



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS**

**Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em ratos Wistar
submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação**

DÉBORA ABREU DA COSTA

PORTO ALEGRE

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS**

**Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em ratos Wistar
submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação**

DÉBORA ABREU DA COSTA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-Orientadora: Profa. Dra. Aline de Souza Pagnussat

Dissertação de mestrado acadêmico apresentado ao Programa de Pós-graduação de Ciências
Biológicas: Neurociências como requisito parcial para obtenção do título de mestre em
Neurociências

PORTO ALEGRE

2011

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Alexandre Netto pela orientação, confiança e ensinamentos;

À professora, Dra. e colega Aline Pagnussat por ter me recebido no laboratório, pela orientação, confiança e paciência. Sempre disposta a ajudar, ensinar, acalmar e sanar as diversas dúvidas existentes nestes anos;

À minha filha Rafaela, que me deu forças para continuar diante de todas as dificuldades;

Ao meu marido, pela força e paciência, por me agüentar com o meu “stress”, choro, falta paciência e de tempo. Sempre me incentivando com palavras positivas;

Aos meus Pais, pessoas simplesmente maravilhosas que me ajudaram muito e sempre me incentivaram a não desistir;

À Professora Dra. Patrícia Pranke e ao colega Gerson responsáveis pelo fornecimento das células-tronco;

Aos meus colegas de laboratório Janine, Cibele, Régis, Eduardo, Lígia, Joseane, Marilucia, Fabrício.

Aos alunos de fisioterapia da UFSCPA Daiana e Leonardo pela ajuda nas avaliações.

À UFRGS por oportunizar a realização deste trabalho e à CAPES pela bolsa concedida durante o período.

SUMÁRIO

ABSTRACT	XI
RESUMO	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fisiopatologia da Isquemia Cerebral	1
1.2 Isquemia e Células-Tronco	4
1.3 Atividades Motoras e Plasticidade	8
1.4 Plasticidade Neural e Recuperação da Funcionalidade	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Desenho Experimental	17
3.2 Modelo de Isquemia Focal Produzida Pela Administração de ET-I	19
3.3 Transplante de Células-Tronco	20
3.3.1 Células-tronco pulpaes de dentes decíduos	20
3.3.2 Cultura de células	21
3.4 Tarefa Motora	22
3.4.1 Tarefa de habilidade do alcance e preensão	22
3.5 Avaliação Comportamental	24
3.5.1 Teste do cilindro	24
3.6 Análise Morfológica	25
3.6.1 Perfusão	25
3.6.2 Área da lesão	26
3.6.3 Imunofluorescência	27
3.7 Análise Estatística	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Tarefa de Habilidade do Alcance	28
4.2 Teste do Cilindro	29
4.3 Área da Lesão	30
4.4 Análise Morfológica Qualitativa	32
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	39

7 PERSPECTIVAS.....	40
8 BIBLIOGRAFIA.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático representando eventos que ocorrem durante a isquemia cerebral	3
Figura 2. Cortes encefálicos demonstrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu)	9
Figura 3. Curso da plasticidade do córtex motor de roedores durante o aprendizado de tarefa de habilidade.	12
Figura 4. Reorganização do mapa motor cortical após 10 dias de treinamento de uma tarefa de habilidade e de não habilidade.	13
Figura 5. Desenho experimental.....	18
Figura 6. Caixa acrílica para realização da tarefa de habilidade do alcance e de preensão.	23
Figura 7. Teste do Cilindro.	25
Figura 8. Quantidade de esferas consumidas na tarefa de alcance e preensão.	29
Figura 9. Uso assimétrico dos membros anteriores no teste do cilindro.	30
Figura 10. Área da lesão 3 semanas após a cirurgia.	31
Figura 11. Fotomicrografias do grupo ICT obtidas a partir da região cortical de interesse.....	33

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Doação de Material Biológico. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE: Acidente Vascular Encefálico

AVD: Atividade de Vida Diária

AMS: Área motora suplementar

APM: Área pré-motora

ACM: Artéria cerebral média

AE: Ambiente enriquecido

bFGF: fator de crescimento fibroblástico básico

BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo

BMSC: Célula –tronco derivada de medula espinhal

CFA: área cortical caudal de representação do membro anterior

CTM: Célula-tronco mesenquimal

CT: Célula-tronco

DPSC: Célula-tronco derivada de polpa de dente

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EF: Exercício físico

EGF: fator de crescimento endotelial

ET-I: Endotelina 1

Fr: Isocórtex frontal

Fr1: Isocórtex frontal área 1

Fr2: isocórtex frontal área 2

GDNF: Fator neurotrófico derivado de célula glial

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GFP: Proteína verde fluorescente

I: Isquemia

IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1

M1: Córtex motor primário

MAP-2: Proteína associada amicrotúbulo 2

Neu-N: Proteína neuronal específica de neurônio

NF-L: Neurofilamento “leve”

NGV: Fator de crescimento neural

TH: Tarefa de habilidade

OMS: Organização Mundial da saúde

PBS: Tampão fosfato-salino

PFA: Paraformaldeído

RFA: Área cortical rostral de representação do membro anterior

SNC: Sistema nervoso Central

TF: tampão fosfato

VE: Ventrículo Esquerdo

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

VPT: Volume de perda tecidual

VRHN: Volume remanescente do hemisfério normal

VRHL: Volume remanescente do hemisfério lesado

ABSTRACT

Stroke is a disease with high mortality rate in Brazil. Most survivors of this disease remains some kind of sensory or motor disabilities, even after rehabilitation treatment. Evidence has suggested that rehabilitation by performing motor tasks of skill can induce behavioral changes and neurological damage in animals submitted to the CNS. These changes have also been observed in animals that carry out the transplantation of mesenchymal stem cells, since these cells have great capacity proliferation and differentiation, providing improved micro-environment in pathological affections of the CNS. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effects of therapy with mesenchymal stem cells derived from human tooth pulp in rats subjected to focal ischemia and treatment of rehabilitation by performing the skill task reach. For this purpose, 60 adult Wistar rats were initially adapted to the task of skill over a week and randomly distributed in the following experimental groups: Sham: n = 12, Ischemia-Vehicle: n = 12, ischemia-Cell: n = 12, Ischemia-Task-Vehicle: n = 12 and Ischemia-Cell-Task: n = 12. After, they underwent surgery to induce focal ischemia by administration of endothelin-1 in the striatum and motor cortex or vehicle (saline). One week after focal ischemia was performed intra-cardiac injection of mesenchymal stem cells in groups IC and ICT, and vehicle groups S, IV and IVT. The rehabilitation treatment for ICT and IVT groups began 24 hours after cell transplantation, being conducted over two weeks. The animals in groups S, IV and IC did not perform any type of motor task as a form of rehabilitation. The animals were tested in the cylinder test and sensorimotor performance in the pre-surgery, post-surgery and post-treatment. Concludes the treatment, the animals were deeply anesthetized and their brains were processed for morphological analysis. The results showed that cell therapy by infusion of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from human deciduous tooth pulp was not able to enhance sensorimotor recovery in animals subjected to focal ischemia. It was shown that the animals performed the task of skill, independent of cell transplantation showed better functional recovery, and decreasing the area of injured brain. It was also possible to observe the presence of MSCs, cells GFAP+ and NeuN+ in the region of ischemic penumbra, with little colocalization.

Based on these results, we conclude that the motor skill task, used as a form of rehabilitation, has the potential of reducing the area of ischemic infarction and recovery of motor function when administered alone or wide conjutno cell transplantation in the CMTs.

RESUMO

O AVE é uma doença com alto índice de mortalidade no Brasil. Grande parte dos sobreviventes desta patologia permanece com algum tipo de incapacidade sensório-motora, mesmo após o tratamento de reabilitação. Evidências têm sugerido que a reabilitação por meio da realização de tarefas motoras de habilidade podem induzir mudanças comportamentais e neurológicas em animais submetidos à lesão no SNC. Estas mudanças também têm sido observadas em animais que realizam o transplante de células-tronco mesenquimais, uma vez que essas células apresentam grande capacidade proliferação e diferenciação, propiciando melhora do microambiente em acometimentos patológicos do SNC. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente humano em ratos submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação por meio da realização da tarefa de habilidade do alcance. Para tanto, 60 ratos Wistar adultos foram inicialmente adaptados à tarefa de habilidade ao longo de uma semana e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: Sham: n=12, Isquemia-Veículo: n=12, Isquemia-Célula: n=12, Isquemia-Veículo-Tarefa: n=12 e Isquemia-Célula-Tarefa: n=12. Após, os mesmos foram submetidos à cirurgia de indução de isquemia focal por meio da administração de endotelina-1 no estriado e no córtex motor ou veículo (salina). Uma semana após a isquemia focal foi realizado a injeção intra-cardíaca de células tronco-mesenquimais nos grupos IC e ICT, e de veículo nos grupos S, IV e IVT. O tratamento de reabilitação para os grupos ICT e IVT teve início 24h após o transplante celular, sendo realizado ao longo de 2 semanas. Os animais dos grupos S, IV e IC não realizaram nenhum tipo de tarefa motora como forma de reabilitação. Os animais foram testados no teste do cilindro quanto ao desempenho sensório-motor nos períodos pré-cirurgia, pós-cirurgia e pós-tratamento. Encerrado o período de tratamento, os animais foram profundamente anestesiados e tiveram seus encéfalos processados para análise morfológica. Os resultados demonstraram que a terapia celular por infusão de células-tronco mesenquimais (CTMs), derivadas de polpa de dente decíduo humano não foi capaz de potencializar a recuperação sensório-motora em animais submetidos à isquemia focal. Foi evidenciado que os animais que realizaram a tarefa de habilidade, independente do transplante celular, apresentaram melhor recuperação funcional, além da diminuição da área encefálica lesada. Também foi possível observar a presença das CTMs, células GFAP+ e NeuN+ na região de penumbra isquêmica, com pouca co-localização.

Com base nesses resultados, concluímos que a tarefa motora de habilidade, utilizada como forma de reabilitação, tem potencial para induzir redução da área de infarto isquêmico e recuperação da motricidade ampla quando administrada isoladamente ou em conjunto ao transplante celular de CTMs.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fisiopatologia da Isquemia Cerebral

O Acidente vascular encefálico (AVE) é definido, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como um quadro clínico de perturbação focal ou global da função cerebral, de rápido desenvolvimento, supostamente de origem vascular, com sintomas que perduram após 24 horas ou mais, ou que levam à morte sem outra causa aparente a não ser de origem vascular (WHO, 1988).

No Brasil, as doenças cerebrovasculares estão entre as principais causas de óbitos, com uma incidência anual de 156 casos a cada 100.000 habitantes, apresentando um papel decisivo nos dispêndios da saúde e da previdência, além de influenciarem a qualidade de vida das pessoas acometidas e de seus familiares (RADANOVIC, 2000; SCHRAMM *et al.*, 2004). Além da mortalidade, um fator significativamente importante e que requer especial atenção é a incapacidade sensório-motora conseqüente a esta patologia, a qual permanece em cerca de 1/3 dos pacientes, mesmo após tratamento de reabilitação (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007).

Mais de 80% dos AVCs são conseqüência da oclusão permanente ou temporária de uma artéria principal ou secundária (RODRIGO *et al.*, 2005). O vaso mais comumente obstruído é a artéria cerebral média (ACM) principal ou suas ramificações profundas. A ACM é responsável por quase toda a irrigação sangüínea da superfície posterior do córtex cerebral, gânglios da base e região anterior e posterior da cápsula interna. Como conseqüências da obstrução desse vaso observam-se distúrbios sensório-motores distintos em membro superior, face, tronco e membro inferior (STOKES, 2004; DURUKAN & TATLISUMAK, 2007).

As conseqüências da interrupção parcial ou total da irrigação sangüínea ocorrem em função do encéfalo utilizar aproximadamente 25% da glicose total do corpo. Desta forma, é necessário uma grande quantidade de energia para manutenção de suas funções adequadas (HSU *et al.* 1991; PLASCHKE *et al.* 1998; LIU & LEVINE 2008). Por este motivo, o encéfalo é extremamente

sensível à isquemia, sendo necessário um constante aporte de oxigênio e glicose. O suporte de oxigênio ao tecido cerebral depende da taxa de fluxo sanguíneo e do conteúdo arterial de oxigênio. Uma redução em um desses fatores pode afetar gravemente a função cerebral, ocasionar alterações bioquímicas e moleculares, e manifestar-se como seqüela neurológica (RODRIGO *et al.*, 2005).

Em poucos minutos de oclusão vascular, o encéfalo passa por uma seqüência complexa de eventos fisiopatológicos espaciais e temporais que acontecem em certa ordem, interdependentes, e que são conjuntamente denominados de “cascata isquêmica”. As adaptações decorrentes da lesão ocorrem progressivamente, por várias horas ou até mesmo dias (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007). Os principais mecanismos patogênicos da cascata isquêmica incluem a falha energética (HUANG & MCNAMARA, 2004; MERGENTHALER *et al.*, 2004), a elevação dos níveis intracelulares de Ca^{++} (FISHER & SCHAEBITZ, 2000; McILVOY, 2005), a excitotoxicidade glutamatérgica (DIRNAGL *et al.*, 1999), a geração de radicais livres (LO *et al.*, 2003; MERGENTHALER *et al.*, 2004), o rompimento da barreira hematoencefálica (GARTSHORE *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1999) e a geração de mediadores inflamatórios (EMERICH *et al.*, 2002; DANTON & DIETRICH, 2003) e segundo-mensageiros envolvidos na morte celular programada (PHAN *et al.*, 2002; SCHALLER & GRAF, 2004; MERGENTHALER *et al.*, 2004) (fig 1).

Como conseqüência dos eventos componentes da cascata isquêmica, ocorre dano tecidual e morte celular. Esse dano é irreversível, a morte celular ocorre de forma desordenada e associada a processo inflamatório no centro da lesão. No tecido que circunda este local o dano é menor, possivelmente reversível devido à circulação colateral fornecida pelos vasos que circundam a artéria obstruída. Esta última região é denominada de “penumbra isquêmica” e serve como substrato para a reabilitação pós-isquemia (LIU *et al.*, 2010).

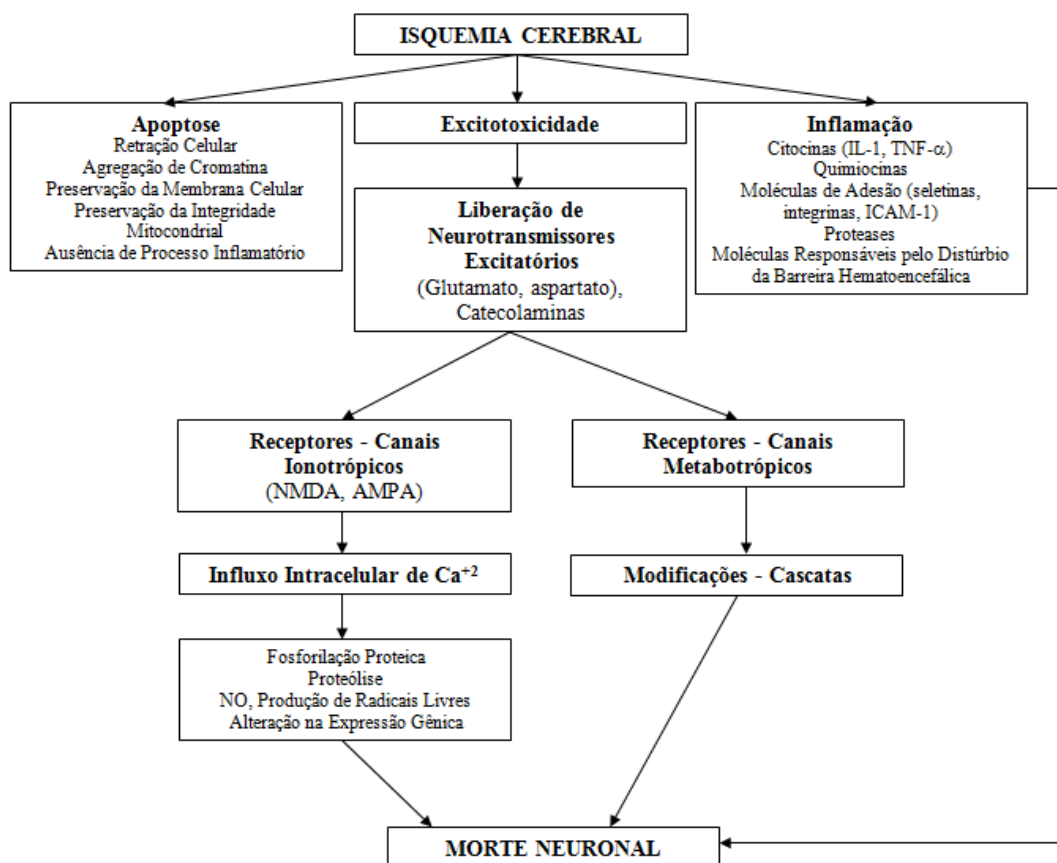


Figura 1. Diagrama esquemático representando eventos que ocorrem durante a isquemia cerebral (adaptado de HARUKUNI & BHARDWAJ, 2006).

O prejuízo da integridade das células neurais ou de suas vias de projeção, que ocorre após distúrbios da perfusão encefálica, é responsável pelo surgimento de sinais clínicos mais pronunciados no hemicorpo contralateral à lesão, os quais incluem perdas sensório-motoras variadas ou hemiparesia, incoordenação na atividade entre agonistas e antagonistas do movimento e fraqueza muscular (BOHANNON, 1990; BOHANNON, 1995; ANDREWS & BOHANNON, 2000). A morbidade relacionada à ocorrência do AVE é um aspecto de grande relevância. Grande parte dos pacientes que sobrevive à lesão permanece com algum grau de dependência na realização de suas atividades da vida diária (AVDs), mesmo após realização de terapia de reabilitação em tempo adequado (HENDRICKS et al, 2002; SCHAECHTER, 2004). A falha na recuperação das funções sensório-motoras e na reinserção do paciente às suas atividades cotidianas ocorre, em parte, pela recuperação

funcional incompleta da extremidade superior no hemicorpo acometido (DUNCAN et al., 1994; LEVIN et al., 2009).

1.2 Isquemia e Células-Tronco

Atualmente o tratamento usando terapia celular tem se mostrado uma grande esperança para pacientes e familiares portadores de doenças neurodegenerativas. O transplante de células tronco é uma interessante estratégia de tratamento, uma vez que o tecido lesado e a perda celular não podem ser completamente regenerados por progenitores endógenos (HICKS et al., 2009; HORNER e GAGE, 2000). Além disso, as células-tronco tem se mostrado eficazes devido à sua grande plasticidade, podendo se diferenciar em células idênticas às do tecido a ser tratado, induzindo recuperação das células perdidas e recuperação da função motora e cognitiva após o AVC (HICKS et al., 2009; HICKS et al., 2007; LAPERGUE et al., 2007; STEINDLER, 2007; LUI et al., 2006; KOMITOVA et al., 2005).

As células-tronco são caracterizadas por uma grande capacidade auto-replicação, ou seja, podem dividir-se para reproduzirem-se a si mesmas (auto-renovação) ou dar origem a células mais diferenciadas (diferenciação), produzindo progenitores de um ou mais tipos de células específicas (ZAGO & COVAS, 2006; LAPERGUE et al., 2007). Estas células são classificadas conforme sua origem em células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias são aquelas que, extraídas da massa celular interna do blastocisto, são capazes de dar origem aos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma. Desta forma, possuem a capacidade de originar todos os diferentes tecidos do corpo e são chamadas de totipotentes, quando provenientes do embrião até 3 dias, ou pluripotentes, quando provenientes do blastocisto (VERFAILLIE, 2002; WISLET-GENDEBIEN, et al, 2003; WALKER, et a.l, 2009). As células-tronco adultas são as que residem em todos os tecidos já formados, onde são parcialmente responsáveis pela manutenção da homeostase e resposta a estímulos nocivos. São também denominadas células-tronco somáticas e apresentam uma

capacidade limitada de diferenciação, em geral restrita ao tecido de que deriva (ZAGO & COVAS, 2006; WALKER, et al., 2009).

No tecido encefálico maduro, as células-tronco adultas são encontradas no giro denteado do hipocampo e na zona subventricular, ao longo das paredes dos ventrículos laterais (VOCCARINO et al., 2001; HAAS et al., 2005; KOMITOVA et al. 2005; HICKS et al., 2007). Em situações de lesão, estas células tendem a migrar para o local, com o objetivo de minimizar o dano tecidual. Mas, uma vez que apresentam limitada capacidade de auto-reparação e de geração de novos neurônios funcionais, não conseguem reparar a perda celular de forma completa após lesão (BJORKLUND & LINDVALL, 2000; LOCATELLI et al., 2009).

Devido às dificuldades técnicas e éticas ao uso de células-tronco fetais e embrionárias, fontes alternativas para terapia celular vêm sendo vastamente procuradas. As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem capacidade de diferenciação em diversos tecidos, de ultrapassar a barreira hematoencefálica do encéfalo lesado e de migrar para o local da lesão, sem prejudicar a arquitetura cerebral. As CTMs podem ser obtidas de qualquer tecido e apresentam capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos, hepatócitos e neurônios (KOPEN et al., 1999; SANCHEZ-RAMOS et al, 2000; ZAGO & COVAS, 2006). *In vitro*, as CTMs derivadas de medula óssea, na presença de BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) são capazes de expressar nestina, proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e proteína nuclear específica de neurônios (NeuN) (SANCHEZ-RAMOS et al, 2000). O transplante de CTMs em tecido neural proporciona diversos benefícios neurológicos, os quais incluem o incremento da neurogênese, a indução de angiogênese e sinaptogênese, além de benefícios que contribuem para a recuperação funcional por meio da ativação de cascatas envolvidas na neuroreparação e neuroproteção. Esses efeitos ocorrem por modulação do processo inflamatório, inibição da morte celular programada e/ou estimulação intrínseca de reparo e regeneração em fase aguda e crônica após o AVE (CHEN et al., 2003; CHEN & CHOPP; 2006).

As CTMs podem ser obtidas de várias fontes. Um tipo de CTM que vem sendo vastamente estudada é a derivada de polpa de dente (DPSC). Essa é uma fonte atrativa, tendo em vista a facilidade na obtenção, não sendo

necessário nenhum tipo de procedimento invasivo ou doloroso. Este tipo de tecido permite o transplante autólogo, superando assim, os problemas imunológicos (DELCROIX et al., 2010; YALVAC et al., 2009). Tem sido demonstrado que as células-tronco derivadas de polpa de dente atuam de modo similar as células-tronco derivadas de medula óssea (BMSC), promovendo, em encéfalos lesados, a proliferação, o recrutamento e a maturação de células progenitoras endógenas por meio da modulação do microambiente local (HUANG et al., 2008). Essas células, quando em cultura, possuem alta capacidade proliferativa e são capazes de expressar marcadores neuronais e gliais, tais como proteína associada a microtúbulo 2 (MAP-2), neurofilamento “*Light*” (NF-L), proteína ácida glial fibrilar (GFAP), nestina e proteína *tau*. Também apresentam capacidade expressar fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado de célula glial (GDNF), BDNF e fator de crescimento neural (NGF) (KARAÖZET al., 2009; YANG et al., 2009). É justamente a produção de fatores de crescimento pelas CTMs, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), VEGF, fator de crescimento neural (NGF), BDNF e fator de crescimento epidermal (EGF), um dos principais mecanismos que levam à recuperação tecidual/funcional por meio da promoção do remodelamento glial, neuronal e vascular (LI & CHOPP, 2009). A modulação de quimiocinas neuroprotetoras e da resposta imune e inflamatória é outro mecanismo envolvido na proteção neuronal após evento isquêmico e terapia com CTMs (RE et al., 2006; MADRIGAL ET AL., 2009).

A literatura demonstra que, após a isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média e a realização de transplante de DPSC ocorre migração destas células para a região peri-infarto, diminuição da zona isquêmica e do déficit motor. Além disso, estas células também proporcionaram a liberação de fatores neurotróficos e promoveram a migração e diferenciação de células progenitoras neurais endógenas na zona subventricular (SUGIYAMA et al, 2011).

As células-tronco podem ser administradas por diversas vias: intracerebral, intraventricular, intravenosa (em vaso periférico ou diretamente no coração) (PSALTIS et al., 2010). Quando injetadas intravenosamente migram diretamente para o local da lesão, ultrapassando a barreira hematoencefálica e penetrando profundamente no parênquima do tecido lesado (PAVLICHENKO et al., 2008; LOCATELLI et al., 2009). A infusão direta

no coração, através do ventrículo esquerdo (VE), tem ação similar à injeção intravenosa, atuando sistemicamente e tendendo a migrar para o local da lesão (HU et al., 2010; PSALTIS et al., 2010). Essa migração ocorre devido à produção, pelo encéfalo lesado, de quimiocinas, como fator derivado de estroma 1 (SDF1), o qual se liga ao receptor CXCR4 presente nas CTMs (MEZEY et al., 2000 e 2003). O período agudo pós-lesão é o momento em que o cérebro encontra-se mais sensível para a reabilitação, maximizando os ganhos funcionais por meio do transplante celular e da reabilitação física (BIERNASKIE et al., 2004; LAPERGUE et al., 2007).

Terapias de reabilitação, como o exercício físico (EF) e o ambiente enriquecido (AE) podem influenciar positivamente a diferenciação e migração de células-tronco, gerando maiores benefícios funcionais do que o transplante de células por si só (HICKS et al., 2009; KIM et al., 2006). Em estudo realizado por Hicks e colaboradores (2007), utilizando modelo de isquemia focal por oclusão da artéria cerebral média (ACM), animais que receberam células transplantadas e foram submetidos à AE e EF apresentaram recuperação funcional significativamente maior do que aqueles não submetidos ao tratamento motor. Além disso, a realização de atividade exerceu influência positiva em relação à sobrevivência e migração das células transplantadas para o foco da lesão.

O modelo de isquemia cortical por ligação do ramo distal da ACM demonstra que animais expostos ao AE apresentam aumento da proliferação de células progenitoras neurais, células-tronco neurais e precursores neurais na zona subventricular, migração celular para o local da lesão e melhora funcional após cinco semanas pós-isquemia (KOMITOVA et al., 2007). A realização de EF associado ao transplante de células-tronco (intravenoso ou no espaço subdural da área perilesional) apresenta resultados positivos em relação à recuperação funcional na primeira semana após a isquemia. No entanto, em períodos mais longos (4 semanas de tratamento), o desempenho motor é superior nos animais em que as células foram transplantadas na região peri-lesional (KIM et al., 2006).

1.3 Atividades Motoras e Plasticidade

O córtex motor primário é anatomicamente e fisiologicamente organizado de forma adequada para aquisição e desempenho de tarefa de habilidade (ITO et al., 2002) É uma região circunscrita do lobo frontal, localizada à frente do sulco central, e organizado em uma rede neuronal altamente especializada e interconectada com outras estruturas, que controla o movimento de todas as articulações do corpo. A ativação correta e coordenada desta rede neuronal possibilita a realização de movimentos finos e complexos, como os de alcance e preensão de objetos (KANDEL et al.; 2003; ADKINS et al., 2006;).

Em humanos, o córtex motor pode ser dividido em três principais regiões: o córtex motor primário (M1), área motora suplementar (AMS) e área pré-motora (APM). A AMS e APM estão envolvidas no planejamento da atividade motora, enquanto M1 é um dos principais sítios de origem do trato córtico-espinal lateral, sendo uma área que recebe densas aferências da AMS e APM. A M1, também se mantém organizada em grupamentos neuronais altamente especializados no controle do movimento de cada segmento corporal. Em roedores, o córtex sensório-motor é denominado de isocórtex frontal (Fr) e se caracteriza por ser uma estrutura de heterogeneidade celular e que pode ser dividida de acordo com suas características morfológicas, neuroquímicas e de padrões de conexões em três áreas: Fr1 (M1), Fr2 (M2) e Fr3 (Fig.2). Comparando-se as regiões do córtex dos roedores, a área M1 corresponde ao córtex motor primário de primatas, a área M2 corresponde à APM e à AMS, enquanto Fr3 seria uma subregião da representação somatotópica. Essas regiões possuem uma estrutura organizada de forma que os corpos celulares estejam arranjados em camadas ou lâminas, mas nem todos os locais do córtex são idênticos, por exemplo, o córtex motor primário não possui camada de células granulares (camada IV), sendo chamado de córtex agranular (KANDEL et al; 2003; BEAR et al.; 2006).

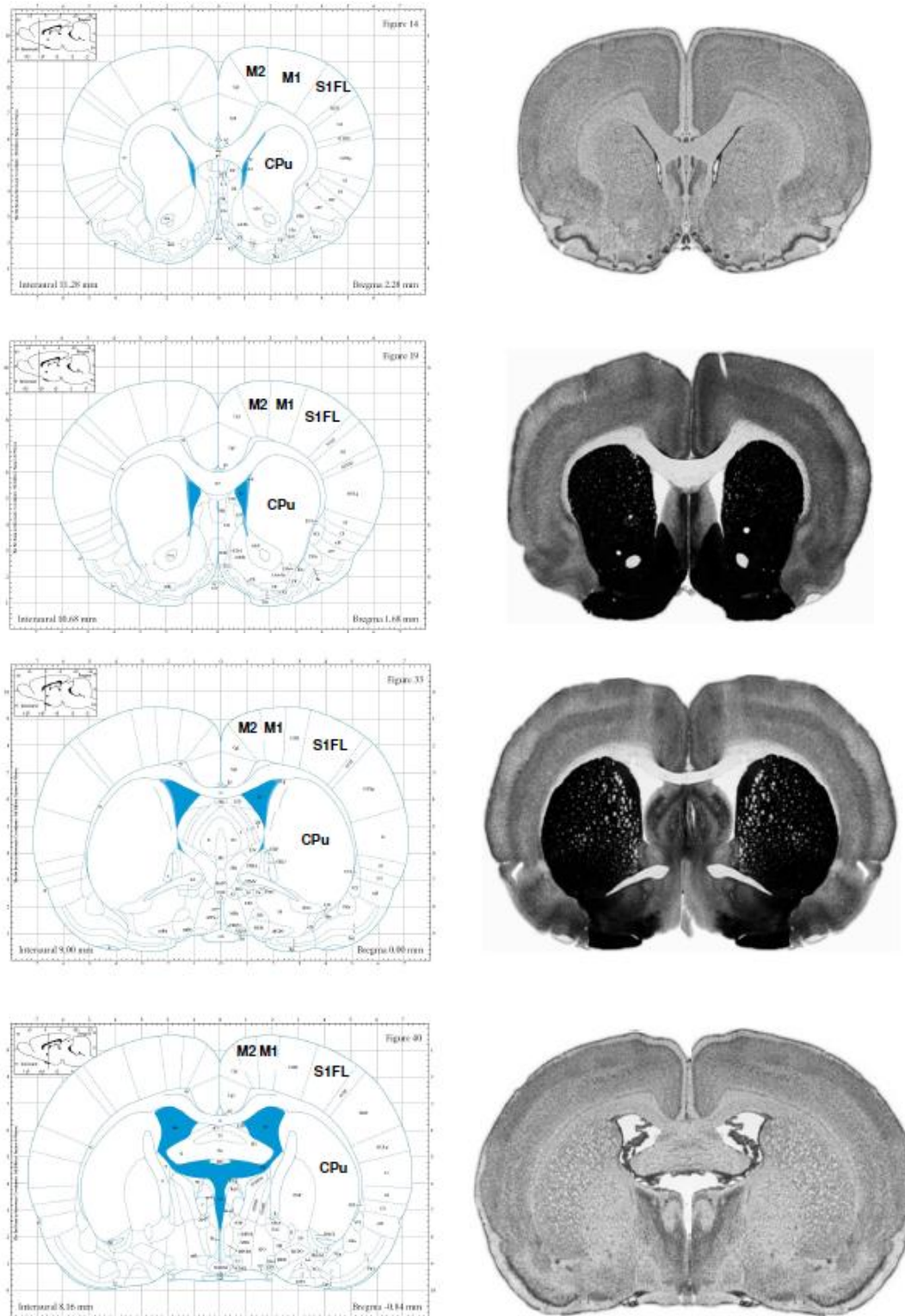


Figura 2. Cortes encefálicas demonstrando o córtex motor (M1 e M2), área cortical de representação primária do membro anterior (S1FL) e o estriado (CPu) (adaptado de PAXINOS & WATSON, 2004).

Além do córtex, outras regiões subcorticais são envolvidas com o controle e ajuste motor, entre elas os gânglios da base e o cerebelo. O estriado é a principal estrutura de entrada de informações dos gânglios da base. É dividido em estriado dorsal (núcleo caudado e putâmen), o qual recebe aferências do córtex motor, córtex pré-motor, substância negra compacta e núcleo rubro, e envia informações para o globo pálido, substância negra reticulada e compacta, núcleo rubro, área tegmental ventral, hipotálamo e estriado ventral (núcleo acumbens). O estriado é relacionado às funções motoras voluntárias, estando envolvido na iniciação e seqüenciamento do comportamento motor (BEAR et al., 2006). As adequações ao planejamento do movimento são elaboradas no cerebelo, a partir de informações trazidas do córtex por meio da via córtico-ponto-cerebelar. Uma vez iniciado o movimento, o cerebelo, através de suas múltiplas aferências sensoriais é informado das características do movimento em execução e promove as devidas correções no movimento pretendido, agindo sobre áreas motoras corticais. Desta forma, a informação correta acerca do movimento é transmitida por meio do trato córtico-espinhal à medula espinhal e tronco encefálico (MACHADO, 2000; BEAR et al., 2006; STOODLEY et al., 2010).

Os córtices sensorial e motor organizam-se de modo a formar um mapa somatotópico funcional, que exhibe altos níveis de plasticidade uso-dependente, ou seja, pode ser modificado pela experiência (NUDO et al., 1996). O mapa motor possibilita aprendizado e expressão do movimento e, então, representa o tipo de engrama motor. Este mapa é organizado por meio de quatro princípios principais, os quais estão envolvidos na codificação da habilidade motora pelo córtex: 1) *somatotopia fraturada* – movimentos individuais são representados diversas vezes e são espalhados com representações de movimentos adjacentes através de regiões corticais discretas, 2) *interconectividade* – neurônios corticoespinhais de áreas corticais adjacentes são densamente interconectados via redes intracorticais, 3) *área de igual habilidade* – movimentos com alto grau de habilidade são facilmente evocados em resposta a estimulação e ocupam uma grande proporção do mapa, 4) *plasticidade* – a topografia do mapa motor é altamente dinâmica e pode mudar rapidamente em resposta a uma variedade de estímulos (MONFILS et al., 2005).

Dessa forma, quando alguma região do córtex é destruída por isquemia, o engrama motor é perdido e a única forma de alcançar a recuperação pode ser a substituição dos circuitos perdidos através do desenvolvimento de estratégias inovadoras associadas à reabilitação clássica (CARMICHAEL, 2008; HICKS et al., 2008). A associação, após a isquemia, de reabilitação física e terapias como o transplante celular, demonstram melhora funcional significativa assim como do microambiente cerebral (aumento da sobrevivência de astrócitos e diminuição da proliferação microglial) (KEINER et al., 2008).

Existem diversas evidências de que o treinamento físico induz adaptações estruturais e funcionais em diversas áreas encefálicas relacionadas ao controle motor, como córtex motor, gânglios da base, cerebelo e núcleo rubro (CONNER et al., 2003; VAZQUEZ et al., 2004; GRAYBIEL et al., 2005; GRAZIANO, et al 2006). A aquisição e refinamento de seqüências de movimento envolvidos em tarefas de habilidade envolvem modificações na conectividade da rede neuronal (MONFILS et al., 2005). Essas adaptações incluem ajustes na síntese de proteínas (HERNANDEZ et al., 2006), no número e efetividade das sinapses (KLEIM et al., 1998), além de alterações na representatividade cortical dos segmentos treinados (Fig. 3) (MONFILS, et al., 2005).

Estudos em roedores demonstraram que a representação no córtex motor, do membro treinado em tarefa de habilidade de alcance e preensão, expande-se durante o aprendizado da tarefa e volta a níveis basais quando o treinamento é interrompido. Entretanto, se as novas sinapses formadas foram suficientemente fortalecidas, a habilidade motora é mantida (MOLINA –LUNA et al., 2008). A expansão das áreas de representação ocorre de forma paralela ao melhor desempenho motor durante a realização da tarefa de habilidade proposta, o que também tem sido evidenciado em primatas (Fig. 4) (KLEIM et al., 1998). Em humanos, estudos que utilizam ressonância magnética funcional permitem a visualização do aumento da atividade cortical durante a realização de tarefas complexas em pacientes que sofreram AVC. Esta reorganização do mapa motor é observada em duas etapas: a primeira ocorre concomitante à recuperação inicial (até os 4 meses pós AVC) e a outra durante o período em que o paciente encontra-se clinicamente estável (de 4 a 12 meses pós AVC) (TOMBARI et al., 2004).

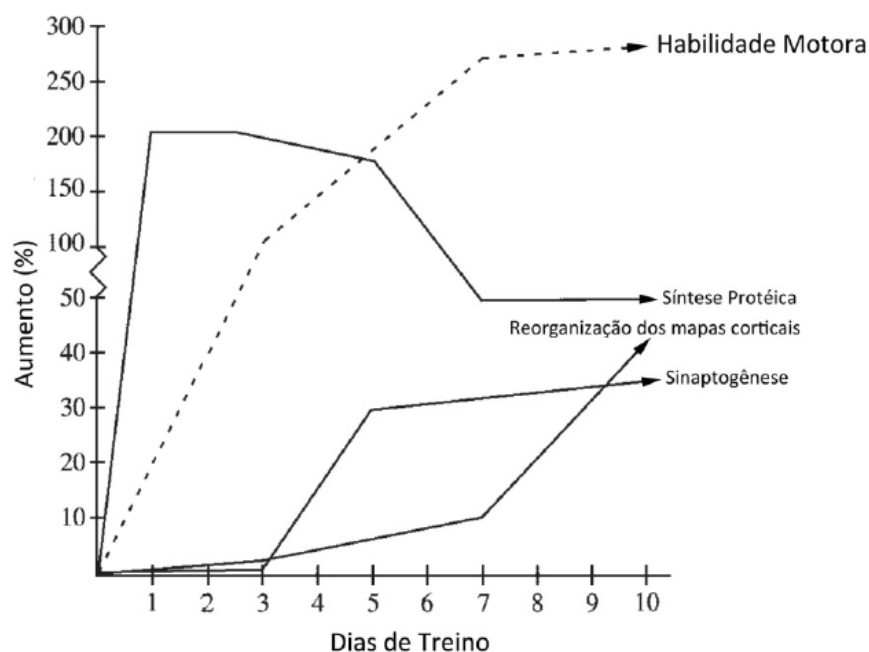


Figura 3. Curso da plasticidade do córtex motor de roedores durante o aprendizado de tarefa de habilidade. As medidas são expressas como porcentagem em relação aos níveis pré-treino, obtidos de animais intactos (adaptado de ADKINS et al., 2006).

A terapia orientada à tarefa baseia-se no re-treinamento de atividades funcionais por meio da utilização e inter-relação de múltiplos sistemas, incluindo o músculo-esquelético, perceptivo e cognitivo. Estudos de neuroimagem sugerem que os ganhos funcionais em pacientes hemiparéticos obtidos por meio do treinamento orientado à tarefa, possivelmente sejam devido ao restabelecimento do controle exercido pelo córtex sensório-motor ipsilateral à lesão. Nesses casos, ocorreria um aumento na atividade no córtex sensório-motor primário ipsilesional e uma redistribuição da atividade em diversas áreas da rede sensório-motora (SCHAECHTER, 2004). Por outro lado, o simples aumento no uso do membro anterior, obtido pela repetição de uma tarefa de baixa complexidade, não é capaz de promover tal reorganização cortical. Essas evidências foram observadas em investigações onde roedores eram submetidos a tarefas de baixa complexidade, como pressionar uma barra (*running Wheel*) (KLEIM et al., 2002) ou após sessões de fortalecimento do membro anterior (REMPLE et al., 2001). Contudo, muitos dos mecanismos

celulares que fundamentam a plasticidade sináptica e a concomitante alteração dos mapas corticais ainda não foram completamente esclarecidos, principalmente na presença de lesões ou doenças que comprometam estruturas encefálicas importantes para o controle motor (MONFILS et al., 2005).

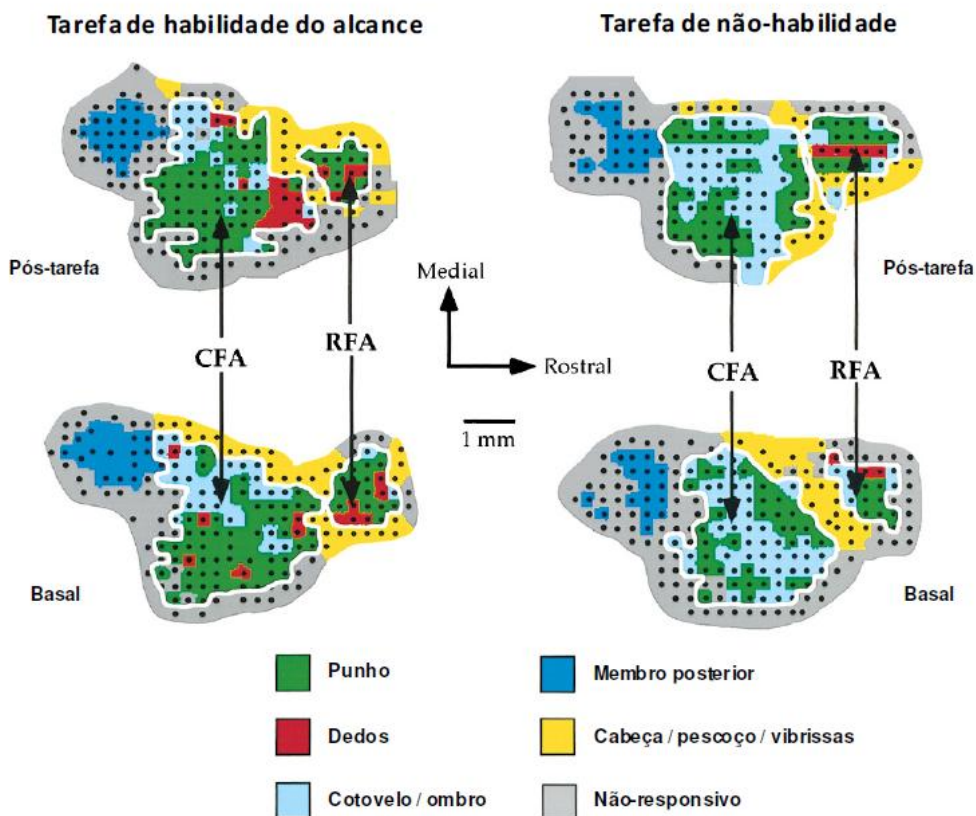


Figura 4. Reorganização do mapa motor cortical após 10 dias de treinamento de uma tarefa de habilidade (alcance e prensão) e de não habilidade (repetição de um movimento de baixa complexidade). As áreas de representação do punho e dos dedos (verde e vermelho, respectivamente) expandem-se dentro da área de representação do ombro e do cotovelo (azul) nos animais que realizaram tarefa de habilidade o que não é evidenciado nos animais que realizam a simples repetição de um movimento de baixa complexidade. CFA: Área cortical caudal de representação do membro anterior. RFA: Área cortical rostral de representação do membro anterior (adaptado de KLEIM et al., 1998).

1.4 Plasticidade Neural e Recuperação da Funcionalidade

A função do membro superior é crítica para o desempenho eficiente e independente nas atividades de vida diária (AVD's) e sua reabilitação após o AVC mantém-se como um alvo de estudo, uma vez que se mostra resistente à recuperação funcional (NAKAYAMA et al., 1994). Estudos epidemiológicos indicam que em mais de 60% dos pacientes hemiplégicos o membro superior permanece parético, com limitação acentuada da função, seis meses após o insulto isquêmico, enquanto apenas 5% a 20% demonstram recuperação funcional completa (KWAKKEL et al., 2003). Em modelos animais de isquemia focal, a habilidade do membro anterior contralateral ao hemisfério lesado é prejudicada, não sendo recuperada no decorrer de 15 dias, nos modelos mais brandos, até a completa incapacidade de realizar a tarefa de alcance após a utilização de protocolos mais agressivos, com lesão isquêmica simultânea do córtex sensorio-motor e do estriado (WINDLE et al., 2006).

O perfil da reabilitação motora é caracterizado por uma grande variabilidade interindividual, entretanto, pode ser influenciada por uma série de fatores biológicos e ambientais. Existem fortes evidências de que os melhores resultados terapêuticos dependem da escolha e execução adequada da atividade motora (MICHAELSEN et al., 2006; THIELMAN et al., 2004), intensidade e frequência do tratamento, assim como do início precoce de reabilitação (HUANG et al., 2009). A reabilitação após pequenas lesões isquêmicas provoca reorganização do tecido cortical adjacente e alterações nos mapas corticais (NUDO et al., 1996), expressão de proteínas e modificações na morfologia dendrítica (GONZALES et al., 2003). Essas modificações sinápticas e dos circuitos neurais ocorrem devido à relação direta com a recuperação motora das funções perdidas, sendo conhecida como 'neuroplasticidade' (CAURAUGH & SUMMERS, 2005).

Alguns pacientes após AVC apresentam algum grau de recuperação espontânea, a qual pode ser aumentada por intervenções terapêuticas (GONZALES et al., 2003; MACLELLAN et al., 2006; MURPHY & CORBETT, 2009; MESTRINER et al., 2011) que visam otimizar fenômenos neuroplásticos presentes neste período, o que poderia contribuir para melhor recuperação

funcional (BIERNASKIE et al., 2005; MACLELLAN et al., 2006). Estudos em humanos evidenciam também que esta recuperação funcional espontânea, que ocorre durante os primeiros meses após o insulto isquêmico, é um processo atribuído a uma série de fatores que incluem mudanças compensatórias no hemisfério lesado; organização funcional do tecido cortical que circunda a área lesada; ativação de áreas motoras no hemisfério não lesado; e a ativação aumentada de áreas motoras “não primárias”, tais como AMS, córtex parietal inferior, cíngulo, ínsula e cerebelo (BIERNASKIE et al., 2005; CAURAUGH & SUMMERS, 2005; MACCIOCCHI et al., 1998).

Tendo em vista que o AVC é uma das maiores causas de morte e incapacidade no mundo, e que não existem drogas efetivas para o seu tratamento, a terapia com células-tronco tem se mostrado uma estratégia promissora, pois contribui para diminuir o risco de um novo AVC e potencializa o aumento da recuperação, conquanto o período para o transplante seja adequado (HAAS et al., 2005). As células-tronco transplantadas atuam de forma a promover a melhora do microambiente encefálico, facilitando e aumentando a neurogênese, vasculogênese, expressão de fatores de crescimento (IGF-1, VEGF, EGF e bFGF), expressão de proteínas (MAP-2, GFAP, Neu-N, NG-2, Nestina,). A terapia celular também é capaz de promover a melhora funcional em animais que sofreram oclusão da ACM, comprovada através de testes comportamentais (BANG et al., 2005; HICKS et al., 2007; LAPERGUE et al., 2007; SHEN et al., 2007; WAKABAYASHI et al., 2010). Dados demonstram que o transplante de células tronco (SOLOKOVA et al., 2006; HICKS et al., 2009; YANG et al., 2009), o tratamento de reabilitação funcional (BIENARSKIE e CORBETT, 2001) ou a exposição a ambiente enriquecido (HICKS et al., 2008; HICKS et al., 2009), induzem melhora da recuperação após o AVE, impactando positivamente sobre a qualidade de vida, atividades funcionais e de vida diária.

Com base nestes dados, e tendo como referência estudos prévios que utilizaram metodologia semelhante, acredita-se que o transplante de célula-tronco derivada de polpa de dente humano associado à realização de tarefa motora de habilidade irá ampliar a recuperação sensório-motora e reduzir o dano morfológico após a isquemia focal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da terapia com células-tronco derivadas de polpa de dente humano em ratos Wistar adultos submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação.

2.2 Objetivos Específicos

- 1.** Avaliar a recuperação da função motora ampla do membro contralateral à lesão, por meio do teste do Cilindro.
- 2.** Verificar morfológicamente a área da lesão isquêmica e adjacências, nos diferentes grupos experimentais, por meio de análise por microscopia óptica.
- 3.** Analisar qualitativamente as células GFAP+, NeuN+ e CTMs nas regiões adjacentes à lesão isquêmica nos diferentes grupos experimentais, por meio de análise por microscopia confocal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Foram utilizados 60 ratos Wistar adultos provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com 60 dias de vida ao início dos experimentos. Os animais permaneceram em grupos de 5 em caixas de acrílico sob condições padrão (ciclo de 12 h claro/escuro) e controle da temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$). Água e comida foram fornecidas à vontade, exceto durante a realização dos testes comportamentais, conforme será descrito posteriormente. Para o manejo dos animais seguiu-se a Lei n.º 6.638 de 08 de maio de 1979, a qual regulamenta o uso de animais para a prática didática-científica. Este projeto, número 17743 foi aprovado pelo comitê de ética da UFRGS em dezembro de 2010.

Os animais foram treinados e habituados durante uma semana na caixa utilizada para a realização da tarefa de habilidade, uma vez ao dia, durante 40 minutos. Nas 24h precedentes ao início do período de treinamento os animais permaneceram em restrição alimentar total, a fim de aumentar o interesse pelo alimento novo fornecido. A partir do primeiro dia de treinamento, os animais foram mantidos em regime de restrição parcial de alimento, quando foram fornecidos 12-15 g de ração padrão por animal todos os dias, ao final da realização da tarefa. O peso dos animais foi controlado semanalmente, a fim de que não ultrapassasse o limite de 80 a 90% do peso corporal inicial, quando em alimentação livre.

Após uma semana de treino, tendo como referência o desempenho na tarefa de habilidade do alcance e prensão (quantidade de glóbulos consumidos e pata de preferência), os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

(a) Sham (S) [n=12] – submetidos ao procedimento cirúrgico com injeção de veículo (salina) e procedimento para terapia por células-tronco com injeção de veículo (salina);

(b) Isquemia – Veículo (IV) [n=12] – submetidos ao procedimento cirúrgico com injeção de ET – I, procedimento para terapia por células-tronco com injeção de veículo (salina). Não submetidos a tratamento de reabilitação física;

(c) Isquemia – Célula-tronco (IC) [n=12] – submetidos à isquemia focal e terapia por células-tronco mesenquimais;

(d) Isquemia – Veículo – Tarefa de habilidade (IVT) [n=12] – submetidos à isquemia focal, procedimento para terapia por células-tronco com injeção de veículo e tratamento motor por tarefa de habilidade;

(e) Isquemia – Células-tronco - Tarefa de habilidade (ICT) [n=12] – submetidos à isquemia focal, terapia por células-tronco mesenquimais e tratamento motor por tarefa de habilidade;

Nos dois dias anteriores ao procedimento cirúrgico os animais retornaram à alimentação livre. Todos os animais foram avaliados na semana anterior e nos dois dias posteriores à cirurgia no Teste do Cilindro. No 7º dia pós-operatório foi realizada a infusão de células-tronco. O tratamento de reabilitação motora iniciou 24h após a infusão (no 8º dia pós-operatório). Ao longo de 2 semanas, os animais pertencentes aos grupos IVT e ICT foram submetidos à tarefa motora de habilidade (alcance e preensão de pequenas esferas comestíveis). Os grupos S, IV e IC foram manipulados diariamente, permaneceram no mesmo regime de restrição alimentar e receberam a mesma quantidade de alimento doce que os grupos tratados. O teste do cilindro foi realizado antes, após a isquemia e ao final da segunda semana de tratamento.

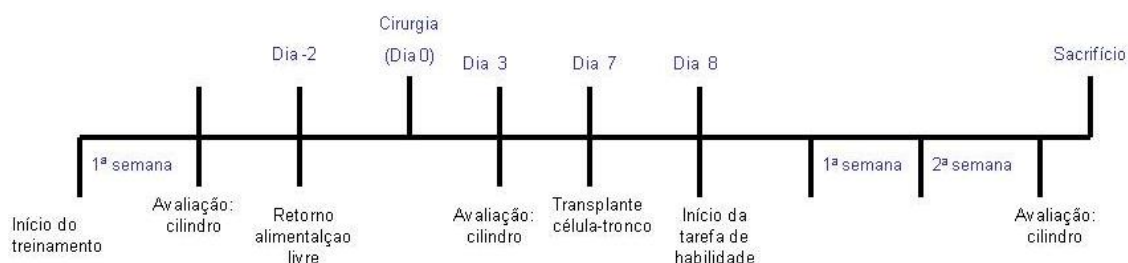


Figura 5. Desenho experimental.

3.2 Modelo de Isquemia Focal Produzida Pela Administração de ET-I

Para a indução da isquemia focal foi utilizado o modelo de isquemia produzido pela injeção de ET-I no córtex motor e no estriado (WIDLE et al., 2006). A endotelina-I é um potente peptídeo vasoconstritor, que quando injetado diretamente no tecido cerebral reduz o fluxo sanguíneo local levando a isquemia tecidual (FUXE et al., 1997).

Após serem anestesiados com halotano (indução 4%, manutenção de 1,5 a 2%, diluído em 70% N₂O e 30% O₂) por meio de vaporização em aparato de anestesia inalatória (narcosul), os animais foram acomodados em posição ventral no aparelho estereotáxico. Realizou-se a tricotomia na região dorsal da cabeça do animal, assepsia com álcool etílico 70%, e incisão na linha média de aproximadamente 0,5 cm sobre a pele para exposição da calota craniana. Com o auxílio de uma broca odontológica (Beltec LB100) foi realizado um pequeno orifício, se diâmetro suficiente a permitir a passagem da seringa de injeção estereotáxica (Hamilton[®], nº 26, USA). A isquemia foi induzida no córtex motor e estriado contralateral à pata de melhor desempenho no treinamento da tarefa de habilidade, por meio da micro-injeção de 2µL de ET-I (1200pmol) ET-I, seguindo as coordenadas estereotáxicas: [Inj1) + 0,7 mm anterior, ± 3,8 mm lateral e -6,0 mm ventral e Inj2 +1,5 mm anterior, ± 2,0 mm lateral e -2,0 mm ventral (PAXINOS & WATSON, 2004). A taxa de injeção de ET-I foi de 1µL /2min, com 1 min de intervalo entre cada µL. Antes da retirada da seringa esperou-se 3 min adicionais, a fim de minimizar possível refluxo da droga (SHARKEY et al., 1993; SHARKEY & BUTCHER, 1995). Nos animais pertencentes ao grupo sham foi injetado o mesmo volume do diluente (salina). Todo o procedimento cirúrgico foi realizado mediante controle da temperatura retal (termômetro retal - Letica, Espanha), devendo permanecer entre os limites de 36.5 a 37.5°C. Ao final do procedimento a incisão foi suturada com fio de nylon cirúrgico e foram tomados os devidos cuidados pós-operatórios (administração de analgésico e facilitação do acesso à alimentação).

No 1º dia pós-operatório, os animais foram examinados quanto ao sucesso do procedimento cirúrgico e conseqüente prejuízo motor. Todos os animais injetados com ET-I deveriam exibir adução-retração da pata anterior

contralateral ao hemisfério lesado e apresentar rotação espontânea na direção contralateral ao hemisfério lesado quando segurados pela cauda (WHISHAW et al., 1986).

A localização topográfica do infarto isquêmico, a qual tipicamente inclui região lateral do córtex e estriado lateral (caudado, putâmen), bem como a extensão da lesão foram mensuradas pela avaliação histológica das áreas não infartadas no hemisfério lesado e não lesado, por meio da técnica de coloração por hematoxilina-eosina, descrita posteriormente. Essas áreas foram utilizadas para calcular valores correspondentes ao volume do hemisfério remanescente, tecido cortical e estriatal.

3.3 Transplante de Células-Tronco

3.3.1 Células-tronco pulpares de dentes decíduos

As células-tronco utilizadas neste estudo foram fornecidas pela Faculdade de farmácia da universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e obtidas a partir do tecido pulpar de um dente decíduo humano. A criança esteve em atendimento no Ambulatório de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da UFRGS, sendo o motivo da extração um critério julgado pelo cirurgião-dentista responsável pelo tratamento da criança e não pelo pesquisador. O dente hígido possuía metade de sua raiz reabsorvida pelo processo rizólise e a criança apresentava bom estado geral de saúde. Os responsáveis assinaram um Termo de Doação de Material Biológico (Anexo I), o qual informava sobre a doação do dente extraído para a realização do experimento.

As células que não foram utilizadas nos experimentos foram colocadas em sacos brancos identificados como material biológico para que fosse realizado seu descarte, sendo posteriormente recolhidos por empresa especializada – ABORGAMA.

3.3.2 Cultura de células

A manipulação do dente após a extração e dos fragmentos de tecido pulpar deles removidos foi realizada e orientada pelo processamento descrito por Bernardi em 2009, para cultura de células pulpares de dentes decíduos em processo de rizólise. Seguindo essa metodologia, após coletado, o dente foi colocado em um frasco contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Gibco/NY) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 2,5µg/mL de anfotericina B (fungizone, Gibco) para transporte até uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis.

Na capela de fluxo laminar, todo o tecido pulpar remanescente (polpa coronária e radicular) foi separado do elemento dentário. O tecido obtido foi incubado a 37°C, por 1h, em tampão contendo 0,2 % de colagenase tipo I (Gibco), 25mmol/L HEPES (N-2 Hidroxietil piperazine – N'-2 ácido sulfônico etano pH7,4 (Gibco)), 10mmol/L de fosfato de sódio mono-básico (Nuclear/SP), 100mmol/L de cloreto de sódio (Dinâmica/São Paulo), 3mmol/L de fosfato de potássio, 1mmol/L de cloreto de cálcio (Synth/SP), 24mmol/L de cloreto de potássio (Synth), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich/St Louis), 12mmol de manitol (Synth), 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), 45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plought).

A suspensão de células foi centrifugada a 800 “g” durante 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspensionado em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco), 100µg/mL de estreptomicina (Gibco), 0,45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plought) e 3,7mg/L de HEPES (Gibco). A ressuspensão foi realizada em garrafas de cultura plástica de 75cm² e estas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 95% de ar a 37°C.

As células foram mantidas em cultura monocamada. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias. Quando as células mostraram-se confluentes foi realizado o repique (passagem) destas células para novas garrafas de cultivos, sendo que para isso as células em cultura foram colhidas com solução de tripsina–EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich) e transferidas para

subculturas na razão de 1:3, no respectivo meio de cultivo. Após nova confluência, as células foram novamente repicadas, ou seja, alocadas em novas garrafas na mesma razão de 1:3. Ao atingir a sétima passagem celular, as células foram marcadas com Mini26 (PKH26 – Sigma, marcador de membrana celular) e *falcons* com 3×10^6 células concentradas em 300 μ L de tampão de fosfato salino 1X (PBS) cada, foram alicotados para posteriormente serem implantados nos animais envolvidos no estudo.

Sete dias após a isquemia, foi realizado o procedimento de transplante celular, por meio de injeção intracardíaca. Os animais foram anestesiados com halotano (indução 4%, manutenção de 1,5 a 2%, em 70% N₂O e 30% O₂) e acomodados em posição dorsal. 3.0×10^6 cels/ μ L foram injetadas diretamente no ventrículo cardíaco esquerdo através de injeção percutânea, utilizando *abocath* e seringa de 1mL (YIN et al, 1999). Para a certificação do local correto da injeção, era realizada punção inicial. Os animais pertencentes ao grupo S, IV e IVT passaram pelo mesmo procedimento, mas foi injetado veículo (salina).

3.4 Tarefa Motora

3.4.1 Tarefa de habilidade do alcance e preensão

A tarefa motora de reabilitação foi realizada utilizando-se caixas desenvolvidas para o treinamento do alcance e preensão de comida, chamadas de caixas de reabilitação (BIERNASKIE & CORBETT et al., 2001). Os aparatos foram confeccionados em acrílico e possuíam uma plataforma central e uma bandeja de cada lado, as quais eram preenchidas com alimento (Fig. 6). As dimensões do aparato permitem o uso independente do membro ipsilateral à bandeja em questão, não permitindo o alcance cruzado do animal. A bandeja situada abaixo do membro não-afetado permaneceu vazia, enquanto a bandeja situada abaixo do membro afetado foi preenchida com pequenas esferas comestíveis (15 g por sessão, glóbulos inertes nº 7- 4,6 mm; 65mg \pm 10%; Farmácia Brasileira Homeopática). A quantidade destas esferas foi

estabelecida de modo a prevenir o alcance da mesma com a língua do animal ou um possível sucesso utilizando o membro não-lesado, conforme já descrito pelos autores citados.

Para realizar a sessão de habilidade do alcance e preensão, os animais eram removidos de suas caixas-moradia e colocados individualmente em caixas idênticas que continham o referido aparato. As sessões tinham duração de 40 minutos e eram realizadas uma vez por dia (durante o ciclo claro, entre 9 - 14 h), durante 14 dias após a injeção de células-tronco (MESTRINER et al., 2011). Ao término de cada sessão, os animais eram devolvidos às caixas moradia e a quantidade de esferas restantes era pesada com a finalidade de estabelecer a pata de preferência do animal (durante as sessões de treinamento/aprendizado da tarefa) e verificar a adesão do animal ao tratamento (durante as sessões de tratamento após a isquemia).

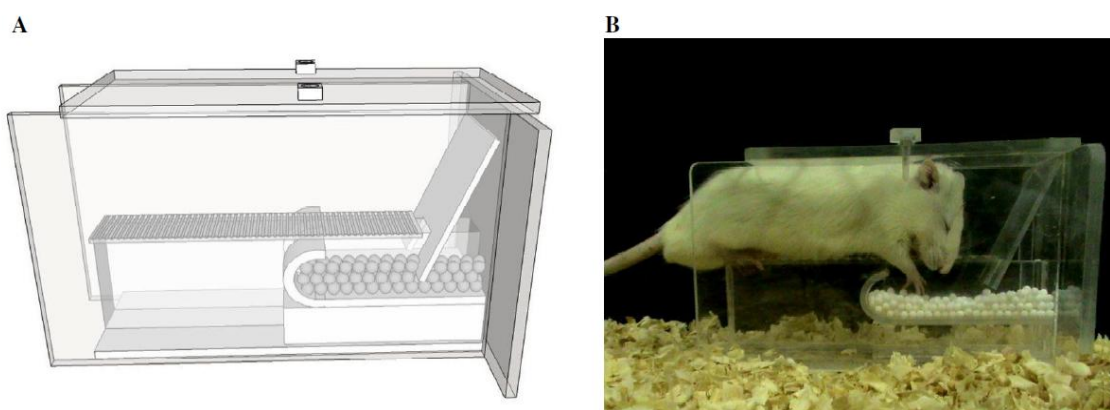


Figura 6. Caixa acrílica para realização da tarefa de habilidade do alcance e de preensão. (A) Ilustração da caixa de alcance e preensão; (B) Rato realizando a tarefa. Fonte: o autor.

3.5 Avaliação Comportamental

3.5.1 Teste do cilindro

O teste do cilindro tem como objetivo avaliar a assimetria dos membros anteriores durante a realização de uma tarefa de exploração e suporte corporal (MAcLELLAN et al., 2006; SCHALLERT et al., 2006). Os animais foram colocados no interior de um cilindro acrílico de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, situado sobre um tampo de mesa de vidro (Fig. 7). Então foi realizada a filmagem de cada animal, individualmente, por meio de um espelho angulado (vista inferior do animal) dos movimentos exploratórios espontâneos dos mesmos durante 5 min (FORGIE et al., 1996). O número de contatos dos membros anteriores com as paredes do cilindro, utilizadas para suporte corporal durante a exploração, foi computado e os animais que não realizassem pelo menos 12 contatos exploratórios independentes eram excluídos da análise. Para realização deste teste os animais não foram habituados, o que permite maior exploração e torna o teste mais fidedigno.

A quantificação do uso do membro anterior contralateral à lesão encefálica foi realizada com base na análise das imagens em câmera lenta e quadro por quadro (realizada por um avaliador cego quanto aos grupos experimentais), sendo, posteriormente calculado por meio da fórmula: $(\text{contatos ipsilaterais} / \text{numero total de contatos}) \times 100$ (BIERNASKIE & CORBETT, 2001).

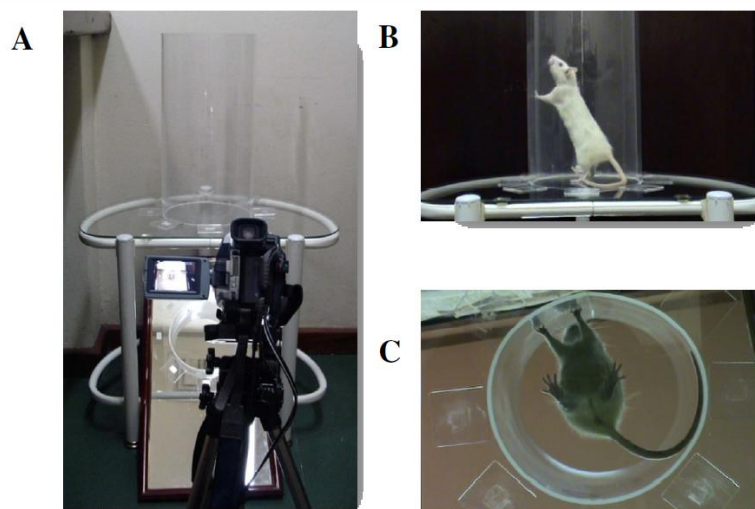


Figura 7. Teste do Cilindro. (A) Aparato para realização do teste, (B) vista lateral do animal realizando a exploração; (C) vista inferior, utilizada para análise das imagens. (adaptado de PAGNUSSAT et al., 2009).

3.6 Análise Morfológica

3.6.1 Perfusão

Finalizados os testes comportamentais os animais foram profundamente anestesiados, via intra-peritoneal, com hidrato de cloral 30% (10mL/Kg), sendo realizada a toracotomia com exposição do coração. Foi injetado 1000 UI de heparina sódica (Cristália) no ventrículo esquerdo, e por meio de uma incisão neste mesmo ventrículo foi inserida uma cânula ligada a uma bomba de perfusão (Control Company). Após uma segunda incisão, desta vez, no átrio direito, foi perfundida, inicialmente, solução salina (200 mL), para lavagem da árvore vascular e, posteriormente, solução fixadora (150 mL) composta de paraformaldeído (PFA) 4% diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7,4. Após esse procedimento, os encéfalos foram retirados por meio da abertura da calota craniana, e pós-fixados na mesma solução fixadora usada para a perfusão por mais 4 h à temperatura ambiente. Posteriormente, foram crioprotetidos em sacarose 30% diluída em TF 0,1M a 4°C até submergirem.

Depois de realizada a crioproteção, os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e seccionados (30 μ m) em criostato (Leitz).

3.6.2 Área da lesão

A fim de calcular a extensão da lesão alguns cortes do encéfalo foram destinados à técnica de Hematoxilina-Eosina. Para tal, foi utilizado um n=24 animais. Para isso, os cortes foram hidratados e levados à solução de hematoxilina de Mayer por 3 minutos, sendo, posteriormente, lavados duas vezes em água destilada por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram levados à solução de eosina a 0,5% de 15 segundos a 1 minuto, com retirada do excesso de Eosina por meio de diversas imersões em álcool 95%. Transcorrido este passo, deu-se início ao processo de desidratação (duas imersões em álcool absoluto, por fim uma imersão em xilol). Em seguida, as lâminas foram montadas e cobertas por lamínulas e bálsamo do Canadá.

Os cortes foram, então, analisados ao microscópio óptico Nikon Eclipse E-600 (400X) acoplado a uma câmera de alta performance CCD. Foi, então, realizadas fotomicrografias do córtex e estriado (caudado/putâmen) para posterior análise da lesão dessas regiões.

A extensão da lesão foi calculada com base na fórmula (HICKS et al., 2008):

APT = ARHN – ARHL, onde:

APT = área de perda tecidual;

ARHN = área remanescente do hemisfério normal;

ARHL = área remanescente do hemisfério lesado.

3.6.3 Imunofluorescência

Para a visualização das células-tronco e células de fenótipo neuronal ou astocitário, alguns cortes (n=20) que continham áreas de representação do córtex sensorio-motor e o estriado dorsolateral foram selecionados, tendo como base o Atlas de PAXINOS & WATSON (2004). Os anticorpos utilizados foram GFAP (Sigma, policlonal, produzido em coelho, na diluição de 1:200) e NeuN (Millipore, monoclonal, produzido em camundongo, na diluição de 1:200). O processamento da técnica de imunofluorescência foi realizado diretamente nos cortes, protegidos da luz. Resumidamente, os cortes foram fixados em PFA 4% por 15 min, lavados com PBS em três séries de 5 min, bloqueados com soro normal de cabra 3% (Sigma) em PBS contendo 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx) por 60 min, lavados em PBS por 5 min, incubados com o anticorpo primário em sua diluição pré-determinada em PBS-Tx *overnight* a 4°C, lavados em três séries de 5 min em PBS, incubados com o anticorpo secundário conjugado a fluorocromo (anti-IgG de coelho e camundongo conjugada a Alexa Flúor 488) na diluição de 1:500 em PBS-Tx por 2 horas em temperatura ambiente. Após, as fatias foram lavadas em PBS (duas séries de 5 min), cobertas com Fluoromount (Sigma) e lamínulas. As imagens imunofluorescentes foram adquiridas usando um microscópio confocal (Olympus FV1000) e realizado uma análise qualitativa.

3.7 Análise Estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software SPSS 16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., Chicago, USA). A avaliação da homogeneidade das variâncias foi realizada pelo teste de Levine. Os dados comportamentais foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas e as medidas morfológicas por ANOVA de 1 via, seguidas pelo teste post-hoc de Tukey, quando apropriado. A significância foi estabelecida em $p < 0.05$ para todas as análises e os resultados foram

representados como médias \pm erro padrão da média (E.P.M).

4 RESULTADOS

Todos os animais submetidos à isquemia focal apresentaram características comportamentais típicas como adução do membro anterior contralateral à lesão e rotação espontânea em direção ao hemisfério contralateral quando segurado pela cauda (WIDLE et al.,2006).

4.1 Tarefa de Habilidade do Alcance

A fim de verificar a adesão dos animais à tarefa, a quantidade de alimento consumido foi quantificada nos grupos submetidos à isquemia e tarefa motora de habilidade. O alimento para os demais grupos foi oferecido dentro das caixas moradia e não foi quantificado.

O teste t de amostras pareadas revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o número médio de glóbulos consumidos ao final das semanas 1 e 2 para cada grupo ($p < 0.01$). No entanto, não houve diferença na média de glóbulos consumidos entre os grupos ao final de cada semana, conforme visualizado na Figura 8.

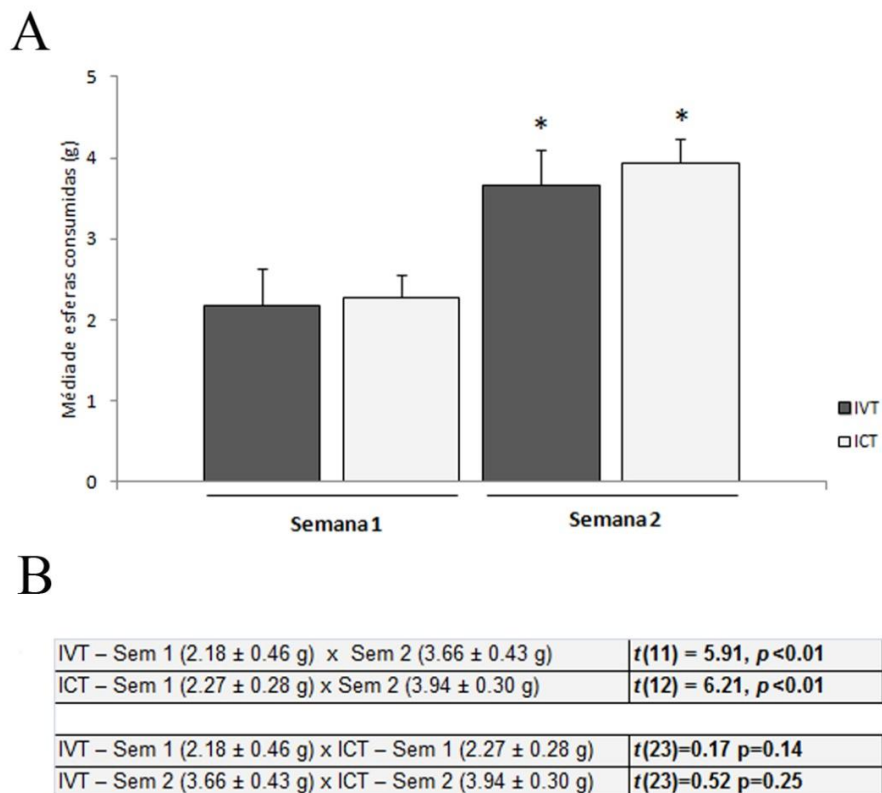


Figura 8. Quantidade de esferas consumidas na tarefa de alcance e preensão. (A) Gráfico demonstrando a média de esferas consumidas. (B) Tabela com os valores numéricos da média de esferas consumidas. Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M. *= diferença entre os grupos IVT e ICT nas semanas 1 e 2 ($p < 0.01$). IVT= isquemia, veículo, tarefa; ICT= isquemia, célula, tarefa.

4.2 Teste do Cilindro

No teste do Cilindro, a ANOVA de medidas repetidas evidenciou efeito principal do “grupo” [$F_{(4,48)} = 3.51, p = 0.01$], do “tempo” [$F_{(2,48)} = 29.30, p < 0.01$] e interação entre “grupo x tempo” [$F_{(8,96)} = 2.95, p < 0.01$]. O teste de comparações múltiplas aplicado apontou não haver diferenças entre os grupos na avaliação pré-operatória ($p > 0.05$). Na avaliação pós-operatória (pós 1), a análise demonstrou haver diferença somente entre o grupo sham e grupos isquemia ($p = 0.01$). Na avaliação realizada ao final da semana 2 (pós 2), houve menor uso do membro anterior para suporte na exploração vertical do cilindro

do grupo IV comparado com o S ($p < 0,05$), IV comparado com ICT e IVT, respectivamente ($p = 0,05$ e $p = 0,05$) e IC comparado com ICT ($p = 0,05$) (Fig 9).

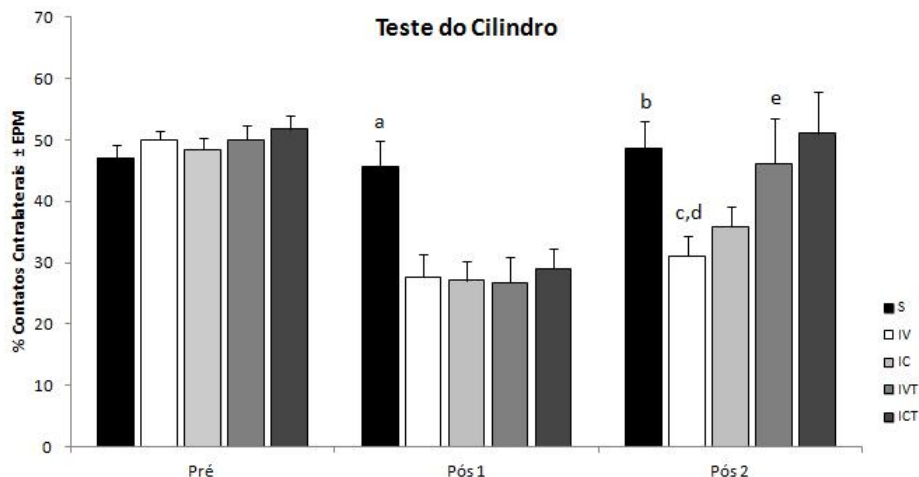


Figura 9. Uso assimétrico dos membros anteriores no teste do cilindro. a= diferença entre o grupo sham e grupos isquemia ($p = 0,01$); b= diferença entre os grupos sham e IV ($P < 0,05$); c= diferença entre os grupos IV e ICT ($P = 0,05$); d= diferença entre os grupos IV e IVT ($P = 0,05$); e= diferença entre os grupos IC e ICT ($P = 0,05$). Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M. S= sham; IV= isquemia-veículo; IVT= isquemia, veículo, tarefa; IC= isquemia, célula-tronco; ICT= isquemia, célula-tronco, tarefa.

4.3 Área da Lesão

Após 3 semanas do procedimento cirúrgico, a investigação morfológica da área da lesão revelou dano tecidual que abrangia a região sensório-motora do córtex cerebral e estriado dorsolateral (Fig 8A). A ANOVA de uma via demonstrou efeito significativo entre os grupos [$F_{(4,19)} = 10,11$ $p < 0,01$]. O teste de comparações múltiplas de Tukey evidenciou que a área de lesão foi maior no grupo IC e IV comparado com o grupo S, respectivamente ($p < 0,01$ e $p = 0,02$), a área de lesão foi menor no grupo IVT e ICT comparado com o grupo IC, respectivamente ($p < 0,01$ e $p = 0,01$) (Fig 10).

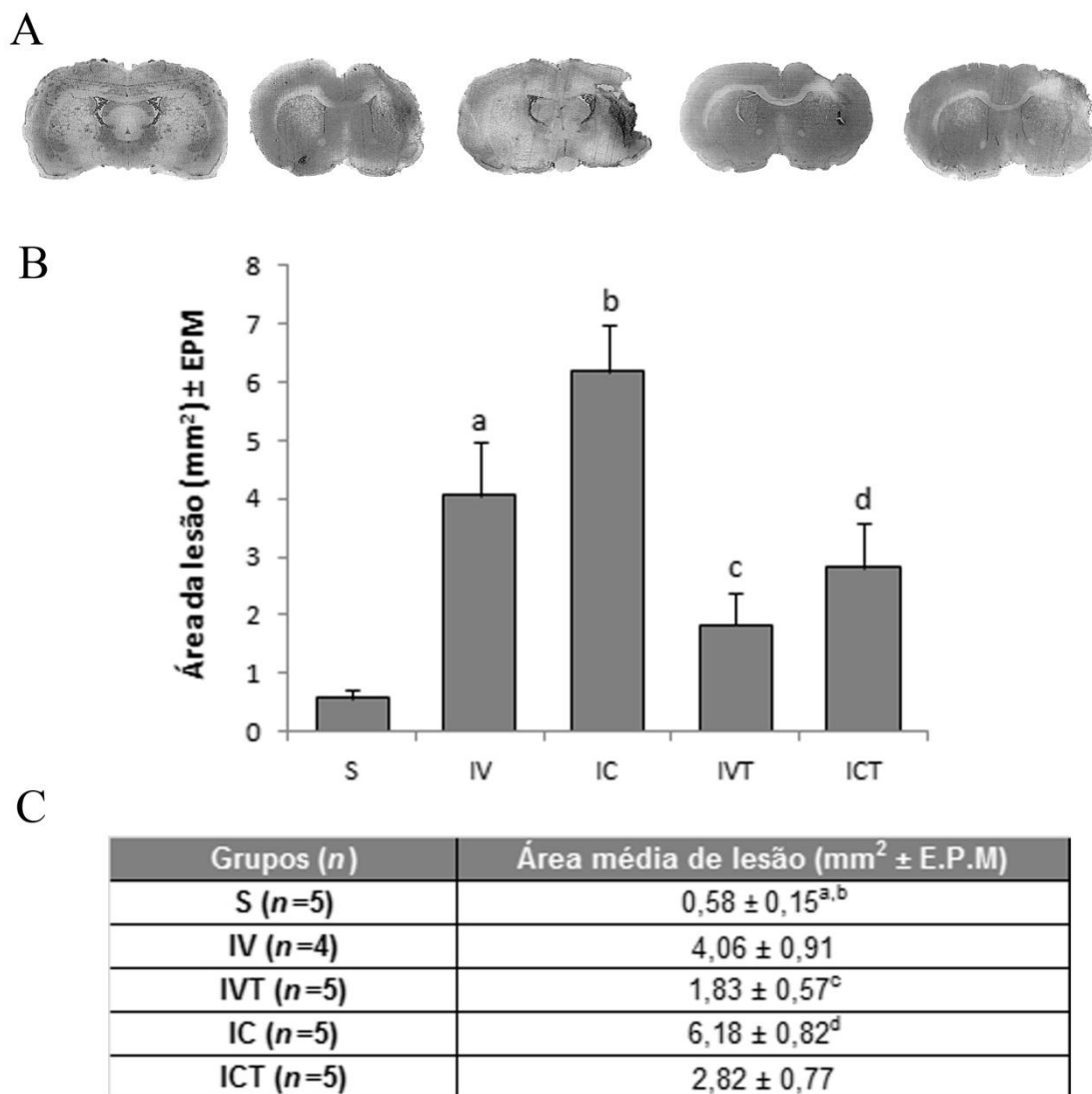


Figura 10. Área da lesão 3 semanas após a cirurgia. (A) Fotomicrografias obtidas a partir da coloração de cortes encefálicos coronais de animais S, IV, IC, IVT e ICT, respectivamente. (B) Gráfico demonstrando a área média de perda tecidual após lesão. (C) Tabela com valores numéricos da área de perda tecidual após lesão. Os dados foram apresentados como médias \pm E.P.M. a= diferença entre S e IV ($p=0.02$); b= diferença entre S e IC ($p<0.01$); c= diferença entre IVT e IC ($p<0.01$); d= diferença entre IC e ICT ($p=0.01$). S= sham; IV= isquemia-veículo; IVT= isquemia, veículo, tarefa; IC= isquemia, célula-tronco; ICT= isquemia, célula-tronco, tarefa.

4.4 Análise Morfológica Qualitativa

As células-tronco mesenquimais foram marcadas com Mini-26 antes da infusão intra-cardíaca. Células marcadas com Mini-26 evidenciavam ampla marcação da membrana celular, a qual podia ser visualizada em vermelho (Fig. 11B). GFAP e NeuN são marcadores amplamente utilizados para processos primários astrocitários e núcleos de células com fenótipo neuronal, respectivamente (Fig 11C e D).

As imagens demonstraram que as células-tronco mesenquimais derivadas de polpa de dente humano marcadas com Mini-26 apresentaram forma ovalada e estavam presentes na área de penumbra, assim como em regiões adjacente à lesão após 2 semanas do transplante celular (Fig 11B).

Algumas células-tronco mesenquimais apresentavam fenótipo de astrócito e neurônio, conforme verificado pela dupla marcação aos anticorpos. Era possível visualizar maior expressão de células GFAP+ nas regiões adjacentes à lesão (bordos da lesão), apresentando-se mais dispersas na zona da penumbra isquêmica. Por outro lado, as células NeuN+ apresentavam-se em formato esferóide, devido a marcação do núcleo, dispersas na zona de penumbra, sem modificações fenotípicas marcantes (Fig 11).

Não foi evidenciado diferença entre os grupos na observação qualitativa, apenas foi possível constatar que os grupos que foram submetidos à tarefa, independente do transplante celular, apresentaram características semelhante (não demonstrado).

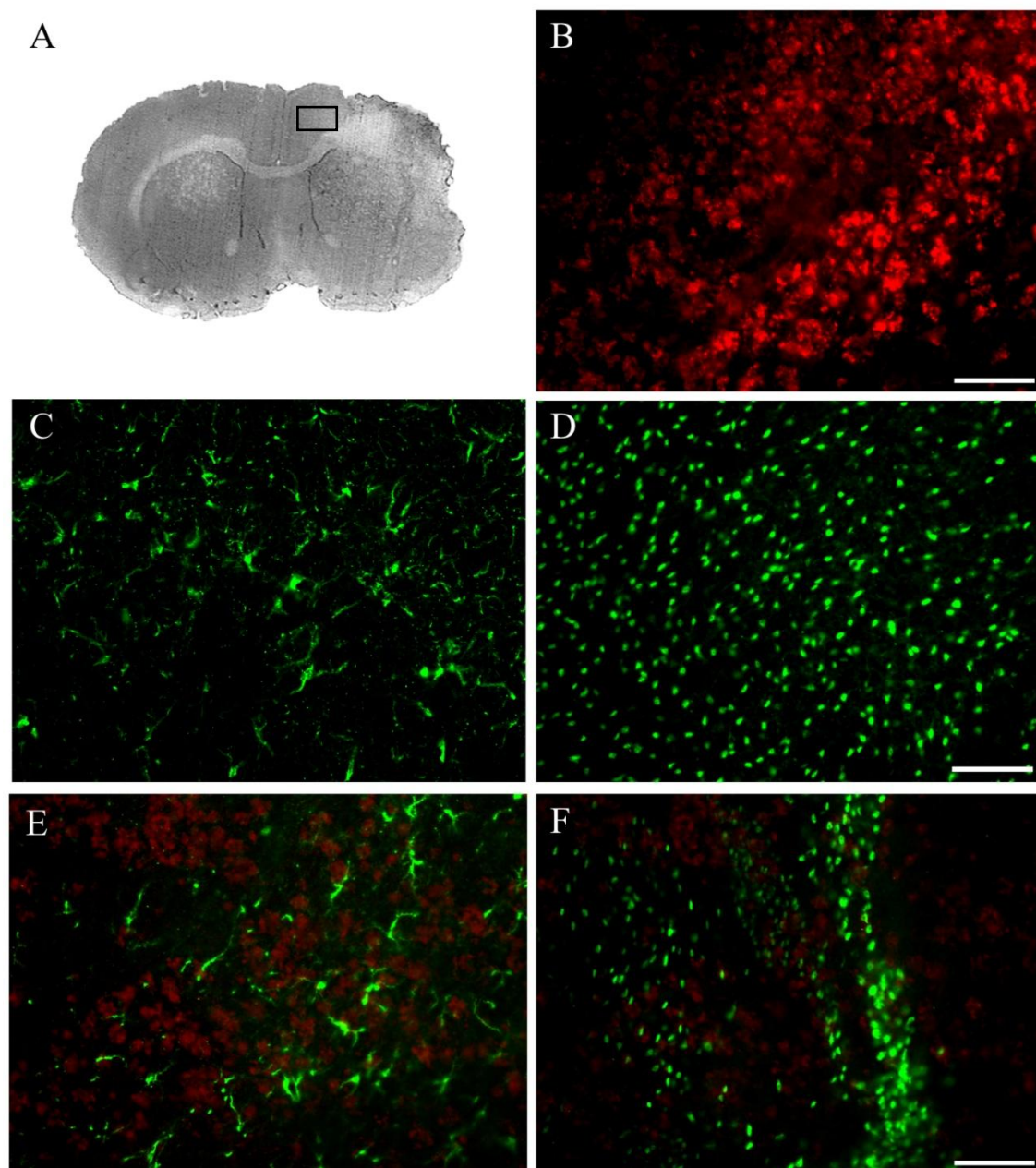


Figura 11. Fotomicrografias do grupo ICT obtidas a partir da região cortical de interesse. (A) Fotomicrografia demonstrando a região do córtex de interesse. (B) Imunomarcção fluorescente de CTMs (Mini-26 - vermelho). (C) marcação imunofluorescente de células GFAP+ (verde). (D) marcação imunofluorescente de células NeuN+ (verde). (E) dupla marcação imunofluorescente de células GFAP+ (verde) e CTMs (vermelho). (F) dupla marcação imunofluorescente de células NeuN+ (verde) e CTMs (vermelho).

5 DISCUSSÃO

O principal achado do presente trabalho demonstra que os animais que realizaram a tarefa de habilidade do alcance e preensão, independente do transplante de células-tronco mesenquimais, apresentaram melhor recuperação funcional, além da diminuição da área encefálica lesada.

O sistema nervoso é responsável por dar origem a uma série de formas de comportamento e, sendo assim, a análise comportamental pode ser considerada a maneira mais elementar de avaliação das funções neurais (WHISHAW et al., 1999). Os resultados comportamentais obtidos neste estudo sugerem que a reabilitação do membro anterior, realizada por meio da tarefa de habilidade, é capaz de potencializar a recuperação sensório-motora 3 semanas após o evento isquêmico. Este tipo de tratamento melhorou a motricidade ampla, reduzindo a assimetria no uso dos membros anteriores durante movimentos exploratórios verticais, avaliada por meio do Teste do Cilindro. Nossos resultados concordam com estudos anteriores, em que estratégias reabilitação sensório-motora foram capazes de induzir melhora do desempenho motor (BIERNASKIE & CORBETT, 2001; MALDONADO et al., 2008; MOLINA-LUNA et al., 2008; HICKS et al., 2009; MESTRINER et al., 2011). Estudos prévios têm demonstrado que os benefícios funcionais adquiridos após o tratamento de reabilitação ocorrem devido à melhora do micro-ambiente e reorganização neural da zona de penumbra (METHA et al. 2007), ao aumento da arborização e comprimento dos processos primários nos astrócitos (MESTRINER et al., 2011), ao aumento na síntese de proteínas (KLEIM et al., 2004), à sinaptogênese (JONES et al., 1999; KLEIM et al., 2002), ao aumento da densidade de espinhos e complexidade da arborização dendrítica (BURY et al., 2002) e à reorganização funcional do córtex motor (NUDO et al; 1996; ADKINS et al, 2006; MULDER & HOCHSTENBACH, 2011).

Após lesões isquêmicas que afetam regiões corticais e subcorticais, como os núcleos da base, é comum observar o surgimento da heminegligência e o desenvolvimento do “desuso aprendido” dos segmentos corporais contralaterais ao hemisfério lesado (SCHALLERT, 2006). Nossos resultados demonstram, por meio da avaliação no cilindro, que os grupos IVT e ICT

apresentaram maior simetria no uso dos membros anteriores, quando comparados aos grupos IV e IC. Estudos prévios, os quais utilizaram terapia de reabilitação (ambiente enriquecido - AE) em associação ao transplante celular após isquemia cerebral, demonstram que, após associação entre os tratamentos, ocorre melhora no desempenho motor, evidenciado pelo uso mais simétrico dos membros anteriores nessa mesma tarefa. Entretanto, diferindo de nossos achados, animais que receberam o transplante celular e permaneceram em caixas-padrão apresentaram características semelhantes ao grupo exposto a ambos os tratamentos. Tal diferença talvez tenha ocorrido devido ao tempo de avaliação. No estudo acima citado as avaliações finais foram realizadas decorridas 4 semanas do transplante celular, demonstrando que pode ter ocorrido uma melhora espontânea, enquanto nossas avaliações foram realizadas após 2 semanas de tratamento. (HICKS et al., 2007; 2009).

Sabe-se que o grau de recuperação sensório-motora após lesões encefálicas está sujeito à grande variabilidade interindividual, mas que há relação com o tipo de atividade executada, intensidade, frequência e duração do tratamento (MICHAELSEN et al., 2006; THIELMAN et al., 2004). Apesar de nossos resultados corroborarem com estudos prévios, nossos dados comportamentais mostraram-se superiores quando comparados a outros de metodologia semelhante (HICKS et al., 2007; 2008; 2009). Parte da diferença observada poderia estar relacionada ao tipo de tratamento aplicado, uma vez que os estudos acima citados utilizaram a exposição ao AE como forma terapêutica. O AE é uma estratégia de tratamento que inclui uma série de estimulações sensoriais e possibilidade de execução motora ampla, exercício e/ou condicionamento físico e interação social (HICKS et al., 2007). Entretanto, apesar de seu potencial em induzir adaptações morfo-funcionais no tecido nervoso, compatíveis com a reabilitação (KOBILLO et al., 2011; HICKS et al., 2008; KEINER et al., 2008), essa forma de tratamento possibilita que o animal desenvolva estratégias motoras compensatórias devido ao déficit motor presente.

O aprendizado motor diz respeito a modificações comportamentais permanentes, as quais ocorrem em decorrência da prática ou experiência e estão associadas a adaptações nas unidades centrais de comando e controle do movimento (SCHMIDT, 2005). A recuperação motora diz respeito à

capacidade de gerar movimentos sob controle voluntário da mesma maneira que era realizada antes da lesão (LEVIN et al., 2009), enquanto a recuperação funcional diz respeito à melhora da capacidade em desempenhar atividades de auto-cuidado e mobilidade, de forma independente (DAVIS, 2006). Embora ambos os tipos de recuperação sejam dependentes da recuperação neurológica, recuperação motora e recuperação funcional não são sinônimos (TEASELL et al., 2005).

É possível que nossos resultados tenham sido superiores em função de termos utilizado uma tarefa de habilidade motora, que associa aspectos cognitivos e motivacionais, e que restringe movimentos compensatórios de tronco durante a realização do alcance e preensão. Sabe-se que a prática leva à retenção e generalização do gesto motor aprendido e que o nível de significância da tarefa desempenha importante papel no nível de neuroplasticidade induzida pelo tratamento (ARYA et al., 2011). Essa recuperação motora pode ser verdadeira ou compensatória. A recuperação verdadeira ocorre quando vias alternativas de controle de movimento levam ao disparo nas mesmas unidades motoras usadas antes da lesão (KRAKAUER, 2006), mecanismo que ocorre via redundância das vias corticais e/ou revelação de conexões corticais pré-existentes (TEASELL et al., 2005). Por outro lado, a compensação envolve o uso de músculos alternativos na realização da tarefa proposta (KRAKAUER, 2006). Embora ambos os tipos de recuperação envolvam aprendizado motor, a recuperação compensatória é menos eficaz, uma vez que o desenvolvimento de um engrama motor anormal induz adaptações musculares não desejáveis, as quais, em longo prazo, serão fonte de desconforto, dor e limitação funcional (MICHAELSEN et al., 2001). Assim, a contextualização funcional da tarefa utilizada, bem como a restrição quanto às compensações de movimentos, pode ter contribuído para uma recuperação funcional mais eficiente nos grupos submetidos ao treinamento motor, observada neste estudo.

Em relação à área de lesão, nossos resultados demonstram uma lesão moderada, sendo que apenas uma das intervenções propostas (tarefa motora) foi capaz de reduzi-la. Dados de estudos anteriores, que utilizaram o transplante de células mesenquimais associado à exposição ao AE ou a realização de exercício físico, demonstram sucesso na redução da área

infartada quando estas duas intervenções foram utilizadas conjuntamente (HICKS et al., 2008; 2009; KOMATSU et al., 2010). Enquanto a realização de tarefa motora de habilidade, sozinha, parece não ser capaz de reduzir o volume do dano tecidual após modelos de isquemia focal e hemorragia (KOMITOVA et al., 2007; PLOUGHMAN et al., 2009; MESTRINER et al., 2011), estratégias de reabilitação que incluem a associação de mais de um tipo de tarefa apresentam capacidade de atenuar o volume da lesão (PLOUGHMAN et al., 2007; FANG et al., 2010). Isso nos leva a crer que as estratégias de reabilitação são de fundamental importância na redução da área isquêmica e que a associação do transplante celular poderia facilitar esta recuperação, possivelmente por prevenir a morte celular programada e facilitar a gênese e proliferação celular (WAKABAYASHI et al., 2010).

Além disso, neste estudo, a tarefa motora de reabilitação foi capaz de induzir a redução da área infartada, uma vez que o modelo utilizado provocou lesão moderada, em contraste a lesões severas utilizadas em nossos estudos prévios, as quais se demonstraram muito resistentes à reabilitação neurológica do ponto de vista morfológico, motor e funcional (PAGNUSSAT, 2009).

Em relação ao uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) os estudos têm demonstrado sua eficácia no tratamento de uma série de doenças que afetam o SNC. Estas células apresentam capacidade de se diferenciar em neurônios e células gliais, de migrar para o local de lesão e de promover recuperação funcional (LI et al., 2002; WAKABAYASHI et al., 2010). Nosso estudo demonstrou que o uso das CTMs não teve influência na recuperação funcional, apenas a realização da tarefa contribuiu para esta recuperação. Foi observada a presença pronunciada das CTMs em áreas próximas ao infarto, nossos resultados se devem à forma escolhida para administração dessas células. A injeção intracardíaca tem ação sistêmica, similar à injeção intra-arterial, o que pode ter feito com que as células tenham sido distribuídas, por meio da circulação, a todo o corpo, chegando até o local de lesão (GUISE et al., 1996; HU et al., 2010; PSALTIS et al., 2010).

Existe grande variabilidade quanto à quantidade de células CTMs infundidas sistemicamente após lesões isquêmicas do encéfalo. Neste estudo a quantidade de células utilizadas foi escolhida com base em trabalhos anteriores, de isquemia focal e transplante celular sistêmico (HICKS et al.,

2007, 2009; PAVLICHENKO et al., 2008). Por meio da imunomarcção, verificamos pronunciada presença das CTMs na zona de penumbra isquêmica, mas com poucas características fenóticas de neurônios e astrócitos, conforme visualizado pela dupla marcação a NeuN e GFAP. As pesquisas têm demonstrado que a recuperação neurológica, após terapia celular, pode ocorrer por outros mecanismos que não a diferenciação em células neurais e sua integração no SNC (WAKABAYASHI et al., 2010). Acredita-se que o percentual de células-tronco capazes de se diferenciar em neurônios seja muito pequeno ou até inexistente, e que a melhora observada seja atribuída à expressão de fatores tróficos, como NGF, BDNF e GDNF, os quais seriam capazes de estimular mecanismos endógenos de reparo, regeneração e sobrevivência celular (CHOP & LI, 2002; ZHAO et al., 2002; GUZMAN et al., 2008).

Por outro lado, nossos resultados apontaram para a não recuperação tecidual/motora quando feita somente a infusão de células-tronco. Existem indícios de que alguns fatores secretados pelas CTMs poderiam exercer efeitos tóxicos (HORN et al., 2009). É possível que a capacidade em modular o microambiente no tecido nervoso após lesão, características tão vastamente descritas para as CTMs, tenha sido potencializada ou ainda, que os efeitos deletérios da administração dessas células (HORN et al., 2009) tenha sido neutralizado mediante associação com a tarefa motora de reabilitação.

Com base nesses resultados, concluímos que a tarefa motora de habilidade, utilizada como forma de reabilitação, tem potencial para induzir redução da área de infarto isquêmico e recuperação da motricidade ampla quando administrada isoladamente ou em conjunto ao transplante celular de CMTs.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação permitem concluir que:

- O tratamento por meio de tarefa de habilidade do alcance e preensão foi capaz de promover recuperação sensório-motora ampla avaliada pelo teste do cilindro, após isquemia focal por ET-1.
- O transplante de células-tronco mesenquimais parece não ter influenciado na recuperação sensório-motora após isquemia focal por ET-1.
- Que ocorreu direcionamento das CMTs ao local da lesão após infusão sistêmica (em decorrência de mecanismos quimiotáticos e prejuízo da barreira hemato-encefálica);
- O tratamento de reabilitação motora, sozinho ou em associação à terapia celular, foi capaz de reduzir o volume de dano cerebral após modelo de isquemia focal por ET-1.

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar aspectos morfológicos de células GFAP+ e NeuN+ na zona de penumbra;
- Investigar os fatores tróficos secretados pela CTMs e seu papel na recuperação funcional após a isquemia focal;

ANEXO 1 – Termo de Doação de Material Biológico.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

Termo de Doação de Material Biológico

Efeitos da terapia com células-tronco mesenquimais em ratos Wistar submetidos à isquemia focal e tratamento de reabilitação

Neste projeto de pesquisa será realizada uma isquemia focal no encéfalo de ratos wistar adultos e como tratamento será injetado células- tronco mesenquimais derivadas de polpa de dentes decíduos humano e a realização de uma tarefa de habilidade. Serão realizadas avaliações comportamentais e histológicas para verificação da melhora funcional destes animais.

Esse projeto de pesquisa está vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, telefone 51 3308 3629.

Toda e qualquer dúvida será esclarecida pelos envolvidos nesta pesquisa. Fica, ainda, assegurada a liberdade dos responsáveis pelo paciente, recusarem-se a participar do estudo. Não haverá nenhuma alteração no tratamento da criança e não será necessária sua participação futura em nenhum momento da pesquisa. Não haverá qualquer tipo de remuneração ou bonificação caso haja concordância em participar do projeto, bem como custos por parte do doador. Será mantida a confidencialidade da identidade do paciente.

Eu, _____
como responsável pelo(a) menor _____,
declaro que fui informado dos objetivos e procedimentos que serão realizados nesta pesquisa, tendo lido e compreendido integralmente as informações acima antes de

assinar este termo, não restando dúvidas quanto ao conteúdo deste documento. E, dessa forma, autorizo meu (minha) filho (a) ou criança pela qual sou responsável a participar do estudo, estando disposto (a) a trazê-lo (a) nas consultas marcadas, assim como, doar seu dente de leite depois da extração.

Porto Alegre, ____ de _____ de 2011.

Responsável pelo Participante

RG: _____

Pesquisador Responsável: Débora Abreu da Costa

RG: 1076563464

Telefone de contato: (51) 9246-2074 ou 3308-5568

8 BIBLIOGRAFIA

ADKINS DL, BOYCHUK J, REMPLE MS, KLEIM JA. Motor training induces experience-specific patterns of plasticity across motor cortex and spinal cord. *J Appl Physiol.* v.101(6), p.1776-82, 2006.

ANDREWS AW, BOHANNON RW. Distribution of muscle strength impairments following stroke. *Clin Rehabil* v.14, n.1, p.79-87, 2000.

BAIRD AL, MELDRUM A, DUNNETT SB. The staircase test of skilled reaching in mice. *Brain Research Bulletin.* v.54(2), p. 243–250, 2001.

BANG OY, LEE JS, LEE PH, LEE G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol.* v.57(6), p.874-82, 2005.

BEAR, MARK F., CONNORS, BARRY W., PARADISO, MICHAEL A. *Desvendando o Sistema Nervoso.* 3.ed. São Paulo. Manole. 2003.

BIERNASKIE J, CORBETT D. Enriched Rehabilitative Training Promotes Improved Forelimb Motor Function and Enhanced Dendritic Growth after Focal Ischemic Injury. *J Neurosci.* v. 21(14), p.5272–5280, 2001.

BIERNASKIE, J.; CHERNENKO, G. e CORBETT, D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci.* p. 1245-1254, 2004.

BIERNASKIE, J.; SZYMANSKA, A.; WINDLE, V. e CORBETT D. Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *Euro J Neurosci.*, v. 21, p. 989–999, 2005.

BJORKLUND, A; LINDVALL, O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat. Neurosci.* v. 3, p. 537-544, 2000.

BOHANNON RW. Measurement, nature, and implications of skeletal muscle strength in patients with neurological disorders. *Clinic Biomech* v.10, n.6, p. 283-293, 1995.

BOHANNON RW. Significant relationships exist between muscle group strengths following stroke. *Clinic Rehab* v.4, p.27-31, 1990.

CARMICHAEL ST. Themes and strategies for studying the biology of stroke recovery in the poststroke epoch. *Stroke.* v.39(4), p.1380-8, 2008.

CAURAUGH JH, SUMMERS JJ. Neural plasticity and bilateral movements: A rehabilitation approach for chronic stroke. *Prog Neurobiol.* v.75(5), p.309-20, 2005.

CHEN J, CHOPP M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx*. v.3, p. 66–73, 2006.

CHEN J, ZHANG ZG, LI Y, WANG L, XU YX, GAUTAM SC. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*. v.92, p.692–9, 2003.

DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. v.62, p.127-136, 2003.

DELCROIX GJ, SCHILLER PC, BENOIT JP, MONTERO-MENEI CN. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*. v.31(8), p.2105-20, 2010.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. v.22, p.391-397, 1999.

DUNCAN PW, GOLDSTEIN LB, HORNER RD, LANDSMAN PB, SAMSA GP, MATCHAR DB. Similar motor recovery of the upper and lower extremities after stroke. *Stroke*. v.25, p.1181–1188, 1994.

DURUNKAN, A.; TATLIUSMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. v.87, p.179-197, 2007.

FISHER, M.; SCHAEBITZ, W. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med*. v.160, p.3196–3206, 2000.

FORGIE ML, GIBB R, KOLB B. Unilateral lesions of the forelimb area of rat motor cortex: lack of evidence for use-dependent neural growth in the undamaged hemisphere. *Brain Res*. v.710(1-2), p.249-59, 1996.

FUXE K, BJELKE B, ANDBJER B, GRAHN H, RIMONDINI R, AGNATI LF. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. *Neuroreport*. v. 28;8(11), p.2623-9, 1997.

GARTSHORE, G.; PATTERSON, J.; MACRAE, I.M. Influence of ischemia and reperfusion on the course of brain tissue swelling and blood-brain barrier permeability in a rodent model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. v. 147, p.353-560, 1997.

GONZALEZ CL, KOLB B. A comparison of different timing middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.Bull*. v.59, p.459–466, 2003.

HAAS, S., WEIDNER, N., WINKLER J. Adult stem cell therapy in stroke. *Cerebrovascular disease*, p. 59-64, 2005.

HARUKUNI I, BHARDWAJ A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin*. v.24(1), p.1-21,2006.

HENDRICKS HT, VAN LIMBEEK J, GEURTS AC, ZWARTS MJ. Motor recovery after stroke: a systematic review of the literature. *Arch Phys Med Rehabil.* v.83(11), p.1629-37, 2002.

HERNANDEZ, P. J.; SCHILTZ, C. A.; E KELLEY, A. E. Dynamic shifts in corticostriatal expression patterns of the immediate early genes Homer 1a and Zif268 during early and late phases of instrumental training. *Learning & Memory* v.13, p.599-608, 2006.

HICKS, AU., LAPPALAINEN, RS., NARKILAHTI, S., SUURONEN, R., CORBETT, D., SIVENIUS, J., HOVATTA, O., JOLKKONEN, J. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *European Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 562–574, 2009.

HICKS, AU., HEWLETT, K., WINDLE, V., CHERNENKO, G., PLOUGHMAN, M., JOLKKONEN, J., WEISS, S., CORBETT, D. Enriched environmental enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience* v.146, p.31-40, 2007.

HORNER, PJ., GAGE, FH. Regenerating the damage central nervous system. *Nature.* v. 407, p. 963-970, 2000.

HU Z, ZHANG Z, GUISE T, SETH P. Systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing soluble transforming growth factor- β receptor II-Fc fusion protein can inhibit breast cancer bone metastasis in a mouse model. *Hum Gene Ther.* v.21(11), p.1623-9, 2010.

HUANG AH, SNYDER BR, CHENG PH, CHAN AW. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells.* v.26(10), p.2654-63, 2008.

HUANG, Y., McNAMARA, JO. Ischemic stroke: “acidotoxicity” is a perpetrator. *Cell.* v.118, p.665-666, 2004.

ITO M. Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Ann N Y Acad Sci* v.978, p.273–88. 2002.

HUANG HC, CHUNG KC, LAI DC, SUNG SF. The impact of timing and dose of rehabilitation delivery on functional recovery of stroke patients. *J Chin Med Assoc.* v.72(5),p.257-64, 2009.

KARAOZ E, AKSOY A, AYHAN S, SARIBOYACI AE, KAYMAZ F, KASAP M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* v.132(5), p.533-46, 2009.

KIM C.H.; KIM, Y.W.; JANG, S.H.; CHANG, C.H.; JUNG, J.H.; KIM S.H. Motor functional recovery after adipose tissue derived mesenchymal stem cell

therapy in rats with cerebral infarction. *J. Korean Neurosurg Soc.* v.40, p. 267-272, 2006.

Kleim JA, Barbay S, Cooper NR, Hogg TM, Reidel CN, Rempel MS, and Nudo RJ. Motor learning-dependent synaptogenesis is localized to functionally reorganized motor cortex. *Neurobiol Learn Mem.* v.77, p.63–77, 2002.

KLEIM, JA., Swain, R A., Armstrong, K A., Napper, R M., Jones, TA., GREENOUGH, WT. Selective Synaptic Plasticity within the Cerebellar Cortex Following Complex Motor Skill Learning. *Neurobiology of learning and memory* v.69, p. 274–289, 1998.

KOMITOVA, M., MATTSSON, B., JOHANSSON BB., ERIKSSON, P. Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke-Lesioned Adult Rats. *Stroke* v.36, p.1278-1282, 2005.

KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.96(19), p.10711-6,1999.

KWAKKEL G, KOLLEN BJ, VAN DER GROND J, PREVO AJ. Probability of regaining dexterity in the flaccid upper limb: impact of severity of paresis and time since onset in acute stroke. *Stroke.* v.34, p.2181-2186, 2003.

LAPERGUE B, MOHAMMAD A, SHUAIB A. Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases. *Prog Neurobiol.* v.83(6), p.349-62, 2007.

KANDEL, ER.; SCHWARTZ, JH.; JESSELL, TM. Princípios da neurociência. 4.ed. São Paulo: Manole, 2003.

LEVIN MF, KLEIM JA, WOLF SL. What do motor "recovery" and "compensation" mean in patients following stroke? *Neurorehabil Neural Repair.* v.23(4), p.313-9, 2009.

LI Y., CHOPP M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* v.456(3), p.120-3, 2009.

LIU S, LEVINE SR. The Continued Promise of Neuroprotection for Acute Stroke Treatment. *J Exp Stroke Transl Med.* v.1(1), p.1-8, 2008.

LIU DD., SHYU, WC., LIN, SZ. Stem cell therapy in stroke: strategies in basic study and clinical application. *Acta Neurochir. Suppl.* v.99; p. 137-139; 2006.

LIU S, LEVINE SR, WINN HR. Targeting ischemic penumbra: part I – from pathophysiology to therapeutic strategy. *J Exp Stroke Transl Med.* v.3(1), p.47-55. 2010.

LO, EH., DALKARA, T., MOSKOWITZ, MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* v.4, p. 399–415, 2003.

LOCATELLI F, BERSANO A, BALLABIO E, LANFRANCONI S, PAPADIMITRIOU D, STRAZZER S, BRESOLIN N, COMI GP, CORTI S. Stem cell therapy in stroke. *Cell Mol Life Sci.* v.66(5), p.757-72. 2009.

MACCIOCCHI SN, DIAMOND PT, ALVES WM, MERTZ T. Ischemic stroke: relation of age, lesion location, and initial neurologic deficit to functional outcome. *Arch Phys Med Rehabil.* v.79(10), p.1255-7, 1998.

MACLELLAN CL, AURIAT AM, MCGIE SC, YAN RH, HUYNH HD, DE BUTTE MF, COLBOURNE F. Gauging recovery after hemorrhagic stroke in rats: implications for cytoprotection studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* v.26(8), p.1031-42, 2006.

MADRIGAL JL, LEZA JC, POLAK P, KALININ S, FEINSTEIN DL. Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *J Neurosci.* v.29(1), p.263-7, 2009.

McILVOY, L.H. The effect of hypothermia and hyperthermia on acute brain injury. *AACN Clin Issues.* v.16, p.488-500, 2005.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis.* v.19, p.151-167, 2004.

MESTRINER RG, PAGNUSSAT AS, BOISSERAND LS, VALENTIM L, NETTO CA. Skilled reaching training promotes astroglial changes and facilitated sensorimotor recovery after collagenase-induced intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol.* v.227(1), p.53-61, 2011.

MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* v.290, p.1779–82, 2000.

MEZEY E, KEY S, VOGELSANG G, SZALAYOVA I, LANGE GD, CRAIN B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci US.*; v.100, p.1364–9, 2003.

MICHAELSEN SM, DANNENBAUM R, LEVIN MF. Task-specific training with trunk restraint on arm recovery in stroke: randomized control trial. *Stroke.* v.37(1), p.186-92, 2006.

MOLINA-LUNA K, HERTLER B, BUITRAGO MM, LUFT AR. Motor learning transiently changes cortical somatotopy. *Neuroimage.* v.40(4), p.1748-54, 2008.

MONFILS, M.H., PLAUTZ, E.J., KLEIM, JA. In Search of the Motor Engram: Motor Map Plasticity as a Mechanism for Encoding Motor Experience. *The Neuroscientist.* V. 11; p. 471-483, 2005.

MURPHY TH, CORBETT D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* v.10(12), p.861-72, 2009.

NAKAYAMA H, JORGENSEN HS, RAASCHOU HO, OLSEN TS. The Copenhagen Stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil.* v.75, p.394-398, 1994.

NUDO RJ, WISE BM, SIFUENTES F, MILLIKEN GW. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science.* v.272(5269), p.1791-4, 1996.

PAGNUSSAT, AS., MICHAELSEN, SM., ACHAVAL, M., NETTO, CA. Skilled forelimb reaching in Wistar rats: Evaluation by means of Montoya staircase test. *Journal of Neuroscience Methods.* 2008

PAVLICHENKO N.; SOKOLOVA, I; VIJDE, S.; SHVEDOVA, E.; ALEXANDROV, G.; KROUGLYAKOV, P.; FEDOTOVA, O.; GILEROVICH, EG.; POLYNTSEV, DG., OTELLIN, VA. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. *Brain Research* v.1233, p.203-213, 2008.

PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, San Diego, 2004.

PHAN, TG., WRIGHT, P.M.; MARKUS, R.; HOWELLS, D.W.; DAVIS, S.M.; DONNAN, G.A. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v.29, p.1-10, 2002.

PLASCHKE K, MARTIN E, BARDENHEUER HJ. Effect of propentofylline on hippocampal brain energy state and amyloid precursor protein concentration in a rat model of cerebral hypoperfusion. *J Neural Transm.* v.105(8-9), p.1065-77, 1998.

PSALTIS PJ, ZANNETTINO AC, GRONTHOS S, WORTHLEY SG. Intramyocardial navigation and mapping for stem cell delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* v.3(2),p135-46, 2010.

RADANOVIC M. Características do atendimento de pacientes com acidente vascular cerebral em hospital secundário. *Arq Neur Psiq* v.58, n.1, p.99-106, 2000.

RE DB, NAFIA I, MELON C, SHIMAMOTO K, KERKERIAN-LE GOFF L, HAD-AISSOUNI L. Glutamate leakage from a compartmentalized intracellular metabolic pool and activation of the lipoxygenase pathway mediate oxidative astrocyte death by reversed glutamate transport. *Glia.* v.54(1), p.47-57, 2006.

REMPLE MS, BRUNEAU RM, VANDENBERG PM, GOERTZEN C, KLEIM JA. Sensitivity of cortical movement representations to motor experience: evidence that skill learning but not strength training induces cortical reorganization. *Behav Brain Res.* v.123(2), p.133-41, 2001.

RODRIGO J, FERNANDEZ AP, SERRANO J, PEINADO MA, MARTINEZ A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med.* v.39, p.26 – 50, 2005.

SANCHEZ-RAMOS, J., SONG, S., CARDOZO-PELAEZ, F., HAZZI, C., STEDEFORD, T., WILLING, A., FREEMAN, TB., SAPORTA, S., JANSSEN, W., PATEL, N. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol.* v. 164, p. 247-256, 2000.

SCHAECHTER JD. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol.* v.73(1), p.61-72, 2004.

SCHALLER, B., GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab.* v.24, p.351-371, 2004.

SCHALLERT, T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx.* v.3, p.497–504, 2006.

SCHRAMM, JMA., OLIVEIRA, AF., LEITE, IC., VALENTE, JG., GADELHA, AMJ., PORTELA, MC., CAMPOS, MR. Transição epidemiológica e o estudo de carga de doença no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.9(4), p.897-908, 2004.

SHARKEY J, BUTCHER SP. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *Journal of Neuroscience Methods* v.60, p.125-131, 1995.

SHEN LH, LI Y, CHEN J, ZACHAREK A, GAO Q, KAPKE A, LU M, RAGINSKI K, VANGURI P, SMITH A, CHOPP M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* v.27(1), p.6-13, 2007.

SOKOLOVA, IB., FEDOTOVA, OR., ZIN'KOVA, NN., KRUGLYAKOV, PV., POLYNTSEV, DG. Effect of Mesenchymal Stem Cell Transplantation on Cognitive Functions in Rats With Ischemic Stroke. *Cell Technologies in Biology and Medicine*, v.2(4), p.511 – 514; 2006.

STEINDLER, DA. Stem cells, regenerative medicine and animal models of disease. *Har. J.* v.48, p.323–338, 2007.

STOKES, M. Neurologia para Fisioterapeutas. São Paulo: Premier, 2000.

STOODLEY CJ, SCHMAHMANN JD. Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing. *Cortex.* v.46(7), p.831-44, 2010.

SUGIYAMA M, IOHARA K, WAKITA H, HATTORI H, UEDA M, MATSUSHITA K, NAKASHIMA M. Dental pulp-derived CD31⁻/CD146⁻ side population

stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng Part A*. 2011.

THIELMAN GT, DEAN CM, GENTILE AM. Rehabilitation of reaching after stroke: task-related training versus progressive resistive exercise. *Arch Phys Med Rehabil*. v.85(10), p.1613-8,2004.

TOMBARI D, LOUBINOX I, PARIENTE J, GERDELAT A, ALBUCHER JF, TARDY J, CASSOL E, CHOLLET F. A longitudinal fMRI study: in recovering and then in clinically stable sub-cortical stroke patients. *Neuroimage*. v.23(3), p.827- 39, 2004.

VACCARINO, F. M., GANAT, Y., ZHANG, Y. E ZHENG, W. Stem Cells in Neurodevelopment and Plasticity. *Europsychopharmacology*. v.25(6), 2001.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

WAKABAYASHI K, NAGAI A, SHEIKH AM, SHIOTA Y, NARANTUYA D, WATANABE T, MASUDA J, KOBAYASHI S, KIM SU, YAMAGUCHI S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res*. 2010.

WHISHAW IQ, O'CONNOR WT, DUNNETT SB. The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain*. v.109 (Pt 5), p.805-43, 1986.

WINDLE, V.; SZYMANSKA, A.; GRANTER-BUTTON, S.; WHITE, C.; BUIST, R.; PEELING, J.; CORBETT, D. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*. v.201, p.324–334, 2006.

WISLET-GENDEBIEN, S.; LEPRINCE, P.; MOONEN, G.; REGISTER, B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. *Journal of cell Science*. v. 16(Pt 16), p.3295-302, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Project Investigators: The World Health Organization - MONICA Project (Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease). *J Clin Epidemiol*. v.41, p.105-114, 1988.

YALVAC ME, RIZVANOV AA, KILIC E, SAHIN F, MUKHAMEDYAROV MA, ISLAMOVIĆ RR, PALOTÁS A. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr Pharm Des*.v.15(33), p.3908-16, 2009.

YANG, G.Y.; GONG, C.; QIN, Z.; LIU, X.H.; LORRIS BETZ, A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res*. v.69, p.135-143, 1999.

YANG, G.Y.; GONG, C.; QIN, Z.; LIU, X.H.; LORRIS BETZ, A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res*. v.69, p.135-143, 1999.

YIN, JJ., SELANDER, K., CHIRGWIN, JM., DALLAS, M., GRUBBS, BG., WIESER, R., MASSAGUE, J., MUNDY, GR., GUISE, TA. TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J. Clin. Invest.* v.103, p.197–206, 1999.

ZAGO, MA., COVAS, DT. Células-tronco: A nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu. 2006.