i.s.), da malha de colágeno (3D) contendo  $3 \times 10^6$  células CMMOs; e em 3, os animais receberam 30  $\mu$ L de PBS i.s. contendo  $3 \times 10^6$  células de CMMOs cultivadas em garrafa (2D). Nos controles, em 1, os ratos receberam administração i.v. de 500  $\mu$ L de PBS; em 2, receberam transplante i.s. da malha de colágeno (3D) sem as células; e em 3, receberam administração i.s. de 30  $\mu$ L de PBS apenas. Para os grupos i.s. foi necessária a remoção da esponja hemostática local da lesão para o transplante. Após a administração, a incisão foi fechada com pontos cirúrgicos.



**Figura 6: Esquema ilustrando o desenho experimental.** CMMOs 2D i.v.: animais que receberam administração intravenosa das CMMOs cultivadas em garrafas. CMMOs 3D i.s.: animais que receberam transplante *in situ* da malha de colágeno contendo as CMMOs. CMMOs 2D i.s.: animais que receberam *in situ* as CMMOs cultivadas em garrafas. PBS i.v.: animais que receberam administração intravenosa de tampão PBS (veículo). Colágeno i.s.: animais que receberam

transplante da malha de colágeno sem as células. PBS i.s.: animais que receberam administração *in situ* de tampão PBS (veículo). Cada grupo continha seis animais.

### 3.6. Marcação celular para rastreamento

Com o intuito de marcar as células para posterior rastreamento, após a terceira passagem de cultivo, as CMMOs foram tratadas com tripsina (Gibco®) por 3 min. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com 3 mL de PBS, centrifugadas a 400 x g por 5 min e ressuspensas na última lavagem com 1 mL de DMEM-F12 sem soro. Então, as células obtidas foram contadas e incubadas com os marcadores abaixo:

**DAPI:** foram incubadas, com 50µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2h. Em seguida as CMMOs lavadas 3 vezes com 3 mL PBS, ressuspensas em 1 mL, contadas e observadas ao microscópio de fluorescência.

**CellTrace Far Red:** foram incubadas 20 µM de *CellTrace Far Red* DDAO-SE (Invitrogen®) a 37 °C em estufa com 5 % CO<sub>2</sub> durante 30 min. Posteriormente, 3 x 10<sup>6</sup> células com a marcação foram utilizadas para cada malha de colágeno.

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e posicionados em decúbito dorsal, passando por uma incisão cirúrgica para expor o coração. Uma agulha conectada a cânula da bomba de perfusão foi inserida no ventrículo esquerdo iniciando-se a perfusão com 200 mL de salina 0,9% por 15 minutos, seguida de 500 mL de paraformaldeído 4% por 30 minutos. No término deste procedimento foi feita a craniotomia, os encéfalos foram removidos da caixa craniana e mantidos em tampão fosfato com 20% de sacarose com o objetivo de iniciar a crioproteção. Os encéfalos foram, então, emblocados em resina OCT (Tissue-Tek-4583), cortados coronalmente em criostato (Leica CM-1850) a 40 µm em lâminas gelatinizadas e mantidos a -20°C até a posterior observação ao microscópio de fluorescência.

Para investigar se houve infiltração no parênquima encefálico pelas CMMOs nos grupos com administração *in situ*, as CMMOs marcadas com o *Cell Trace Far Red*, foram administradas 24 h após a lesão e observadas 24 h e 72 h após o tratamento.

### 3.7. Testes comportamentais para avaliação funcional

Testes funcionais apropriados para estudos pré-clínicos de doenças neurológicas foram utilizados para avaliar as funções sensorimotoras dos animais (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHALLERT, 2006). Todos os testes foram realizados durante o período da tarde na Sala de Experimentações do Biotério Central da UENF, em ambiente tranquilo e com pouco ruído, visando minimizar qualquer interferência no comportamento dos animais. Ao término de cada modalidade de teste, aguardou-se 10 min para que o próximo fosse iniciado. Cada teste foi realizado uma vez ao dia em cada animal.

#### 3.7.1 Teste de recuperação de pílula e alcance na câmara

Primeiramente, os animais foram condicionados a uma restrição alimentar (aproximadamente 15 mg.dia<sup>-1</sup>), tendo o peso controlado para que mantivessem durante todo o experimento entre 90 e 95 % do seu peso inicial (BURY e JONES, 2002, GHARBAWIE *et al.*, 2006). Para execução do teste, cada animal foi colocado numa caixa (26 cm de comprimento x 30 cm de altura x 16 cm de largura) com uma janela frontal (1,9 cm de largura x 20 cm de altura) e uma plataforma (16 cm de comprimento x 3 cm de largura) fixada no exterior da caixa, em frente à janela, ao nível de 4,5 cm da base (Figura 7). Sobre esta plataforma havia cinco orifícios (um central e dois para cada lado, esquerdo e direito), que acomodavam as pílulas de ração. Estas foram rigorosamente padronizadas em forma, tamanho e peso (45 mg) (Dustless Precision Pellets<sup>®</sup> / Rodent; Bio-Serve).

O teste foi dividido em três fases. Na primeira, avaliou-se diariamente a pata de preferência, colocando a ração no orifício central da plataforma. O animal deveria fazer uso de uma das patas dianteiras para ter acesso ao alimento, com tentativas que podiam ser em número de 20 ou até que se completasse 20 min. Quando se alcançou o mínimo de 70 % de uso com a mesma pata, durante 3 dias consecutivos, a pata de preferência foi estabelecida.

Na segunda fase, foi realizado o treinamento, onde se inseriu no interior

da caixa uma placa do mesmo lado da pata dianteira, estabelecida como preferencial e, simultaneamente, a ração foi posicionada no orifício mais distante da plataforma, do lado contralateral à pata utilizada para alcançar o alimento. O posicionamento da placa e da ração condicionou o animal a utilizar a pata dianteira de preferência para executar a tarefa esperada. Isto deveria ser realizado durante 20 min ou até que se completassem 20 eventos, respeitando-se os seguintes critérios: foram permitidas cinco tentativas para recuperar uma ração, desde que o animal não se deslocasse de sua posição inicial; os ratos foram induzidos a se afastar da plataforma antes de iniciar cada nova tentativa; o desempenho do animal baseou-se na porcentagem de sucessos por tentativa de “pegada” da ração; um sucesso ocorreu quando o animal alcançou a ração, segurou-a e levou-a a boca sem deixá-la cair; o insucesso incluiu às vezes em que a ração não foi alcançada, foi arrastada e deixada cair.

Após 3 dias consecutivos de treinamento, com no mínimo 70 % de sucesso no uso da pata de preferência, realizou-se a ablação no córtex contralateral a pata de preferência. Assim, deu-se início a terceira fase do teste, na qual se avaliou o desempenho da pata de preferência do animal após ocorrência da lesão, igualmente a fase anterior. O percentual de sucessos no teste foi avaliado em intervalos regulares de 3 em 3 dias, do 2º ao 50º dias pós-ablação (DPAs).



**Figura 7: Teste RPAC. Animal coletando ração na plataforma.**

### 3.7.2 Teste do cilindro

Este teste analisou o uso das patas dianteiras no apoio durante a exploração vertical espontânea (SCHALLERT *et al.*, 2000). Todos os animais tiveram seu desempenho avaliado 1 dia antes da ablação, sendo estes valores considerados para o estado normal. Após a ablação, os testes foram realizados nos DPAs 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49.

Neste teste, o animal foi colocado no interior de um cilindro de vidro transparente (20 cm x 30 cm), sendo filmado com uma câmera digital durante no mínimo 5 min, até o tempo suficiente para que ocorressem pelo menos 10 eventos de apoio (Figura 8). Os vídeos foram analisados através do programa *Media Player Classic* para que fosse contado o número de vezes que o animal, durante a exploração vertical, se apoiou usando a pata dianteira contralateral à lesão, a pata dianteira ipsilateral e o apoio com ambas as patas (neste caso, considerou-se quando o animal apoiou as duas patas ao mesmo tempo ou quando ele fez exploração vertical, apoiando uma pata de cada vez rapidamente). Cada apoio somente foi considerado e contado como um evento independente se ocorresse por no mínimo 1 s.

Foi calculada a taxa de assimetria (% de uso com a pata dianteira ipsilateral - % de uso com a contralateral). Estas porcentagens foram em relação ao número total de apoios na parede do cilindro (número de apoio com a pata contralateral + com a pata ipsilateral + com ambas). Sendo o valor da taxa de assimetria representada por X, onde:  $X = 0 \rightarrow$  uso simétrico;  $0 < X \leq 100 \rightarrow$  uso maior da ipsilateral;  $-100 \leq X < 0 \rightarrow$  uso maior da contralateral. Estes cálculos permitiram concluir que a deficiência motora da pata contralateral estava relacionada diretamente com a taxa de assimetria, ou seja, quanto maior o valor da taxa de assimetria maior a deficiência motora da pata contralateral.

Não foram encontrados estudos que façam uma relação direta entre o nível (extensão) da lesão e o nível de perda funcional da pata afetada, utilizando o teste do cilindro. Então, buscou-se ter um controle maior sobre a padronização do nível da lesão entre os animais, e se estabeleceu que a taxa de assimetria no DPA 2 devia ser de no mínimo 30. Animais que apresentaram

taxa de assimetria menor que 30 não foram considerados neste teste, uma vez que poderiam apresentar lesão de menor extensão, fruto de erro no procedimento cirúrgico. Além disso, foram descartados animais com possíveis déficits prévios à ablação. Consequentemente, somente animais com taxa de assimetria de no máximo 15 no teste pré-ablação (feito 1-2 dias antes da cirurgia) foram usados neste estudo.



**Figura 8: Teste do Cilindro. Animal realizando exploração vertical**

### **3.7.3 Teste de remoção do adesivo**

Teste sensorimotor que avaliou a função das patas dianteiras em resposta a uma estimulação tátil. Colocou-se no animal um pedaço de papel adesivo (12 mm de diâmetro) em ambos os pulsos de suas patas dianteiras.(figura 9) Num total de quatro sessões, com intervalo de 5 min entre as mesmas, registrou-se qual membro do animal (contralateral ou ipsilateral) foi extraído o adesivo primeiramente. Todos os animais tiveram seu desempenho avaliado 2 e 1 dias antes da ablação, sendo estes valores considerados para o estado normal. Após a ablação os testes foram realizados nos DPAs 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49.

A porcentagem de preferência contralateral foi calculada (número de

remoções primeiramente efetuada na pata contralateral / número de remoções primeiramente efetuadas na pata contralateral + número de remoções primeiramente efetuadas na pata ipsilateral). Foi considerado que porcentagem igual a 50 → sem preferência; > 50 % → preferência pelo lado contralateral; < 50 % → preferência pelo lado ipsilateral.

Também não foram encontrados estudos que façam uma relação direta entre o nível (extensão) da lesão e o nível de perda funcional da pata afetada para o teste do adesivo. Portanto, para ter um controle maior sobre a padronização do nível da lesão entre os animais, se estabeleceu que o percentual de preferência no DPA 2 devia ser entre 0 % e 25 %. Animais que apresentaram preferência maior que 25 % foram desconsiderados neste teste, uma vez que poderiam apresentar lesão de menor extensão, causada por um erro no procedimento cirúrgico. Além disso, para descartar animais com possíveis déficits prévios à ablação, só foram usados animais com preferência de no mínimo 25 % no teste pré-ablação (feito 1-2 dias antes da cirurgia).



**Figura 9: Teste do Adesivo. Adesivo colado na pata do animal**

### **3.8 Detecção de citocinas**

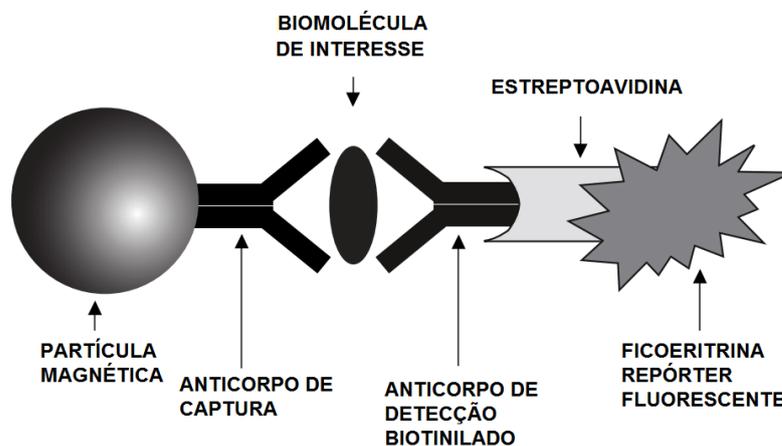
Seis animais foram submetidos à ablação e 24 h após, três animais foram tratados com CMMOs 2D i.v. e os outros três animais controle receberam PBS

i.v. (veículo). Após 24 h dos tratamentos, os animais foram sacrificados. Foi feita a coleta de tecido encefálico circundante à lesão e também da mesma região no córtex contralateral ao dano. Posteriormente, os tecidos foram macerados em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM e triton 0,2%) e 3,4  $\mu\text{L}$  de inibidores de protease (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  inibidor tripsina/soybean e 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinina), centrifugados a 3.000 G a 4°C por 10 min e a concentração de proteínas foi dosada por meio do ensaio com ácido bicinonínico (BCA). Para isto foi utilizado o Kit “BCA - Protein assay kit®” (PIERCE) segundo as instruções do fabricante para microensaio, que detecta de 20 a 2.000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de proteína total. Foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  da amostra em teste ou do padrão (solução de proteína soro albumina bovina - BSA) nos respectivos poços. A seguir, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da mistura do reagente A e B, sendo 50 partes do reagente A com 1 parte do reagente B. A leitura foi feita a 562 nm, utilizando um leitor de placas. As concentrações das amostras foram obtidas com base na curva padrão de BSA (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ).

Foram feitas diluições nas amostras para se obter a concentração proteica de 900  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Em seguida, o material foi congelado a -70 °C e mantido até o momento de uso. Foram coletados 2 mL de sangue. Após centrifugação a 1.000 x g a 4°C, os plasmas coletados para análise no Bioplex® também foram congelados a -70 °C e mantidos até o uso.

O painel usado foi o de citocinas de rato (Bio Rad, cat# M80005MJU3), analisando IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gama, GM-CSF e TNF- $\alpha$ . Brevemente, o filtro da placa de 96 poços foi lavado com *Bioplex® Assay Buffer* (Bio Rad). Em seguida, foram adicionadas as partículas conjugadas com anticorpos anti-citocinas, lavados com *Bioplex® Wash Buffer*, sendo posteriormente adicionadas as amostras diluídas, conforme o protocolo do fabricante. Seguida de uma incubação de 1 h, a placa foi novamente lavada com *Bioplex® Wash Buffer*, sendo então adicionado a cada poço o anticorpo biotilado de detecção para um epítipo diferente da citocina, formando um sanduíche de anticorpos, incubado por 1 h. Após esse período, estreptavidina conjugada com ficoeritrinaPE, que se liga ao anticorpo biotilado, foi incubada por 30 min. Novas lavagens foram realizadas com *Bioplex® Wash Buffer*, e as partículas foram ressuspensas com *Bioplex® Assay Buffer* e analisados no

*Bioplex® 200 Suspension Array system/Luminex* (Bio Rad, Hercules, CA) através do programa *Bioplex® Manager*, versão 4.1 (Bio Rad, Hercules, CA). Os dados observados são referentes à no mínimo 200 partículas por citocina.



**Figura 10: Imunoensaio sanduíche BioPlex.** Extraído do manual do kit *Bioplex®*.

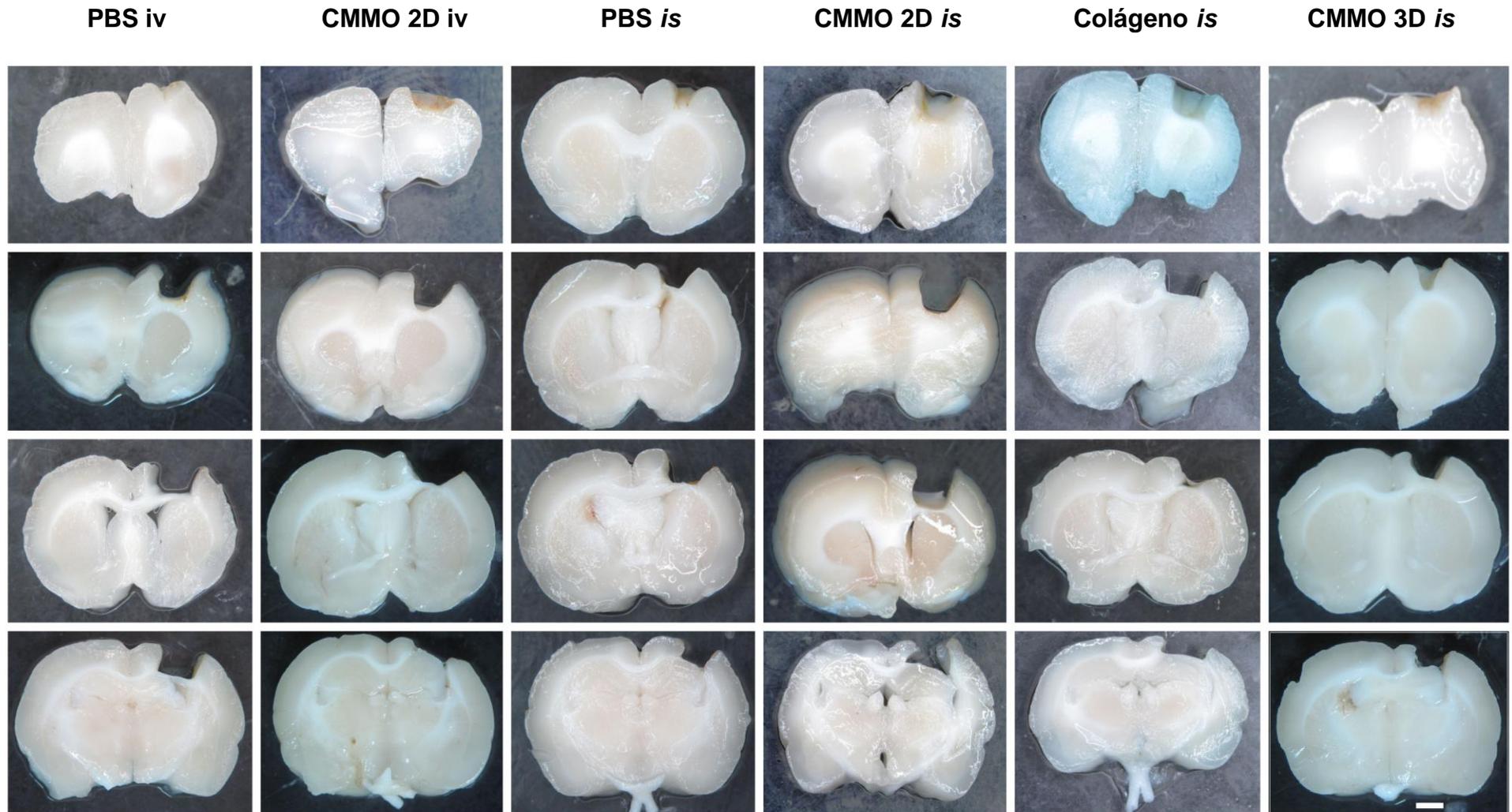
### 3.9 Análise estatística

Para as análises funcionais foi feita a ANOVA de dois fatores com medidas repetidas (tratamento vs tempo, tempo como o fator de medidas repetidas) para cada grupo de via de administração. Quando a interação não foi significativa, para cada tratamento foram agrupados os valores dos tempos, e a comparação entre os tratamentos foi feita com o teste *t*. Quando a interação foi significativa, foi feito o ajuste de modelo de regressão não-linear para cada tratamento. Para a análise de volume de lesão foi feita a ANOVA de dois fatores (via de administração vs tratamento). Para a análise de correlação entre volume de lesão com a recuperação funcional, foi calculado o Coeficiente de correlação de Pearson para cada teste funcional. Em todos os casos, o nível de significância foi de  $p < 0,05$ . Para todas as análises estatísticas foi utilizado o software *GraphPad Prism 4*.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Lesão cortical unilateral por ablação**

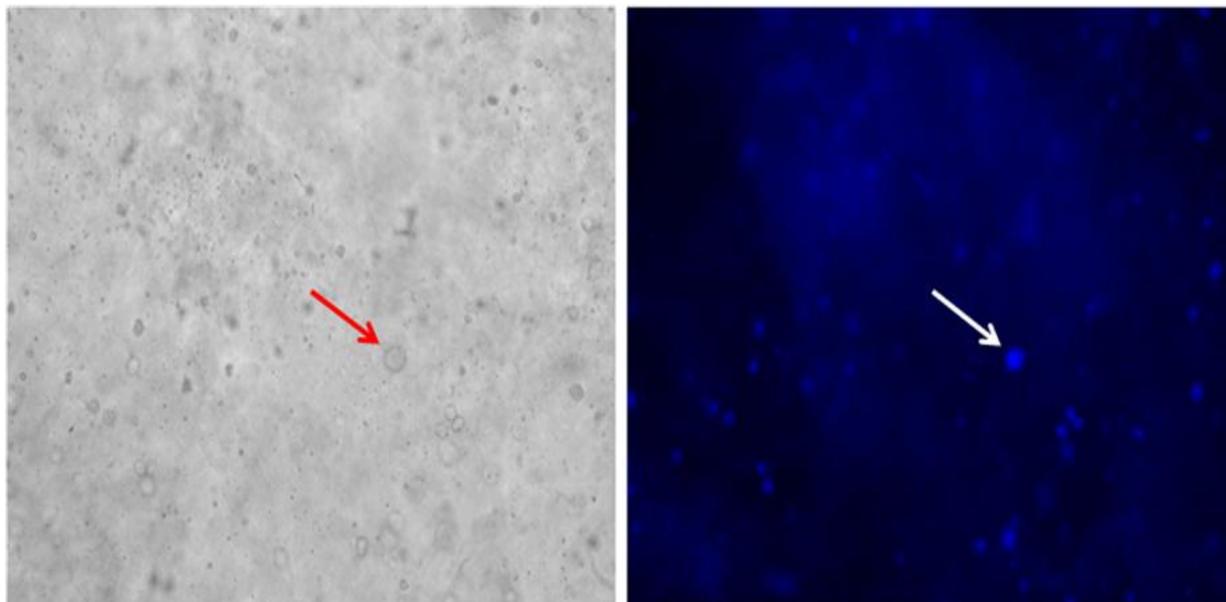
A lesão induzida por ablação unilateralmente no córtex motor e somestésico dos ratos se constituiu na remoção das seis camadas corticais, atingindo parcialmente a substância branca subjacente. Como pode ser observado (Figura 11) em cada imagem verifica-se a extensão medio-lateral da lesão após 60 dias, o que confirma a eficiência do procedimento cirúrgico realizado nos animais.



**Figura 11: Imagens sequenciais de cortes coronais:** Encéfalos de animais representativos de cada grupo experimental 60 dias após ablação. Em cada grupo, as imagens foram posicionadas de cima para baixo, da região mais anterior à mais posterior. Barra de cal. = 2 mm.

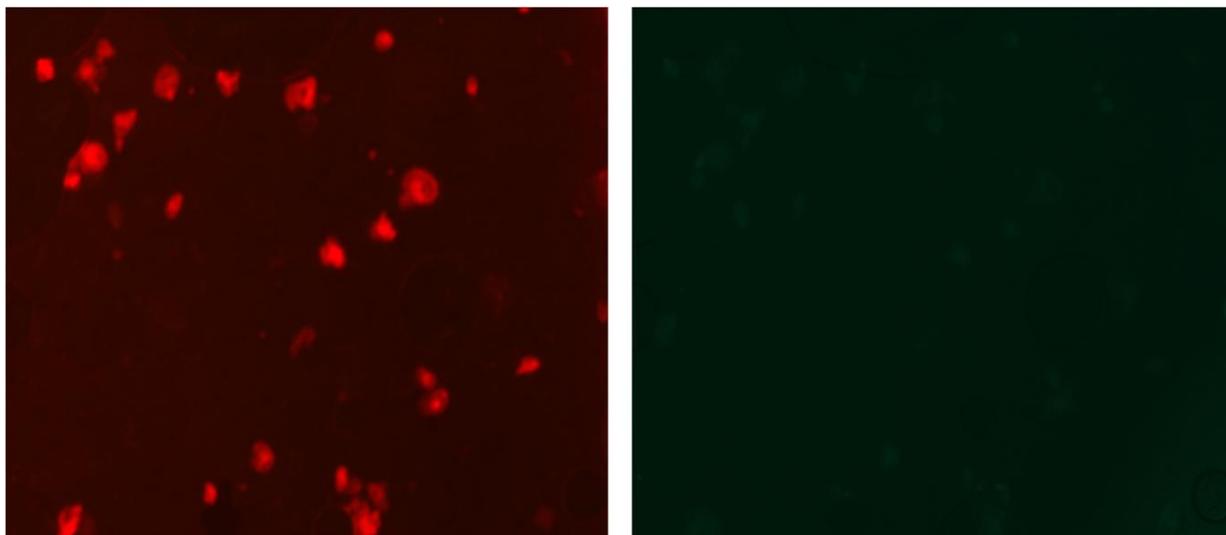
## 4.2. Viabilidade e marcação das células mesenquimais de medula óssea

A marcação com o azul de tripano demonstrou alta viabilidade das CMMOs cultivadas dentro da matriz de colágeno, uma vez que virtualmente nenhuma célula foi marcada com o corante (Figura 12).

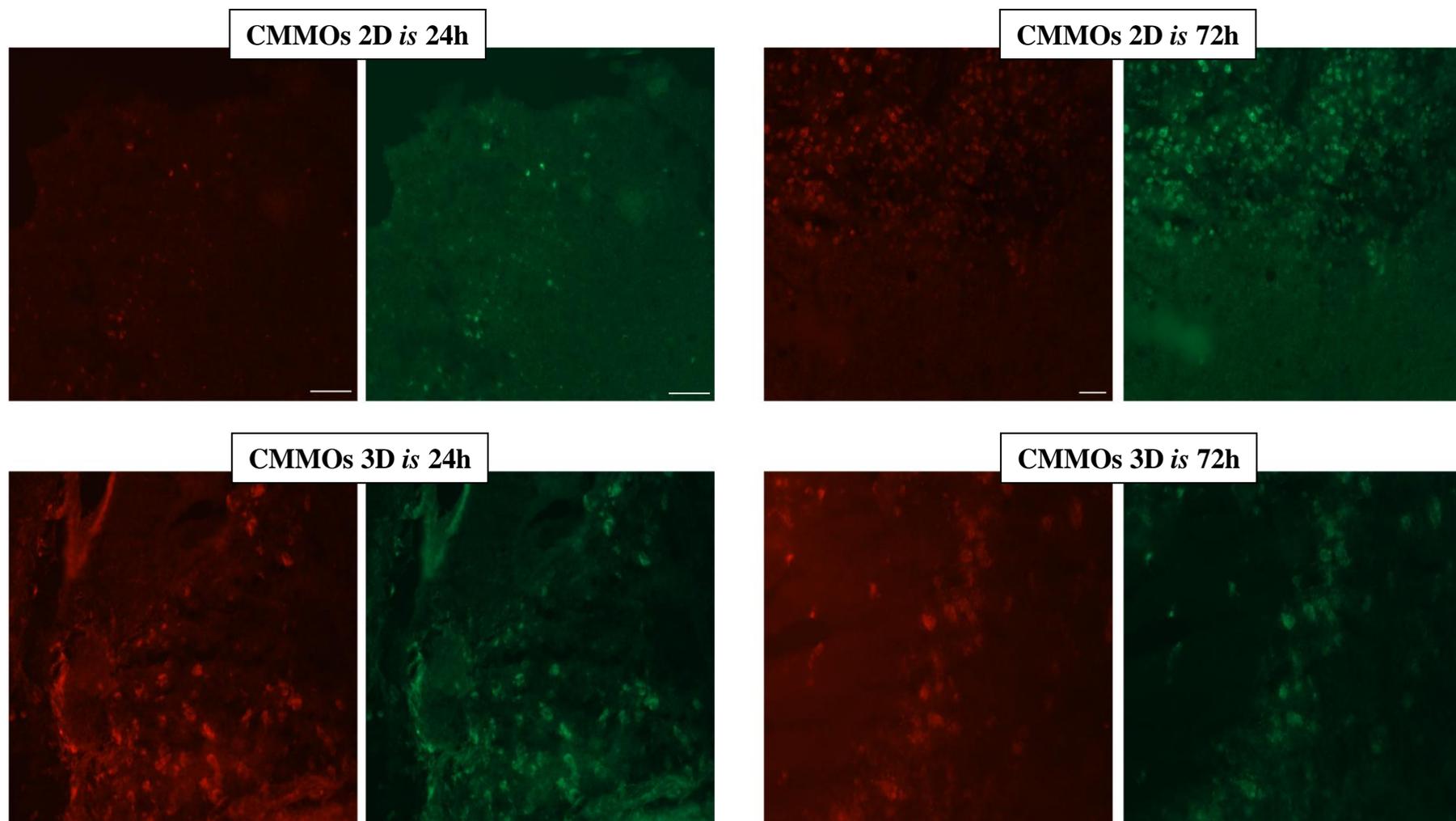


**Figura 12: Viabilidade das CMMOs 3D.** Imagens do mesmo campo, mostrando as CMMOs na matriz de colágeno. À esquerda, marcação com azul de tripano e visualização em contraste de fase, e a direita, a marcação com DAPI visualizada no seu filtro.

Para investigar se houve infiltração no parênquima encefálico pelas CMMOs nos grupos com administração *in situ*, as CMMOs foram marcadas com *Cell Tracer Far Red* (Figura 13). A observação com a utilização do filtro para rodamina (o correto, seguindo as especificações do fabricante) revelou células marcadas nas regiões de borda da lesão, sendo em maior número 72 h após a administração (Figura 14). Entretanto, a mesma marcação foi observada também com o filtro para a fluoresceína, o que não era esperado (Figura 14). Não foram encontradas células marcadas que aparecessem apenas no filtro da rodamina.



**Figura 13: Marcação com *CellTracer*.** Imagem representativa de CMMOs marcadas com o *Cell Tracer Far Red*, em lâmina, logo após a lavagem do marcador. Como recomendado pelo fabricante, o marcador deve ser observado com o filtro para rodamina, com o qual foi observada forte marcação das CMMOs (em vermelho, à esquerda). Como esperado, não foi observada marcação significativa das células com o filtro da fluoresceína (em verde, à direita).



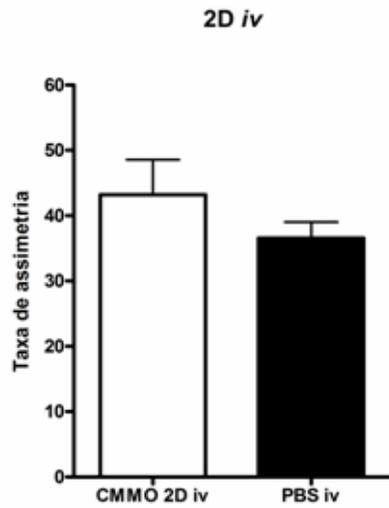
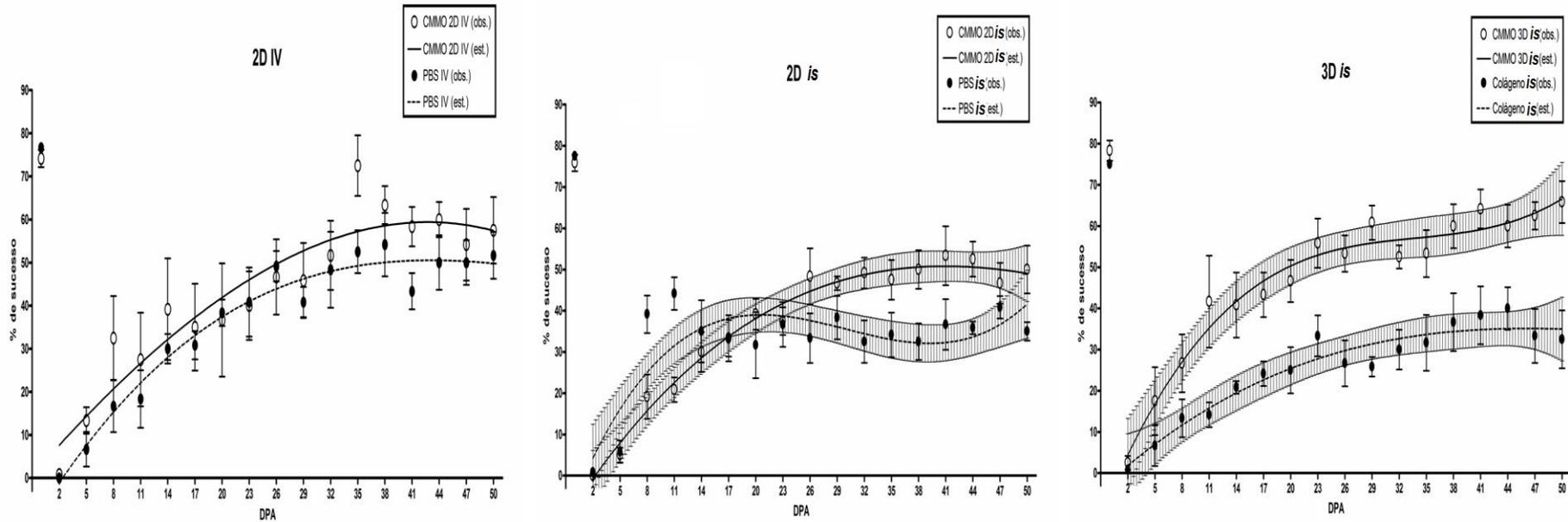
**Figura 14: Rastreamento das Células Mesenquimais de Medula Óssea utilizadas após ablação.** Imagens representativas do tecido encefálico dos grupos que receberam administração *in situ* das CMMOs marcadas com *CellTracer*, mostrando a borda da lesão. Todas as células apresentaram observação de marcação tanto com o filtro para a rodamina (em vermelho, à esquerda) como com o filtro para a fluoresceína (em verde, à direita). CMMOs 2D 24 h: barra corresponde a 100 μm; CMMOs 2D 72 h e as 3D: barra de cal. = 200 μm.

### 4.3. Avaliações funcionais

#### 4.3.1. Teste da recuperação de pílula e alcance na câmara

O desempenho de recuperação dos grupos tratados e controles antes da lesão e ao longo das semanas pós-ablação segundo o teste RPAC foi observado (Figura 15). A "% de sucesso" avalia a performance dos animais durante a realização da tarefa de buscar a cápsula de ração. Os testes de RPAC executados antes da ablação demonstraram que ambos os grupos apresentaram desempenho similar e atingiram mais de 70% de sucesso na realização da tarefa. Entretanto, no dia pós-ablação (DPA) 2, a performance dos mesmos foi muito reduzida, demonstrando a perda funcional ocasionada pela ablação.

Os grupos de tratamento CMMO 2D *is* e CMMO 3D *is* não apresentaram sobreposição dos intervalos de confiança, sendo assim considerados estatisticamente diferentes. O grupo CMMO 2D *iv* apresentou sobreposição dos intervalos de confiança ao longo do tempo e por isso foi feito o agrupamento de todos os dados deste grupo de tratamento e por meio da análise por teste *t* foi observada diferença significativa entre os grupos do tratamento 2D *iv*. Estes resultados indicam que o tratamento com as CMMO 2D *is* e CMMO 3D *is* induziram recuperação funcional significativa no teste do RPAC nos animais tratados com as mesmas. Porém quando comparamos os três tratamentos, nenhum deles se destaca como melhor e, além disto, o grupo que recebeu somente Colágeno *is* apresentou um resultado inferior a todos os outros grupos.

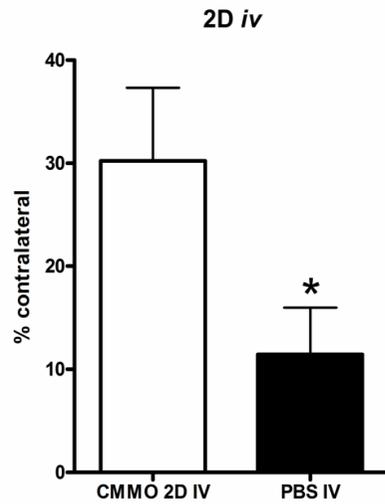
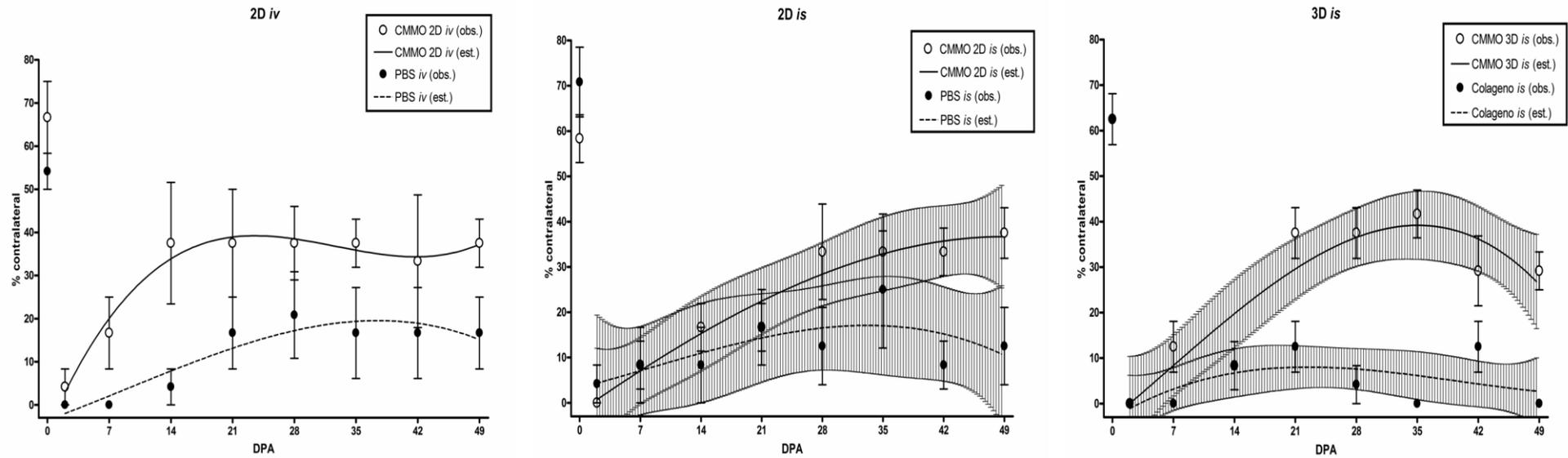


**Figura 15: Teste RPAC:** Acompanhamento da porcentagem de sucessos por até 50 dias de todos os grupos experimentais. Gráficos acima apresentam as regressões não lineares para cara grupo de tratamento. O gráfico em barras ao lado apresenta os dados agrupados do grupo de tratamento 2D iv. As barras no gráfico representam média±SEM.

### 4.3.2. Teste do adesivo

A recuperação de todos os grupos tratados e controles antes da ablação e ao longo das semanas pós-isquemia segundo o teste do adesivo (Figura 16). Na avaliação pré-ablação (DPA 0), é possível visualizar que não ocorreu diferença significativa entre os grupos tratados e controles. No 2º DPA, ambos os grupos removeram primeiramente o adesivo da pata ipsilateral, o que resultou em 0% de remoção em primeiro lugar no lado contralateral, sugerindo uma perda tátil em consequência da ablação. A "preferência contralateral" avalia a preferência para remoção do adesivo da pata lesada.

Neste teste, os grupos de tratamento CMMO 2D *is* e CMMO 3D *is* não apresentaram sobreposição dos intervalos de confiança, sendo considerados estatisticamente distintos. O grupo CMMO 2D *iv* apresentou sobreposição dos intervalos de confiança ao longo do tempo e por isso foi feito o agrupamento de todos os dados deste grupo de tratamento. Por meio da análise por teste *t* foi observada diferença significativa entre os grupos do tratamento 2D *iv*. Estes resultados indicam que o tratamento com as CMMO 2D *is* e CMMO 3D *is* induziram recuperação funcional significativa no teste do adesivo nos animais tratados com as mesmas. Porém quando comparamos os três tratamentos, nenhum deles se destaca como melhor que o grupo intravenoso ainda que este último tenha apresentado sobreposição dos intervalos de confiança.



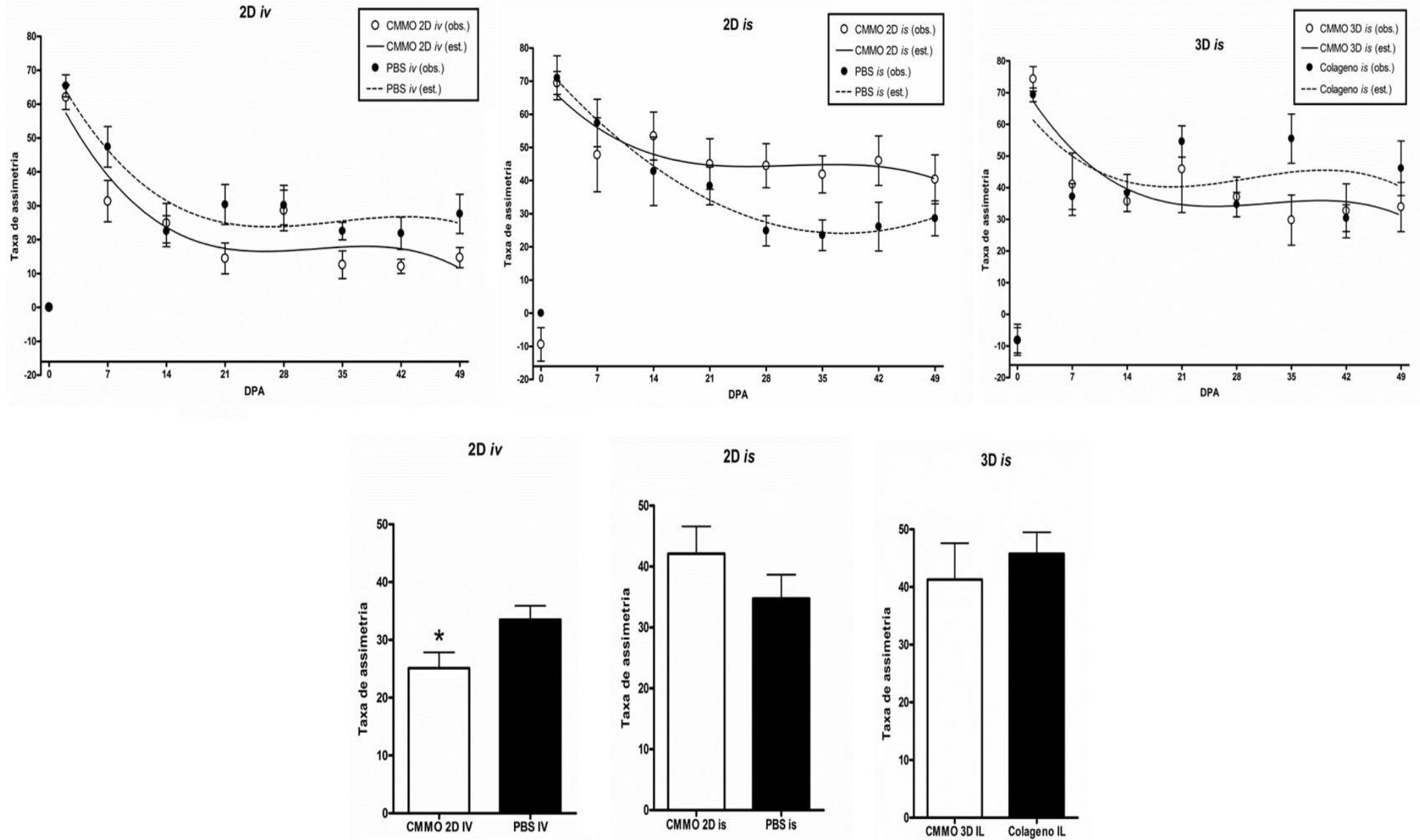
**Figura 16: Teste do Adesivo.** Acompanhamento da porcentagem de uso da pata contralateral por até 49 dias de todos os grupos experimentais Gráficos acima apresentam as regressões não lineares para cara grupo de tratamento. Os gráficos em barras ao lado apresentam os dados agrupados As barras no gráfico representam média±SEM. \*=P<0.05, teste t.

### 4.3.3. Teste do cilindro

As análises dos vídeos realizados no dia pré-ablação (DPA 0), demonstraram que não ocorreu diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 17). No 2º DPA, todos os grupos apresentaram alta taxa de assimetria, demonstrando perda funcional, em consequência da ablação.

Os gráficos ilustram o desempenho de recuperação dos grupos tratados e controles antes da lesão e ao longo das semanas pós-ablação segundo o teste do cilindro. A "Taxa de assimetria" avalia a preferência dos animais no uso das patas durante a exploração vertical no cilindro.

Como no teste do cilindro, todos os grupos apresentaram sobreposição dos intervalos de confiança. Então foi feito o agrupamento de todos os dados em cada grupo experimental e por meio da análise por teste *t* foi observada diferença significativa entre os grupos do tratamento 2D iv. Estes resultados indicam que o tratamento com as CMMOs 2D iv induziu recuperação funcional significativa no teste do cilindro nos animais tratados com as mesmas. Deste modo obtiveram-se os gráficos a seguir.



**Figura 17: Teste do cilindro.** Gráficos acima apresentam as regressões não lineares para cada grupo de tratamento. Os gráficos em barras abaixo apresentam os dados agrupados. As barras no gráfico representam média±SEM. \*=P<0.05, teste t.

#### 4.4. Avaliação do volume da lesão

Após a quantificação do volume de lesão, realizado 50 dias após a lesão, a ANOVA de dois fatores revelou que não houve interação significativa entre os fatores (tratamento *versus* via de administração;  $p = 0,18$ ). Não houve efeito significativo do tratamento ( $p = 0,37$ ), mas houve da via de administração ( $p < 0,05$ ). Entretanto, no desdobramento com o agrupamento dos valores por via de administração, o ANOVA não revelou diferença significativa entre elas ( $p = 0,05$ ). Portanto, não houve diferença significativa no volume de lesão entre os grupos experimentais (Figura 18). Isto sugere que qualquer efeito observado, seja do tratamento, da via de administração ou do tempo, não pode ser atribuído a diferenças significativas no volume de lesão, ao menos ao nível macroscópico.

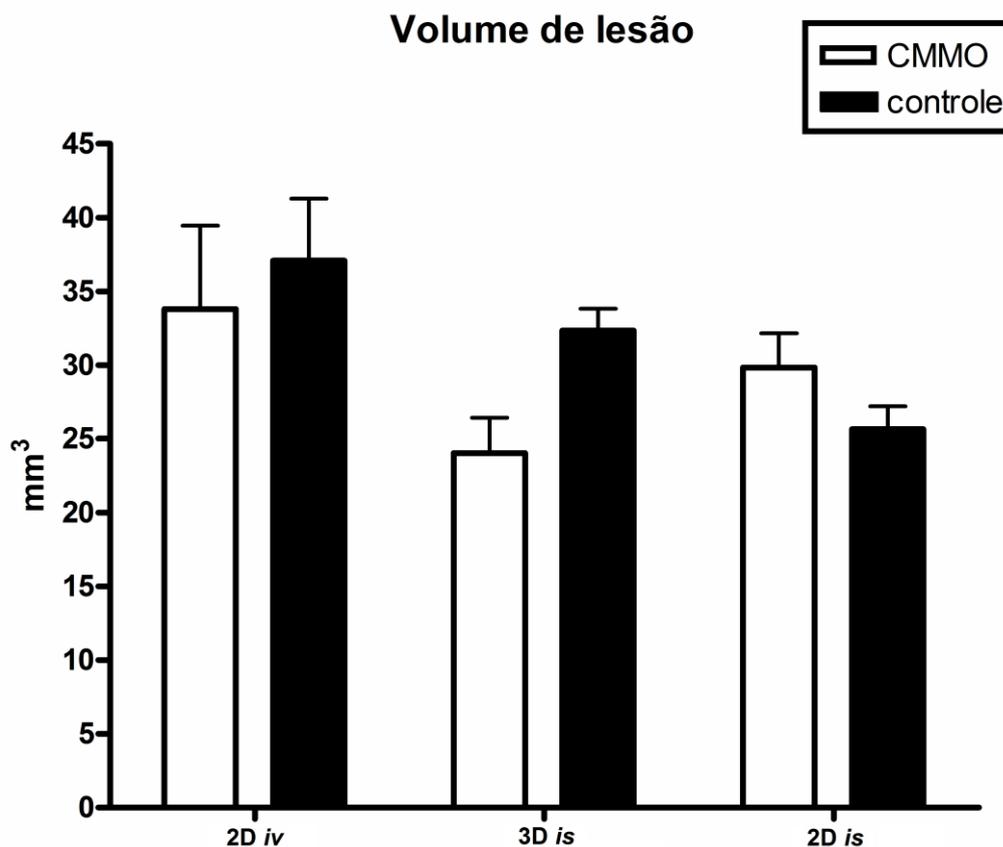
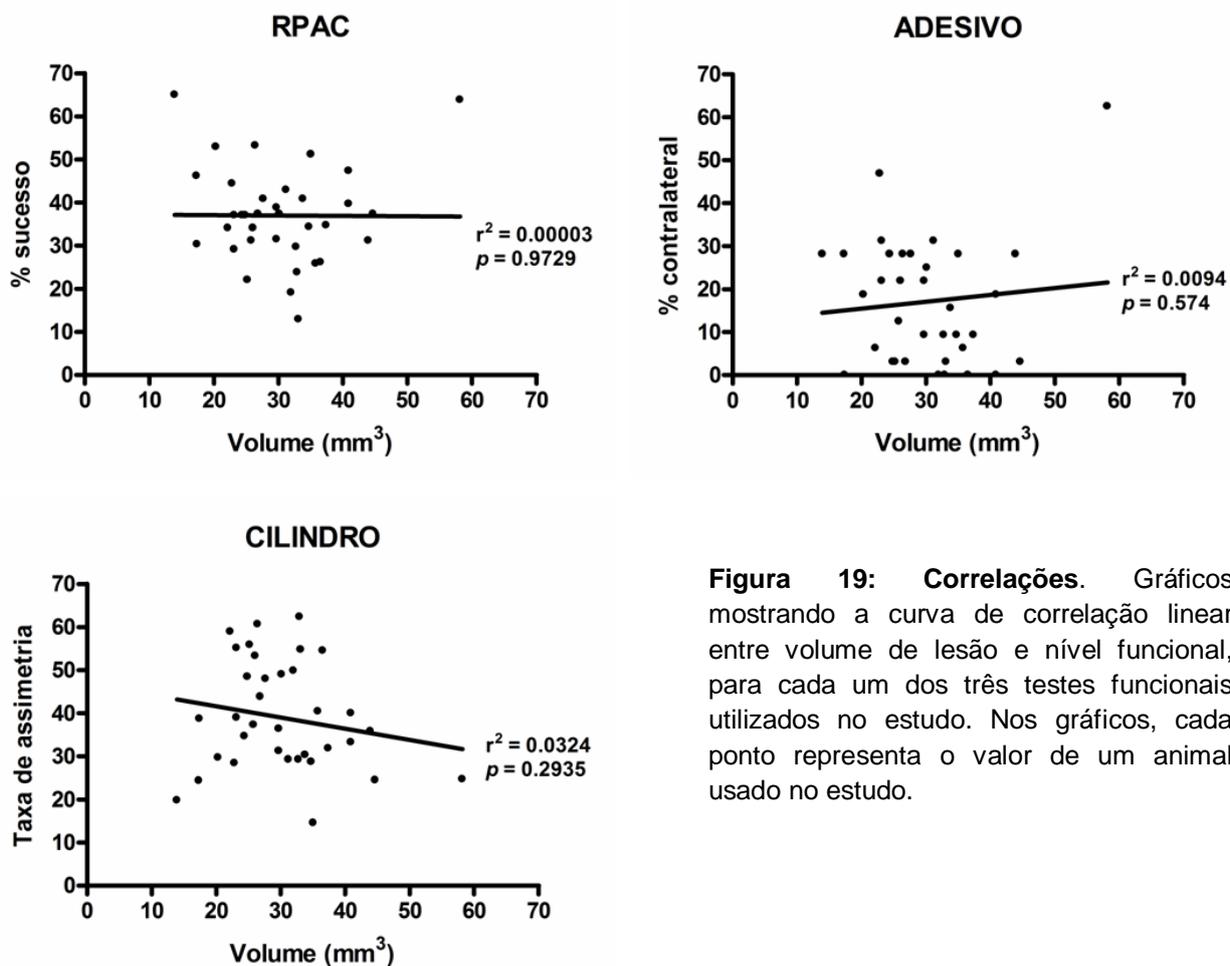


Figura 18: Quantificação do volume de lesão. As barras no gráfico representam média+SEM.

#### 4.5. Correlação do volume de lesão com a recuperação funcional

A análise de correlação demonstrou que em nenhum teste funcional houve correlação linear entre o volume da lesão e o nível funcional do animal (Figura 19).

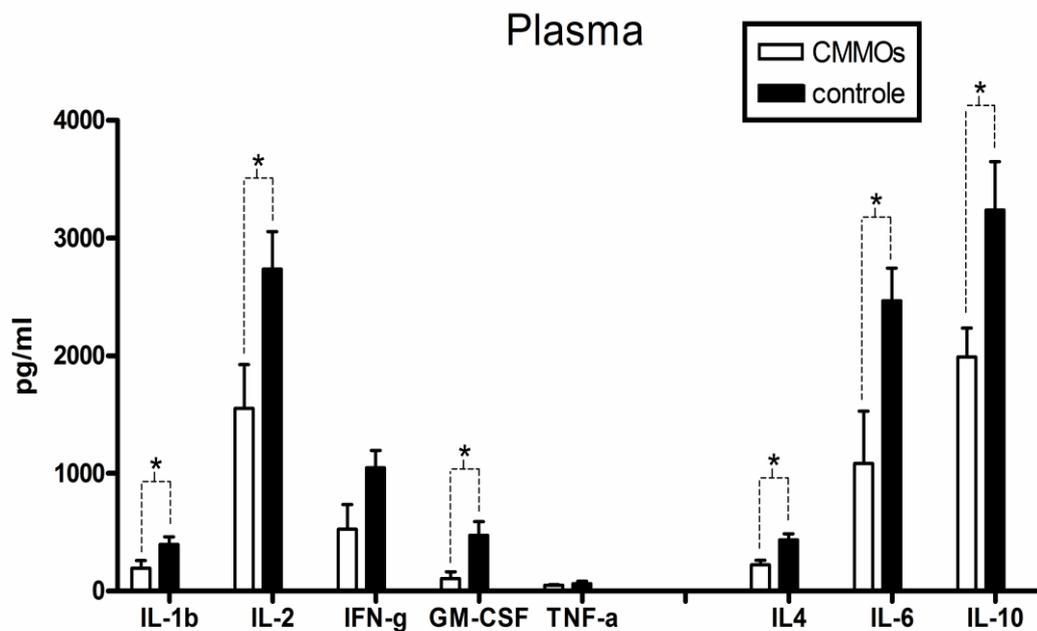


**Figura 19: Correlações.** Gráficos mostrando a curva de correlação linear entre volume de lesão e nível funcional, para cada um dos três testes funcionais utilizados no estudo. Nos gráficos, cada ponto representa o valor de um animal usado no estudo.

#### 4.6. Análise de citocinas

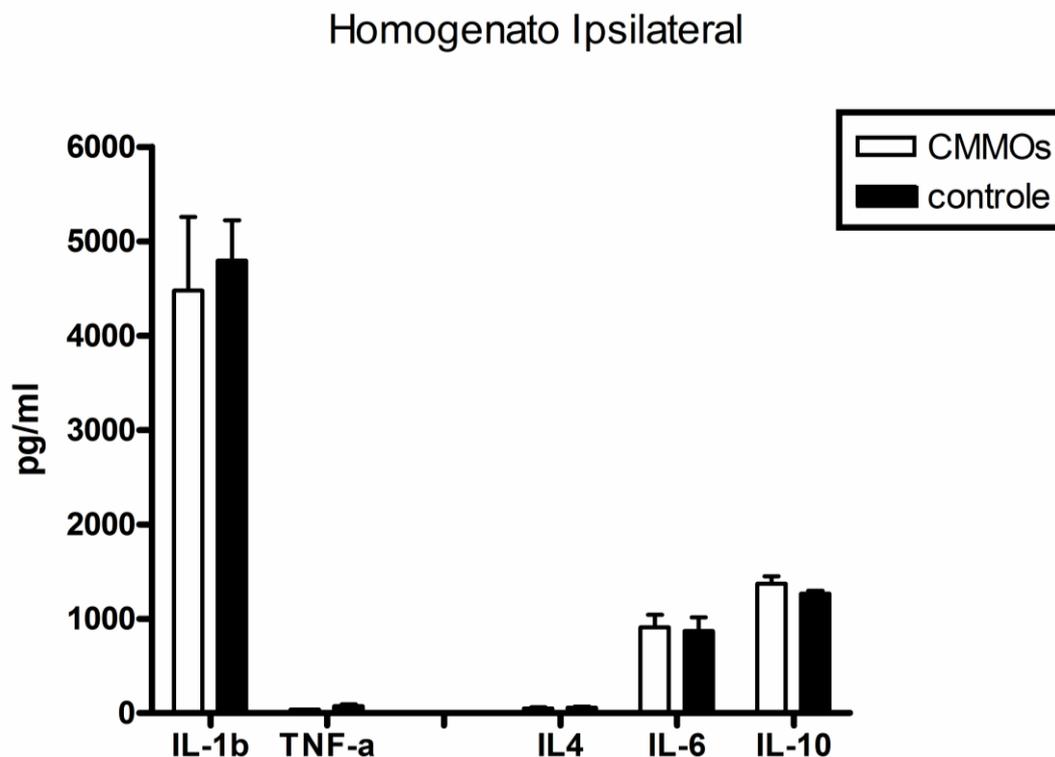
Uma vez que os resultados da análise funcional sugeriram que a administração i.v. é a mais eficiente, foi feita uma análise para verificar se as CMMOs administradas desta forma apresentaram efeito sobre a expressão de

citocinas no tecido lesado e no sangue, 24 h após o tratamento da lesão. A quantificação no plasma demonstrou que as CMMOs reduziram significativamente a expressão das citocinas IL-1b, IL-2, GM-CSF, IL-4, IL-6 e IL-10 (Figura 20).



**Figura 20: Quantificação de citocinas no plasma.** O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média+SEM dos grupos PBS (N=3) e CMMOs 2D i.v. (N=3). \* =  $p < 0,05$ ; teste *t*.

Na quantificação dos homogenatos do tecido cortical lesado (ipsolateral), não foi observado efeito significativo das CMMOs na expressão das citocinas detectadas (figura 21).



**Figura 21: Quantificação de citocinas nos homogenatos de tecido lesado (ipsilateral).** O gráfico apresentado em barras ilustra os valores de média+SEM dos grupos PBS (N=3) e CMMOs 2D i.v. (N=3).

## 5. DISCUSSÃO

Nos últimos 10 anos, as células-tronco mesenquimais têm emergido como uma abordagem terapêutica para medicina regenerativa, câncer, doenças autoimunes, entre outras. Isto se deve ao potencial das CMMOs para se diferenciar e reparar tecidos e órgãos danificados, além das suas propriedades imunomoduladoras. A estratégia de cultivo tridimensional é considerada promissora, pois garante sobrevivência prolongada às células quando enxertadas, podendo assim ampliar o seu efeito terapêutico (QU *et al.*, 2011; SCHEIBE *et al.*, 2012).

No presente estudo investigamos a ação das CMMOs na recuperação sensorimotora de ratos submetidos à ablação focal no córtex. Para o

tratamento, foram utilizadas duas vias de transplante, intravenosa e *in situ*, e dois tipos de cultivo celular, bidimensional e tridimensional. SCHALLERT, (2006) descreveu algumas propostas de testes que avaliam a condição sensorimotora de animais que comumente estão presentes na literatura. Destes, utilizamos o teste do cilindro, que permitiu quantificar o uso das patas dianteiras durante o movimento exploratório do animal (SCHALLERT *et al.*, 2000; SCHAAR *et al.*, 2010; VOLKOV *et al.*, 2011). Também, o teste de remoção do adesivo que permitiu averiguar os prejuízos relacionados à estimulação tátil (MODO *et al.*, 2000; SCHAAR *et al.*, 2010). E o RPAC, que avaliou a motricidade fina das patas dianteiras, baseando-se na similaridade de movimentos entre os humanos e os roedores quando manipulam certos alimentos com suas patas. (WHISHAW e COLES 1996; ALLRED e JONES, 2004; GHARBAWIE *et al.*, 2006; BRYANT *et al.*, 2007; ALLRED *et al.*, 2008).

Os resultados dos testes funcionais evidenciaram que o cultivo em colágeno (3D) não resultou em aumento da capacidade terapêutica das CMMOs, quando comparado com o protocolo de cultivo em 2D e administração intravenosa. Entretanto, considerando apenas a via de administração *is*, o uso do cultivo em 3D demonstrou melhores resultados. A via intravenosa é mais simplificada e segura, se utilizada em terapias. Com isto, foram feitas as avaliações dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, no plasma e encéfalo lesado, após o tratamento com a injeção das CMMOs por via intravenosa. Foi observada uma redução geral nos níveis de citocinas no plasma dos animais tratados.

A eficácia da terapia com células de medula óssea no tratamento de animais com lesões no córtex sensorimotor já foi descrita na literatura. GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, (2009), utilizando modelos animais de lesão do córtex sensorimotor por termocoagulação. Neste trabalho também realizado pelo nosso grupo, foi observada a recuperação funcional dos animais tratados com células mononucleares de medula óssea pelos testes sensorimotores do cilindro e do adesivo até 28 dias após a isquemia.

DE FREITAS *et al.*, (2012), também com o mesmo modelo de lesão por ablação utilizado no presente trabalho, realizou análises da recuperação funcional pelos testes sensorimotores do cilindro e do adesivo, a fim de avaliar

os efeitos do transplante intravenoso das CMMOs 2D e das células mononucleares de medula óssea. Foi demonstrada a capacidade das CMMOs na promoção de recuperação sensorimotora em ratos, assim como foi observado nos resultados deste estudo, que induziram uma resposta funcional significativa, incluindo a avaliação com teste de RPAC nos modelos animais abladados.

Neste trabalho foi utilizado o modelo de ablação unilateral por sucção já descrito por NAPIERALSKI *et al.*, (1998). Este tipo de lesão é similar a um estado clínico de remoção imediata do tecido do cérebro, por exemplo, a remoção cirúrgica de tumores cerebrais. Embora menos recorrente que acidentes encefálicos, vasculares ou traumáticos, a possível eficácia de terapias celular nesta condição deve ser verificada. A ablação é diferente quanto ao processo inflamatório natural de resposta após a lesão do tecido que ocorre após isquemia ou lesões encefálicas traumáticas. Trabalhos anteriores sugerem que a inflamação induz plasticidade estrutural induzida pela lesão, que não é observado após a ablação (VOORHIES e JONES, 2002). Como esperado, os resultados mostram que a ablação causou dano encefálico na mesma extensão que aquela observada em modelos de isquemia por termocoagulação (GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2013 SAMPAIO *et al.*, 2013), tanto no eixo antero-posterior como no medio-lateral.

CARMICHAEL, (2003) descreveu que por injeções de BDA no córtex contralateral de animais isquêmicos por termocoagulação, observou-se marcação de numerosas fibras no tecido estriado ipsilateral à lesão, o que não foi notado após lesão por aspiração. Além de diferenças na plasticidade, diferenças nas perdas sensorimotoras também foram observadas entre lesões do córtex causadas por ablação e por isquemia. Na ablação foi observada maior perda de função sensorimotora da pata dianteira induzida por estimulação tátil.

Após uma isquemia cerebral em humanos e animais já é conhecido que estes desenvolvem uma dependência compensatória no lado do corpo menos afetado, ou seja, ipsilateral à lesão (SCHALLERT, 2006; ALLRED *et al.*, 2008). Porém, o desenvolvimento de comportamentos compensatórios permite que

atividades habituais sejam executadas (ALLRED *et al.*, 2008). Considerando estas informações, em nossa avaliação ao longo do tempo, os resultados mostraram que o grupo de animais transplantados com as CMMOs *in situ*, teve seu comportamento significativamente diferente do grupo salina após a ablação. O grupo intravenoso não apresentou diferença entre tratados e controles, porém, os seus resultados foram tão satisfatórios quanto aos dos tratados com células *in situ*.

Para uma sugestão mais clara de que as CMMOs 2D *iv*, seriam capazes de produzir uma recuperação na motricidade fina nos modelos isquêmicos, outros experimentos são necessários. Para isto, seria conveniente analisar a neuroplasticidade anatômica com a utilização de traçadores como o BDA utilizado por CARMICHAEL, (2006), uma vez que lesões cerebrais podem levar a reorganizações neuroplásticas.

O teste de remoção do adesivo mostrou uma evidente perda de função da pata contralateral dianteira, logo dois dias após isquemia, indicando ser um efeito da lesão isquêmica induzida, como visto na literatura (ADKINS, 2004; GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2013). Com o acompanhamento realizado ao longo do tempo, além da indução de recuperação funcional pelos tratamentos, foi observada uma influência do teste RPAC no teste do adesivo. Quando comparamos os resultados do presente trabalho com DE FREITAS *et al.*, (2012), utilizando o mesmo modelo e tratando com as CMMOs sem realizar o RPAC, observamos que pelo fato dos animais terem sido submetidos ao treinamento de aprendizagem e de destreza, o mesmo possibilitou uma melhora terapêutica iniciada de forma precoce. Possivelmente, trata-se de uma ação benéfica resultante da associação das CMMOs somado o efeito do treino de aprendizado e destreza (teste de RPAC).

No teste do cilindro, nossos resultados mostraram que o grupo tratado CMMOs 2D *i.v.* apresentou melhora funcional significativa, quando comparado ao grupo salina. Estes achados foram condizentes com os estudos anteriores (DE VASCONCELOS dos SANTOS *et al.*, 2010; DE FREITAS *et al.*, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2013). Nossos resultados mostraram que no 2º dia após a ablação houve uma grande perda de função da pata dianteira contralateral, assim como demonstrado em outros estudos (NAPIERALSKI *et al.*, 1998).

A lesão por ablação trata-se de um modelo que apresenta vantagens como o fato de permitir que se faça à lesão em diferentes regiões da porção dorsal do córtex, podendo também variar a extensão da lesão, abrangendo mais ou menos áreas corticais. A reação com o TTC (cloreto de trifênil tetrazólio) e as observações dos cortes coronais realizados *post mortem* mostraram que a lesão acometeu as seis camadas do córtex cerebral, localizadas imediatamente abaixo dos vasos coagulados, sem acometimento da substância branca nem do corpo caloso. Com isso, nossos achados relacionaram-se com os de SZELE *et al.*, (1995).

Em nossos estudos, ao correlacionar os resultados da extensão do dano nos animais dos grupos tratados e não tratados ao final dos experimentos, observou-se que as CMMOs, em todas as condições, não produziu efeitos significativos na redução da lesão, quando comparada ao grupo salina. Tal resultado não foi observado por LU *et al.*, (2007) que demonstrou que matrizes de colágeno I impregnadas com CMMOs humanas, além de melhorar a aprendizagem espacial e a função sensorimotora, reduziu o volume da lesão, e promoveu a migração das células transplantadas para a zona de fronteira lesão após uma injúria traumática em ratos, os mesmos dados foram observados por QU *et al.*, (2009). Já SAMPAIO *et al.*, (2013) em um modelo de isquemia por termocoagulação, também não observou esta correlação entre volume de lesão e melhora funcional.

A discussão desses dados se limita por que os estudos descritos na literatura apresentam os resultados de redução de volume em outros modelos de lesão, como na oclusão da artéria cerebral média e injúria traumática, além de outras vias de administração, dose e tempo de sobrevivência dos animais que não coincidem com os procedimentos que realizamos. Entretanto, o fato dos resultados não mostrar o efeito do tratamento na redução do volume da lesão, não exclui a possibilidade de que isto poderia ser visualizado em outro momento após o tratamento.

Atualmente, tem sido atribuído a diversas citocinas inflamatórias classicamente descritas no sistema imune um proeminente papel no desenvolvimento e na resposta à lesão do sistema nervoso (BOULANGER, 2009, DEVERMAN e PATTERSON, 2009; SCHROETER e JANDER, 2005).

BRENNEMAN *et al.*, (2010) demonstraram, em modelo experimental de acidente vascular encefálico isquêmico, que o tratamento com CMMOs reduz a expressão de IL-1 $\beta$  entre outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , e IL-6). Ainda neste modelo, foi demonstrado um aumento da expressão de IL-10 após transplante com células-tronco mesenquimais, reduzindo a atividade inflamatória nas células da astroglia, permitindo um regresso da funcionalidade dos tecidos isquêmicos. Estudos anteriores tiveram resultados variáveis em demonstrar como ocorre o mecanismo de imunossupressão pelas CMMOs (NAUTA *et al.*, 2006; SUDRES *et al.*, 2006). REN *et al.*, (2008) mostrou que a capacidade imunossupressora das CMMOs não é inata, mas sim induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  em combinação com o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ . Assim, citocinas pró-inflamatórias podem levar a imunossupressão em circunstâncias específicas. Estas citocinas induzem uma regulação positiva na *iNOS* e também induzem quimiocinas dos leucócitos que podem recrutar as células imunitárias, incluindo células T, células B e células apresentadoras de antígeno para as proximidades da localização da CMMO, onde os altos níveis de NO podem suprimir a função de células imunitárias. Portanto, a ação concertada de citocinas induzidas quimiocinas e NO são fundamentais para a imunossupressão CMMO mediada (REN *et al.*, 2008).

Apesar das suas funções imunossupressoras conhecidas, no presente trabalho, o comparativo entre os analitos, plasma e homogenato ipsilateral, demonstrou uma clara distinção entre os valores de citocinas. Não foram observados efeitos da administração das CMMOS no tecido encefálico lesionado, nestes os parâmetros imunológicos como níveis de citocinas pró-inflamatórias permaneceu inalterado depois da administração intravenosa das CMMOs após a ablação. Já no plasma, observamos uma redução geral dos níveis de citocinas dos animais tratados com as CMMOs, sugerimos com isso, que o tempo de avaliação dos efeitos terapêuticos no encéfalo seja superior a 24 h.

O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são considerados os principais mediadores das mais graves doenças neurodegenerativas (TONELLI e POSTOLACHE, 2005). Estas citocinas funcionam como cofatores essenciais à sustentação da inflamação cerebral em diversas desordens neurológicas como Parkinson, Alzheimer,

demência e doença de Huntington. Neste estudo, (TONELLI e POSTOLACHE, 2005) observamos a forte presença da citocina IL-1  $\beta$  no homogenato do lado lesionado, o que era esperado. O lado contralateral também foi avaliado e apresentou baixíssimos níveis desta citocina. No plasma, observamos uma redução significativa de IL-1  $\beta$  nos animais tratados, podendo ser um indício da ação imunossupressora sistêmica.

A citocina IL-10, no homogenato, não apresentou alterações, porém, no plasma foi uma das que apresentou forte redução após o tratamento. Dado o seu marcante caráter anti-inflamatório, contemplado não somente por doenças do sistema nervoso central como de outras doenças importantes, acreditamos que este resultado deve ser melhor investigado. A sua importante ação inibitória sobre a resposta imune, previne as ativações celulares e apresentações de antígenos e promove ação supressora sobre as citocinas IL-1  $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (ABBAS *et al.*, 2005).

A interleucina 6 também apresentou uma significativa redução no plasma. Ela é comumente produzida por fagócitos mononucleados e outras células em resposta a infecção por microorganismos e por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF $\alpha$ , atuando também sobre células da imunidade adaptativa, como linfócitos B, induzindo sua diferenciação em células produtoras de anticorpos (ABBAS *et al.*, 2005)

A IL-2 é uma das citocinas pró-inflamatórias que já foi identificada em diversas populações neuronais e gliais durante todo o desenvolvimento do SNC. A sua detecção é facilitada após inflamação e trauma, porém em nossos resultados, só foram detectados níveis de IL-2 no plasma, que apresentaram uma redução significativa nos animais tratados. Estes resultados corroboram com STEMBERGER *et al.*, (2011).

Apesar das mudanças estruturais no córtex cerebral representarem uma limitação do recurso disponível para uma reorganização neural eficiente, estudos recentes demonstram que a plasticidade é uma propriedade do tecido nervoso que se estende ao longo do curso da vida. O presente trabalho demonstrou que além deste conhecido potencial, as células devem ser investigadas com relação a sua capacidade de possível indução de neuroplasticidade, de auxiliar uma reorganização neural após lesões corticais

possivelmente através de imunomodulação da inflamação, o que traz implicações diretas para a reabilitação do controle motor, que é o foco de interesse para terapias em humanos.

## 6. CONCLUSÕES

- A avaliação sensorimotora mostrou que a via de administração iv apresentou maior efeito geral de aumento da recuperação sensorimotora comparada aos demais grupos.
- O cultivo em colágeno (3D) não resultou em aumento da capacidade terapêutica das CMMOs, quando comparado com o protocolo de cultivo em 2D e administração intravenosa. Entretanto, considerando apenas a via de administração is, o uso do cultivo em 3D demonstrou melhores resultados.
- O efeito da terapia não pode ser atribuído à redução do tamanho da lesão, ao menos ao nível macroscópico.
- A análise das citocinas sugere que a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias pode ser um dos mecanismos de ação das CMMOs. Entretanto, foi observada também redução de citocinas consideradas anti-inflamatórias. Isto mostra que o papel imunomodulador das CMMOs é complexo, e o verdadeiro papel de citocinas consideradas anti-inflamatórias no modelo usado precisam ser melhor investigados.
- Ao contrário do que a literatura sugere, nem sempre o cultivo das CMMOs em 3D resulta em melhoria das suas propriedades terapêuticas, sendo o protocolo de tratamento com cultivo tradicional (2D) e administração intra (iv) uma melhor alternativa.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A, LICHTMANN A, PILLAI S (2008) **Imunologia Celular E Molecular**. Elsevier – 6, 560pp.

ABBOTT, A (2003) **Cell culture: Biology's new dimension**. Nature 424: 870-872.

ADKINS, DL, BOYCHUCK, J, REMPLE, MS, KLEIM, JA (2006) **Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord**. Journal of Applied Physiology 101: 1776-1782.

AGGARWAL S, PITTENGER MF (2005) **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses**. Blood 105: 1815-1822.

ALAVERDASHVILI M, WHISHAW IQ (2008) **Motor cortex stroke impairs individual digit movement in skilled reaching by the rat**. European Journal of Neuroscience 28: 311-322.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2002) **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science 1463: 86.

ALLRED RP, JONES TA (2004) **Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic córtex**. Experimental Neurology 190: 433-445

ALLRED RP, ADKINS DL, WOODLEE MT, HUSBANDS LC, MALDONADO MA, KANE JR, SCHALLERT TJ (2008) **The vermicelli handling test: a simple quantitative measure of dexterous forepaw function in rats**. Journal of Neuroscience Methods 170: 229-234.

BARRY FP, MURPHY JM (2004) **Mesenchymal stem cells: clinical**

**applications and biological characterization.** International Journal of Biochemistry e Cell Biology 4: 568-584.

BEAR MF, CONNORS BW, PARADISO MA (2008) **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** Artmed, 3° ed, 896.

BEDERSON JB, PITTS LH, GERMANO SM, NISHIMURA MC, DAVIS RL, BARTKOWSKI HM (1986) **Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats.** Stroke 17: 1304-1308.

BENVENUTO F, FERRARI S, GERDONI E, GUALANDI F, FRASSONI F, PISTOIA V (2007) **Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state.** Stem Cells 25: 1753–1760.

BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG (2001) **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** Stem Cells 19(3): 180-192.

BIERNASKIE J, SZYMANSKA A, WINDLE V, CORBETT D (2005) **Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats.** European Journal of Neuroscience 21: 989-999.

BJORKLUND A, LINDVALL O (2000) **Cell replacement therapies for central nervous system disorders.** Nature Neuroscience 6: 537-544.

BONASSA EMA, SANTANA TR (2005) **Enfermagem em terapêutica Oncológica.** 3. ed. São Paulo: Atheneu.

BOUET V, FRERET T, TOUTAIN J, DIVOUX D, BOULOURARD M, SCHUMANN-BARD P (2007) **Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse.** Experimental

Neurology 203: 555-567.

BOULANGER LM (2009) **Immune proteins in brain development and synaptic plasticity.** Neuron 64: 93-109.

BRENNEMAN M, SHARMA S, HARTING M, STRONG R, COX CS JR, ARONOWSKI J, GROTTA JC, SAVITZ SI (2010) **Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats.** Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism 30 (1): 140-149

BRYANT AO, BERNIER B, JONES TA (2007) **Abnormalities in skilled reaching movements are improved by peripheral anesthetization of the less-affected forelimb after sensorimotor cortical infarcts in rats.** Behavioural Brain Research, v. 177, p. 298-307.

BURY SD, JONES TA (2002) **Unilateral sensorimotor cortex lesions in adult rats facilitate motor skill learning with the “unaffected” forelimb and training-induced dendritic structural plasticity in the motor cortex.** The Journal of Neuroscience 22: (19) 8597-8606.

CAPLAN AI (2005) **Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics.** Tissue Engineering 11: 198-211.

CARMICHAEL ST (2003) **Plasticity of Cortical projections after stroke.** The Neuroscientist 9: (1) 64-75.

CARMICHAEL ST (2006) **Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves.** Annals of Neurology 59: 735–742.

CHEN J, ZHANG ZG, LI Y, WANG L, XU YX, GAUTAM SC, LU M, ZHU Z, CHOPP M (2003) **Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after**

**stroke in rats.** Circulation Research 92: 692-696.

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

CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, GIUNTI D, CAPPIELLO V, CAZZANTI F (2006) **Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.** Blood 107: 367–372.

DE FREITAS HT, DA SILVA VG, GIRALDI-GUIMARÃES A (2012) **Comparative study between bone marrow mononuclear fraction and mesenchymal stem cells treatment in sensorimotor recovery after focal cortical ablation in rats.** Behavioral and Brain Functions 8: 58.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS A, DA COSTA REIS J, DIAZ PAREDES B, MORAES L, JASMIN, GIRALDI-GUIMARÃES A, MENDEZ-OTERO R (2010) **Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats.** Brain Research 1306: 149-158.

DEVERMAN BE, PATTERSON PH (2009) **Cytokines and CNS development.** Neuron 64 (1): 61-78.

DELCROIX GJR, SCHILLER PC, BENOIT J-P, MONTERO-MENEI CN (2010) **Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering.** Biomaterials 31: 2105–20.

DOEPPNER T R e HERMANN DM (2010) **Mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke: progress and possibilities.** Stem Cells and Cloning: Advances and Applications 3: 157-163.

ELSDALE T e BARD J (1972) **Collagen substrata for studies on cell behavior.** Journal of Cell Biology 54: 626-37.

FELASA WORKING GROUP ON PAIN AND DISTRESS (1994) **Pain and**

**distress in laboratory rodents and lagomorphs.** Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. Lab Animal 28: 97-112.

FREED LE, VUNJAK-NOVAKOVIC G, BIRON RJ, EAGLES DB, LESNOY DC, BARLOW SK, LANGER R (1994) **Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering.** Nature Biotechnology 12: 689.

FRERET T, VALABLE S, CHAZALVIEL L, SAULNIER R, MACKENZIE E, PETIT E, BERNAUDIN M, BOULOUARD M, SCHUMANN-BARD P (2006) **Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat.** European Journal of Neuroscience 23: 1757-1765.

FRIEDENSTEIN AJ, DERIGLASOVA UF, KULAGINA NN, PANASUK AF, RUDAKOWA SF, LURIA EA, RUADKOW IA (1974) **Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method.** Experimental Hematology 2: 83-92.

GALINDO LT, FILIPPO TR, SEMEDO P, ARIZA CB, MOREIRA CM, CAMARA NO, PORCIONATTO M A (2011) **Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury.** Neurology Research International 2011: 1-9.

GHARBAWIE OA, AUER RN, WHISHAW IQ (2006) **Subcortical middle cerebral artery ischemia abolishes the digit flexion and closing used for grasping in rat skilled reaching.** Neuroscience 137: 1107-1118.

GHARBAWIE OA, GONZALEZ CLR, WHISHAW IQ (2005) **Skilled reaching impairments from the lateral frontal cortex component of middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rats.** Behavioural Brain Research 156: 125-137.

GIRALDI-GUIMARÃES A, REZENDE-LIMA M, BRUNO FP, MENDEZ-OTERO R (2009) **Treatment with bone marrow mononuclear cells induce functional recovery and decrease neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats.** Brain Research 1266: 108-120.

GLOWACKI J, MIZUNO S (2008) **Collagen scaffolds for tissue engineering.** Biopolymers 89: 338.

GONZALEZ CL, KOLB B (2003) **A comparison of different lowing middle cerebral artery occlusion in rats.** Brain Research Bulletin 59: 459–466.

GRAHAM DI, MCINTOSH TK, MAXWELL WL, NICOLL JA (2000) **Recent advances in neurotrauma.** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 59: 641-651.

GREGORY CA, PROCKOP DJ, SPEES JL (2005) **Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation.** Experimental Cell Research 2: 330-335.

GRINNELL F (1999) **Signal transduction pathways activated during fibroblast contraction of collagen matrices.** Current Topics Pathology 93: 61-73.

HARUKUNI I, BHARDWAJ A (2006) **Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia.** Neurologic Clinics 24: 1–21.

HUA Y, SCHALLERT RFK, WU J, HOFF JT, XI G (2002) **Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in rat.** Stroke 33: 2478-2484.

HUNTER AJ, GREEN AR, CROSS AJ (1995) **Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs?** Trends in pharmacological sciences 16: (4) 123-128.

HUTMACHER DW (2001) **Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives.** Journal of Biomaterials Science, Polymers Edition 12:107-124

JIN R, YANG G, GUOHONG L (2010) **Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells.** Journal of Leukocyte Biology 87: 779-789.

KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSELL TM (2003) **Princípios da neurociência.** Editora Manole; 4ª ed, 936-947.

KIM E J, KIM N, CHO SG (2013) **The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation** Experimental e Molecular Medicine 45: 1-10.

KLEIM JA, BARBAY S, NUDO RJ (1998) **Functional reorganization of the rat motor cortex following motor skill learning.** Journal of Neurophysiology 80: 3321-3325.

KOSHIZUKA S, OKADA S, OKAWA A, KODA M, MURASAWA M, HASHIMOTO M, KAMADA T, YOSHINAGA K, MURAKAMI M, MORIYA H, YAMAZAKI M (2004) **Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice.** Journal of Neuropathology Experimental Neurology 63:64-72.

KUROZUMI K, NAKAMURA K, TAMIYA T, KAWANO Y, ISHII K, KOBUNE M, HIRAI S, UCHIDA H, SASAKI K, YOSHINORI ITO, KATO K, HONMOU O, HOUKIN K, DATE I, HAMADA H (2005) **Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model.** Molecular Therapy 11: 96–104.

LANCET JE, RAPOPORT AP, BRASACCHIO R, EBERLY S, RAUBERTAS RF,

LINDER T, MUHS A, DUERST RE, ABOUD CN, PACKMAN CH, DIPERSIO JF, CONSTINE LS, ROWE JM, LIESVELD JL (1998) **Autotransplantation for relapsed or refractory Hodgkin's disease: long term follow-up and analysis of prognostic factors.** Bone Marrow Transplantation 22: 265-271.

LENT, R (2001) **Cem Bilhões de Neurônios.** Atheneu.

LESSA I (1999) **Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil.** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de SP 4: 509-518.

LEVENBERG S, HUANG NF, LAVIK E, ROGERS AB, ITSKOVITZ-ELDOR J, LANGER R (2003) **Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds.** Proceedings of the National Academy of Sciences 100:12741

LIECHTY KW, MACKENZIE TC, SHAABAN AF, RADU A, MOSELEY AM, DEANS R, MARSHAK DR FLAKE AW (2000) **Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep.** Nature Medicine 6: 1282-1286.

LIPTON, P (1999) **Ischemic cell death in brain neurons.** Physiological Reviews 79: (4) 1431-1568.

LU D, MAHMOOD A , QU C, HONG X, KAPLAN D, CHOPP M (2007) **Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury.** Neurosurgery 61: 596-602.

LU D, MAHMOOD A, WANG L, LI Y, LU M, CHOPP M (2001) **Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome.** Neuroreport 12: 559-63.

MAHMOOD A, LU D, LU M, CHOPP M (2003) **Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells.** *Neurosurgery* 53: 697-702.

MAHMOOD A, LU D, CHOPP M (2004) **Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury.** *Journal of Neurotrauma* 21: 33-39.

MAHMOOD A, LU D, WANG L, CHOPP M (2002) **Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury.** *Journal of Neurotrauma* 19: 1609-1617.

MAHMOOD A, WU H, QU C, XIONG Y, CHOPP M (2013) **Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord.** *Journal of Neurosurgery* 118: (2) 381-389.

MAYNE M, NI W, YAN HJ, XUE M, JOHNSTON JB, DEL BIGIO MR, PEELING J, POWER C (2001) **Antisense oligodeoxynucleotide inhibition of tumor necrosis factor-alpha expression is neuroprotective after intracerebral hemorrhage.** *Stroke* 32: 240-248.

MEHTA SL, MANHAS N, RAGHUBIR R (2007) **Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics.** *Brain Research Reviews* 54: 34-66.

MINELLI C, FEN LF, MINELLI DPC (2007) **Stroke incidence, prognosis, 30-day, and 1-year case fatality rates in Matão, Brazil: a population-based prospective study.** *Stroke* 38: 2906-2911.

MINGRONI-NETTO RC, DESSEN EMB (2006) **Células-tronco: o que são e o que serão?** *Genética na Escola.Revista on line.* Sociedade Brasileira de

Genetica, v. 1.

MODO M, STROEMER RP, TANG E, VEIZOVIC T, SOWNINSKI P, HODGES H (2000) **Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion.** Journal of Neuroscience Methods 194: 99-109.

MURPHY TH, CORBETT D (2009) **Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour.** Neuroscience 10: 861-872.

NADIG SN, WIECKIEWICZ J, WU DC, WARNECKE G, ZHANG W, LUO S (2010) **In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells.** Nature Medicine 16: 809–813.

NAPIERALSKI JA, BANKS RJ, CHESSELET MF (1998) **Motor and somatosensory deficits following uni- and bilateral lesions of the cortex induced by aspiration or thermocoagulation in the adult rat.** Experimental Neurology 154: 80-88.

NAPIERALSKI JA, BUTLER AK, CHESSELET MF (1996) **Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat.** Journal of Comparative Neurology 373: 484-497.

NAUTA AJ, FIBBE WE (2007) **Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells.** Blood 110: 3499-3506.

NAUTA AJ, WESTERHUIS G, KRUISSELBRINK AB, LURVINK EG, WILLEMZE R, FIBBE WE (2006) **Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting.** Blood 108: 2114–2120.

NUDO R, WISE BM, SIFUENTES F, MILLIKEN G (1996) **Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic**

**infarct.** Science 272: 1791-1794.

NUDO RJ, FRIEL KM (1999) **Cortical plasticity after stroke: implications for rehabilitation.** Revue Neurologique 155: 713-717.

PATEL SA, SHERMAN L, MUNOZ J, RAMESHWAR P (2008) **Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications.** Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 56: 1-8.

PAXINOS G (2004) **The Rat Nervous System**, Third Edition, Academic Press, San Diego.

PAXINOS G, WATSON C (1986) **The rat brain in stereotaxic coordinates**, Academic Press, Sydney.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR (1999) **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science 284 5411: 143-147.

PROCKOP DJ (1997) **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** Science 276: 71-74.

QU C, MAHMOOD A, LIU XS, XIONG, Y, WANG L, WU H, LI B, ZHANG ZG, KAPLAN DL, CHOPP (2011). **The treatment of TBI with human marrow stromal cells impregnated into collagen scaffold: functional outcome and gene expression profile.** Brain Research 1371: 129-139.

RAJAN N, HABERMEHL J, COTÉ MF, DOILLON CJ, MANTOVANI D (2006) **Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications.** Nature Protocols 1(6): 2753-2758.

REN G, ZHANG L, ZHAO X, XU G, ZHANG Y, ROBERTS AI, ZHAO RC e SHI Y (2008) **Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide** Cell stem Cell 2: 141-150.

RODRIGUES AMG, MARCILIO FS, FRAZÃO MUZITANO M, GIRALDI-GUIMARÃES A (2013) **Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats.** Brain Research 1503: 53-61.

ROSENBERG GA, ESTRADA EY, MOBASHERY S (2007) **Effect of synthetic matrix metalloproteinase inhibitors on lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier opening in rodents: Differences in response based on strains and solvents.** Brain Research 1133(1): 186-192.

SACHLOS E, REIS N, AINSLEY C, DERBY B, CZERNUSZK JT (2003) **Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication.** Biomaterials 24: 1487-1497.

SAMPAIO MFS, MARCILIO FS, GIRALDI-GUIMARÃES A (2013) **Does treatment with bone marrow mononuclear cells recover skilled motor function after focal cortical ischemia? Analysis with a forelimb skilled motor task in rats.** Brain Research 1492: 130-139.

SAVITZ SI, ROSENBAUM DM, DINSMORE JH, WECHSLER LR, CAPLAN LR (2002) **Cell transplantation for stroke.** Annals of Neurology 52: 266-275.

SAYAH S, ISCHENKO AM, ZHAKHOV A, BONNARD AS, FONTAINE M (1999) **Expression of Cytokines by Human Astrocytomas Following Stimulation by C3a and C5a Anaphylatoxins.** Journal of Neurochemistry 72: 2426-2436.

SCHAAR KL, BRENNEMAN MM, SAVITZ SI (2010) **Functional assessments in the rodent stroke model.** Experimental e Translational Stroke Medicine 2: 1-11.

SCHAAR KL, BRENNEMAN MM, SAVITZ SI (2010) **Functional assessments in the rodent stroke model.** *Experimental e Translational Stroke Medicine* 2: 1-11.

SCHALLERT T (2006) **Behavioral tests for preclinical intervention assessment.** *NeuroRx* 3: 497-504.

SCHALLERT T, FLEMING SM, LEASURE JL, TILLERSON JL, BLAND ST (2000) **CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury.** *Neuropharmacology* 39: 777-787.

SCHEIBE F, LADHOFF J, HUCK J, GROHMANN M, BLAZEJ K, OERSAL A, BAEVA N, SEIFERT M, PRILLER J (2012) **Immune effects of mesenchymal stromal cells in experimental stroke.** *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32: (8) 1578-1588

SCHROETER M, JANDER S (2005) **T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair.** *Neuromolecular Medicine* 7 (3): 183-195.

SHORT B, BROUARD N, OCCHIODORO-SCOTT T, RAMAKRISHNAN A, SIMMONS PJ (2003) **Mesenchymal stem cells.** *Archives of Medical Research* 6: 565-571.

SPAGGIARI GM, CAPOBIANCO A, ABDELRAZIK H, BECCHETTI F, MINGARI MC, MORETTA L. (2008) **Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2.** *Blood* 111: 1327–1333.

STEMBERGER S, JAMNIG A, STEFANOVA N, LEPPERDINGER G, REINDL M, WENNING GK (2011) **Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and**

**neuroprotection.** PLOS One 6(5): 1-11.

SUDRES M, NOROL F, TRENADO A, GREGOIRE S, CHARLOTTE F, LEVACHER B, LATAILLADE JJ, BOURIN P, HOLY X, VERNANT JP (2006). **Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice.** The Journal of Immunology 176: 7761–7767.

SZELE FG, ALEXANDER C, CHESSELET MF (1995) **Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats.** The Journal of Neuroscience 75: (6) 4429-4448.

TONELLI LH, POSTOLACHE TT (2005) **Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and major histocompatibility complex molecules in the normal brain and after peripheral immune challenge.** Neurological Research (7): 679-684

URYU K, MACKENZIE L, CHESSELET MF (2001) **Ultrastructural evidence for differential axonal sprouting in the striatum after thermocoagulatory and aspiration lesions of the cerebral cortex in adults rats.** Neuroscience 105: (2) 307-316.

VOLKOV AI, LEBEDEV SV, STARYKH EP, VOLKOVA NA, CHEKHONIN VP (2011) **Post-stroke Neurological Impairments in Ras with Functional Asymmetry of the Cerebral Hemispheres.** Neuroscience and Behavioral Physiology 41: (8) 865-870.

VOORHIES AC, JONES TA (2002) **The behavioral and dendritic growth effects of focal sensorimotor cortical damage depend on the method of lesion induction.** Behavioral Brain Research 133: 237–246.

WAGNER KR, XI G, HUA Y, KLEINHOLZ M, COURTEN-MYERS GM, MYERS

RE (1998) **Early metabolic alterations in edematous perihematoma brain regions following experimental intracerebral hemorrhage.** Journal of Neurosurgery 88: 1058-1065.

WAN CD, CHENG R, WANG HB, LIU T (2008) **Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model.** Hepatobiliary e Pancreatic Diseases International. 7: 29-33.

WANG J, ROGOVE AD, TSIRKA AE, TSIRKA SE (2003) **Protective role of tuftsin fragment 1-3 in an animal model of intracerebral hemorrhage.** Annals of Neurology 54: 655–664.

WHISHAW IQ, COLES BLK (1996) Varieties of paw and digit movement during spontaneous food handling in rats: Postures, bimanual coordination, preferences, and the effect of forelimb cortex lesions. **Behavioural Brain Research.** 77: 135-148. 1996.

WINSLOW e CAITLIN DUCKWALL (2006) **Regenerative Medicine** NIH 1: 14-28.

WISE SP, DONOGHUE JP (1986) **Cerebral Cortex - Sensorimotor areas and aspects of cortical connectivity.** Plenum Press 5: 243-270.

XIONG Y, QU C, MAHMOOD A, LIU Z, NING R, LI Y, KAPLAN DL, SCHALLERT T, CHOPP M (2009) **Delayed transplantation of human marrow stromal cell-seeded scaffolds increases transcallosal neural fiber length, angiogenesis, and hippocampal neuronal survival and improves functional outcome after traumatic brain injury in rats.** Brain Research 1263: 183-91.

YANNAS IV (2001) **Tissue and organ regeneration in adults.** Springer, New York.

ZAGO MA (2005) **Terapia com células-tronco. Fundamentos, oportunidades e obstáculos.** Revista da Sociedade Brasileira de Hipertensão 8(4): 145-150.

ZENG X, ZENG YS, MA YH, LU LY, DU BL, ZHANG W, LI Y, CHAN WY (2010) **Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Three Dimensional Gelatin Sponge Scaffold Attenuate Inflammation, Promote Angiogenesis and Reduce Cavity Formation in Experimental Spinal Cord Injury.** Cell Transplantation 20: 1881-1899.

ZHANG ZG, ZHANG L, JIANG Q, CHOPP M (2002) **Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse.** Circulation Research 90: 284-288.