

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM MODELO DE ABLAÇÃO FOCAL DO CÓRTEX CEREBRAL EM
RATOS: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *GROWTH-
ASSOCIATED PROTEIN-43*

VIVIANE GOMES DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2013

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM MODELO DE ABLAÇÃO FOCAL DO CÓRTEX CEREBRAL EM
RATOS: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *GROWTH-
ASSOCIATED PROTEIN-43*

VIVIANE GOMES DA SILVA

Dissertação de Mestrado
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.

Orientador: Prof. Dr Arthur Giraldi
Guimarães

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL DE 2013

TERAPIA COM CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA
EM MODELO DE ABLAÇÃO FOCAL DO CÓRTEX CEREBRAL EM
RATOS: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *GROWTH-
ASSOCIATED PROTEIN-43*

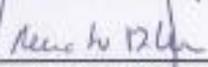
VIVIANE GOMES DA SILVA

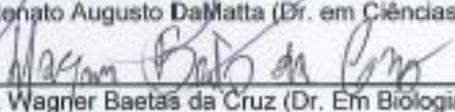
Dissertação de Mestrado
apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências, da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como
parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Biociências.

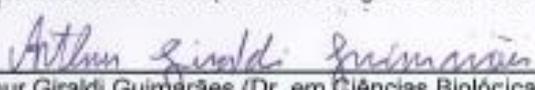
Aprovada em: 04/04/2013

Comissão Examinadora:


Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. em Parasitologia Veterinária) – UENF/CBB/LBCT


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


Prof. Wagner Baetas da Cruz (Dr. Em Biologia Celular e Molecular) – UFRJ


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

Dedico a minha família...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido chegar onde estou hoje.

Aos meus pais Sidinei e Sueli e ao meu irmão Rafael por estarem comigo incondicionalmente nessa longa caminhada. Obrigada por todo amor, confiança e paciência com as minhas raras idas para casa. A distância nunca nos afastará. Amo muito!

Ao meu namorado Renato, por estar sempre tão presente na minha vida ouvindo minhas reclamações (que foram muitas na reta final desse mestrado) sempre com muita paciência, compartilhando conquistas, me mimando e apoiando. Obrigada por ser meu companheiro e amigo. Te amo!

Às minhas mais que amigas Brunna e Pâmela, pela linda amizade e por todos os momentos vividos. Vocês são a minha família em Campos. Muito obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao tio-amigo Cosme, pelo carinho, por sempre me apoiar e se alegrar com minhas conquistas.

Aos colegas de laboratório: Bárbara, Fralini, Helder, Mariana e Mayara pela agradável convivência em todos os momentos.

À minha querida IC e amiga Gabi, pela ajuda dada e pela grande companhia durante os experimentos.

Ao meu orientador Arthur Girdali pelo aprendizado compartilhado, pela paciência e oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação. Obrigada!

Ao César pela grande ajuda com as eletroforeses e Blottings e por compartilhar seu conhecimento comigo nessa 'jornada de experimentos'. Não foi fácil a correria, mas conseguimos! Seria muito mais difícil sem a sua ajuda. Obrigada de coração!

Agradeço ao professor Gustavo Rezende que aceitou ser revisor e contribuiu para uma melhor organização da dissertação.

Aos professores Clóvis de Paula, Renato DaMatta e Wagner Baetas, membros da banca, por terem aceitado fazer parte da finalização desse trabalho.

Ao Professor Arnaldo Façanha por ceder seu espaço e o potter para o homogenato das amostras.

Ao professor Gonçalo Apolinário por me dar acesso ao seu laboratório e ao Adão, técnico do LBT, por prontamente ajudar com o aparelho fotodocumentador.

Agradeço à FAPERJ pelo fomento para a realização desse trabalho.

Agradeço também à UENF pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS.....	XII
1- INTRODUÇÃO	13
1.1- O CÓRTEX MOTOR	13
1.2- LESÕES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	17
1.3- GAP-43	22
1.3.1- <i>A proteína GAP- 43 e a plasticidade</i>	27
1.4- COMPARAÇÃO ENTRE MODELOS DE LESÃO POR ISQUEMIA E ABLAÇÃO NO CÓRTEX CEREBRAL - PLASTICIDADE NEURAL.	29
1.5- CÉLULAS-TRONCO E A TERAPIA CELULAR.....	32
2- OBJETIVOS.....	36
2.1- OBJETIVO GERAL	36
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3- MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1- MODELO ANIMAL	37
3.2- PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	37
3.2.1- <i>Ablação focal unilateral por sucção</i>	38
3.3- OBTENÇÃO DAS CMMOS	39
3.4- ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DAS CMMOS	40
3.5- PREPARAÇÃO DE HOMOGENATOS DE TECIDOS.....	41
3.6- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RELACIONADAS À PLASTICIDADE ANATÔMICA NA PERIFERIA DA LESÃO POR SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING	42
3.7- ANÁLISE HISTOLÓGICA	43
4- RESULTADOS	44
4.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA	44
4.2- EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GAP-43 POR WESTERN BLOT	45

5- DISCUSSÃO	53
6- CONCLUSÃO	58
7- REFERÊNCIAS	59

RESUMO

As barreiras que limitam a regeneração axonal no Sistema Nervoso Central (SNC) dentre elas a cicatriz glial, moléculas inibitórias presentes na mielina e o processo de cavitação, impedem uma eficaz recuperação pós-lesão. Assim, minimizar ou extinguir essas barreiras pode ser um fator promissor para o desenvolvimento de novas terapias. Diferenças na plasticidade cortical e subcortical, além de diferentes efeitos na perda funcional são observados dependendo do tipo de lesão. O uso de Células Mononucleares de Medula Óssea (CMMOs) tem sido mostrado eficiente na recuperação funcional após danos cerebrais, mas seus mecanismos de ação precisam ser melhor compreendidos. Já se sabe que a proteína GAP-43 (*growth-associated protein-43*) está relacionada com crescimento neural, regeneração e plasticidade. Sendo assim, aumento na sua expressão após uma lesão encefálica poderia ser um indício de processo regenerativo. Neste projeto, avaliamos o efeito do tratamento com CMMOs no modelo de ablação focal unilateral do córtex sensorimotor em ratos analisando a expressão da proteína marcadora de plasticidade estrutural, a GAP-43. 24 horas após a indução da ablação em aparelho estereotáxico, administraram-se as CMMOs obtidas de fêmures de animais doadores via veia jugular e após os tempos de sobrevivência de 5, 7 e 10 dias, os animais tiveram seus encéfalos frescos removidos e homogenizados preparados para análises por Western Blotting. Após a análise da densitometria das bandas, observamos um aumento na expressão de GAP-43 no lado ipsilateral para tempo de sobrevivência de 5 dias e no lado contralateral em 10 dias. Como conclusão, o tratamento com as CMMOs aumenta a expressão de GAP-43 em dois tempos de sobrevivência (5 e 10 dias), sugerindo que a recuperação observada anteriormente, no mesmo modelo de lesão e com a mesma terapia celular, pode ser atribuída a significativas mudanças plásticas estruturais envolvendo neuritogênese. Entretanto, o n amostral do experimento precisa ser aumentado para que possamos chegar a uma conclusão a cerca da terapia na expressão da proteína GAP-43 e assim verificarmos se a recuperação observada anteriormente, no mesmo modelo de lesão e com a mesma terapia celular, pode ser atribuída a significativas mudanças plásticas estruturais envolvendo neuritogênese. Assim, mais estudos precisam ser realizados pra comprovar essa hipótese.

PALAVRAS-CHAVE: Neuroplasticidade; Terapia Celular; Ablação; Proteína GAP-43

ABSTRACT

The barriers (glial scar, inhibitory molecules present in myelin and the process of cavitation) which limit axonal regeneration in the central nervous system (CNS) prevent effective recovery. Thus, minimizing or eliminating them may be a promising factor for the development of new therapies. Differences in cortical and subcortical plasticity and different effects on functional loss are observed depending on the type of lesion. The use of Bone Marrow Mononuclear Cells (BMMC) has been shown to be effective in functional recovery after brain damage, but its mechanisms of action needs to be better understood. It is known that the protein GAP-43 (growth-associated protein-43) is related to neural growth, regeneration and plasticity. Thus, increased expression after brain injury could be a sign of regenerative process. In this project, we assessed the effect of BMMC treatment in the model of focal ablation of sensorimotor cortex in rats analyzing the expression of the structural plasticity marker protein GAP-43 (growth-associated protein-43). Therefore, the objective of this study was to assess the effect of BMMC treatment in structural plasticity in the model of unilateral focal lesion of the sensorimotor cortex ablation by quantifying protein GAP-43 in cortex regions. 24 hours after induction of ablation in a stereotaxic apparatus, the BMMC obtained from the femurs of animals, were administered via jugular vein. After survival times of 5, 7 and 10 days, the animals had their brains removed and fresh homogenates prepared for analysis by Western Blotting. After analyzing the densitometry of the bands, we observed a increased expression of GAP-43 on the ipsilateral side on the survival time of 5 days, and on the contralateral side at 10 days. As conclusion, our results showed effect of BMMC treatment on the expression of GAP-43 at two survivals time (5 and 10 days). However, the number of samples of the experiment needs to be increased so that we can come to a conclusion about the therapy on the expression of GAP-43 protein and thus verify whether the recovery observed previously on the same model with the same injury and cell therapy, can be attributed to significant structural changes involving plastic neurogenesis. Therefore, further studies need to be performed to confirm this hypothesis.

KEYWORDS: Neuroplasticity; Celular Terapy; Ablation; Protein GAP-43

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC- Área Motora Cingulada

AMS - Área Motora Suplementar

APM- Área Pré-Motora

AVE- Acidente Vascular Encefálico

bFGF- Fator de Crescimento Fibroblástico básico

CEUA – UENF- Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense

CEP- Células Progenitoras Endoteliais

CH- Células Hematopoiéticas Diferenciadas

CMMOs- Células Mononucleares de Medula Óssea

CPH- Células Progenitoras Hematopoiéticas

CTH- Células-tronco Hematopoiéticas

CTMs- Células-tronco Mesenquimais

DMEM-F12- DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium* e Mistura de Nutrientes de Ham F12

GAP-43- *Growth Associated Protein-43*

GTP- Guanosina Trifosfato

i.p.- Intraperitoneal

LTP- Long-term Potentiation

M1- Córtex Motor Primário

PBS- Solução Salina Tamponada por Fosfato

SDS-PAGE- *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP- Sistema Nervoso Periférico

S1- Área Somestésica Primária

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.Divisão do Córtex Motor em humanos..	14
Figura 2. Figura esquemática mostrando áreas que compõem o córtex de roedores.	15
Figura 3.Cicatrização Glial e Regeneração no Sistema Nervoso Central.	19
Figura 4. Danos à mielina e a cicatrização glial como fatores limitantes a regeneração.	21
Figura 5.Tipos de filopódios.....	24
Figura 6. Neuroplasticidade de conexões cortico-corticais e cortico-estriatais.	31
Figura 7. Terapia celular e seus prováveis benefícios após lesões do SNC (isquemia).....	34
Figura 8. Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato representativo da área em que foi realizada a lesão.....	38
Figura 9. Esquema representativo do procedimento de extração de células mononucleares.....	40
Figura 10.Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato mostrando as regiões que foram analisadas no projeto.	41
Figura 11. Reação com Cloreto de Tetrazólio (TTC) em amostras de encéfalos submetidos à ablação.	44
Figura 12. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 5 dias.....	46
Figura 13. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 7 dias.....	48
Figura 14. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 10 dias.	50
Figura 15. Expressão de GAP-43 em animais sem lesão.	51
Figura 16. Gráfico de dados agrupados para todos os dias de sobrevida.	52

1- INTRODUÇÃO

1.1- O Córtex Motor

O Sistema Nervoso Central (SNC) é formado por um tecido de extrema complexidade, servindo como centro de processamento ao organismo e transmitindo informações externas para o meio interno (corpo). A sua principal unidade funcional é o neurônio, que possui como função: receber, armazenar e transmitir informações. Entretanto, esse tipo celular difere entre si de acordo com papéis funcionais que desempenham podendo ser caracterizados em: neurônios sensitivos, autônomos e motores; diferem também nos neurotransmissores que utilizam para transmitir o sinal, na forma como suas conexões são distribuídas e ainda de acordo com suas necessidades metabólicas e nível de atividade elétrica em um determinado momento. A maior parte dos neurônios já no seu estágio final de maturidade são células pós-mitóticas (permanentes) e incapazes de sofrer o processo de divisão celular (Bear *et al.*, 2002).

A capacidade de gerar movimentos de forma coordenada depende da interconexão de diversas estruturas envolvidas no controle motor de mamíferos. O primeiro passo necessário para que um movimento voluntário se inicie é a ativação do córtex. O córtex motor em humanos é dividido em córtex motor primário (M1), córtex motor secundário incluindo o córtex parietal posterior, córtex suplementar ou área motora suplementar (AMS) e córtex pré-motor ou área pré-motora (APM) (Figura 1). A área M1, que possui o menor limiar de estimulação para a produção de movimentos e projeta densos feixes axonais pelas vias descendentes, ocupa o giro pré-central do lobo frontal. É dessa região que partem os comandos para a realização de movimentos voluntários, responsáveis pelo início da locomoção e dos movimentos de integração sensorimotora. Já as áreas AMS e APM são mais associadas ao planejamento de movimentos voluntários do que ao comando de sua execução (Lent, 2005).

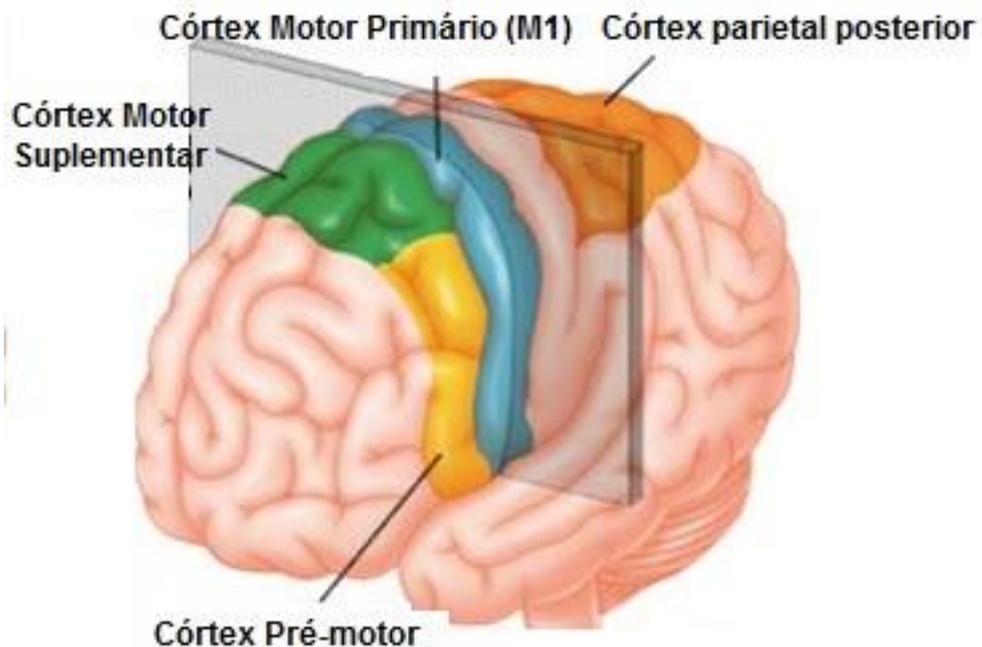


Figura 1. Divisão do Córtex Motor em humanos. A figura mostra a disposição e localização das quatro principais partes do córtex motor. Córtex Pré-motor em amarelo, Córtex motor primário representado pela cor azul, Córtex Parietal Posterior na região laranja e na verde o Córtex Motor Suplementar (Imagem fonte: www.lookfordiagnosis.com).

No caso de roedores, o córtex sensorio-motor denomina-se isocórtex frontal (Fr), uma estrutura bastante heterogênea com relação a sua composição celular, podendo ser dividida conforme as suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexões em três áreas: Fr1 (M1), Fr2 (M2) e Fr3 (Figura 2). A área M1 corresponde ao córtex motor primário de primatas, a área M2 corresponde a APM e AMS, enquanto Fr3 seria uma sub-região da representação somatotópica. Essas regiões possuem uma estrutura ordenada em camadas celulares, conferindo um padrão de organização laminar. No córtex sensorio-motor as camadas celulares II e V são as mais proeminentes (Palomero-Gallagher e Zilles, 2004; Paxinos e Watson, 2004).

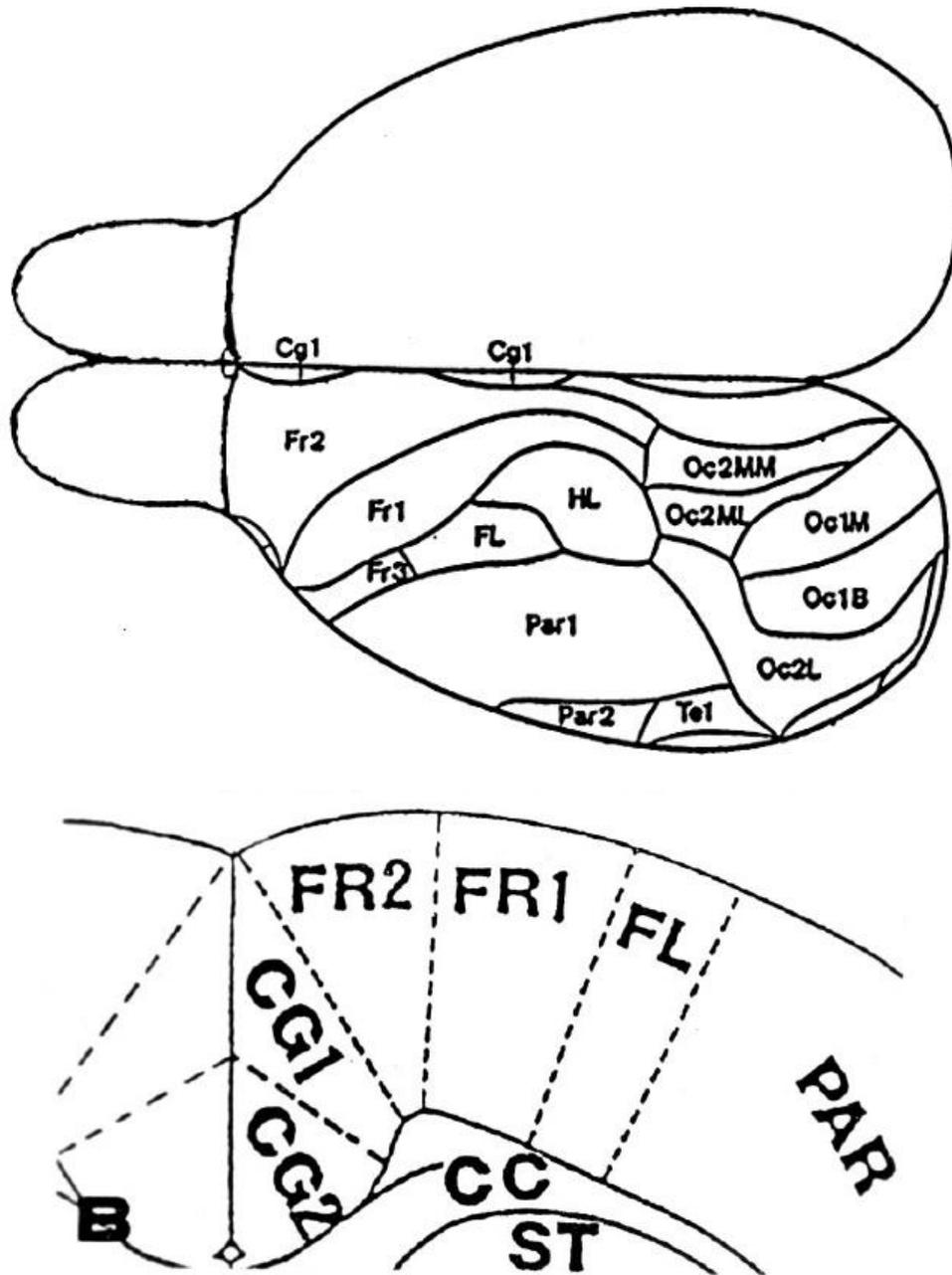


Figura 2. Figura esquemática mostrando áreas que compõem o córtex de roedores. (A) Representação esquemática de uma vista dorsal do mapa neocortical do cérebro de rato com base em estudos citoarquitetônicos. Cg1, córtex cingulado; Fr1-3, áreas corticais frontais; Oc1B, Oc1M, Oc2L, Oc2MM e Oc2ML, áreas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

As células do córtex motor são dispostas em colunas verticais, com milhares de neurônios em cada coluna, as quais funcionam como unidades, geralmente estimulando um grupo de músculos sinérgicos, mas algumas vezes estimulando grupamentos musculares únicos. Igualmente, cada coluna tem seis camadas de células distintas, como ocorre em quase todo córtex cerebral.

A capacidade de reorganização funcional cortical não se restringe ao desenvolvimento, podendo ser observada em um cérebro já maduro. A redistribuição das representações motoras e sensoriais dentro do córtex de adultos tem sido demonstrada em resposta a um grande número de manipulações experimentais, incluindo mudanças nas aferências corticais, estimulação cortical repetitiva e manipulações farmacológicas. Alterações prolongadas dos sinais de entrada proprioceptivas e táteis associadas aos músculos têm mostrado indução de mudanças plásticas no mapa motor em roedores (Nudo e Jenkins, 1990; Sanes e Donoghue, 2000). A organização do mapa cortical pode também ser dependente do treinamento motor (Monfils *et al.*, 2005).

No córtex cerebral de ratos, as áreas motoras são fortemente interconectadas e apresentam conexões com outras regiões corticais, como a área somestésica primária (S1) e as áreas associativas dos lobos parietal e frontal. Todas as áreas projetam-se para regiões motoras sub-corticais, núcleos da base e cerebelo (Lent, 2005). Além disso, os tratos corticoespinal e corticobulbar são as vias mais importantes utilizadas na execução dos movimentos voluntários. O trato corticoespinal medial e parte do trato corticobulbar, assim como outras vias indiretas, controlam a musculatura do tronco, proporcionando sustentação postural aos movimentos apendiculares voluntários (Levy, 2006).

O sistema de controle do movimento funciona através de uma alça de retroalimentação, que leva a informação do movimento pretendido até as estruturas de controle que irão corrigí-lo, adequá-lo e aperfeiçoá-lo reenviando essas informações às estruturas corticais (DeLong e Wichmann, 2007; Handley *et al.*, 2009). As informações geradas no córtex, de forma simplificada, são transmitidas

através do estriado, globo pálido e tálamo, e dessas áreas voltam ao córtex cerebral (Handley *et al.*, 2009).

1.2- Lesões do Sistema Nervoso Central

Uma vez que a maior parte dos neurônios já no seu estágio final de maturidade são células pós-mitóticas (permanentes) e incapacitadas de sofrer o processo de divisão celular, danos mesmo que a um pequeno número de neurônios com função específica como, por exemplo, neurônios motores, podem resultar em sérios déficits ao indivíduo acometido com perda de movimento ou até mesmo paralisia (Robbins e Cotran, 2004), visto que axônios maduros são incapazes de regenerar após uma lesão.

As lesões do Sistema Nervoso Central (SNC), como por exemplo, traumatismo craniano e Acidente Vascular Encefálico (AVE) encontram-se entre as principais causas de óbito e constituem atualmente a maior causa de incapacitação humana no Brasil segundo o Ministério da Saúde em 2007 e no mundo (Sekhon e Fehlings, 2001; Strong *et al.*, 2007). Quando acometidos, os pacientes geralmente apresentam hemiparesia ou hemiplegia (um dos lados paralisado ou enfraquecido) e passam a ficar dependentes de outras pessoas para auxiliá-lo em tarefas antes comuns ao seu dia a dia (Michaelsen *et al.*, 2004).

O tratamento necessário para a recuperação destes pacientes, que gera enormes gastos ao governo (Wolfe, 2000; Strong *et al.*, 2007), e todas as barreiras fisiológicas que limitam a regeneração axonal no SNC, são limitações a uma recuperação eficaz. Dentre essas barreiras encontram-se a cicatriz glial, as moléculas inibitórias presentes na mielina e o processo de destruição tecidual (Michael e Jerry, 2008).

A cicatriz glial, é formada após um dano ao tecido nervoso e constituída por elementos do tecido conjuntivo e astrócitos. Estes últimos agem de forma a proporcionar efeitos benéficos, visto que o isolamento do local da lesão limitaria a

área onde esses eventos inflamatórios estariam ocorrendo e minimizaria assim danos teciduais e conseqüente degeneração (Michael e Jerry, 2008). Entretanto, a maioria das células presentes nesse ambiente se torna hipertrófica e passa a reagir de forma exacerbada (Glennie e Zhigang, 2006), liberando diversas moléculas inibidoras de matriz como a Tenascina, diversos proteoglicanos sulfato de condroitina, Semaforina 3 (Brodkey *et al.*, 1995; McKeon *et al.*, 1995; Pasterkamp *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2003; Rhodes e Fawcett, 2004) entre outros constituintes, que reagem com axônios cortados pela lesão, se apresentando então como uma barreira química ao processo de regeneração axonal (figura 3).

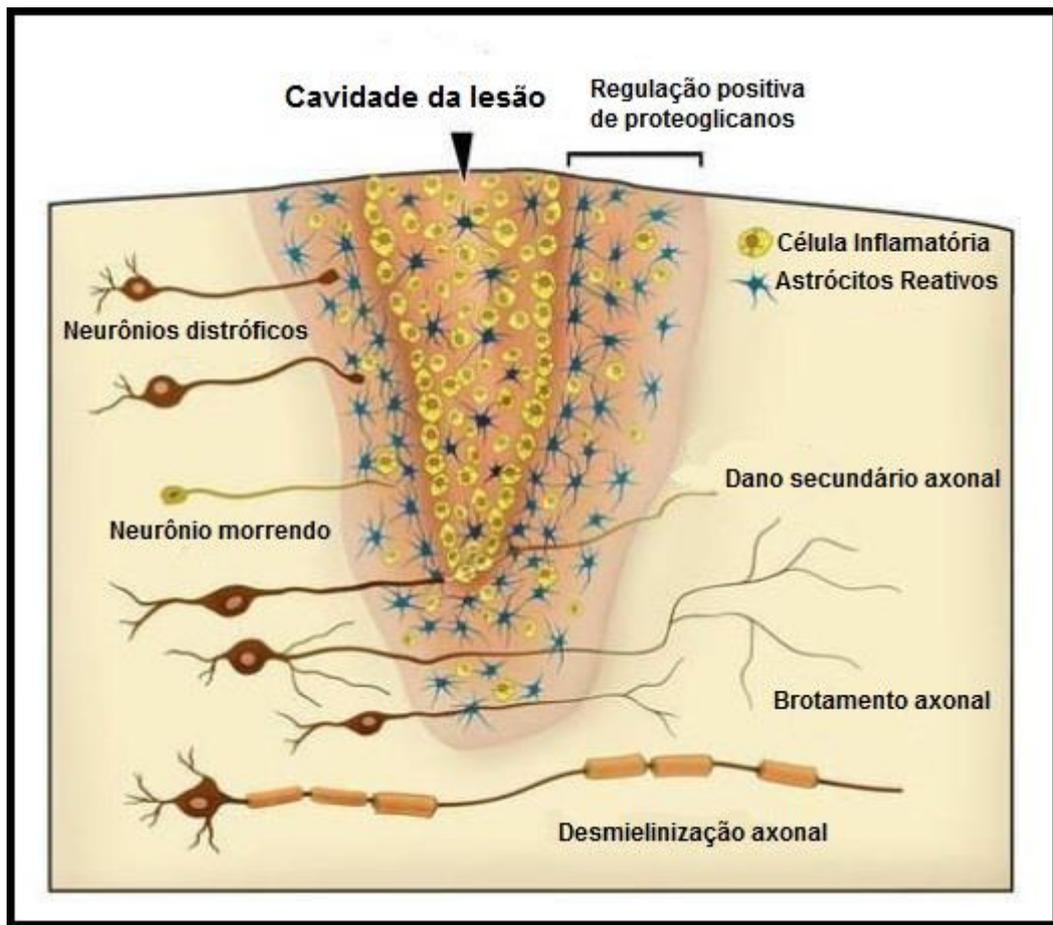


Figura 3. Cicatrização Glial e Regeneração no Sistema Nervoso Central. A cavidade provocada pela lesão no SNC é resultado da interação de células da glia reativas com os astrócitos também reativos e aumenta de tamanho conforme essa interação ocorre. Tal resposta inflamatória exacerbada acaba levando os axônios poupados do dano inicial a uma situação em que sofrem danos secundários. Outro fator importante envolvido nesse processo é a desmielinização que ocorre nos axônios próximos e acaba por limitar o processo de regeneração, uma vez que não conseguem ser re-mielinizados pelos oligodendrócitos adultos, dando origem aos neurônios distróficos. Na localidade da cicatriz glial há ainda uma mudança de forma crescente na distribuição e concentração de moléculas inibitórias presentes na mielina, onde maior concentração se dá no centro desta, com diminuição gradual à medida que se direciona para regiões periféricas (zona de penumbra). A regulação positiva da distribuição de moléculas inibitórias de mielina neste ambiente faz com que a regeneração não aconteça (Retirada de Michael e Jerry, 2008).

A resposta inflamatória envolvida após a lesão desencadeia diversos danos secundários aos axônios que foram poupados do dano direto e também desmieliniza os axônios adjacentes impedindo assim a regeneração à longa distância, diferindo do Sistema Nervoso Periférico ou do Sistema Nervoso embrionário (Michael e Jerry, 2008) (figura 4.).

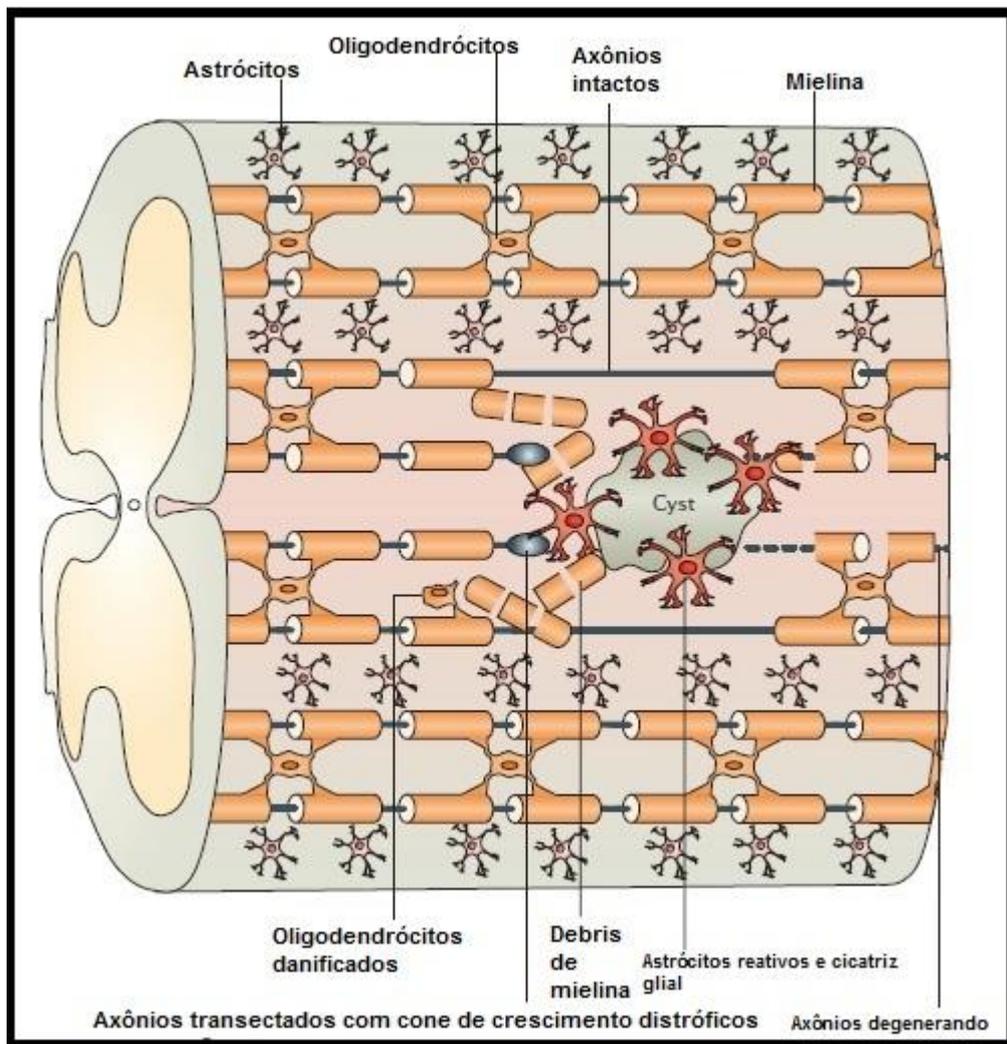


Figura 4. Danos à mielina e a cicatrização glial como fatores limitantes a regeneração. Com o acontecimento de uma lesão no SNC ocorrem danos aos axônios (transecção de fibras nervosas), que danificam a mielina formada por oligodendrócitos saudáveis, fazendo com que aja uma associação dos debrís de mielina e das moléculas inibitórias de mielina. Além disso, vale ressaltar o envolvimento das células inflamatórias do SNC e dos astrócitos, que acabam por formar uma cicatriz glial no tecido associado com aumento na liberação de proteoglicanos sulfato de condroitina. Juntos, esses fatores limitam ainda mais a regeneração axonal. (Retirada de Glenn e Zhigang, 2006).

Além disso, a microglia, que são células constituintes do SNC e servem para a manutenção da integridade do tecido e de neurônios nele presentes expressando diversos fatores neurotróficos (Elkabes *et al.*, 1996; Hanisch, 2002), também pode dar origem a um dano tecidual através da secreção exacerbada de uma grande quantidade de fatores como citocinas pró-inflamatórias em resposta a uma agressão. Este dano ou descontinuidade tecidual representa uma barreira física para a regeneração a longa distância de tratos lesados (Windle e Chambers, 1950; van Rossum e Hanisch, 2004).

Assim, minimizar ou até mesmo extinguir as barreiras que restringem a regeneração axonal pode ser um fator promissor para o desenvolvimento de novas terapias para doenças relacionadas a lesões do SNC (Benowitz e Yin, 2007).

1.3- GAP-43

A proteína GAP-43 (do inglês *growth associated protein*), também conhecida como neuromodulina, B-50, P-57, F1 e pp46 (Benowitz e Routtenberg, 1997) é uma fosfoproteína de membrana que apresenta peso molecular real de cerca de 25 Kda. Porém, em géis de SDS-poliacrilamida seu peso molecular aparente é de 43 Kda. Esse fenômeno apresenta como explicação o fato de a GAP-43 ser altamente carregada, levando a uma menor reação desta proteína com o SDS quando comparado à reação normal do SDS com proteínas menos carregadas, além de sua longa estrutura proteica secundária que é explicada pela riqueza em resíduos de Prolina (Pro) (Hayashi *et al.*, 1997). Além disso, seu peso molecular aparente também varia inversamente com relação à concentração de acrilamida em géis. (Jacobson e colaboradores em 1986) evidenciou esse fato e mostrou que em um gel com concentração de 5-10%, a proteína migra através de uma concentração muito baixa de acrilamida durante a corrida do gel e exibe peso molecular de 56-60 kDa. Entretanto, em géis de 12%, a GAP-43 migrou em bandas equivalentes a 46-50 kDa.

O gene *gap-43* está localizado em humanos no cromossomo 3 e em ratos no 11, é sintetizada no corpo celular dos neurônios em ribossomos livres e concentra-

se em axônios em regeneração de neurônios adultos no Sistema Nervoso Periférico (SNP), se apresentando também no Sistema Nervoso Central (SNC), porém em menor quantidade (Benowitz, 1991). A presença de GAP-43 na membrana plasmática de cones de crescimento axonal apresenta importância nos eventos de sinalização celular para a modificação do citoesqueleto de actina (Carmichael, 2003), uma vez que está associada com a formação de filopódios- projeções de membrana plasmática finas (0,1-0,3 μ m) e ricas em actina, que apresentam estrutura similares a dedo preenchidos com feixes paralelos e apertados de (F)-actina filamentosa. Os filopódios funcionam como antenas a fim de que as células possam explorar o seu ambiente, apresentando importante papel na migração celular através de adesão a matriz extracelular, orientação através de quimioatrativos, cicatrização de feridas, crescimento de neuritos, desenvolvimento embrionário e servem ainda como precursores de espinhas dendríticas em neurônios (figura 5) (Steketee e Tosney, 2002; Faix e Rottner, 2006, Gupton e Gertler, 2007;).

Protusões e retrações filapodiais são promovidas por um balanço dinâmico entre a polimerização de actina nas extremidades do filamento e fluxo retrógrado do feixe de filamentos de actina (Mallavarapu e Mitchison, 1999). Os filopódios contêm três adesões funcionais distintas. A adesão da ponta está envolvida em recepção de sinal, a adesão do eixo controla a extensão lamelar e a adesão basal é associada com emergência filapodial. A formação do filopódio se dá em resposta a sinais extracelulares e é tida como o primeiro passo para a o processo de ramificação neural (Pieta e Pekka, 2008).

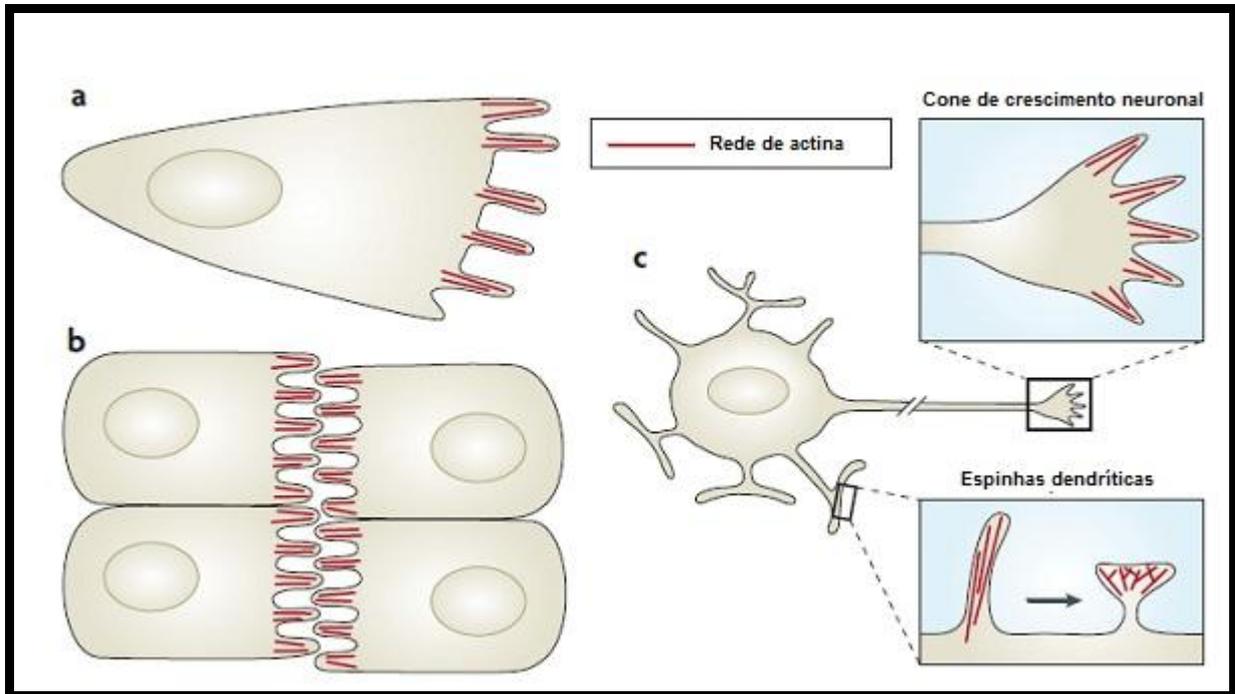


Figura 5. Tipos de filopódios. a- Em células migratórias, os filopódios se apresentam na ponta da sonda, sondam o microambiente, sendo pioneiros na protusão celular. b- Filopódios de camadas epiteliais, que se projetam a partir de células opostas, ajudam no alinhamento e adesão das células. c- filopódios participam na orientação e na migração de cones de crescimento neuronal (inserto superior) e são precursores de espinhas dendríticas (inserto inferior), que são as regiões pós-sinápticas com maior número de sinapses neuronais excitatórias. A medida que uma espinha dendrítica amadurece, suas mudanças na morfologia da protusão se assemelha a uma estrutura em forma de cogumelo. Figura retirada de Pieta e Pekka, (2008).

GAP-43 também têm sido associada com a liberação de neurotransmissores e com endocitose e reciclagem de vesículas sinápticas na membrana plasmática pré-sináptica. Após sua síntese, GAP-43 não se liga imediatamente à membrana plasmática (Martin e Bazan, 1992). Primeiramente ela se liga a membranas da via secretória *early secretory pathway*, dentre elas o compartimento intermediário do Complexo de Golgi, e a rede *cis*-Golgi e através de transporte de membranas pela via secretória chega então à membrana plasmática (Gonzalo e Linder 1998). Alguns experimentos confirmaram essa localização de GAP-43 no Golgi, dentre eles o de Liu *et al.*, 1994 que mostrou que quando células COS-7 são transfectadas com cDNA de GAP-43 houve imunomarcação dessa proteína no Golgi. Esse fato foi confirmado através de mutações nos resíduos de Cys-3 e Cys-4 por glicina, uma vez que nesse caso a imunomarcação para GAP-43 revelou uma localização citosólica. Foi também mostrado que essa ligação de GAP-43 na superfície citosólica da via secretória *early secretory pathway* é devida também à afinidade pela palmitoiltransferase de Golgi.

A ligação da GAP-43 na face citoplasmática da membrana ocorre como resultado da palmitoilação em Cys-3 e Cys-4, ou seja, adição de palmitato (C16) a resíduos de cisteína, mediada por uma palmitoil transferase. Esse fato foi comprovado por Liu *et al.*, 1994 que diz que uma mutação nessas regiões impede que a GAP-43 se ligue à membranas. Quando a GAP-43 apresenta resíduos de Arg-6, Arg-7, e Lys-9, ela se encontra ligada à membrana e palmitoilada. No entanto, a ligação de GAP-43 à membrana não é permanente, uma vez que em alguns tipos celulares como em células PC-12 a maioria das proteínas GAP-43 foram encontradas despalmiteiladas, porém ligadas (Liang *et al.*, 2002). Esse fato se deve aparentemente por interação da GAP-43 com outros componentes de membrana. Uma vez que mutações em Cys-3 e Cys-4 impedem a ligação (Zuber *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1994), sugere-se que a palmitoilação é o evento inicial para que a ligação ocorra, seguida pela interação dos 3 resíduos básicos com a membrana. Linder e Deschenes, 2003 comprovaram ainda que o propósito da palmitoilação é alinhar os resíduos de Arg-6, Arg-7 e Lys-9 com a membrana para que a ligação aconteça. Após a ligação, as cadeias de palmitato são removidas por não serem mais necessárias.

A proteína quinase C medeia a fosforilação de GAP-43 no resíduo de Ser-41, que se encontra no domínio efetor, e introduz um grupamento fosfato carregado negativamente que elimina a ligação da GAP-43 ao ácido fosfolipídico fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PI (4,5) P2) (Laux *et al.*, 2000) e calmodulina (Chapman *et al.*, 1991) além de mudar as interações de GAP-43 com os filamentos de actina (He *et al.*, 1997). Sua fosforilação parece ser importante para o crescimento axonal (Benowitz e Routtenberg, 1997).

A GAP-43 pode interagir tanto com a Ca/Calmodulina quanto com a apocalmodulina (Chapman *et al.*, 1991). A fosforilação de GAP-43 pela proteína quinase C reduz significativamente a afinidade por calmodulina (Alexander *et al.*, 1987; Apel *et al.*, 1990) sugerindo que uma função da GAP-43 é se ligar à sítios específicos de calmodulina em células neuronais e liberá-la localmente quando a proteína quinase é ativada (Alexander *et al.*, 1987). Um estudo de ligações cruzadas realizado por Gamby *et al.*, 1996 mostrou que a GAP-43 *in vivo* encontra-se ligada à calmodulina em condições onde a concentração de cálcio encontra-se reduzida e/ou quando ocorre a fosforilação de GAP-43 pela proteína quinase C.

Com relação à ligação de GAP-43 com a actina, a ligação ocorre em actinas no estado desfosforilado, na razão de uma molécula de GAP-43 para 7 de actina ou ainda uma molécula de GAP-43 por filamento de actina que possui aproximadamente 203 nm de comprimento (He *et al.*, 1997). A afinidade de ligação de GAP-43 pela actina é diferente quando comparamos uma molécula de GAP-43 no seu estado fosforilado ou desfosforilado. Fosforilada, ela apresenta maior afinidade ($K_d = 161 \text{ nM}$) que desfosforilada ($K_d = 1.2 \text{ } \mu\text{M}$).

Por último, a ligação de GAP-43 com o ácido fosfolipídico fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PI (4,5) P2) agrupa os fosfolipídios em 'rafts' no folheto interno da membrana plasmática (Laux *et al.*, 2000). PI (4,5) P2 pode se ligar a proteínas ligadoras de actina como a profilina, cofilina e gelsolina concentrando-as, portanto na membrana plasmática e inibindo sua ação no 'esqueleto' da membrana. Nesse modelo, o sequestro de PI (4,5) P2 induzido por GAP-43 remove esse efeito

inibitório. Como resultado, a dinâmica de actina cortical é aprimorada e ocorre o espalhamento celular (Laux *et al.*, 2000).

1.3.1- A proteína GAP- 43 e a plasticidade

Como dito anteriormente, a GAP-43 isolada pode se ligar à actina e à calmodulina e ativar as proteínas heterotriméricas de ligação a guanosina trifosfato (GTP), Go e Gi (Strittmatter *et al.*, 1991) para regular as respostas metabólicas que iniciam o crescimento axonal (Strittmatter *et al.*, 1990; Strittmatter *et al.*, 1991). A importância da GAP-43 nesta regulação foi demonstrada em cultura de células de feocromocitoma de rato (PC-12), onde o crescimento de neuritos foi eliminado bloqueando a expressão de GAP-43 com a utilização de sondas anti-sense de oligonucleotídeos (Fidel *et al.*, 1990). No entanto, as células PC-12 sem a proteína puderam ainda estender neuritos (Baetge e Hammang, 1991) sugerindo que, enquanto GAP-43 poderia alterar uma propensão para o crescimento de neuritos, ela não é em si essencial. Em outras palavras, GAP-43 pode aumentar ou diminuir os efeitos de outros reguladores de crescimento, sem que ela própria diretamente leve ao crescimento.

Já se sabe que a extensão axonal se dá em resposta a agentes extracelulares, dentre eles neurotrofinas como o fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), e neurotrofina - 4/5 (NT-4/5), assim como moléculas de matriz extracelular como laminina, proteoglicanos heparan sulfato e moléculas de adesão como L1 e N-caderina (Goldberg, 2003). Tem sido proposto que quando há a ligação de NCAM, L1 ou N-caderina na superfície externa de um cone de crescimento, os receptores FGF são agrupados e ativados resultando em fosforilação de GAP-43 e posterior mudança no esqueleto membranar, levando ao avanço do cone de crescimento (Dunican e Doherty, 2000).

A proteína GAP-43 é inicialmente detectada no SNC, quando os neurônios completam sua divisão celular final. No neocórtex e na formação hipocampal de ratos, altos níveis de expressão de GAP-43 são observados nas duas primeiras

semanas pós-natais, coincidindo com o período de brotamento dos terminais axonais e formação de sinapses (Holtmaat *et al.*,1995). Dessa forma, as células neuronais de indivíduos adultos apresentam, em condições normais, baixos níveis de GAP-43, quando comparados aos indivíduos em estágios iniciais de desenvolvimento (Stroemer *et al.*,1995).

Apesar dos níveis do RNAm e da proteína decaírem após o nascimento na maior parte do cérebro, algumas populações de neurônios continuam a expressar altos níveis de GAP-43 constitutivamente (Dani *et al.*, 1991). A presença da proteína em regiões do sistema límbico, por exemplo, sugere o seu envolvimento na capacidade dos neurônios de continuarem a sofrer mudanças estruturais e funcionais relacionadas ao armazenamento de informações (Benowitz e Routtenberg, 1997).

Estudos mostram que a superexpressão de GAP-43 induz o crescimento de projeções neuronais aberrantes, como no caso da doença de Alzheimer (de la Monte *et al.*, 1990). Assim, a proteína parece permitir o brotamento de novos terminais mesmo na ausência de fatores tróficos. A expressão do transgene para GAP-43 induz o crescimento de prolongamentos com conseqüente reorganização do citoesqueleto inclusive em células não neuronais (Verhaagen *et al.*, 1994). Camundongos que não possuem um *exon* do gene que codifica a proteína GAP-43 apresentam defeitos nas vias axonais e a maioria morre logo após o nascimento (Strittmatter *et al.*, 1995).

O aumento de expressão de GAP-43 também aumenta o brotamento axonal após lesões no sistema nervoso, como a isquemia (Carmichael, 2003). Stroemer e colaboradores em 1993 mostraram pela primeira vez que uma lesão isquêmica provocada pela oclusão da artéria cerebral média induziu o aumento significativo da expressão da proteína GAP-43 na periferia da lesão e um aumento menor no córtex contralateral homólogo. A expressão da proteína também é observada em situações em que os neurônios são inseridos no ambiente permissivo do sistema nervoso periférico, podendo, assim, regenerar os axônios danificados.

Uma medição bioquímica que tem sido utilizada como um índice quantitativo de crescimento neuronal, regeneração ou plasticidade é a presença de GAP-43, ou seja, o aumento da expressão desta proteína após uma lesão é um indício de que o axônio está em processo regenerativo. No entanto, para se obter conclusões definitivas de que ocorre crescimento axonal após lesão, são necessárias análises ultraestruturais e o traçamento das conexões no córtex adjacente à área lesada e em áreas que mantinham conexões com a mesma, uma vez que a GAP-43 poderia também atuar de outras formas na célula nervosa, como através da indução de potenciação de longo prazo (LTP) (Benowitz, 1991; Benowitz e Routtenberg, 1997; Carmichael, 2003). Essa correlação com a indução de LTP está relacionada com alterações na fosforilação da GAP-43 observada no hipocampo de ratos e serve como medida fisiológica de plasticidade sináptica (Akers, 1987).

1.4- Comparação entre modelos de lesão por Isquemia e Ablação no córtex cerebral - Plasticidade Neural.

Diferenças notáveis na plasticidade cortical e subcortical, além de diversos efeitos na perda funcional são observadas dependendo do método utilizado para induzir lesão. Existe uma grande diversidade em modelos de AVE que incluem modelos de isquemia global e focal (ex: oclusão transiente de vasos) e infarto focal (oclusão permanente de vasos). No entanto, os diferentes modelos não são equivalentes com relação à patologia pós-lesão (Gonzalez e Kolb, 2003).

Na lesão cerebral isquêmica induzida por termocoagulação, há mudanças muito diferentes no corpo estriado comparadas às induzidas pela lesão por ablação em áreas equivalentes, incluindo diferenças no brotamento axonal e na expressão de moléculas associadas com plasticidade neuronal, como a proteína GAP-43 (do inglês, "growth associated protein-43), mais expressa em regiões ao redor da área lesionada por termocoagulação (Stroemer *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1998; Uryu *et al.*, 2001) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Szele *et al.*, 1995). Estudos anteriores mostraram que a imunomarcagem para GAP-43 diminuiu no corpo estriado dorsolateral após remoção do córtex por aspiração (Szele *et al.*,

1995), o que não foi visto na termocoagulação, sugerindo que a última induz a uma redistribuição desta proteína.

Lesões isquêmicas do córtex sensório-motor provocam brotamento axonal e remodelação sináptica no córtex homotípico do hemisfério oposto à lesão. Entretanto, nenhum ou mínimo brotamento axonal foi observado no estriado dorsolateral denervado após lesões por aspiração (Napieralski *et al.*, 1996), o que leva a consideração de que o brotamento axonal é lesão-específico (Carmichael, 2003; figura 6). Em lesões por termocoagulação, uma densa rede axonal foi observada no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão (figura 6). O brotamento axonal no estriado dorsolateral pode resultar tanto de um aumento na colaterização local de axônios existentes no estriado dorsolateral ou de brotamento axonal de longa distância que normalmente não inervam o estriado (McGeorge e Faull, 1987, 1989; Napieralski *et al.*, 1996). Além disso, lesões por aspiração não resultam em aumento da arborização dendrítica cortical contralateral encontrada depois de lesões por isquemia de mesmo tamanho e localização (Voorhies e Jones, 2002).

Neuroplasticidade (conexões cortico-corticais e cortico-estriatais)

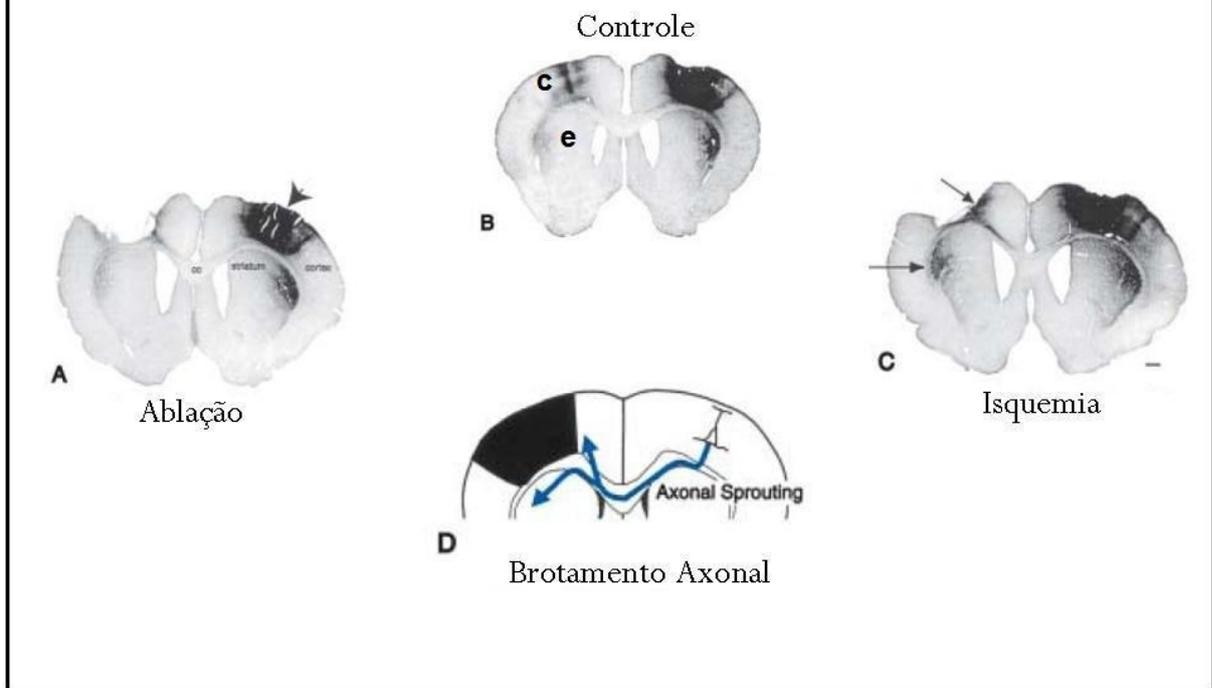


Figura 6. Neuroplasticidade de conexões cortico-corticais e cortico-estriatais. A figura mostra cortes coronais do córtex frontal de ratos submetidos à ablação (A), isquemia (C) e ainda ratos controle (B). A região escura no córtex de cada corte (cabeça de seta em A) é uma injeção de BDA (do inglês *biotinylated dextran amine*), um marcador axonal anterógrado. Podem-se observar no padrão normal destas conexões (B) terminais axonais no córtex motor primário contralateral e no corpo estriado (ipsolateral). No córtex de animais submetidos à isquemia (C), houve um importante aumento em projeções axonais em direção ao estriado contralateral e ainda na periferia da lesão (mostrado pelas setas em (C)). Plasticidade anatômica não é induzida em lesões por ablação (A) de mesma extensão e localização. Em (D) podemos observar uma representação esquemática do brotamento axonal após lesões corticais isquêmicas. Modificada de Carmichael *et al.*, 2003.

A plasticidade em conexões corticais após acidente vascular cerebral leva à recuperação parcial da função após a lesão inicial resultante de um remapeamento motor, onde o cérebro recruta áreas adjacentes e contralaterais do mapa motor normal ou ainda incorpora porções do mapa somatossensorial resultando em evidente função motora o que explica a existência de plasticidade funcional em lesões isquêmicas (Szele *et al.*, 1995; Napieralski *et al.*, 1998; Weiller, 1998; Hallet, 2001; Uryu *et al.*, 2001; Carmichael, 2003; Gonzales *et al.*, 2003).

A plasticidade funcional observada após a isquemia pode ser devida a indução de um processo de remapeamento e reconexão dentro do cérebro de adultos através de mudanças na atividade neuronal, que pode envolver uma ativação de programas de desenvolvimento em áreas ligadas ao infarto (Carmichael, 2003). Diferenças na plasticidade e nas perdas sensorimotoras também são observadas em lesões do córtex causadas por ablação e por isquemia (atingindo a mesma região cortical e mesma extensão). Na ablação observou-se maior perda de função sensorimotora da pata dianteira induzida por estimulação tátil (Napieralski *et al.*, 1998). Na lesão por isquemia, a maior perda foi observada no uso espontâneo da pata dianteira durante os comportamentos de exploração e apoio (Napieralski *et al.*, 1998). Tal diferença nas perdas funcionais pode ser devida à diferença no potencial indutor de alterações nas conexões entre os dois modelos de lesão.

1.5- Células-Tronco e a Terapia Celular

As células-tronco tem sido alvo de recentes estudos em diversos tipos de doenças incluindo as que atingem o Sistema Nervoso Central (SNC). Dentre estas encontram-se as neurodegenerativas e as neurotraumáticas, as quais ainda apresentam poucas alternativas à terapia eficaz. Estas células são indiferenciadas e com capacidade de autorrenovação, ou seja, podem se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos, e com capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Schwindt *et al.*, 2005). Desta forma, acredita-se que células-tronco

presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria.

Dependendo da fonte a partir da qual a célula-tronco é obtida, há uma variação nas suas características e, portanto na sua classificação. As células que são obtidas do blastocisto são denominadas embrionárias e consideradas células que apresentam a capacidade de originar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários de um determinado tecido e todos os tecidos do corpo, ou seja, são células totipotentes. As células-tronco fetais somente originam tipos celulares de um tecido determinado e como o próprio nome diz, apresentam sua origem fetal. Assim, podem originar todas as células que formam um embrião (propriamente dito), sendo denominadas de pluripotentes. Outro tipo de células-tronco são aquelas que apresentam um baixo nível de proliferação e reduzida capacidade de diferenciação em tipos de células de outros tecidos que não o de origem (multipotentes), comparada a outros tipos celulares citados anteriormente. Essas últimas são, portanto denominadas células-tronco adultas (Schwindt *et al.*, 2005).

As células derivadas de medula óssea têm sido descritas como multipotentes, com capacidade de ser quimioatraídas para tecidos lesionados e de liberar citocinas e fatores tróficos (Krause *et al.*, 2001; Chopp and Li, 2002; Crain *et al.*, 2005; Shyu *et al.*, 2006; Kawamoto and Losordo, 2008). Dentre as células-tronco derivadas de medula óssea, um protocolo alternativo vem sendo estabelecido através da terapia com as células mononucleares de medula óssea.

A fração de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) pode ser obtida pela separação do restante das células da medula óssea por diferença de densidade, não sendo necessária a proliferação em cultura. Ela corresponde a uma fração de medula que contém dois tipos de células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais (CTMs) que ocorrem em pequena fração e as células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Orkin, 2000; Weissman *et al.*, 2001) que representam apenas cerca de 0,0001% do total de células da medula óssea, além de células progenitoras hematopoiéticas (CPH) (Weissman *et al.*, 2001), células progenitoras endoteliais (CEP) (Wang *et al.*, 2008) e células hematopoiéticas diferenciadas (CH).

Esta constituição heterogênea de células favorece a produção de uma elevada quantidade de citocinas e fatores tróficos que promovem, após a injúria do sistema nervoso central, a angiogênese, neuroproteção e neurogênese, em modelos animais de doenças neurológicas (figura 7). Tais ações provavelmente contribuirão para reduzir as perdas funcionais que poderão ocorrer devido ao insulto isquêmico (Lipton,1999; lioshil *et al.*, 2004; Mendez-Otero, 2007).

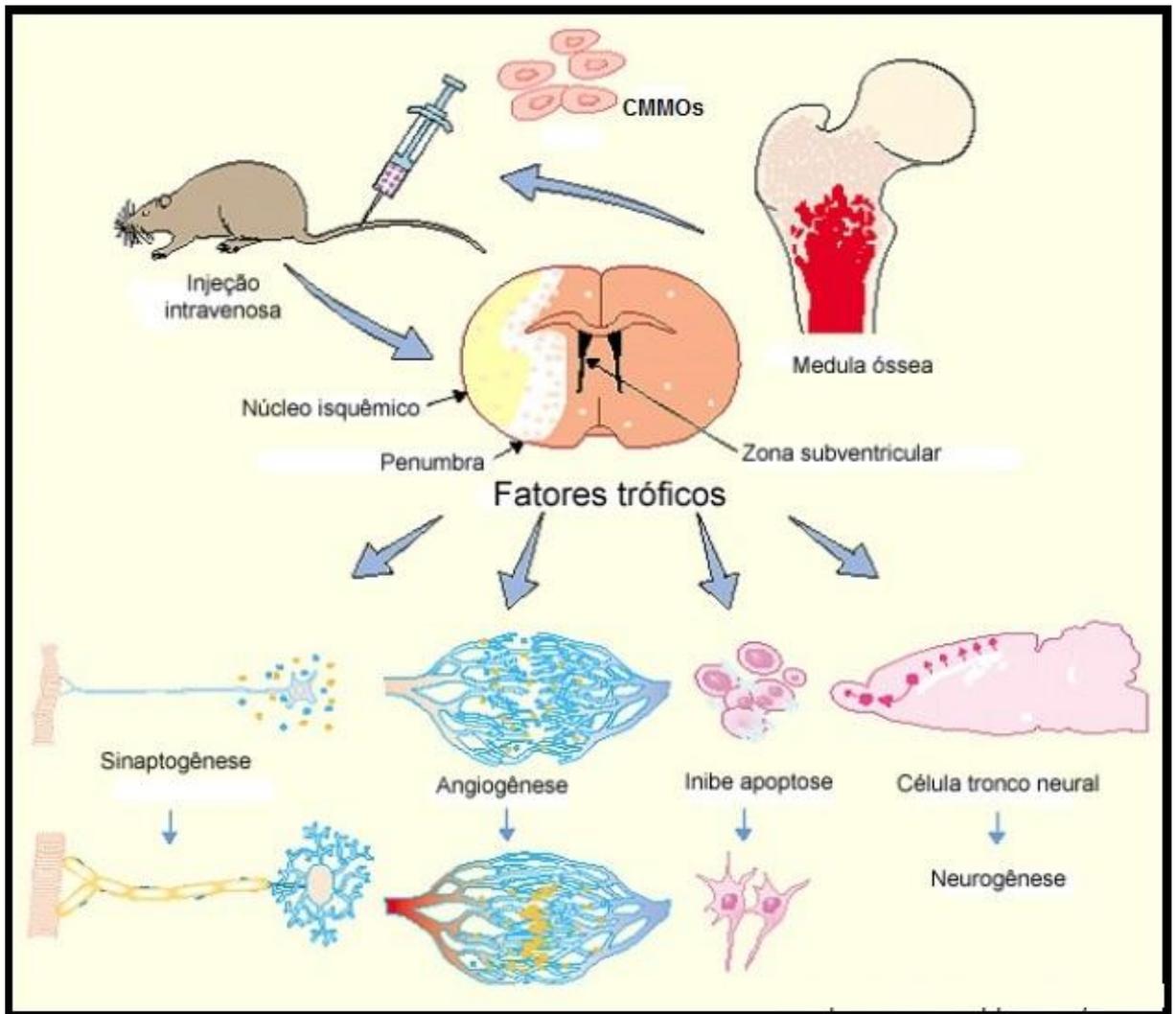


Figura 7. Terapia celular e seus prováveis benefícios após lesões do SNC (isquemia).

Acredita-se que quando administradas em um animal ou no homem, as células-tronco apresentam a capacidade de migrar para os locais de lesão através dos fatores quimiotáticos. Em casos de lesões por isquemia, as células-tronco aglomeram-se na zona de penumbra (uma área de hipoperfusão sanguínea, periférica à lesão e que contém células ainda vivas, porém danificadas). Lá, essas células podem vir a induzir a sinaptogênese, angiogênese e neurogênese e ainda inibir a morte celular programada por apoptose através da liberação de fatores tróficos. Adaptada de Chopp e Li, 2002.

Desde 1950 são realizados transplantes de células-tronco da medula óssea com a finalidade de tratar doenças do sangue. Porém, somente na década de 1990, começaram a surgir evidências a partir de experimentos realizados em animais, de que na medula óssea também existem outros tipos de células-tronco com capacidade de regenerar tecidos e até órgãos como, por exemplo, o coração, fígado e o sistema nervoso (Krause, 2001). Estudos de transplante de CMMO demonstraram que a terapia com essas células pode ser segura e eficaz em modelos de doença do coração, isquemia e lesões medulares mostrando resultados benéficos similares aos observados na administração de CTMs (Perin *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004; Mendez-Otero *et al.*, 2007; Sprengers *et al.*, 2008; Strauer *et al.*, 2008). No modelo de isquemia focal, a terapia com CMMOs resulta em recuperação funcional e reduzida neurodegeneração na periferia da lesão (Iihoshi *et al.*, 2004; Kamiya *et al.*, 2008; Giraldo-Guimarães *et al.*, 2009; de Vasconcelos dos Santos *et al.*, 2010).

Sendo assim, a terapia com as CMMOs pode ser uma alternativa que venha a minimizar ou até mesmo curar algumas dessas doenças (McLaren, 2001) mais rapidamente e com menor custo visto que não há a necessidade de manutenção em culturas e que a sua administração pode ser imediatamente após a obtenção.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Verificar o efeito do tratamento com as CMMOs na plasticidade estrutural no modelo de lesão dos córtices motor e somestésico primários por ablação focal unilateral.

2.2- Objetivos Específicos

Após a indução da lesão cortical por ablação focal unilateral e a administração das CMMOs pretendeu-se:

- estimar o efeito da terapia no brotamento axonal através da quantificação da expressão da proteína GAP-43 na região cortical periférica à lesão e na região de córtex homólogo contralateral à lesão através da técnica de *Western Blotting*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Modelo Animal

Ratos Wistar machos com idade variando de 2 a 4 meses e peso entre 250-550 gramas foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os procedimentos no qual os animais foram submetidos obteve aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Instituição (CEUA – UENF), sob o protocolo nº 86 em 02/09/2010. Os animais permaneceram mantidos no mesmo local com água e comida ad. libitum, em um ciclo de 12 horas em claro : 12 horas em escuro, antes e durante o experimento.

3.2- Procedimentos Cirúrgicos

Para os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de quetamina (90 mg/kg), via injeção intraperitoneal (i.p.) e tiveram então a cabeça fixada no aparelho estereotáxico. Após terem seu crânio exposto cirurgicamente com auxílio de um bisturi, realizou-se através de uma broca a craniotomia a fim de expor o córtex frontoparietal esquerdo, de +2 a -8 mm a partir do bregma no eixo anteroposterior; de acordo com o atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1986). A lesão deve resultar em perda das seis camadas de córtex com igual localização e extensão (vide item 3.2.1). A pele foi suturada e os animais mantidos aquecidos sob uma lâmpada até se recuperarem do efeito do anestésico. Após a recuperação, os animais foram levados ao biotério, onde ficaram mantidos até a data da indução do óbito, através de câmara de CO₂.

3.2.1- Ablação focal unilateral por sucção

A lesão por ablação foi induzida através da sucção de maior parte do córtex motor e de parte do córtex somestésico (figura 8) Após a craniotomia, foi realizado o rompimento da dura-máter com auxílio de pinças ultrafinas. A parte exposta do córtex foi sugada com uma ponteira de pipeta de 1.000 μL acoplada a uma bomba de vácuo. Todo cuidado foi tomado para que fossem aspiradas apenas as seis camadas corticais, não lesando ou lesando o menos possível o corpo caloso e a substância branca subjacentes ao córtex lesado. Após a aspiração, foi colocado um pedaço de esponja hemostática feita de gelatina (Hemospon[®], Technew Ltda., Brasil) dentro da lesão, para auxiliar no estancamento da hemorragia.

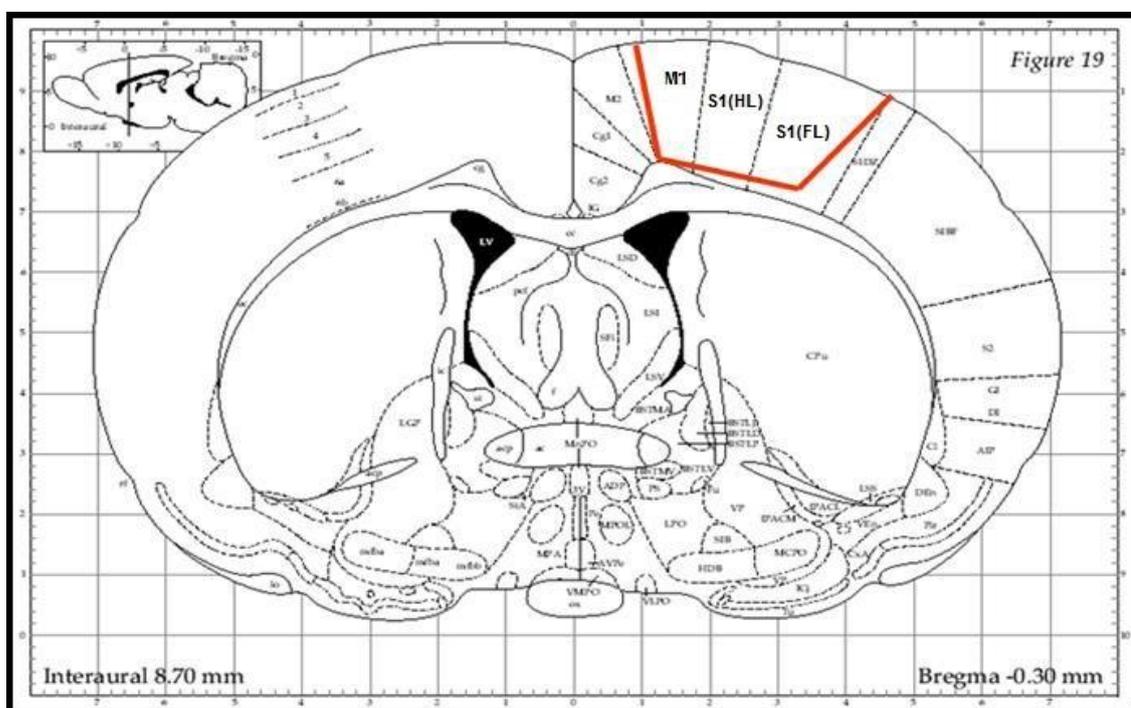


Figura 8. Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato representativo da área em que foi realizada a lesão. Destacada em vermelho se encontra a área onde foram realizadas as lesões por ablação. Vale ressaltar que a injúria provocada abrangeu o córtex motor primário (M1) e parte do córtex somestésico (S1). (Retirada de Paxinos e Watson, 1986).

3.3- Obtenção das CMMOs

Animais adultos foram anestesiados e posteriormente eutanasiados na câmara de CO₂ e tiveram seus fêmures e tíbias extraídos e separados dos tecidos adjacentes. Os ossos obtidos foram cortados de forma a permitir o acesso à medula com uma seringa contendo 10 ml de meio de cultura (DMEM F12) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Assim, o conteúdo da medula foi lavado e coletado em tubos estéreis. O material obtido foi então submetido à centrifugação por 5 minutos com velocidade de 8,5, o precipitado recolhido e novamente suspenso em meio de cultura (2 ml de DMEM F12 sem soro). Este material foi submetido à centrifugação por 30 minutos em Ficoll para a extração das CMMOs. As células que ficam na interface entre a fração aquosa (DMEM F12) e o Ficoll foram retiradas e submetidas à primeira lavagem em um tubo contendo PBS 10mM. Posteriormente as mesmas foram ressuspensas e centrifugadas por 5 min a 4000G e em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 3 ml de PBS para uma segunda lavagem. Novamente realizou-se a ressuspensão das células, centrifugação e o descarte do sobrenadante. Mais uma lavagem foi efetuada, e após o descarte do sobrenadante as células foram ressuspensas em 1ml de DMEM F12 sem soro. Após a extração, as células foram submetidas a uma lavagem e suspensão em salina e iniciou-se o processo de contagem das células. Estas foram contadas com o auxílio da câmara de *Neubauer* e tiveram sua viabilidade avaliada através da coloração do Azul de Tripán (4%). Após a contagem, as células foram ressuspensas em solução PBS, na concentração final de $3,0 \times 10^7$ células/500 μ L (figura 9).

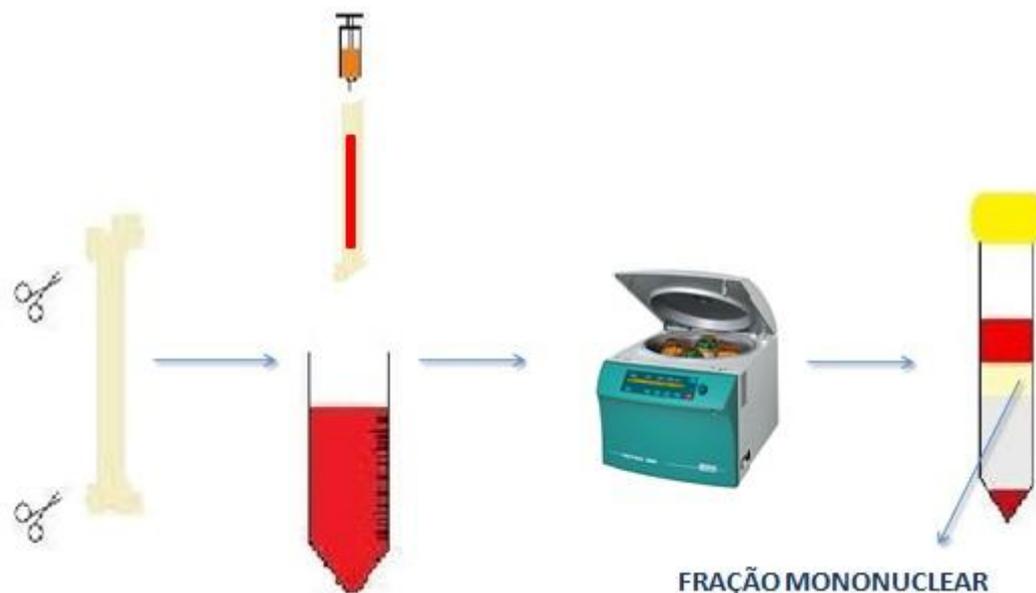


Figura 9. Esquema representativo do procedimento de extração de células mononucleares. Após a remoção do osso, a medula óssea do animal foi extraída com DMEM-F12, dissociada e submetida à centrifugação em gradiente de Ficoll, para obtenção da fração mononuclear.

3.4- Administração sistêmica das CMMOs

Os animais submetidos à ablação foram divididos em dois grupos: tratado e controle. Aproximadamente 24 horas após serem submetidos à lesão cortical, os animais do grupo tratado foram submetidos à injeção de cerca de $3,0 \times 10^7$ células em 500 μ L de solução salina pela veia jugular. Nos animais dos grupo controle, foi injetado apenas 500 μ L do veículo (PBS).

A técnica de injeção pela veia jugular requer a exposição da mesma por uma incisão cirúrgica da pele próxima ao pescoço com o auxílio de um bisturi. Com pinças ultrafinas, a veia de interesse foi localizada para que assim a administração pudesse ser realizada através da introdução de uma seringa com agulha fina na luz do vaso sanguíneo. Em seguida a incisão foi suturada, e após a recuperação anestésica (conforme descrito no item 3.2) os animais foram devolvidos ao Biotério.

3.5- Preparação de homogenatos de tecidos

Amostras de tecidos corticais (ipso e contralaterais) (figura 10) de ratos submetidos à ablação que receberam injeção de células mononucleares, injeção de PBS foram preparadas para gel SDS. Homogenatos de animais normais (sem lesão) também foram feitos para fins de comparação. Após os tempos de sobrevivência de 5, 7 e 10 dias após a ablação, os animais foram sacrificados e tiveram seus encéfalos rapidamente removidos e as áreas de interesse devidamente dissecadas, separadas em eppendorfs e congeladas a -20 °C até o momento da preparação dos homogenatos. Para os homogenatos, foi adicionado às amostras 400 µl de tampão de lise com inibidores de proteases. Após centrifugação por 20 min a 3000 RPM e 4 °C, o sobrenadante foi obtido e as proteínas foram dosadas através do kit “Pierce ® BCA protein Assay” conforme instruções do fabricante (Thermo Scientific) e normalizadas, de forma que cada amostra que foi colocada em um poço do gel teve a mesma massa de proteína bruta (30 µg).

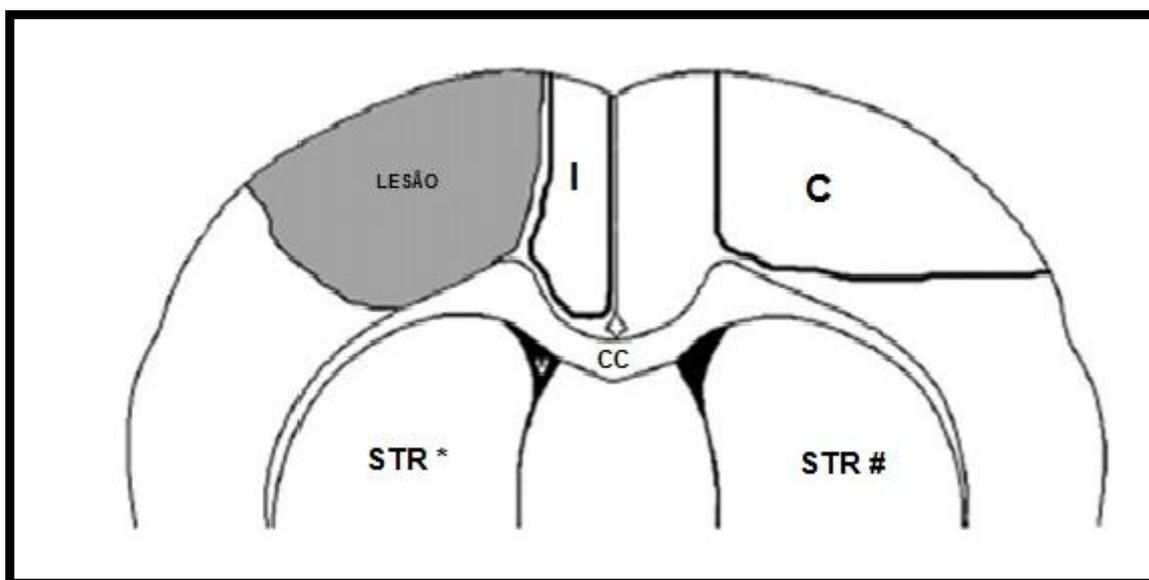


Figura 10. Desenho de um corte coronal do encéfalo de rato mostrando as regiões que foram analisadas no projeto. As regiões homogeneizadas para os estudos com western blotting foram o córtex cingulado periférico à lesão (I) e o córtex homólogo contralateral à lesão (C). A figura mostra ainda: STR* - corpo estriado ipsilateral à lesão; STRV# – corpo estriado contralateral à lesão; CC – corpo caloso; ventrículo (v). Adaptada de Giraldi-Guimarães et al. (2009).

3.6- Análise da expressão das proteínas relacionadas à plasticidade anatômica na periferia da lesão por SDS-PAGE e Western Blotting

Amostras dos sobrenadantes dos homogenatos foram utilizadas de acordo com o seguinte protocolo: as amostras foram previamente solubilizadas em tampão de amostra para eletroforese, que é constituído de β -mercaptoetanol, SDS, glicerol, azul de bromofenol e água. Elas foram então colocadas no gel, onde foi aplicada uma voltagem de 70 Volts por 2 h. O gel é composto de acrilamida 30%, bisacrilamida 1%, tampão Tris 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,4% e água, sendo a concentração final de poli-acrilamida de 5%. Após a eletroforese, o gel foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham) numa cuba contendo tampão de transferência (constituído de 24,8 mM de Tris, 192 mM de glicina e 10% (v/v) de metanol). As proteínas foram transferidas submetendo-se o gel e a membrana a uma corrente de 200 mA por 2h. A membrana foi bloqueada com uma solução de leite em pó desnatado (MOLICO) a 5% diluído em tampão TBS (Tris-buffered saline) + Tween 0,1% por 2h sob agitação e à temperatura ambiente, sendo depois incubada com o anticorpo primário específico para a proteína desejada (GAP-43 - rabbit, diluição: 1:500, por 2 h a temperatura ambiente) diluído na mesma solução. Em seguida a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho conjugado à peroxidase (Amersham) (1:5000 por 1 h a temperatura ambiente), lavada novamente e usada para impressionar um filme do tipo Hyperfilm-ECL (Amersham), pelo método *western blotting* - ECL. A proteína beta-actina foi usada como controle de carregamento. Para a sua marcação, os anticorpos foram removidos das membranas e uma segunda rodada de incubação com anticorpo primário (beta-actina - mouse, diluição 1:5000, por 2 h a temperatura ambiente) mais anticorpo secundário anti-imunoglobulina de camundongo conjugado à peroxidase (Amersham) (1:5000 por 1 h a temperatura ambiente) e lavagem foi feita. A densitometria (O.D.) das bandas foi quantificada medida, e o valor final para cada amostra foi: O.D. da GAP-43 / O.D. da beta-actina.

3.7- Análise Histológica

A fim de analisar a extensão da lesão realizada, um animal foi sacrificado 24h após o procedimento de indução de ablação. O encéfalo foi rapidamente removido do crânio e cortes de 2 mm de espessura foram feitos no plano coronal usando uma matriz para fatiamento de encéfalo de rato (Insight LTDA; Ribeirão Preto, SP). Os cortes foram imersos imediatamente em uma placa de 24 poços contendo tampão fosfato 0,1M. Posteriormente, substituímos esta solução pela solução de Cloreto de Tetrazólio (TTC) 0,5% aquecida previamente a 37 °C. Os cortes permaneceram dentro de uma estufa protegidos da luz por cerca de 30 minutos, sendo viradas na metade do tempo para que ambos os lados da amostra reagissem de forma homogênea. Passados os 30 minutos na estufa, as fatias foram então lavadas por duas vezes em PBS e fixadas com paraformaldeído (PF) 4% diluído em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, por 24 horas. Neste tipo de análise, somente o tecido saudável é corado de vermelho o que nos permite uma clara observação da região cortical afetada pela lesão através de uma Lupa STEMI SV11 ZEISS (Oberkochen, Germany) acoplada com uma câmera digital Canon G10 14.7 megapixels utilizando o software AxionVision®.

4- RESULTADOS

4.1- Análise Histológica

Na figura 11 pode-se observar que o procedimento de indução de ablação utilizado induziu de forma eficaz uma lesão que abrangeu as seis camadas corticais, deixando intacta a substância branca.



Figura 11. Reação com Cloreto de Tetrazólio (TTC) em amostras de encéfalos submetidos à ablação. A figura mostra cortes sequenciais (no sentido rostral caudal) de encéfalo de animal submetido à ablação após reagir com TTC evidenciando que a lesão foi realizada ao longo da extensão rostrocaudal cortical, e englobou as seis camadas corticais sem atingir a substância branca. Nesse tipo de reação, somente o tecido que mostra viabilidade é marcado de vermelho. O corpo caloso e a substância branca são corados menos intensamente.

4.2- Expressão da proteína GAP-43 por Western Blot

Como resultado das análises realizadas por Western Blot em homogenatos corticais de animais após um período de sobrevivência de 5 dias, verificamos através de análises densitométricas que houve diferença na expressão entre os lados (ipsolateral e contralateral) do grupo tratado com a fração mononuclear da medula e do grupo controle (figura 12a).

Após análise dos dados de forma agrupada para esse tempo de sobrevivência, podemos ver esse aumento da expressão com o tratamento no lado ipsolateral e contralateral quando comparado aos mesmos lados em animais controle (Figura 12b), mostrando-se maior no lado ipsolateral.

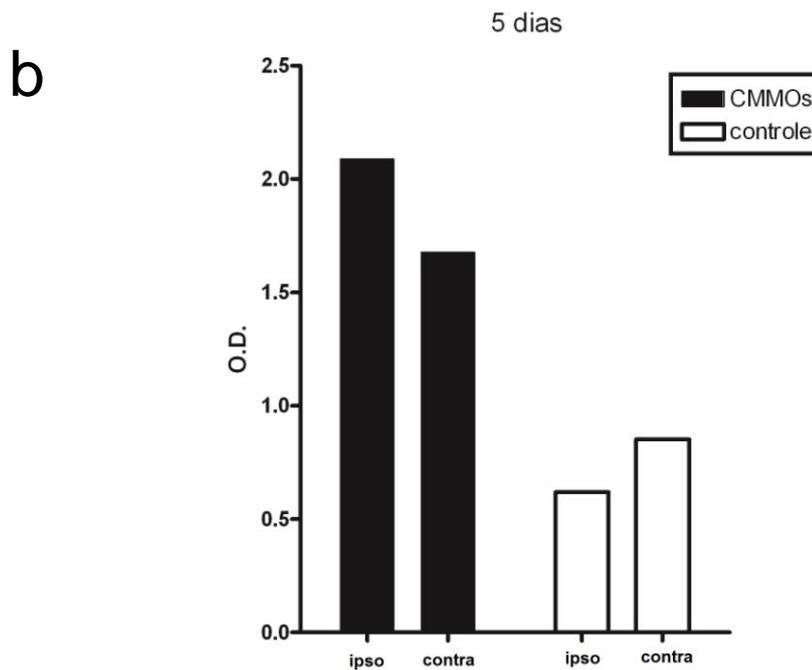
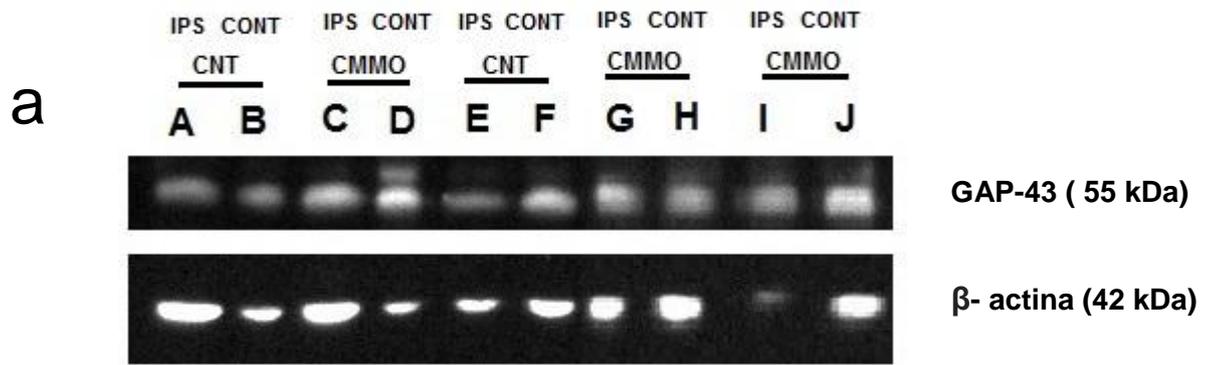


Figura 12. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 5 dias. a- Análises da expressão de GAP-43. O painel superior mostra bandas imunorreativas para a proteína de interesse. Foi observado um aumento na expressão da proteína entre os grupos. O painel inferior mostra a proteína de controle de carga (β -actina). Note que o tratamento com as CMMOs induziu mudanças na expressão da proteína GAP-43 relacionada com plasticidade neural. b- Análise dos dados agrupados. A análise nos revela que há um aumento na expressão proteica em animais tratados com as CMMOs no lado ipsilateral à lesão. A- animal controle (córtex ipsilateral); B- animal controle (córtex contralateral); C- animal tratado (córtex ipsilateral); D- animal tratado (córtex contralateral); E- animal controle (córtex ipsilateral); F- animal controle (cortex contralateral); G- animal tratado (córtex ipsilateral); H- animal tratado (córtex contralateral); I- animal tratado (córtex ipsilateral); J- animal tratado (córtex contralateral). O.D-densitometria

As amostras corticais de animais com 7 dias de sobrevida nos revela uma diferença na expressão proteica no lado ipsolateral do grupo controle (figura 13a). Através da análise dos dados agrupados (figura 13b) podemos observar esse aumento da expressão no lado ipsolateral de animais controle, ao contrário das amostras de mesmo lado de animais controle com sobrevida de 5 dias (figura 12b). Esse fato pode ser explicado pelo n utilizado ser pequeno, de 1 animal, uma vez que o Blotting para amostras do outro animal não deu certo (apresentou sinal fraco) (ver figura 13a, lanes E e F). Assim, a quantificação para animais controle de sobrevida 7 dias contou somente com dados de um animal.

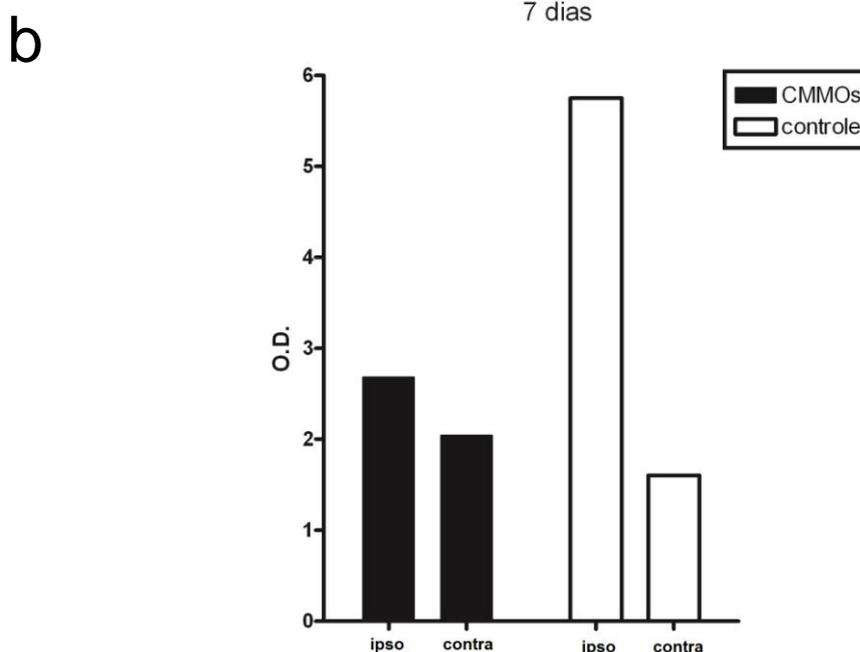
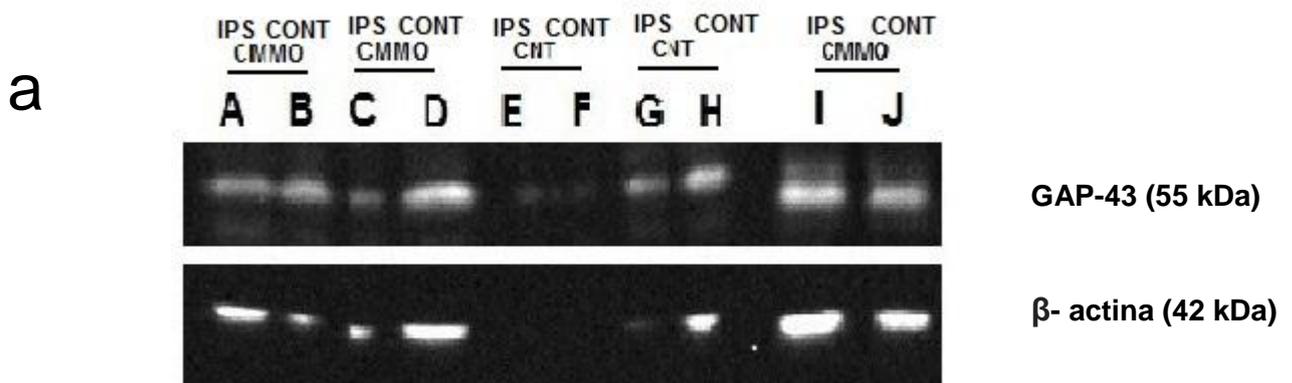


Figura 13. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 7 dias. a- Análises da expressão de GAP-43. As bandas superiores correspondem à expressão da proteína estudada (GAP-43) e as inferiores ao controle de carga (β -actina). Para o tempo de sobrevida de 7 dias, pode-se observar que o tratamento com as células não induziu alterações na expressão da proteína em questão, visto que nenhuma diferença foi observada. b- Análise dos dados agrupados. Nesta análise observa-se um ligeiro aumento na expressão da GAP-43 no lado ipsilateral de animais controle. A- animal tratado (córtex ipsilateral); B- animal tratado (córtex contralateral); C- animal tratado (córtex ipsilateral); D- animal tratado (córtex contralateral); E- animal controle (córtex ipsilateral); F- animal controle (cortex contralateral); G- animal controle (córtex ipsilateral); H- animal controle (córtex contralateral); I- animal tratado (córtex ipsilateral); J- animal tratado (córtex contralateral). O.D-densitometria.

Como resultado das análises da expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 10 dias, não observamos diferença na expressão proteica nos lados ipsolaterais de animais submetidos ao tratamento com as CMMOs e de animais controle (figura 14a). Contudo, para animais tratados com as CMMOs foi observado um aumento na expressão proteica do lado contralateral à lesão em comparação com o grupo controle que pode ser melhor visualizado através do gráfico dos dados agrupados (figura 14b).

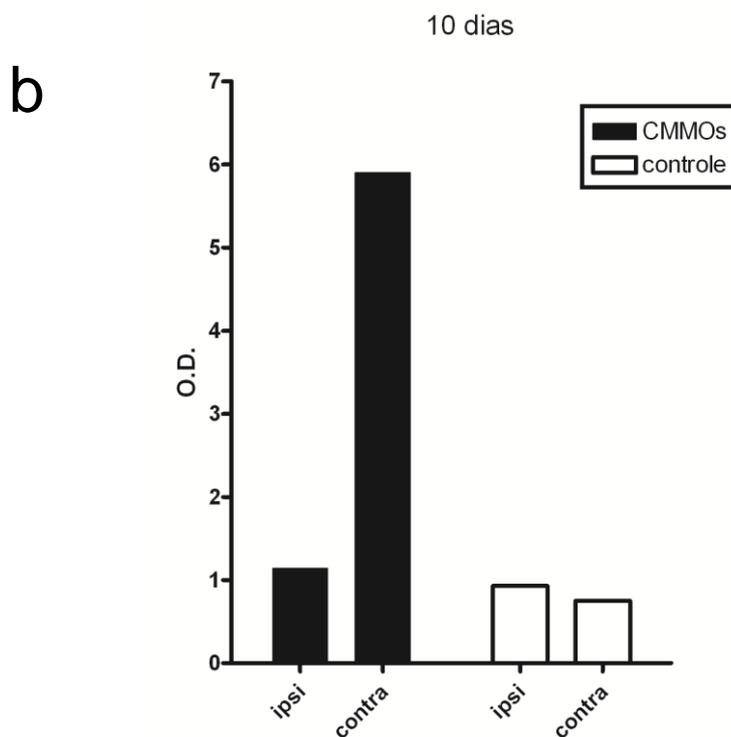
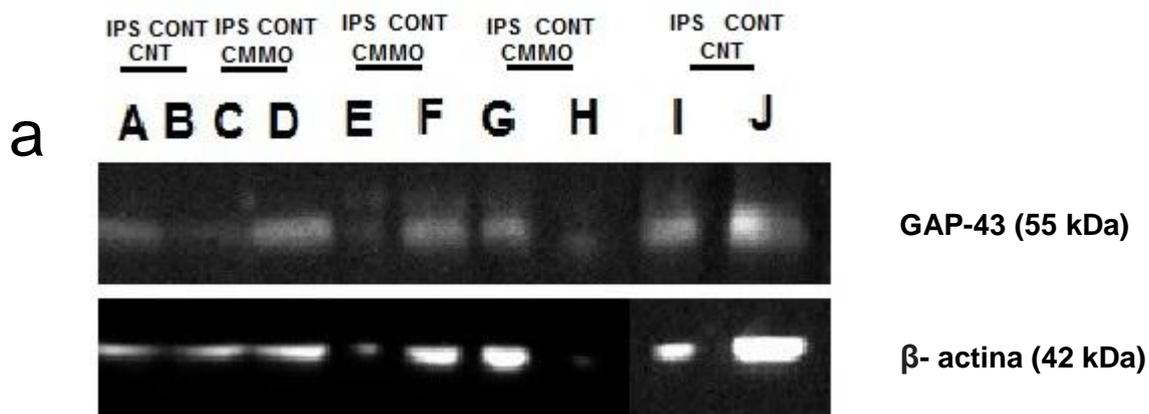


Figura 14. Expressão de GAP-43 em animais com sobrevida de 10 dias. a- Análises da expressão de GAP-43. As bandas superiores correspondem às bandas de expressão da proteína GAP-43 e as inferiores à β -actina (controle de carga). O tratamento com as CMMOs também induziu alterações na expressão da proteína em animais tratados com as CMMOs. b- Análise dos dados agrupados. Na figura 11.b podemos verificar um aumento na expressão da proteína no lado contralateral à lesão de animais tratados. A- animal controle (córtex ipsilateral); B- animal controle (córtex contralateral); C- animal tratado (córtex ipsilateral); D- animal tratado (córtex contralateral); E- animal tratado (córtex ipsilateral); F- animal tratado (córtex contralateral); G- animal tratado (córtex ipsilateral); H- animal tratado (córtex contralateral); I- animal controle (córtex ipsilateral); J- animal controle (córtex contralateral). O.D-densitometria.

Para fins comparativos, também realizamos o procedimento para análise da expressão da proteína GAP-43 em animais que não foram submetidos à lesão (figura 15). Podemos observar no lane D da figura 15 que apareceram duas bandas para a proteína GAP-43, diferindo das outras bandas. Esse fato pode estar relacionado com eventos de splicing na proteína e também ao citado anteriormente no item 1.3 com relação ao variável peso molecular da mesma. Vale ressaltar ainda que o Blotting para o lado ipsolateral de um animal (letra C da figura 15) não deu certo. Portanto, contamos apenas com amostras de lado ipsolateral de um animal.

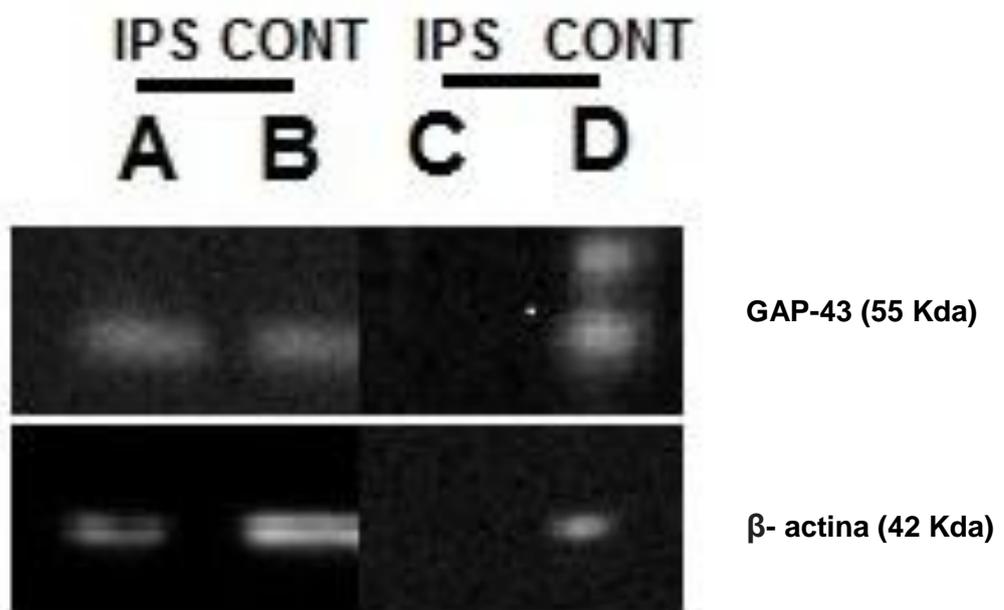


Figura 15. Expressão de GAP-43 em animais sem lesão. A- animal sem lesão (córtex ipsolateral); B- animal sem lesão (córtex contralateral); C- animal sem lesão (córtex ipsolateral); D- animal sem lesão (córtex contralateral). Note que em D, na parte superior do painel, podemos observar duas bandas para a proteína GAP-43. Esse fato pode estar relacionado a um evento de splicing que a proteína pode ter sofrido e/ou a variação no peso molecular pelo fato da mesma ser uma proteína altamente carregada e variar sua posição em géis SDS (ver item 1.3).

Para verificar se houve efeito do tratamento sobre a expressão da proteína, agrupamos os animais controle e tratados de todos os tempos de sobrevivência: 5, 7 e 10 dias (figura 16). O que podemos constatar com esse resultado é que há uma tendência de aumento na expressão de GAP-43 nos animais submetidos ao tratamento com as CMMOs. Entretanto, o n amostral ainda precisa ser aumentado.

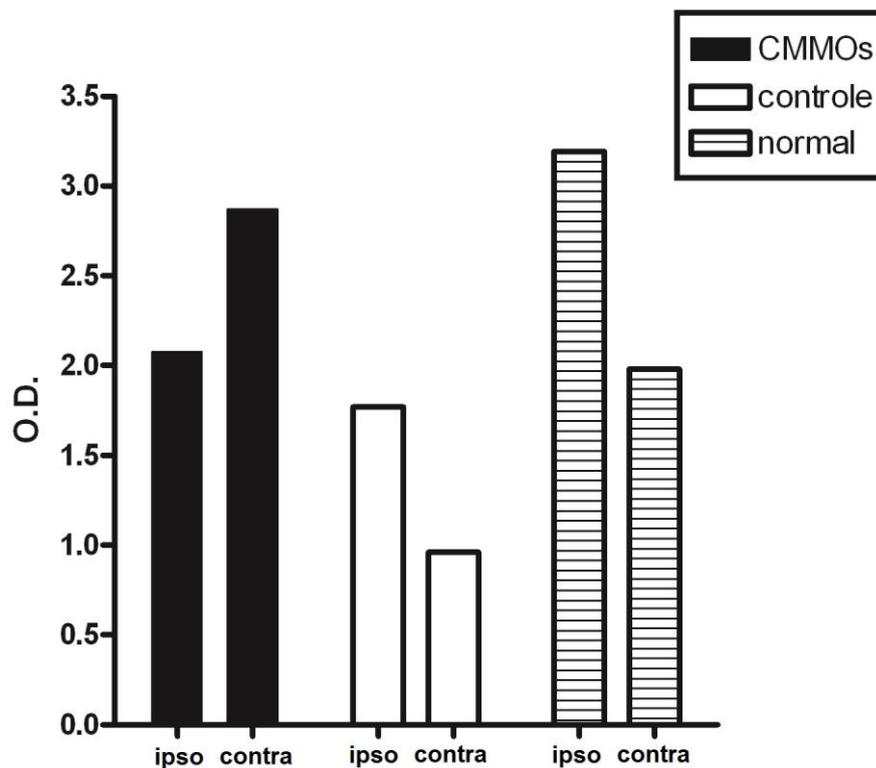


Figura 16. Gráfico de dados agrupados para todos os dias de sobrevivência. Agrupando os animais com tempos de sobrevivência 5, 7 e 10 dias em grupos tratados e controle, podemos observar um aumento na expressão de GAP-43 no lado contralateral de animais tratados. Pode-se observar também uma grande expressão da proteína no lado ipsolateral de animais normais. Entretanto, esse dado não pode ser considerado definitivo. Assim, o n amostral precisa ser aumentado a fim de que se tenha uma conclusão mais precisa sobre a expressão proteica.

5- DISCUSSÃO

Diferentes modelos de lesão cortical induzem alterações plásticas e funcionais distintas, mesmo quando as lesões são realizadas na mesma área e atingindo as mesmas 6 camadas corticais. Esse fato foi descrito previamente por Uryu, K. (2001). Já se sabe que em lesões isquêmicas, a recuperação funcional que foi observada é restrita principalmente pelo fato de ocorrer um remapeamento motor, ou seja, o cérebro recruta áreas adjacentes e contralaterais do mapa motor normal e ainda incorpora algumas porções do mapa somatossensorial resultando em função motora (Napieralski *et al.*, 1998; Carmichael, 2003; Gonzales *et al.*, 2003). Ao contrário, ainda não foi comprovado qualquer tipo de plasticidade seja ela em conexões cortico-corticais ou cortico-estriatais no modelo escolhido para nosso trabalho: a ablação (Carmichael, 2003).

Inicialmente buscamos verificar se o nosso procedimento lesional se assemelhava com o procedimento de isquemia utilizado por outros autores para que pudéssemos ter um modelo para comparação. Assim, após realizar a reação com o Cloreto Tetrazólio (TTC) em encéfalo de animais que tinham sido submetidos à ablação, constatamos que o nosso modelo de lesão atingiu as 6 camadas corticais como o descrito previamente para lesões isquêmicas (Szele *et al.*, 1995; Giraldi-Guimarães *et al.*, 2009).

Estudos anteriores do nosso grupo (Freitas, H.T *et al.*, 2012) demonstraram que para o modelo de lesão induzido por ablação cortical em ratos Wistar tratados 1 dia após a lesão com a fração mononuclear da medula óssea ou com células mesenquimais, houve recuperação funcional significativa dos animais nos primeiros 2 meses de acompanhamento com testes funcionais. Já sabendo disso, pretendemos verificar se essa melhora foi atribuída a uma indução de plasticidade. Portanto, o presente trabalho investigou a modulação da expressão da proteína GAP-43, relacionada com plasticidade sináptica, no córtex cerebral de ratos adultos submetidos ao processo de lesão cortical focal unilateral por ablação após a terapia com células mononucleares de medula óssea. A fim de acessar de forma quantitativa a expressão desta proteína no córtex ipso e contralateral à lesão, realizamos a técnica bioquímica Western Blotting.

Já se sabe que o aumento na expressão da proteína GAP-43 pode ser usado como uma medida fisiológica de plasticidade sináptica para identificar brotamento axonal, um dos eventos que está relacionado com mudanças plásticas em conexões neuronais (Benowitz *et al.*, 1988; Stroemer *et al.*, 1998).

Alguns estudos anteriores como o de Stroemer et al. (1995) realizaram análises imunohistoquímicas por imunoblot em ratos Wistar machos hipertensos submetidos a isquemia unilateral neocortical por oclusão permanente da artéria cerebral média distal e da artéria carótida comum ipsilateral. Como resultado desse estudo, foi observado um aumento na expressão de GAP-43 na região da periferia da isquemia durante as duas primeiras semanas pós-lesão (3, 7 e 14 dias). Esse resultado foi interpretado como uma evidência de crescimento e brotamento axonal em regiões neocorticais que se encontram ao redor da lesão induzida.

Em outro estudo, Giral-di-Guimarães e colaboradores (2009) submeteu ratos Wistar machos à lesão isquêmica por termocoagulação de vasos sanguíneos piais dos córtices motor e somestésico, e após o tratamento com células mononucleares da medula óssea quantificou a expressão de GAP-43 em animais com tempo de sobrevivência de 7 dias (escolhido a partir dos resultados anteriores obtidos por Stroemer e colaboradores (1995). A expressão da proteína foi então verificada por análise densitométrica de bandas em imunoblot e revelaram nenhuma diferença significativa entre os grupos de animais que foram tratados com as células ou com os animais controle. Entretanto, ao contrário do mesmo estudo de Stroemer e colaboradores (1995), foi observado por Giral-di-Guimarães e colaboradores (2009) que a expressão da proteína na região periférica à lesão foi menor do que no lado oposto em ambos os grupos (tratado ou controle). Para comprovar se essa diferença era devido à lesão isquêmica realizada pelo grupo ou a uma alteração natural na expressão da proteína entre os lados ipso e contralateral, análises foram realizadas em animais sem lesão e o que foi observado nesses animais foi que a expressão da GAP-43 foi similar em ambos os lados. Portanto, esses resultados indicam que a lesão isquêmica induziu um decréscimo na expressão da GAP-43 na região periférica à lesão.

Nosso resultado para animais submetidos ao processo de lesão cortical focal unilateral por ablação com sobrevida de 5 dias mostrou que houve um aumento na expressão da proteína GAP-43 no lado ipsolateral em animais tratados, ao contrário do que foi observado para ambos os grupos em lesões isquêmicas por Giral-di-Guimarães e colaboradores (2009). Entretanto, os nossos resultados são condizentes com o estudo de Stroemer e colaboradores (1995), uma vez que ele observa que em tempos de sobrevida curtos (3, 7 e 14 dias) após lesão isquêmica houve um aumento na expressão de GAP-43 na região periférica (ipsolateral) à lesão.

Para amostras com sobrevida de 7 dias, a expressão proteica entre os lados ipso e contralateral dos dois grupos (tratado e controle) não apresentou diferença. Porém, a análise dos dados agrupados revela um aumento na densitometria em amostras de animais controle (lado ipsolateral). Esse fato se contrapõe ao observado para o tempo de sobrevida de 5 dias, que mostrou que em animais controle a expressão para o lado ipsolateral foi menor. Essas diferenças observadas podem estar relacionadas ao fato citado por Benowitz et al. (1990) e Masliah et al. (1991), que segundo seus trabalhos mostram que no caso de lesões em vias hipocâmpais adultas que resultam em brotamento axonal, há inicialmente um aumento na expressão de GAP-43 que retorna a níveis basais assim que o brotamento termina. Esse fato pode ser uma possível explicação para nossos resultados, sugerindo que no período de 7 dias pós-lesão para nosso modelo de ablação essa diminuição seja devida ao término do processo de brotamento. Além disso, outra justificativa para esse evento pode estar relacionada com o número de animais utilizados para a quantificação proteica, uma vez que tínhamos um n amostral de 2 animais e 1 animal não foi utilizado na quantificação devido a um problema no Blotting que não revelou expressão proteica (inclusive de β -actina).

Porém, observamos na maior sobrevida estudada -10 dias- que esse padrão (aumento na expressão de proteína GAP-43 na região periférica de animais controle) não se repete como para a sobrevida de 7 dias, se comparando portanto aos resultados obtidos com a sobrevida de 5 dias. Para saber se esse aumento (7 dias) e diminuição (em 5 e 10 dias) na expressão proteica é um fato característico de

lesões por ablação e chegar a alguma conclusão acerca, mais estudos precisam ser realizados com maior n amostral. Além disso, também observamos um aumento na expressão de GAP-43 no lado contralateral de animais tratados com as CMMOs.

Segundo Ng e colaboradores (1998), que realizou experimentos com hibridização *in situ* em encéfalos humanos que sofreram uma injúria isquêmica aguda, houve aumento no mRNA de GAP-43 pouco tempo após a lesão, com expressão proteica aumentada em regiões corticais periféricas ao centro da isquemia e até mesmo em áreas onde inicialmente sua expressão era baixa. Entretanto, outros estudos mostraram expressão de mRNA de GAP-43 após lesões do SNC sem expressão proteica da proteína (Tetzlaff *et al.*, 1991), o que indica uma possível degradação pós- translacional (Mains *et al.*, 1990; Saunders *et al.*, 1992 e McCune *et al.*, 1993).

Analisando o gráfico da figura 15, que mostra todos os tempos de sobrevivência agrupados de acordo com o tratamento recebido, pode-se inferir que há uma tendência de aumento da expressão da proteína com o tratamento com as células mononucleares de medula óssea.

Não há explicações até o presente momento para a diferença entre nossos resultados e resultados anteriores obtidos por outros grupos. Uma possível explicação pode ser o tipo de lesão. Como comprovado anteriormente, dependendo do tipo de lesão induzida, uma perda funcional e na plasticidade é observada (Napieralski *et al.*, 1998; Carmichael, 2003; Gonzales *et al.*, 2003). Além disso, outra explicação pode ser a diferença nas metodologias para a detecção e quantificação de proteínas. Alguns estudos fizeram análises *in situ* (imunohistológicas), enquanto outras analisaram a expressão proteica através de homogenatos, como no caso do nosso trabalho. Com relação à quantificação, diferenças no protocolo também foram vistas em diversos trabalhos, dentre elas a medida de densitometria por secções de tecido que reagiram imunologicamente para o anticorpo em questão e a medida da densitometria para bandas de imunoblotting.

Estudos sobre o tempo de expressão para GAP-43 após a indução da ablação e também após o tratamento com as CMMOs nesse modelo de lesão são

necessários para melhorar as análises sobre o possível efeito das células na plasticidade estrutural.

6- CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram efeito do tratamento das CMMOs na expressão de GAP-43 no lado ipsolateral no tempo de sobrevivência de 5 dias além de para o tempo de sobrevivência de 10 dias no lado contralateral. Para o tempo de sobrevivência de 7 dias isso não foi observado. Entretanto, o n amostral do experimento precisa ser aumentado para que possamos chegar a uma conclusão a cerca da terapia na expressão da proteína GAP-43 e assim verificarmos se a recuperação observada anteriormente, no mesmo modelo de lesão e com a mesma terapia celular, pode ser atribuída a significativas mudanças plásticas estruturais envolvendo neuritogênese. Logo, mais estudos precisam ser realizados pra comprovar essa hipótese.

7- REFERÊNCIAS

Akers, R.E., Routtenberg, A. (1987) Calcium-promoted translocation of protein kinase C to synaptic membranes: relationship to the phosphorylation of an endogenous substrate (Protein F1) involved in synaptic plasticity. **J. Neurosci.** 7:3976-3983.

Alexander, K.A., Cimler, B. M., MEIER, K. E., STORM, D. R. (1987) Regulation of calmodulin binding to P-57. A neurospecific calmodulin binding protein. **J. Biol. Chem.** 262: 6108-6113.

Apel, E.D., Byford, M.F., Au, D., Walsh, K.A., Storm, D.R. (1990) Identification of the protein kinase C phosphorylation site in neuromodulin. **Biochemistry.** 29(9):2330–2335.

Ávila, J., Dominguez, J., Díaz-Nido, J. (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. **Int. J. Dev. Biol.** 38:13-25.

Baetge, E.E., Hammang, J. P. (1991) Neurite outgrowth in PC12 cells deficient in GAP-43. **Neuron.** 6:21-30.

Bear, M.F. Desvendando o Sistema Nervoso. Artmed, 2002. 3ª edição. 858p.

Benowitz, L., Rodriguez, W., Neve, R. (1990) The pattern of GAP-43 immunostaining changes in the rat hippocampal formation during reactive synaptogenesis. **Mol Brain Res.** 8:17-23.

Benowitz, L.I., Apostolides, P.J., Perrone-Bizzozzero, N., Finkelstein, S.P., Zwiers, H. (1988) Anatomical distribution of the growth-associated protein GAP-43/B-50 in the adult rat brain. **J. Neurosci.** 8 :339–352.

Benowitz, L., Perrone-Bizzozero, N. (1991) The relationship of GAP-43 to the development and plasticity of synaptic connections. ***Ann.NY Acad. Sci.*** 627:58-74.

Benowitz, L.I., Routtenberg, A. (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. ***Trends Neurosci.*** 2:84-91.

Benowitz, L.I., Yin, Y. (2007) Combinatorial treatments for promoting axon regeneration in the CNS: strategies for overcoming inhibitory signals and activating neurons' intrinsic growth state. ***Dev Neurobiol.*** 67:1148-1165.

Brodkey, J.A., Laywell, E.D., O'Brien, T.F., Faissner, A., Stefansson, K., Dorries, H.U., Schachner, M., Steindler, D.A. (1995) Focal brain injury and upregulation of a developmentally regulated extracellular matrix protein. ***J Neurosurg.***82:106–112.

Carmichael, S.T. (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. ***Neuroscientist.*** 9:64–75.

Chapman, E.R., Au, D., Alexander, K.A., Nicolson, T.A., Storm, D.R. (1991) Characterization of the calmodulin binding domain of neuromodulin. Functional significance of serine 41 and phenylalanine 42. ***J. Biol. Chem.*** 266:207-213.

Chopp, M., Li, Y. (2002) Treatment of neural injury with marrow stromal cells. ***Lancet Neurol.***1:92–100.

Crain, B.J., Tran, S.D., Mezey, E. (2005) Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. ***J. Neurol. Sci.*** 233:121–123.

Dani, J.W., Armstrong, D.M., Benowitz, L.I. (1991) Mapping the development of the rat brain by GAP-43 immunocytochemistry. ***Neuroscience.*** 40:277-287.

De La Monte, S.M., Ng, S.C., HSU, D.H. (1990) Aberrant expression of GAP-43 in Alzheimer's disease, ***J. Neuropathol. Exp. Neurol.*** 49:319 (Abstr).

Delong, M.R., Wichmann, T. (2007) Circuitry and circuit disorders of the basal ganglia. **Arch Neurol.** 64:20-64:24.

De Vasconcelos dos Santos, A., Da Costa Reis, Juliana., Diaz Paredes, Bruno., Moraes, L., Giraldo-Guimarães, A., Mendez-Otero, R. (2010) Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Res.** 1306:149-158.

Dunican, D.J., Doherty, P. (2000) The generation of localized calcium rises mediated by cell adhesion molecules and their role in neuronal growth cone motility. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.*, v. 3, p. 255-263.

Elkabes, S., Diccico, B.E., Black, I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. **J. Neurosci.** 16:2508–2521.

Faix, J., Rottner, K. (2006) The making of filopodia. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:18–25.

Fidel, S.A., Davies, C.R., Neve, K.A., Neve, R.L. (1990) Effects of manipulation of GAP-43 expression on morphology of PC12 cells and cultured hippocampal neurons. **Soc. Neurosci. Abstr.** 16:339.

Freitas, H.T.*, Gomes Da Silva, V.*, Giraldo-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. * autores contribuíram igualmente para a publicação

Gamby, C., Waage, M.C., Allen, R.G., Baizer, L. (1996) Analysis of the role of calmodulin binding and sequestration in neuromodulin (GAP-43) function. **J. Biol. Chem.** 271:26698-26705.

Glenn, Y., Zhigang, H. (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Neurosci.** 7:617-627.

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

Goldberg, J.L. (2003). How does an axon grow? **Genes Dev.** 17:941-958.

Gonzales, C.L., Kolb, B. (2003) A comparison of different models of stroke on behavior and brain morphology. **Eur J Neurosci.** 18:1950-1962.

Gonzalo, S., Linder, M.E. (1998) SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. **Mol. Biol. Cell.** 9:585-597.

Gupton, S. L., Gertler, F. B. (2007) Filopodia: the fingers that do the walking. **Sci. STKE.** re5.

Hallet, M. (2001) Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. **Brain Res Rev.** 36:169-74.

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

Hayashi, N., Matsubara, M., Titani, K., Taniguchi, H. (1997) Circular dichroism and ¹H nuclear magnetic resonance studies on the solution and membrane structures of GAP-43 calmodulin-binding domain. **J. Biol. Chem.** 272:7639-7645.

He, Q., Dent, E.W., Meiri, K.F. (1997) Modulation of actin filament behavior by GAP-43 (neuromodulin) is dependent on the phosphorylation status of serine 41, the protein kinase C site. **J. Neurosci.** 17:3515-3524.

lihoshi, S., Honmou, O., Houkin, K., Hashi, K., Kocsis, J.D. (2004) A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. **Brain Res.** 1007(1-2):1-9.

Jones, L.L., Margolis, R.U., Tuszynski, M.H. (2003) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. **Exp Neurol.**182:399–411.

Kamiya, N., Ueda, M., Igarashi, H., Nishiyama, Y., Suda, S., Inaba, T., Katayama, Y. (2008) Intra-arterial transplantation of bone marrow mononuclear cells immediately after reperfusion decreases brain injury after focal ischemia in rats. **Life Sci.** 83:433–437.

Kawamoto, A., Losordo, D.W. (2008) Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. **Trends Cardiovasc. Med.** 18:33–37.

Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S.J. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell.** 105:369–377.

Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., Caroni, P. (2000) GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI (4,5) P2 at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. **J. Cell Biol.** 149:1455-1471.

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

Levy, M.N., Koeppen, B.M., Stanton, B.A., Beme e Levy. (2006) Fundamentos de Fisiologia. Rio de Janeiro: Elsevier.

Liang, X., Lu, Y., Neubert, T.A., Resh, M.D. (2002) Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species. **J. Biol. Chem.** 277:33032-33040.

Li, Y., Jiang, N., Powers, C., Chopp, M. (1998) Neuronal damage and plasticity identified by microtubule-associated protein 2, growth-associated protein 43, and cyclin D1 immunoreactivity after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke.** 29:1972-80.

Linder, M.E., Deschenes, R.J. (2003) New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. **Biochemistry.** 42:4311-4320.

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

Liu, Y., Fisher, D.A., Storm, D.R. (1994) Intracellular sorting of neuromodulin (GAP-43) mutants modified in the membrane targeting domain. **J. Neurosci.** 14:5807-5817.

Mains, E., Dickerson, I., May, V., Stoffers, DA., Perkins, SN., Ouafik, L., Husten, EJ., Eipper, BA. (1990) Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. **Front Neuroendocrinol.** 11:52-89.

Mallavarapu, A., Mitchison, T. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. **J. Cell Biol.** 146 p. 1097–1106, 1999.

Masliah, E., Fagan, A.M., Terry, R.D., Deteresa, R., Mallory, M., Gage, F.H. (1991) Reactive synaptosomes as assessed by synaptophysin immunoreactivity is associated with GAP-43 in the dentate gyrus of the adult rat. **Exp Neurol.** 113:131-142.

Mccune, S.K., Voigt, MM., Hill, JM. (1993) Expression of multiple alpha adrenergic receptor subtype messenger RNAs in the adult rat brain. **Neuroscience.** 57:145-151.

McGeorge, A.J., Faull, R.L. (1987) The organization and collateralization of corticostriate neurones in the motor and sensory cortex of the rat brain. ***Brain Res.*** 423:318–24.

McGeorge, A.J., Faull, R.L. (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. ***Neurosci.*** 29:503–37.

Mckeen, R.J., Hoke, A., Silver, J. (1995) Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. ***Exp Neurol.*** 136:32–43.

Mclaren, A. (2001) Ethical and social considerations of stem cell research. ***Nature.*** 414:129-131.

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

Mendez-Otero, R., De Freitas, G.R., André, C., De Mendonça, M.L., Friedrich, M., Oliveira-Filho, J. (2007) Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. ***Regen Med.*** 2:417-423.

Michael, T. F., Jerry, S. (2008) CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. ***Exp Neurol.*** 209:294-301.

Michaelsen, S.M., Levin, M.F. (2004) Short-term effects of practice with trunk restraint on reaching movements in patients with chronic stroke. ***Stroke.*** 35:1914-1919.

Ministério Da Saúde, Brasil. Saúde Brasil 2007: uma análise da situação de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. p. 641 , 2007.

Monfils, M.H., Plautz, E.J., Kleim, J.A. (2005) In search of the motor engram: motor map plasticity as a mechanism for encoding motor experience. *Neuroscientist*. 11 (5):471-483.

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

Napieralski, J.A., Butler, A.K., Chesselet, M.F. (1996) Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. *J Comp Neurol*. 373:484–497.

Ng, S., De La Monte, S.M., Conboy, G.L., Karns, L.R., Fishman, M.C. (1992) Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron*. 107:905-907.

Ng, S.C., De La Monte, S.M., Conboy, G.L., Karns, L.R., Fishman, MC. (1998) Cloning of human GAP-43: growth association and ischemic resurgence. *Neuron*. 1:133–139.

Nudo, R.J., Jenkins, W.M., Merzenich, M.M. (1990) Repetitive microstimulation alters the cortical representation of movements in adult rats. *Somatosens Mot Res*. 7: 463-483.

Orkin, S.H. (2000) Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet*. 1:57–64.

Palomero-Gallagher, N., Zilles, K. (2004) Isocortex. In: The rat nervous system. 3.ed. Elsevier, 729-757.

Pasterkamp, R.J., Anderson, P.N., Verhaagen, J. (2001) Peripheral nerve injury fails to induce growth of lesioned ascending dorsal column axons into spinal cord scar tissue expressing the axon repellent Semaphorin3A. *Eur J Neurosci*. 13:457–471.

Paxinos, G., Watson, C. (1986) The rat brain in the Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**.

Paxinos, G., Watson, C. (2004) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: **Academic Press**.

Perin, E.C., Dohmann, H.F., Borojevic, R., Silva, S.A., Sousa, A.L., Mesquita, C.T., Rossi, M.I., Carvalho, A.C., Dutra, H.S., Dohmann, H.J., Silva, G.V., Belem, L., Vivacqua, R., Rangel, F.O., Esporcatte, R., Geng, Y.J., Vaughn, W.K., Assad, J.A., Mesquita, E.T., Willerson, J.T. (2003) Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**. 107:2294-302.

Pieta, K., Mattila, e Pekka., Lappalainen. (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 9:446-454.

Rhodes, K.E., Fawcett, J.W. (2004) Chondroitin sulphate proteoglycans: preventing plasticity or protecting the CNS? **J Anat**. 204:33–48.

Robbins, N., Cotran. (2005) Patologia: Bases patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 1513.

Sanes, J.N., Donoghue, J.P. (2000) Plasticity and primary motor cortex. **Annu Rev Neurosci**. 23:393-415.

Saunders, SE., Kellett, E., Bright, K., Benjamin, PR., Burke, JF. (1992) Cell-specific alternative RNA splicing of an FMFamide gene transcript in the brain. **J Neurosci**. 12:1033-1039.

Schwindt, T.T., Barnabé, G.F., Mello, L.E.A.M. (2005) Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Bras Neurocirurg**. 16:13-19.

Sekhon L.H., Fehlings, M.G. (2001) Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine**. v. 26 p. S2-S12.

Shiomura, Y., Hirokawa, N. (1987) Colocalization of microtubule-associated protein 1A and microtubule-associated protein 2 on neuronal microtubules in situ revealed with double label immunoelectron microscopy. **J. Cell Biol.** 104:1575–1578.

Shyu, W.C., Lee, Y.J., Liu, D.D., Lin, S.Z., Li, H. (2006) Homing genes, cell therapy and stroke. **Front. Biosci.** 11:899–907.

Skene, J.H.P., Jacobson, R.D., Snipes, G.J., Macguire, C.B., Norden, J., Freeman, J.A. (1986) A protein induced during nerve growth, GAP-43, is a major component of growth cone membranes. **Science**. 233:783-785.

Soares, M.B., Lima, R.S., Rocha, L.L., Takyia, C.M., Pontes-De-Carvalho, L., De Carvalho, A.C., Robeiro-Dos-Santos, R. (2004) Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. **Am. J. Pathol.** 164:441-447.

Sprengers, R.W., Lips, D.J., Moll, F.L., Verhaar, M.C. (2008) Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. **Ann. Surg.** 247:411–420.

Steketee, M., Tosney, K.W. (2002) Three functionally distinct adhesions in filopodia: shaft adhesions control lamellar extension. **J. Neurosci.** 22:8071-8083.

Strauer, B.E., Brehm, M., Schannwell, C.M. (2008) The therapeutic potential of stem cells in heart disease. **Cell Prolif.** 41:126–145.

Strittmatter, S.M., Valenzuela, D., Kennedy, T.E., Neer, E.J., Fishman, M.C. (1990) Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. **Nature**. 344:836-841.

Strittmatter, S. M., Valenzuela, D., Sudo, Y., Linder, M. E., Fishman, M. C. (1991) An intracellular guanine nucleotide release protein for Go. **J. Biol. Chem.** 266:22465-22471.

Strittmatter, S., Valenzuela, D., Vartanian, D., Sudo, Y., Zuber, M., Fishman, M. (1991) Growth cone transduction: G, and GAP-43. **J. Cell Sci., Supp.** 15 p. 27-33.

Stroemer, R.P., Kent, T.A., Hulsebosch, C.E. (1992) Increase in synaptophysin immunoreactivity following cortical infarction. **Neuroscience Letters.** 147:21-24.

Stroemer, R.P., Kent, T.A., Hulsebosch, C.E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. **Stroke.** 26:2135–2144.

Stroemer, R.P., Kent, T.A., Hulsebosch, C.E. (1998) Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. **Stroke.** 29:2381–2393.

Strong, K., Mathers, C., Bonita, R. (2007) Preventing stroke: saving lives around the world. **Lancet Neurol.** 6(2):182-187.

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

Tetzlaff, W., Alexander, S.W., Miller, F.D., Bisby M.A. (1991) Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. **J Neurosci** 11:2528-2544.

Van Rossum, D., Hanisch, U.K. (2004) Microglia. **Metab Brain Dis.** 19(3-4):393-411.

Voorhies, A.C., Jones, T.A. (2002) The behavioral and dendritic growth effects of

focal sensorimotor cortical damage depend on the method of lesion induction. **Behav Brain Res.** 133:237–246.

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

Wang, Q.R., Wang, B.H., Huang, Y.H., Dai, G., Li, W.M., Yan, Q. (2008) Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells. **J. Cell. Biochem.** 103:21–29.

Weiller, C. (1998) Imaging recovery from stroke. **Exp Brain Res.** 123:13-7.

Weissman, I.L., Anderson, D.J., Gage, F.H. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 17:387–403.

Windle, W.F., Chambers, W.W. (1950) Regeneration in the spinal cord of the cat and dog. **J Comp Neurol.** 93:241–258.

Wolfe, C.D. (2000) The impact of stroke. **British Medical Bulletin.** 56 2:275-286.

Yoshida, M., Horimoto, H., Mieno, S., Nomura, Y., Okawa, H., Nakahara, K., Sasaki, S. (2003) Intra-arterial bone marrow cell transplantation induces angiogenesis in rat hindlimb ischemia. **Eur. Surg. Res.** 35:86–91.

Zuber, M.X., Strittmatter, S.M., Fishman, M.C. (1989) A membrane- targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. **Nature.** 341:345-348.