ADRIANO BARRETO NOGUEIRA

**Mapeamento de potencial nicho neurogênico
no lobo temporal humano**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eurípedes
Marchiori

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Adriano Barreto

Mapeamento de potencial nicho neurogênico no lobo temporal humano /
Adriano Barreto Nogueira. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.

Orientador: Paulo Eurípedes Marchiori.

Descritores: 1.Neurogênese 2.Nicho de células-tronco 3.Humanos 4.Adulto
5.Lobo temporal 6.Sistema límbico

*Aos meus filhos,
Pedro e Guilherme*

Agradecimentos

A realização desta tese foi possível somente graças à ajuda de um grande número de pessoas que conheci nos caminhos que percorri pela Universidade de São Paulo desde 1990. A lembrança dos nomes de algumas destas pessoas serve também para representar cada pessoa que eu espero que se reconheça nestes agradecimentos porque sabe do valor que eu atribuo à sua contribuição, apesar de seu nome não ser mencionado pela limitação de espaço. Assim, agradeço aos Professores Paulo Eurípedes Marchiori e Manoel Jacobsen Teixeira, sem o apoio dos quais eu não defenderia minha tese neste momento. Agradeço à Professora Umbertina Reed, aos Professores Newton Canteras, Fernando Kok e Erich Fonoff, à Doutora Carmen Lisa Jorge e aos membros da banca examinadora da minha tese, pela contribuição nas diversas etapas do doutorado. Por manterem o apoio durante o longo período de realização da minha pesquisa, agradeço às Professoras Mari Cleide Sogayar e Alison Colquhoun, ao Professor Jarbas Bauer e à Doutora Sheila Aparecida Siqueira. Pela ajuda no dia-a-dia da minha pesquisa, agradeço a todas as pessoas do laboratório de Metabolismo da Célula Tumoral do ICB – USP (Juliano, Marley, Renata, Andrew e todos os outros) e do Nucel – USP (a todos, incluindo a Zizi, o Fernando, a Letícia e, em especial, à Marluce, pela paciência em me ensinar a usar o micrótomo e pela ajuda na instalação do estereomicroscópio), à Ana Lucia Garippo (Núcleo de Microscopia Confocal, Incor) e aos membros dos Departamentos de Patologia e Neurologia do Hospital das Clínicas, principalmente à Doutora Regina Schultz e ao Doutor Luiz Henrique Castro. Agradeço aos colegas intensivistas (Doutores Juan Carlos Monasterio e José Abi Karam, além das Doutoradas Adriana Satie Morimoto e Márcia Trarbach) e neurocirurgiões (Doutores Juan Antonio Castro Flores e Belarmino Fonseca Cordoba), que, pela ajuda nos meus trabalhos como médico, permitiram que eu tivesse

melhores condições para prosseguir com minhas pesquisas. O exemplo dos meus colegas médicos-cientistas Doutores Vinícius Guirado e Bomfim Alves da Silva Jr. foram uma motivação por mostrarem que vale a pena tentar conciliar pesquisa e assistência. Por último, agradeço à pessoa que sintetiza toda a ajuda que recebi e que considero meu mentor, o Doutor Wen Hung Tzu. O ponto de partida da minha pesquisa foi o que aprendi com ele sobre cirurgia de epilepsia e considero sua maneira de trabalhar um caminho ideal para alguém que queira produzir algo de valor na ciência médica.

Esta tese também não seria concluída sem ter como base o suporte emocional dado por meus pais, meus irmãos e minha irmã.

Por último, espero que meu trabalho possa servir para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças neurológicas. Esta seria uma maneira de retribuir o altruísmo das pessoas que permitiram a realização de autópsia em seus parentes queridos, cujos cérebros mudaram minha mente, seja ela o que for.

Financiamento

Esta tese recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processo número 552644/2005-6) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo número 2010/51634-1).

What is mind?

No matter.

What is matter?

Never mind.*

Thomas Hewitt Key, 1799 – 1875

*O que é a mente? / Não importa. / O que é a matéria? / Deixa pra lá.

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Neurogênese mamífera adulta	1
1.2	Neurogênese humana adulta	3
1.3	Imuno-histoquímica	6
1.4	Função da neurogênese adulta	9
1.5	Doenças neuropsiquiátricas e neurogênese	10
1.6	Terapias de neuroregeneração	11
1.7	Objetivo	12
2	MÉTODOS	13
2.1	Aprovação ética e captação dos encéfalos	13
2.2	Estatística	13
2.3	Dissecção dos encéfalos	13
2.4	Imuno-histoquímica e histologia	15
2.5	Microscopia	16
3	RESULTADOS	18
3.1	Dados gerais	18
3.2	Desenvolvimento do protocolo de imuno-histoquímica	18

3.3	Controle positivo da marcação para nestina	18
3.4	Influência de fatores além da imuno-histoquímica	19
3.5	Marcação para nestina entre a ZSV e o subículo	20
3.6	Marcação para DCX entre o subículo e a fímbria	22
3.7	Marcação para astrócitos e neurônios	23
3.8	Plano geral da localização dos marcadores	24
4	DISCUSSÃO	26
4.1	Protocolo de imuno-histoquímica em encéfalos humanos	26
4.2	Células endoteliais nestina-positivas	28
4.3	Novo nicho neurogênico: LECCEL	31
4.4	Evidências de neurogênese na LECCEL	33
4.5	Hipótese sobre o mecanismo de neurogênese na LECCEL	35
4.6	Direções futuras	37
4.6.1	Detalhamento das características da LECCEL	37
4.6.1.1	Fenótipos	37
4.6.1.2	Idade replicativa	40
4.6.1.3	Destino das células-tronco neurais na LECCEL	41
4.6.1.4	Rastreamento da linhagem celular na neurogênese	42
4.6.2	Extensão da LECCEL além do lobo temporal	43
4.6.3	Implicações da LECCEL como nicho neurogênico	45
4.5.3.1	Fisiologia	45
4.5.3.2	Patologia	45
4.5.3.3	Clínica	46
4.7	Conclusões e perspectivas	46

5	ANEXOS	48
5.1	Anexo A. Tabelas	48
5.2	Anexo B. Figuras	55
6	REFERÊNCIAS	78

Lista de abreviaturas e siglas

BMP	“bone morphogenetic protein”
BrdU	bromodeoxiuridina
CCDP	camada de células DCX-positivas
CCNP	camada de células nestina-positivas
CEACAM-1	“carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1”
CENP	célula endotelial nestina-positiva
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTN	célula-tronco neural
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DCX	“doublecortin”
EXCEL	“external line of cells of the limbic system”
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GFAP	“glial fibrillary acid protein”
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
LCR	líquido cefalorraquidiano
LECEL	linha externa de células do sistema límbico
MAP-2	“microtubule associated protein-2”
PCNA	“proliferating cell nuclear antigen”
PSA-NCAM	“polysialylated neural cell adhesion molecule”
SGZ	“subgranular zone”
SVZ	“subventricular zone”
TELI-FISH	“telomere/immunostaining-fluorescence ‘in situ’ hybridization”
TUNEL	“TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling”
USP	Universidade de São Paulo
ZSG	zona subgranular
ZSP	zona subpial
ZSV	zona subventricular

Nogueira AB. *Mapeamento de potencial nicho neurogênico no lobo temporal humano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

No final do século 19, o neurônio foi descrito como a unidade funcional básica do sistema nervoso e sua formação era considerada inexistente na fase adulta, explicando a ausência de recuperação significativa em doenças neurológicas. Evidências de geração de neurônios em mamíferos adultos surgiram na década de 1960 e foram confirmadas três décadas depois. Atualmente, predomina a visão de que mamíferos adultos possuem dois nichos neurogênicos independentes: a zona subventricular (ZSV) e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado. No entanto, a existência de nichos neurogênicos em humanos adultos é controversa. Nossa hipótese foi de que o mapeamento de nichos neurogênicos no lobo temporal humano poderia esclarecer aspectos sobre a neurogênese adulta. A detecção destes nichos foi buscada em 28 lobos temporais através de imuno-histoquímica para nestina, o marcador mais comum de células-tronco neurais, que são aquelas capazes de se autorrenovar e de gerar novas células neurais. A neurogênese foi pesquisada no hipocampo pelo uso de DCX (do inglês “doublecortin”), o principal marcador de neuroblastos e neurônios imaturos. Nestina foi observada em uma camada contínua formada pela ZSV, zona subpial do lobo temporal medial e ZSG, terminando no subículo. A partir do subículo, uma intensa expressão de DCX ocorreu através da principal via eferente do hipocampo até a fímbria. A visão panorâmica das marcações por nestina e DCX mostrava em conjunto uma linha que circundava as estruturas límbicas do lobo temporal. Por isto, foi denominada linha externa de células do sistema límbico (LECEL). Uma possível explicação para os resultados é que a LECEL seja um nicho neurogênico no qual a ZSV, a zona subpial do lobo temporal medial e a ZSG formam uma unidade contendo células-tronco neurais que se diferenciam em neurônios no subículo.

Curiosamente, a área identificada previamente como sendo a corrente migratória rostral humana (formada por células neurais imaturas migrando a partir da ZSV do corno frontal) pode ser na verdade o fórnix, que contém axônios originados no subículo. A implicação mais intrigante dos resultados é que se as características da LECEL seguirem além do lobo temporal, então o encéfalo humano pode conter um anel neurogênico límbico, em que a neurogênese ocorreria principalmente no subículo e seria modulada pelas estruturas relacionadas à fissura coroideia. Este estudo sugere que a neurogênese ocorre de maneira orquestrada em uma área ampla do lobo temporal humano.

Descritores: Neurogênese; Nicho de células-tronco; Humanos; Adulto; Lobo temporal; Sistema límbico.

Nogueira AB. *Mapping of potential neurogenic niche in the human temporal lobe* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

At the end of the 19th century, the neuron was described as the basic functional unit of the nervous system. The formation of neurons was thought to be absent in adulthood, thus explaining the lack of significant recovery from neurological diseases. Evidence for the generation of neurons in adult mammals was reported in the 1960s and confirmed three decades later. Currently, the prevailing view is that adult mammals harbour two neurogenic niches: the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus and the subventricular zone (SVZ). Nonetheless, the existence of these niches in adult humans is controversial. We hypothesised that mapping neurogenic niches in the human temporal lobe could clarify this issue. The presence of neurogenic niches was examined in 28 temporal lobes via immunostaining for nestin, the most common marker for neural stem cells, which are cells with the capacities of self-renewal and the generation of neural cells. The presence of neurogenesis was examined in the hippocampus with doublecortin (DCX), a prominent marker for neuroblasts and immature neurons. Nestin was observed in a continuous layer that was formed by the SVZ, the subpial zone of the medial temporal lobe and the SGZ, terminating in the subiculum. In the subiculum, remarkable DCX expression was observed through the principal efferent pathway of the hippocampus to the fimbria. A panoramic view of nestin and DCX staining collectively displayed a line that surrounded the limbic structures of the temporal lobe. Hence, we termed it the external line of cells of the limbic system (EXCEL). A possible explanation for the results is that the EXCEL is a neurogenic niche, in which the SVZ, the subpial zone of the medial temporal lobe and the SGZ form a unit containing neural stem cells that differentiate into neurons in the subiculum. Curiously, the area previously identified as the human rostral

migratory stream (formed by immature neural cells that migrate from the SVZ of the frontal horn) may in truth be the fornix, which contains axons that originate in the subiculum. Perhaps most intriguingly, if the EXCEL acts as a neurogenic niche beyond the boundaries of the temporal lobe, the human brain may contain a limbic neurogenic ring, in which neurogenesis would occur in the subiculum through the modulation of choroid fissure-related structures. This study suggests that neurogenesis may occur in an orchestrated manner in a broad area of the human temporal lobe.

Descriptors: Neurogenesis; Stem cell niche; Humans; Adult; Temporal lobe; Limbic system.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neurogênese mamífera adulta

O estudo da neurogênese adulta é um ramo do conhecimento com início tardio em comparação à descrição do neurônio, feita por Ramon y Cajal no fim do século 19. Este atraso é em parte atribuído a conclusões de seu estudo publicado em 1913-1914: “Nos centros adultos, as vias neurais são como que fixas, terminadas, imutáveis” e “tudo deve morrer, nada pode ser regenerado”¹. Estas conclusões ficaram rotuladas como o “Dogma Central da Neurobiologia”². No entanto, os críticos de Ramon y Cajal subestimam as perspectivas postuladas por ele, na forma de um desafio à pesquisa científica: “Está para a ciência do futuro mudar, se possível, este duro decreto”^{1,2}.

De fato, este desafio começou a ser vencido apenas quase meio século depois. Em 1962, Altman³ relatou as primeiras evidências de neurogênese mamífera adulta. Contudo, mesmo seus estudos não tiveram grande repercussão inicialmente, em função de dois fatores principais: as limitações técnicas da época e a falta de perspectiva de uma possível aplicação deste conhecimento.

Trabalhos desta natureza foram retomados primeiramente em pássaros. Em 1983, Goldman e Nottebohm⁴ descreveram neurogênese adulta ocorrendo no núcleo do controle vocal, denominado hiperestriado. Para isto, administraram timidina tritiada a canárias. A timidina tritiada é incorporada ao DNA de células em divisão e pode ser detectada por autorradiografia. Os cérebros analisados precocemente após a administração da timidina tritiada continham células marcadas na zona ventricular e os cérebros analisados em períodos tardios continham neurônios do núcleo do controle vocal

marcados pela timidina tritiada. Estes resultados indicaram que neurônios são formados na fase adulta a partir de células progenitoras localizadas na zona ventricular.

A neurogênese mamífera adulta foi novamente demonstrada em 1992, por Reynolds e Weiss⁵. Estes autores realizaram cultura de células a partir de amostras obtidas do corpo estriado de camundongos. Em meio de cultura contendo fator de crescimento epitelial, aproximadamente 1,5% das células proliferaram. Cada célula em proliferação mantinha-se agrupada em esferas com suas descendentes. Imunofluorescência realizada posteriormente nestas esferas revelou a existência de células que expressavam nestina, até então utilizada como marcador de células-tronco neurais (CTNs) embrionárias⁶, além de outras células que expressavam marcadores de neurônios e astrócitos. Desta maneira, este estudo caracterizou CTNs, que são células capazes de se autorrenovar e de gerar células do sistema nervoso (neurônios, astrócitos e oligodendrócitos), em indivíduos mamíferos adultos.

O ensaio de neuroesferas passou a ser empregado com frequência cada vez maior e foi associado a estudos “in vivo” através da imuno-histoquímica na pesquisa de neurogênese mamífera adulta. Atualmente, o consenso na literatura é de que a neurogênese mamífera adulta ocorra em dois microambientes específicos, os chamados nichos neurogênicos: a zona subventricular (ZSV)⁷ e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado⁸. Estes dois nichos neurogênicos são considerados estruturas independentes. As CTNs se proliferam a partir da ZSV, principalmente na região anterior do ventrículo lateral, migram pela chamada corrente migratória rostral e se diferenciam em neurônios no bulbo olfatório. As células geradas a partir da ZSG migram por uma curta distância até o giro denteado e se diferenciam em neurônios granulares.

1.2 Neurogênese humana adulta

A descrição de nichos neurogênicos na espécie humana é mais controversa em relação a roedores. A primeira evidência de que o encéfalo humano adulto contém CTNs foi relatada por Kirschembaun et al.⁹ em 1994. Estes autores coletaram amostras cirúrgicas de pacientes com esclerose mesial temporal, uma forma de atrofia do hipocampo. A formação de neurônios a partir deste tecido foi demonstrada “in vitro” pelo método da timidina tritiada, que foi detectada em células com características morfológicas e funcionais de neurônios.

A demonstração da neurogênese humana adulta constitutiva, ou seja, ocorrendo fisiologicamente, foi realizada por Eriksson et al.¹⁰ em 1998, em um estudo considerado seminal no campo da neurogênese adulta. Para isto, estes pesquisadores analisaram o cérebro de pessoas com óbito por carcinoma de faringe e laringe que haviam recebido bromodeoxiuridina (BrdU) como forma de avaliação clínica do tumor. A BrdU é um análogo da timidina que se incorpora ao DNA de células em divisão e pode ser detectada posteriormente através de imuno-histoquímica. Os autores identificaram células granulares do giro denteado com comarcação por BrdU e marcadores de neurônios maduros. Estes resultados foram considerados prova da existência de neurogênese humana adulta constitutiva, que no lobo temporal foi identificada somente no giro denteado. O método de incorporação de BrdU tornou-se o padrão ouro para a demonstração de neurogênese humana adulta, mas nenhum estudo o usou novamente com esta finalidade, talvez pela dificuldade técnica em realizá-lo.

A formação de neurônios na camada granular do giro denteado humano sugere a existência de CTNs na ZSG, por analogia ao que ocorre em roedores.

Curiosamente, raros estudos relatam a busca de CTNs na ZSG humana. Apenas um estudo mostra células que expressam o principal marcador de CTNs (nestina) na ZSG humana¹¹ e outro estudo não detectou células nestina-positivas nesta localização¹². Por outro lado, CTNs foram repetidamente detectadas pelo ensaio de neuroesferas a partir de amostras do hipocampo obtidas principalmente em lobectomias temporais por esclerose mesial temporal¹³⁻²⁶.

A existência de neurogênese adulta constitutiva na ZSV humana também é controversa²⁷⁻³⁰. Em 2004, Sanai et al.²⁷ reforçaram evidências prévias de existência de CTNs na topografia das paredes dos ventrículos laterais, utilizando o ensaio de neuroesferas a partir de amostras obtidas em cirurgias que envolviam acesso ao ventrículo lateral. Contudo, o dado mais relevante deste estudo foi um resultado negativo. Através de imuno-histoquímica para marcadores de neuroblastos e neurônios imaturos em cérebros coletados em autópsias de indivíduos sem história de doença neurológica, os autores não identificaram uma corrente migratória rostral. A corrente migratória rostral foi buscada em cortes coronais que envolviam os cornos frontais dos ventrículos laterais e a topografia do pedúnculo olfatório. Além disso, a partir do pedúnculo olfatório foram avaliados o trato e o bulbo olfatórios. A conclusão deste estudo foi de que células com o potencial de apresentar “in vitro” as características de CTNs existem na ZSV humana, mas por um mecanismo desconhecido não formam neurônios no cérebro adulto. Este estudo reforçou o conceito de que a neurogênese humana adulta é inexistente, ao menos a partir da ZSV.

Contudo, evidências da existência de uma corrente migratória rostral humana foram mostradas três anos após, por Curtis et al.²⁸. Para isto, os autores também realizaram imuno-histoquímica para marcadores de neuroblastos e neurônios imaturos em cérebros

coletados em autópsias. O resultado principal deste estudo é que a estrutura definida como corrente migratória rostral humana localiza-se em uma região diferente da esperada considerando a anatomia comparada entre roedores e humanos. Desta maneira, os marcadores utilizados neste estudo são mostrados em uma corrente formada por dois braços. O primeiro deles representa cerca de 90% da área marcada, origina-se difusamente na topografia medial e inferior do corno frontal e converge em um feixe que corre no sentido inferior, posterior e lateral à cabeça do núcleo caudado, terminando na topografia do pedúnculo olfatório. O segundo braço corresponde a um feixe menor que começa na topografia do pedúnculo olfatório e segue através do trato olfatório em direção ao bulbo olfatório. Nesta corrente migratória rostral foram também identificados núcleos que expressavam PCNA (do inglês “proliferating cell nuclear antigen”), um marcador de proliferação celular, mas o tipo celular que se proliferava não foi definido. A análise da área identificada como corrente migratória rostral por microscopia eletrônica revelou núcleos celulares com morfologia de núcleos de neuroblastos, sugerindo a existência de migração deste tipo celular por esta corrente. Este estudo apresentou um resultado diferente do esperado até aquele momento em relação à corrente migratória rostral humana.

A controvérsia sobre a existência da corrente migratória rostral humana persiste até os dias atuais. Desta maneira, Sanai et al.²⁹ reavaliaram esta questão e concluíram que a corrente migratória rostral humana existe apenas em crianças com até 18 meses de vida aproximadamente. Este estudo mostra cortes coronais realizados na topografia da parede anterior do corno frontal, mas com a topografia dos corpos mamilares sendo mencionada como o limite inferior destes cortes, ou seja, posteriormente ao realizado no estudo prévio deste grupo. Os autores também identificaram a partir da

localização definida como corrente migratória rostral uma bifurcação que corria medialmente, em direção ao córtex pré-frontal.

Uma questão que não ficou esclarecida nos estudos que encontraram uma corrente migratória rostral humana foi o destino das células que a formam. Em um relato, a área desta corrente é maior em seu início e mínima em seu suposto trajeto final no trato e bulbo olfatórios²⁸. Em outro relato, esta corrente não atinge o trato olfatório e não há sinais de morte celular por apoptose³⁰.

A localização anatômica descrita para a corrente migratória rostral humana não foi englobada em nosso estudo, mas iremos mostrar que nossos resultados podem contribuir para o esclarecimento das controvérsias sobre este tema.

Embora o consenso atual seja de que a neurogênese mamífera adulta ocorra a partir de nichos neurogênicos localizados na ZSG e ZSV, CTNs têm sido identificadas esporadicamente em áreas supostamente não-neurogênicas. Por exemplo, a zona subpial (ZSP) de mamíferos tem gerado achados intrigantes em condições normais e patológicas³¹⁻³³. Na espécie humana, as CTNs foram identificadas por cultura de células a partir de amostras coletadas na topografia de áreas como o neocórtex^{14,16,21,22,27}, a substância branca^{21,24} e a amígdala²¹, mas a localização precisa na citoarquitetura não foi avaliada nestes estudos.

1.3 Imuno-histoquímica

Os principais métodos para estudo da neurogênese humana adulta são o ensaio de neuroesferas (ou cultura de células em monocamada, em um menor número de estudos)³⁴ e a imuno-histoquímica, que é o método mais indicado para avaliar a localização anatômica de potenciais nichos neurogênicos. Apesar da relevância da imuno-

histoquímica, seus limites técnicos têm sido subestimados e a otimização de protocolos deste método por si só constituem um objetivo para o estudo da neurogênese humana adulta³⁵⁻³⁷.

Assim, o aperfeiçoamento de técnicas de dissecação e de imuno-histoquímica pode contribuir para o esclarecimento das controvérsias quanto à existência e localização de nichos neurogênicos na espécie humana. Poucos protocolos foram descritos para esta finalidade³⁵⁻³⁷. Na prática, alguns detalhes técnicos devem ser considerados. As circunstâncias do óbito podem ser um obstáculo para resultados confiáveis, especialmente a idade, a existência de doenças prévias, a causa do óbito e o período pré-agônico; o mesmo é válido para o período entre o óbito e a fixação do tecido.

A padronização da dissecação do encéfalo também deve ser buscada porque um motivo das controvérsias sobre a neurogênese humana adulta pode ser a dificuldade em identificar parâmetros anatômicos e a localização das estruturas encefálicas na citoarquitetura. Adicionalmente, o conhecimento das conexões dos núcleos encefálicos e do córtex cerebral pode contribuir para a interpretação de resultados em estudos sobre neurogênese humana adulta, embora este aspecto não tenha sido mencionado previamente, possivelmente por não ser considerado relevante nesta área de pesquisa.

Quanto ao tipo de tecido³⁸, deve-se lembrar da autofluorescência decorrente dos grânulos de lipofuscina em neurônios. A autofluorescência também ocorre com hemácias, ocasionalmente mantidas em peças de autópsias. Quanto a marcadores de neurogênese, uma limitação pode ser a pouca informação sobre controles positivos. Além disso, há evidências de que o tempo e a temperatura de exposição aos anticorpos primários interfiram no resultado do experimento. Esta informação é particularmente mencionada

para a nestina³⁹. Também a recuperação antigênica pode interferir significativamente no resultado de alguns marcadores relacionados à neurogênese.

A própria microscopia em si deve ser levada em conta na demonstração dos resultados: em função da heterogeneidade da citoarquitetura do encéfalo, resultados interessantes poderiam ser desvendados através de imagens com menores aumentos do que com a microscopia convencional⁴⁰.

Além das limitações relacionadas à imuno-histoquímica em cérebro humano, uma dificuldade para o estudo da neurogênese adulta é a ausência de marcadores específicos para CTNs⁴¹ e neurogênese⁴²⁻⁵², identificada pela presença de neuroblastos ou neurônios imaturos.

Atualmente, o marcador mais utilizado para identificação de CTNs é a nestina^{6,41,53}. A nestina é uma proteína de filamento intermediário de classe VI, cujo gene que a codifica foi identificado e isolado a partir da pesquisa de um marcador de células-tronco presente durante o desenvolvimento embrionário do encéfalo⁶. Desde então, a expressão de nestina tem sido demonstrada também na embriogênese de tecidos originados a partir das três camadas germinativas, assim como em regeneração, tumorigênese e sob condições fisiológicas destes mesmos tecidos, em animais adultos^{41,53}. Portanto, a nestina é detectada sob diferentes condições, em uma grande variedade de tecidos e em um amplo espectro de intensidades, o que tem prejudicado uma síntese quanto às suas principais funções.

O principal marcador para neuroblastos e neurônios imaturos, que indicam ocorrência de neurogênese, é DCX (do inglês “doublecortin”). DCX é uma proteína associada a microtúbulo. O gene que a codifica foi isolado a partir da descoberta de sua

mutação em casos de lissencefalia e síndrome do duplo córtex, que apresentam alteração na migração de neuroblastos durante a neurogênese fetal⁴². DCX tem sido descrita num amplo espectro de fenótipos em relação à diferenciação, variando de neuroblastos⁴³ e células progenitoras oligodendrogliais⁵⁴ a células neurais maduras⁴⁶. Entre estes extremos, DCX foi mostrada como sendo um marcador de plasticidade neural^{52,55}.

Portanto, a marcação por nestina ou DCX não são uma prova de que a célula marcada seja uma CTN ou um neuroblasto, respectivamente. No entanto, a morfologia e localização de células que expressam nestina ou DCX avaliadas em contexto podem fornecer evidências de um potencial nicho neurogênico.

1.4 Função da neurogênese adulta

A função da neurogênese adulta é desconhecida, embora sejam conhecidos fatores que a influenciem, como correr⁵⁶ e o aprendizado⁵⁷. A neurogênese no bulbo olfatório de roedores é mais significativa do que no giro denteado⁷, provavelmente pela relevância do olfato na sobrevivência do animal. No entanto, a função da neurogênese a partir da ZSG tem despertado mais interesse porque o hipocampo é uma estrutura fundamental para a memória e o aprendizado. Atualmente, a hipótese prevalente é de que a neurogênese no giro denteado de mamíferos adultos pode estar relacionada à memória e ao aprendizado⁵⁸ através de dois mecanismos⁵⁹: a separação de padrões e a hiperexcitabilidade de neurônios imaturos.

A separação de padrões é o processo em que diferentes estímulos são discriminados através de uma grande gama de padrões de resposta das células granulares em conjunto⁵⁹. Esta capacidade de discriminação pelo giro denteado é atribuída à existência de um número maior de neurônios neste giro em comparação à sua principal

aferência, o córtex entorrinal. A neurogênese no giro denteado adulto pode contribuir com o número total de neurônios nesta estrutura.

Células em diferenciação neuronal no giro denteado também contribuem com a memória e o aprendizado devido à sua hiperexcitabilidade⁵⁹. Por exemplo, estas células apresentam limiar menor para a potencialização de longo prazo, um mecanismo de formação de memória⁵⁹. De maneira semelhante, no paradigma do labirinto aquático de Morris, no qual o animal normalmente localiza em tempos progressivamente menores uma plataforma submersa na água guiando-se por estímulos do ambiente, estas células em diferenciação neuronal são mais ativas do que as células granulares maduras; quando maduras e integradas à circuitaria neuronal, também apresentam maior atividade em relação às demais células granulares ao serem expostas novamente ao mesmo teste⁵⁹.

Em resumo, o estado atual do conhecimento tanto sobre memória quanto sobre neurogênese tem levado à expectativa de que evidências de existência de neurogênese humana adulta no lobo temporal medial possam contribuir para o esclarecimento de mecanismos da memória.

1.5 Doenças neuropsiquiátricas e neurogênese

As controvérsias sobre neurogênese adulta dificultam o estudo de sua eventual participação em doenças neuropsiquiátricas, mas de acordo com as poucas evidências disponíveis a neurogênese no giro denteado está alterada nestas doenças^{60,61}. Desta maneira, o número de células positivas para marcadores de divisão celular no giro denteado está diminuído na esquizofrenia⁶⁰. Na doença de Alzheimer, a proliferação celular é maior, mas não envolve linhagem neuronal⁶⁰. Na epilepsia do lobo temporal, a neurogênese é maior, mas leva à formação de neurônios granulares ectópicos que

provavelmente contribuem para a formação de circuitos neuronais aberrantes e para a persistência das crises epiléticas⁶¹; entretanto, pacientes cirúrgicos de epilepsia do lobo temporal com maior capacidade de neurogênese demonstrada “in vitro” apresentam melhor desempenho na avaliação pré-operatória da memória⁶². Acidente vascular encefálico^{60,61} e traumatismo cranioencefálico⁶¹, que também podem envolver o lobo temporal, levam a aumento da neurogênese, mas a origem das células positivas para marcadores de neurônios imaturos é desconhecida e uma melhora clínica por este mecanismo não foi demonstrada⁶¹.

1.6 Terapias de neuroregeneração

O conhecimento sobre células-tronco embrionárias e adultas tem levado ao desenvolvimento de ensaios clínicos envolvendo neuroregeneração⁶³. De maneira geral, células-tronco embrionárias, CTNs embrionárias e células-tronco da medula óssea de adultos têm sido testadas como terapia em doenças neurológicas degenerativas, acidente vascular encefálico e traumatismos cranioencefálico e raquimedular⁶³. No entanto, até o momento nenhum estudo ultrapassou as fases iniciais de ensaios clínicos⁶³.

A determinação de potenciais nichos neurogênicos no encéfalo humano implica duas possíveis estratégias clínicas para a neuroregeneração através de CTNs: o estímulo à neurogênese “in vitro” ou “in vivo”. O conhecimento da distribuição citoarquitetônica das CTNs permitiria seu isolamento com maior eficiência para o desenvolvimento de aplicações clínicas através da manipulação “in vitro”. Além disso, fatores sistêmicos e do microambiente de um nicho neurogênico poderiam ser usados para modular a neurogênese “in vivo”. Por exemplo, a influência da inflamação na neurogênese induzida por lesão (fator sistêmico)⁶⁴ e a relação entre a vasculogênese e

neurogênese (fator do microambiente)⁶⁵ podem guiar estratégias de terapia de neuroregeneração através da modulação da neurogênese “in vivo”.

1.7 Objetivo

O objetivo deste estudo foi esclarecer aspectos da neurogênese adulta através do mapeamento de nichos neurogênicos no lobo temporal humano.

O lobo temporal humano foi escolhido pelas poucas evidências através da imuno-histoquímica de que a ZSG humana é um nicho neurogênico^{11,12}. Além disso, a localização de CTNs através do método “in vitro” pode ser imprecisa em função da complexidade da anatomia microcirúrgica desta região, do volume de tecido normalmente usado neste tipo de pesquisa e da possível influência da fisiopatologia da epilepsia do lobo temporal, principal fonte de obtenção de CTNs na espécie humana⁶⁶. Outra justificativa para este objetivo é a falta de dados sobre a localização na citoarquitetura das CTNs identificadas pelo ensaio de neuroesferas em áreas do lobo temporal supostamente não-neurogênicas²¹.

2 MÉTODOS

2.1 Aprovação ética e captação dos encéfalos

Os encéfalos foram obtidos após aprovação deste projeto pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (Protocolo de Pesquisa nº 013 / 05) e pelo Serviço de Verificação de Óbitos da Capital. Os critérios para inclusão dos encéfalos foram baseados naqueles utilizados em estudos semelhantes, envolvendo autópsias. Por isso, programou-se a dissecação dos lobos temporais de pessoas com óbito a partir dos 16 anos, cuja causa de morte não envolvesse patologia neurológica diagnosticada clinicamente ou pela autópsia. O tempo entre o óbito e a fixação do tecido deveria ser menor do que 24 h. Blocos de glioblastoma e carcinoma hepatocelular utilizados para a padronização do protocolo de imuno-histoquímica foram obtidos no arquivo do Departamento de Patologia do HCFMUSP.

2.2 Estatística

A estatística descritiva e as inferências estatísticas (teste U de Mann-Whitney) foram realizadas com o uso do software “Statistica Trial Version” (Star Soft, Tulsa, EUA). Os resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$ para teste unilateral.

2.3 Dissecação dos encéfalos

A dissecação dos encéfalos foi feita à mão livre, com lâminas para micrótomo. Logo após a retirada do encéfalo do cadáver, o mesencéfalo era separado da ponte e do cerebelo. O corpo caloso era seccionado para separação dos hemisférios. Os hemisférios eram então mantidos por 45 a 60 min em solução gelada de formaldeído, tempo mínimo

necessário para tornar a consistência dos hemisférios adequada para dissecação (tempos mais prolongados melhorariam ainda mais a consistência, mas levariam à degradação de proteínas em áreas profundas que seriam alcançadas mais tardiamente pela solução de formaldeído). Cada hemisfério foi cortado axialmente na topografia da linha das comissuras anterior e posterior. Algumas variações pequenas na dissecação foram realizadas, para documentação fotográfica dos parâmetros anatômicos (Anexo B, Figura 1).

No planejamento dos cortes, consideramos o objetivo de obter lâminas com áreas simultaneamente consensuais e controversas em relação à presença de nichos neurogênicos (Anexo B, Figura 1). Ao mesmo tempo, as principais organizações citoarquitetônicas do lobo temporal deveriam estar incluídas. Assim, realizamos três cortes coronais sobre o lobo temporal (Anexo B, Figura 1A). Para cada um destes cortes, o bloco era conseguido a partir de um novo corte a aproximadamente 0,5 cm anteriormente. O corte posterior era feito no nível do sulco mesencefálico lateral. Desta maneira, obtínhamos um corte coronal do corpo do hipocampo e do giro para-hipocampal (Anexo B, Figuras 1A e 1B) no limite posterior de algumas técnicas de lobectomia temporal para epilepsia⁶⁶. O corte intermediário era feito no nível do ponto coróideo inferior, ou seja, no limite entre a cabeça e o corpo do hipocampo (Anexo B, Figuras 1A e 1D). O corte anterior era feito no nível do recesso uncal, com o intuito principal de estudar a amígdala, mas expondo simultaneamente outras áreas citoarquitetônicas relevantes (Anexo B, Figuras 1A e 1C). Um parâmetro na superfície encefálica que auxiliou neste nível foram os corpos mamilares, habitualmente englobados neste plano de corte. Por último, mais dois blocos eram obtidos. Em um deles, a superfície ventricular era dissecada tangencialmente, na topografia da eminência colateral (Anexo B, Figura

1B). O quinto bloco englobava o giro temporal médio, principalmente para estudo do neocórtex (Anexo B, Figura 1C).

2.4 Imuno-histoquímica e histologia

As amostras foram fixadas em solução de formaldeído a 4% (pH 7,2) em temperatura ambiente por 24 h e emblocadas em parafina. Os blocos foram cortados em secções de 5 µm, que eram montadas em lâminas silanizadas.

Os anticorpos primários utilizados estão listados na Tabela 1 do Anexo A. Os anticorpos contra nestina ou DCX eram escolhidos para os experimentos com base na disponibilidade no laboratório e não em função do animal em que foram produzidos ou do fabricante dos anticorpos, porque não há relato de influência destes fatores nos resultados de experimentos envolvendo estas duas proteínas. Os marcadores utilizados para cada tecido emblocado e a justificativa destas escolhas estão listados na Tabela 2 do Anexo A.

Os anticorpos secundários utilizados estão listados na Tabela 3 do Anexo A e eram escolhidos em cada experimento em função do animal em que era produzido o anticorpo primário, como feito habitualmente em experimentos de imuno-histoquímica (por exemplo, em experimentos com anticorpo primário produzido em coelho era utilizado anticorpo secundário produzido em burro ou cabra que reagia contra imunoglobulinas de coelho).

A estreptavidina utilizada era conjugada a sonda fluorescente verde (estreptavidina conjugada a Alexa Fluor® 488, 1 : 1 000, nº de catálogo S32354, Invitrogen Corporation, Carlsbad, EUA) ou vermelha (estreptavidina conjugada a Alexa Fluor® 594, 1 : 250, nº de catálogo S32356, Invitrogen).

Para marcação do núcleo, foram utilizados Hoechst (Hoechst 33342, 1 : 1.000, nº de catálogo H1399, Invitrogen) ou DAPI (1 : 1.000 peso / volume, nº de catálogo 46190, Thermo Scientific, Rockford, EUA). Como “anti-fading”, foi utilizado Vectashield (nº de catálogo H1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA).

A imuno-histoquímica foi realizada através dos métodos fluorescente e cromogênico. O protocolo de imuno-histoquímica fluorescente desenvolvido neste estudo está detalhado na Tabela 4 do Anexo A. Para marcação para nestina através da imuno-histoquímica cromogênica (revelada por 3,3'-diaminobenzidina (DAB)) foi usado um kit de biotina e estreptavidina marcada, seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante (Dako LSAB+ System-HRP, nº de catálogo K0690, Dako, Glostrup, Dinamarca). Para marcação para vimentina, foi usada a técnica de biotina-avidina para imuno-histoquímica (Super ABC kit®, nº de catálogo EP-ABCu, 1 : 200, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, Reino Unido). No experimento ilustrado na Figura 19B do Anexo B, foi utilizado o complexo estreptavidina-biotinilada HRP (1 : 1.000, nº de catálogo RPN1051, GE Healthcare, Chalfont, Reino Unido) e DAB, sendo o núcleo corado com verde metil. Permount (Fisher Scientific, Pittsburgh, EUA) foi utilizado como meio de montagem. A coloração pela hematoxilina-eosina foi realizada de acordo com protocolo usual.

2.5 Microscopia

Para microscopia de campo claro e epifluorescência, foram utilizados: microscópio Nikon Optiphot-2 (Nikon, Tóquio, Japão), câmera digital Cool Snap – Pro Collor e software Image Pro – Plus (ambos de Media Cybernetics, Bethesda, EUA), microscópio Nikon Eclipse E800, câmera digital DMX-1200C e software ACT-1C for DMX 1200 (Nikon). Além disto, o uso do escâner de lâminas Pannoramic MICI® e do

software Pannoramic Viewer 1.15.2 RTM® (ambos de 3DHistech, Budapeste, Hungria) permitiram a obtenção de imagens envolvendo todo o corte do tecido, complementando o estudo feito pela microscopia de campo claro.

Imagens obtidas com o uso dos microscópios de epifluorescência são mostradas nas Figuras 2A, 2E e 15. As demais imagens resultantes de imunohistoquímica fluorescente foram obtidas com o uso de dois microscópios confocais (LSM 510 Meta / UV, Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, EUA), pertencentes ao Instituto do Coração e Instituto de Química da USP; neste caso utilizou-se o software LSM 510 Meta (Zeiss) para captação, arquivamento e edição das imagens.

Também na edição de imagens e montagem dos painéis foi utilizado o software Photoshop CS5 Extended (Adobe Systems, Inc., San Jose, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 Dados gerais

Foram dissecados 28 lobos temporais, provenientes de 14 autópsias. As causas dos óbitos são mencionadas na Tabela 5 do Anexo A. A idade na ocasião do óbito variou entre 20 e 79 anos ($48,2 \text{ anos} \pm 16,7 \text{ anos}$). O intervalo entre o óbito e o início da fixação do tecido em formaldeído variou entre 5 h 10 e 23 h 05 ($15 \text{ h} \pm 4 \text{ h } 56 \text{ min}$) (Anexo A, Tabela 5).

3.2 Desenvolvimento do protocolo de imuno-histoquímica

O protocolo de imuno-histoquímica fluorescente gerou resultados semelhantes à imuno-histoquímica cromogênica (Anexo B, Figura 2) em relação à marcação para nestina, validando os resultados obtidos por ambos os métodos. As Figuras 2 a 4 do Anexo B mostram exemplos de imagens obtidas de experimentos de imuno-histoquímica realizados para padronização dos protocolos.

3.3 Controle positivo da marcação para nestina

Um resultado durante a fase de padronização dos protocolos de imuno-histoquímica foi a persistência de intensa autofluorescência do glioblastoma, prejudicando seu uso para imuno-histoquímica fluorescente. O melhor tecido encontrado para controle positivo da nestina para o método de fluorescência foi o carcinoma hepatocelular (Anexo B, Figuras 3A a 3F). Este achado foi conseguido através de experimentos feitos a partir de três fragmentos de tumor. Todos os três fragmentos de carcinoma hepatocelular continham nódulos de tamanhos variáveis. Suas características histológicas são mostradas na Figura 3G do Anexo B. Estes nódulos eram envolvidos por

fibrose, na qual alguns vasos sanguíneos eram detectados. Somente a autofluorescência das hemácias não pode ser evitada. Contudo, a identificação de uma marcação intensa para nestina em células endoteliais não foi prejudicada, porque as hemácias estavam localizadas principalmente nos vasos sanguíneos dentro das áreas de fibrose. Além disso, a presença de um grande número de células endoteliais, com sua típica forma fina e alongada, mostrando em conjunto uma estrutura semelhante a sinusóides nos nódulos, permitiu uma identificação confiável da marcação para nestina. Outro fator que facilitou a identificação de células endoteliais nestina-positivas (CENPs) foi a pouca marcação para nestina nas células do parênquima tumoral em comparação às células endoteliais.

Embora não esteja relacionado ao objetivo principal de nosso estudo, o achado de carcinoma hepatocelular com alta expressão de nestina em células endoteliais merece ser mencionado porque é um dado inédito na literatura que acrescenta informações sobre dois tópicos, a saber, a nestina como marcador de vaso neoformado e o acoplamento entre neuro e vasculogênese, conforme será discutido.

3.4 Influência de fatores além da imuno-histoquímica

Os resultados foram influenciados por condições técnicas não relacionadas aos experimentos de imuno-histoquímica em si. Por exemplo, células nestina-positivas foram detectadas na eminência colateral de 6 dos 14 cérebros (Anexo A, Tabela 5). O tempo transcorrido entre o óbito e a fixação do tecido foi significativo para a detecção de nestina na ZSV da eminência colateral ($p = 0,004$) (Anexo A, Tabela 6); o período de tempo até o qual esta variável não foi significativa foi de 16 h 40 min ($p = 0,057$) (Anexo A, Tabela 7). A idade não foi significativa para a detecção de nestina na ZSV da eminência colateral, mesmo considerando a influência do intervalo de tempo entre o óbito e a fixação

do tecido ($p = 0,381$) (Anexo A, Tabela 7). No entanto, esta última conclusão poderia eventualmente mudar com uma amostra maior. Além disso, foi observada uma diferença qualitativa: uma camada de células nestina-positivas (CCNP) tendeu a ser mais evidente em amostras provenientes de indivíduos mais jovens.

Os resultados também foram influenciados pelas condições de armazenamento dos cortes e blocos. Os blocos e as lâminas foram mantidos a temperatura ambiente. A marcação para nestina foi detectada em experimentos realizados com cortes e blocos armazenados por até dois anos após o emblocamento em parafina, mas não naqueles realizados com cortes e blocos armazenados por cinco anos (não foram realizados experimentos entre estes dois períodos, devido a uma interrupção involuntária deste estudo). Por outro lado, proteínas como DCX, GFAP (do inglês “glial fibrillary acid protein”) e MAP-2 (do inglês “microtubule associated protein-2”) foram detectadas em experimentos realizados a partir de amostras em lâminas e blocos que estavam armazenados por cinco anos.

Por último, verificamos se a avaliação de imagens em aumentos menores do que os habituais traria alguma contribuição no conhecimento da distribuição dos nichos neurogênicos. De fato, a introdução desta técnica à microscopia habitual permitiu visualizar com mais clareza que os marcadores de neurogênese distribuíam-se em localizações que se expandem além daquelas mais comumente aceitas como sendo nichos neurogênicos.

3.5 Marcação para nestina entre a ZSV e o subículo

Uma CCNP foi encontrada na ZSV, passando pela fímbria e percorrendo a ZSP do lobo temporal medial, com uma bifurcação formando um braço menor que corria

em direção à ZSG e um braço maior que corria até o complexo subicular (Anexo B, Figuras 5 a 10)⁶⁶⁻⁷⁰.

A CCNP envolvia toda a cavidade do corno temporal do ventrículo lateral em sua localização na ZSV, sendo mais espessa nas proximidades de vasos sanguíneos desta área (Anexo B, Figuras 2 e 8). Desta maneira, a CCNP na ZSV estava relacionada ao recesso uncal, à eminência colateral, à amígdala, ao hipocampo propriamente e à fímbria. A CCNP seguia pela fímbria, onde ocorre a transição do epêndima para a pia-máter (Anexo B, Figura 7) e preenchia a ZSP do lobo temporal medial (Anexo B, Figuras 5 a 7 e 10). No sentido ântero-posterior, ocupava desde o uncus na topografia da amígdala (Anexo B, Figura 5) até o corpo do hipocampo (Anexo B, Figura 7). Anterior e superiormente, a CCNP atingia a localização do sulco endorrinal, que marca a transição entre a amígdala e o córtex piriforme, no lobo frontal (Anexo B, Figura 5). De fato, o limite superior das dissecções alcançava a parte do córtex piriforme mais próxima à amígdala, onde células nestina-positivas também foram notadas na ZSP. O limite inferior da CCNP na ZSP correspondia ao fundo dos sulcos uncal (Anexo B, Figura 6) e hipocampal (Anexo B, Figuras 7 e 10). Portanto, a CCNP terminava no limite lateral do complexo subicular, onde está localizado o subículo. No trajeto através da ZSP entre a fímbria e o complexo subicular, uma bifurcação menor da CCNP era observada (Anexo B, Figuras 6, 7 e 10). Esta bifurcação ocorria em áreas da ZSP onde a camada de células granulares era mais superficial e se aproximava da ZSP. Na cabeça do hipocampo, a bifurcação foi observada na borda superior do sulco uncal (Anexo B, Figura 6). No corpo do hipocampo, foi observado que a CCNP na ZSP na topografia do sulco fimbriodenteado era mais espessa e constituía o contato mais próximo com a ZSG (Anexo B, Figuras 7 e 10). De maneira geral, a bifurcação da CCNP da ZSP em direção à ZSG era menos espessa

em comparação à CCNP que prosseguia em direção ao complexo subicular (Anexo B, Figura 10).

Além destas localizações, apenas algumas células nestina-positivas foram detectadas adjacentes a vasos sanguíneos do lobo temporal (principalmente em sua porção medial) (Anexo B, Figura 9) e no fundo de sulcos do neocórtex (Anexo B, Figura 10).

3.6 Marcação para DCX entre o subículo e a fímbria

DCX foi analisada no hipocampo de um caso representativo (Anexo B, Figura 11) para busca de evidências de neurogênese constitutiva e foi detectada como uma camada contínua a partir do complexo subicular, ou seja, na localização em que a marcação para nestina terminava. A marcação para DCX foi notada na localização do subículo, pré-subículo e parassubículo, as três estruturas que formam o complexo subicular. Além disto, a marcação para DCX foi observada nos cortes envolvendo tanto a cabeça (Anexo B, Figura 12) quanto o corpo do hipocampo (Anexo B, Figura 13).

A camada formada pela marcação por DCX mostrou feixes de fibras que se confluíam conforme seguiam uma trajetória em direção ao centro do giro parahipocampal (pela definição da anatomia macroscópica) (Anexo B, Figuras 12 B – E, 13D e 13E). Nesta localização, a expressão de DCX era mais concentrada e massiva. Este feixe mais compacto formado pela marcação por DCX se curvava na direção de uma camada endimária extraventricular (descrita abaixo) (Anexo B, Figuras 12B, 12C e 13D). Ao atingir a camada endimária extraventricular, o feixe se dividia em dois feixes que corriam em paralelo em direção ao ventrículo, juntamente com a camada endimária extraventricular, localizada entre ambos. As fibras DCX-positivas que corriam

lateralmente foram observadas até o limite dos cortes, na eminência colateral (Anexo B, Figura 12B); as fibras DCX-positivas que corriam medialmente alcançavam a ZSV da cabeça (Anexo B, Figuras 12A e 12B) e do corpo do hipocampo (Anexo B, Figuras 13 A – C), ou seja, elas seguiam através do alveus. A expressão de DCX percorria toda a ZSV da cabeça e do corpo do hipocampo e atingia a fímbria (Anexo B, Figura 13A). Na fímbria, era observada uma marcação difusa e intensa por DCX.

3.7 Marcação para astrócitos e neurônios

Devido ao padrão inesperado da marcação para DCX, foi realizado um estudo complementar para análise da marcação para GFAP (marcador de astrócito) (Anexo B, Figura 14), tubulina β -III (marcador de neurônio imaturo) (Anexo B, Figura 15) e MAP-2 (marcador de neurônio maduro) (Anexo B, Figura 16). DCX, GFAP e MAP-2 foram estudadas em amostras do mesmo caso, enquanto que tubulina β -III foi estudada no corpo do hipocampo de outro caso (Anexo A, Tabela 2).

O padrão geral mostrado por GFAP foi o mesmo na ZSV e ZSP (Anexo B, Figuras 14 A – C). Além disso, a marcação para GFAP também preenchia o vazio entre os dois feixes de fibras DCX-positivas no centro do giro para-hipocampal (Anexo B, Figura 14D), em um padrão similar àquele descrito na literatura para o conjunto do epêndima mais a ZSV²⁷. Nós denominamos esta camada de células endimárias que penetram no parênquima a partir da eminência colateral como camada endimária extraventricular. Portanto, os feixes de fibras DCX-positivas que corriam paralelamente estavam localizados em uma camada subendimária, embora não em uma camada subventricular.

A marcação para tubulina β -III foi observada como um padrão puntiforme na fímbria (Anexo B, Figura 15B), o que pode representar fibras neuronais cortadas transversalmente. No hipocampo propriamente, a marcação para tubulina β -III foi detectada em algumas fibras cortadas longitudinalmente, chegando eventualmente até o nível dos respectivos corpos celulares de neurônios piramidais (Anexo B, Figura 15A). Assim, a morfologia mostrada pela marcação de fibras neuronais por DCX e tubulina β -III foi similar, no entanto, a marcação para DCX era mais difusa e irregular na fímbria e ausente no hipocampo propriamente (camada piramidal).

A marcação para MAP-2 foi detectada em corpos celulares neuronais, incluindo neurônios piramidais (Anexo B, Figura 16), mas foi ausente na fímbria. É possível que o uso de uma concentração maior do anticorpo primário contra MAP-2 ou a técnica de microscopia confocal empregada com parâmetros menos restritivos pudessem mostrar uma marcação mais nítida na fímbria, mas as diferenças entre as marcações por DCX e MAP-2 nesta estrutura sugerem que DCX não estava marcando neurônios maduros inespecificamente.

3.8 Plano geral da localização dos marcadores

Em resumo, a visão panorâmica do lobo temporal (Anexo B, Figura 17) mostrou uma camada contínua de células nestina-positivas seguindo primariamente uma trajetória entre a ZSV e a ZSP do subículo, onde se iniciou a detecção de marcação para DCX.

A marcação para DCX no hipocampo mostrou uma camada contínua que começava no complexo subicular e chegava à fímbria. Esta trajetória coincide com a trajetória de eferência do hipocampo em direção ao diencéfalo.

Outros marcadores neuronais complementaram os achados para DCX porque o marcador de neurônios maduros MAP-2 foi encontrado em localizações onde DCX não é expressa e o marcador intermediário entre neuroblasto e neurônio maduro (tubulina β -III) está expresso em áreas com marcação para DCX e MAP-2.

As marcações para nestina e DCX em conjunto circundavam as estruturas límbicas do lobo temporal e por isso foram denominadas como linha externa de células do sistema límbico (LECEL).

4 DISCUSSÃO

4.1 Protocolo de imuno-histoquímica em encéfalos humanos

A imuno-histoquímica em amostras de encéfalo humano é uma alternativa técnica para experimentos sobre a neurogênese humana adulta¹⁰. Com base nos resultados deste estudo, uma recomendação para o desenvolvimento de protocolo para estudar marcadores relacionados à neurogênese humana adulta é a de que o tempo transcorrido entre a morte e a fixação do tecido não deva ultrapassar um período de 16 horas, mas o desenvolvimento de um programa de autópsia rápida^{71,72} seria o ideal. Além disso, as amostras não devem ser armazenadas a temperatura ambiente, para melhor preservação da antigenicidade de marcadores relacionados à neurogênese, especialmente a nestina⁷³. Em relação à imunofluorescência, foi observado uma melhor marcação para nestina quando a solução com o anticorpo primário era mantida sobre as lâminas por 48 h a 4 °C³⁹, ao invés de um período “overnight” a temperatura ambiente (dados não mostrados); este achado poderia ser levado em consideração principalmente durante a resolução de problemas técnicos envolvendo uma eventual marcação exígua em tecido humano.

A diminuição da autofluorescência foi mantida no protocolo como predominantemente se encontra na literatura. No entanto, algumas peculiaridades foram observadas. Esta técnica foi efetiva para o parênquima encefálico em si, mas não completamente para hemácias ou no glioblastoma. A persistência da autofluorescência das hemácias é um aspecto para se ter em mente durante o estudo das lâminas. Contudo, as hemácias são facilmente distinguíveis das demais células. Além disso, facilitam a localização da luz de vasos sanguíneos, o que é vantajoso dado que a literatura^{74,75} e

nossos próprios achados (Anexo B, Figuras 2 e 8) sugerem uma maior presença de CTNs nas proximidades desses vasos.

Em função da autofluorescência no glioblastoma, seu uso como controle positivo seria mais eficiente quando se planeja utilizar a microscopia de campo claro, embora a marcação para anticorpos relacionados à neurogênese seja intensa⁷⁶. A opção por seu uso como controle positivo para imunofluorescência deveria ser feita com uma comparação rigorosa com a imagem de outra lâmina, de corte adjacente, como controle negativo do próprio tumor. Em outras palavras, apenas uma lâmina de glioblastoma usada para controle positivo poderia gerar, em algumas situações, a falsa impressão de que o anticorpo está “funcionando”. Outra conclusão é a de que o controle negativo é particularmente importante nos estudos sobre o glioblastoma através da imunofluorescência⁷⁶. A completa exclusão da autofluorescência das hemácias e das células de glioblastoma estava além dos objetivos deste estudo, por não interferir na interpretação dos resultados.

Como controle positivo em imuno-histoquímica fluorescente para nestina, o carcinoma hepatocelular mostrou-se ser uma alternativa importante. Primeiramente, a marcação para nestina apresentou um padrão prontamente identificável em carcinoma hepatocelular. Em segundo lugar, o uso de animais de laboratório (por exemplo, embriões de roedores) pode ser trocado por biópsias de material humano⁷⁷, o que é imprescindível se a pesquisa for feita com o uso de anticorpo primário que reaja exclusivamente com nestina humana. Por último, o uso de amostras arquivadas de carcinoma hepatocelular pode eventualmente evitar a necessidade de captação de encéfalos humanos fetais, que em geral são mais raramente disponíveis⁷⁸.

A recuperação antigênica também foi um tempo da imuno-histoquímica que seguiu o método mais difundido. O único detalhe que mereceria ser mencionado foi a observação de que tempos menores no micro-ondas podem ser suficientes, evitando o descolamento dos cortes, fato eventualmente observado na prática, mesmo em lâminas silanizadas.

Informações novas sobre a topografia de nichos neurogênicos podem ser conseguidas através de aumentos menores e, conseqüentemente, campos maiores na microscopia. Na literatura, um exemplo desta situação são os estudos sobre a corrente migratória rostral em humanos²⁷⁻³⁰. No nosso estudo, a distribuição da marcação para nestina e DCX na citoarquitetura foi mais bem evidenciada através da edição de imagens de campos microscópicos adjacentes (Anexo B, Figuras 2A, 2B e 7) ou do uso de escâner de lâminas (Anexo B, Figuras 5B, 6 e 10).

4.2 Células endoteliais nestina-positivas

A nestina não é marcador único (Anexo B, Figura 18) ou específico (Anexo B, Figura 19) de CTNs, sendo detectada em células endimárias e endoteliais⁷⁴. CENPs são consideradas um marcador de vasos sanguíneos recém-formados⁷⁹. A nestina é expressa em células endoteliais de diversos órgãos, durante o desenvolvimento e a regeneração, em humanos⁴¹ e em modelos experimentais⁸⁰. Assim, células endoteliais pancreáticas de ratos expressam nestina durante a regeneração pancreática, mas não a expressam quando em estado quiescente⁸⁰. Além disso, CENPs e células endoteliais nestina-negativas sugerindo, respectivamente, vasos recém-formados e maduros, podem ser encontradas dentro de um mesmo encéfalo, em modelo experimental de glioblastoma:

vasos tumorais (recém-formados) expressam nestina; vasos do tecido normal adjacente (maduros) não expressam esta proteína⁷⁹.

Por outro lado, existem evidências de que CENPs não seriam um indicador específico de vasos recém-formados^{65,81}. No pâncreas humano, CENPs são encontradas nos tecidos endócrino e exócrino em uma proporção que ultrapassa significativamente a taxa de renovação de células endoteliais⁸¹. Da mesma maneira, um estudo sobre o acoplamento entre neuro e vasculogênese em encéfalos de ratos adultos mostrou que CENPs são encontradas em capilares maduros⁶⁵. Em nosso estudo, as diferentes regiões analisadas continham CENPs em uma proporção elevada para um órgão cuja capacidade regenerativa é considerada nula, sugerindo uma marcação predominantemente em vasos sanguíneos maduros. No entanto, CENPs poderiam ter ao menos um efeito parácrino em células progenitoras específicas de determinados tecidos durante a regeneração. Assim, no pâncreas exócrino humano, CENPs estão adjacentes a células do epitélio ductal que contém supostas células progenitoras de ilhotas⁸¹. Mesmo em nosso estudo não se pode descartar uma expressão aumentada da nestina em vasos sanguíneos devido a eventual hipóxia no período pré-agônico: vasos sanguíneos são usados como via de migração de neuroblastos durante neurogênese induzida por isquemia⁸².

Quando encontradas em tumores malignos, CENPs sugerem um alto grau de angiogênese, como no caso do carcinoma hepatocelular analisado. Contudo, a linhagem destas células endoteliais não está completamente definida. Primeiramente, estas células podem ser células endoteliais sinusoidais que mudaram de um estado quiescente para um estado proliferativo⁸³. No entanto, algumas células endoteliais de carcinoma hepatocelular podem ter surgido a partir de células progenitoras endoteliais circulantes⁸³. Especulativamente, outros dois tipos de células que expressam nestina poderiam ser

fontes de células endoteliais de carcinoma hepatocelular. Células-tronco tumorais poderiam gerar CENPs tumorais de maneira análoga ao que foi recentemente demonstrado para glioblastoma⁸⁴. Finalmente, células estreladas (pericitos)⁸⁵, que modulam a angiogênese tumoral⁸³, poderiam também dar origem a células endoteliais tumorais sob a influência do fator de crescimento do endotélio vascular. Este fator de crescimento é expresso em altos níveis em carcinoma hepatocelular e pericitos mostram em outros órgãos uma pluripotência dependente do nicho⁸⁶.

Até o momento, a nestina havia sido demonstrada em cortes de carcinoma hepatocelular apenas em células parenquimatosas. Tal demonstração é uma das evidências sobre a tumorigênese de carcinoma hepatocelular através de células-tronco hepáticas⁸⁷⁻⁸⁹. Casos em que características de células-tronco hepáticas são detectadas apresentaram prognóstico pior. Altos níveis séricos de molécula de adesão neural, outro marcador de células-tronco hepáticas, foram detectados em um subgrupo de pacientes com carcinoma hepatocelular⁸⁹; amostras de tumor de uma menor proporção deste subgrupo continham aglomerados de células positivas para molécula de adesão neural. Além disso, casos de carcinoma hepatocelular mostraram expressão gênica comparável àquela apresentada por hepatoblastos de embriões de ratos⁸⁷. Finalmente, Yang et al.⁸⁸ demonstraram através de reação em corrente da polimerase em tempo real e de microensaio de tecidos que a expressão elevada de marcadores de células-tronco hepáticas se correlaciona com aumento de angiogênese e prognóstico pior. Nosso achado inédito de grande quantidade de CENPs em carcinoma hepatocelular pode indicar a existência de um subgrupo deste tipo tumoral. Estudos futuros podem complementar este dado preliminar através de uma casuística maior, do uso de um número maior de

marcadores de angiogênese e de células-tronco hepáticas e da análise de correlação entre este tipo imuno-histológico e o prognóstico.

4.3 Novo nicho neurogênico: LECEL

Células nestina-positivas são consideradas CTNs em função do contexto em que elas são detectadas. Assim, células nestina-positivas que mostrem morfologia de astrócitos ou de células imaturas na ZSV⁷ ou na ZSG⁸ são presumivelmente CTNs. Na ZSV, as CTNs são agrupadas predominantemente próximas a vasos sanguíneos⁷⁴ (Anexo B, Figuras 2 e 8), que formam uma estrutura vascular plexiforme⁷⁵, indicando um possível papel de nicho vascular na modulação da neurogênese⁶⁵. Nossos resultados indicam que os relatos de existência de CTNs na ZSG humana^{11,12,74} são poucos porque o número destas células é pequeno nesta localização em comparação ao padrão encontrado na ZSG de roedores. Ao contrário, a presença de potenciais CNTs em humanos é maior na ZSP do lobo temporal medial.

A existência de um potencial nicho neurogênico na ZSP está de acordo com outros achados recentes. Primeiramente, nos equivalentes embrionários da ZSP – a zona marginal em camundongos⁹⁰ e a ZSV externa na espécie humana⁹¹ – a neurogênese pode ser desencadeada pela proliferação e diferenciação de células semelhantes às células gliais radiais. Estes achados modificaram o conceito de que a neurogênese cortical embrionária ocorre exclusivamente a partir de células gliais radiais localizadas na zona ventricular e na ZSV. Em segundo lugar, CTNs têm sido detectadas na ZSP de outros mamíferos^{31,92-94}. Em terceiro lugar, GFAP δ , uma isoforma de GFAP, apresenta um padrão de marcação interessante, por ser similar àquele mostrado aqui pela nestina em termos de morfologia celular e localização (ZSV e ZSP)⁹⁵. Em quarto lugar, em casos de esclerose mesial

temporal, CTNs foram encontradas adjacentes à fissura hipocampal¹¹ (ou seja, nas camadas moleculares), que é uma extensão do sulco hipocampal, onde nós encontramos um significativo número de células nestina-positivas. Por último, neurogênese induzida por lesão foi descrita na ZSV⁹⁶, ZSG⁹⁷ e ZSP³³ em um modelo de depressão alastrante em ratos (depressão alastrante é uma onda de despolarização de astrócitos e neurônios que pode se propagar a partir de um foco de lesão, como a isquemia⁹⁸).

A concordância entre os relatos mencionados acima com nossos achados, a morfologia das células nestina-positivas na ZSP e o fato de a camada formada pelas células nestina-positivas na ZSP estar em continuidade com nichos sabidamente neurogênicos (ZSV e ZSG) sugerem que a ZSP do lobo temporal medial seja um potencial nicho neurogênico. É improvável que a expressão de nestina na ZSP seja somente devido a lesão, dado que foram observadas células-nestina positivas em diferentes casos sem diagnóstico de uma doença neurológica.

Um padrão geral observado foi de que a probabilidade de se encontrar CTNs em uma determinada localização variava em função da distância desta localização em relação ao líquido cefalorraquidiano (LCR)⁹⁹, ao epêndima^{100,101} e ao plexo coroide¹⁰². Desta maneira, uma linha central da LECEL está localizada aproximadamente na inserção do plexo coroide sobre a fímbria, na fissura coroideia. A partir desta linha, a CCNP corre através tanto da ZSV quanto da ZSP, mas é progressivamente menos evidente na ZSP e mínima além dos limites da LECEL, próxima ao neocórtex (Anexo B, Figura 10). Uma CCNP menos evidente foi observada em contato com vasos sanguíneos, principalmente no parênquima do lobo temporal medial. Além da proximidade com a fissura coroideia (em relação ao volume total do cérebro), esta CCNP está em contato com o LCR através do espaço de Virchow-Robin da unidade neurovascular¹⁰³ (Anexo B, Figura 9).

4.4 Evidências de neurogênese na LECEL

A razão para a marcação encontrada para DCX não é totalmente clara porque a expressão desta proteína ocorre em diferentes tipos neurais durante diferentes fases de diferenciação celular^{43,46,52,54,55}.

No entanto, a marcação para DCX encontrada em nosso estudo pode indicar algum grau de neurogênese. Células DCX-positivas foram encontradas em contato com CTNs e com estruturas que participam do processo da neurogênese, a saber, o epêndima^{99-101,104} e o plexo coroide, que é um órgão circunventricular¹⁰². Apesar de controvérsias, há fortes evidências de que DCX seja um marcador de neurogênese⁴³. A marcação para DCX em nosso estudo é similar à marcação de dois outros supostos marcadores de neurogênese, que são a tubulina β -III (Anexo B, Figura 15) e a molécula de adesão celular neural polissialilada (PSA-NCAM, do inglês “polysialylated neural cell adhesion molecule” – ver Figuras 3 a 5 da referência 35).

A marcação para DCX iniciando-se no complexo subicular e seguindo a principal via eferente do hipocampo para o diencefalo pode representar a presença de neuroblastos migratórios localizados totalmente na fímbria⁵¹. Desta maneira, células DCX-positivas foram encontradas na fímbria adulta por Zhang et al.¹⁰⁵ Estes autores mostraram que lesão no sistema fímbria-fórnix leva à proliferação nesta estrutura de células que expressam sequencialmente nestina e DCX. Uma doença aguda ou crônica não diagnosticada levando à neurogênese induzida por lesão poderia explicar parcialmente a detecção de células DCX-positivas em nosso estudo.

No entanto, uma explicação mais provável para a marcação para DCX é que neurogênese constitutiva ocorre no complexo subicular, o que é coerente com algumas

características desta região. Além de seguir o trajeto de uma via neuronal, a marcação para DCX ocorre na zona onde o córtex formado por três camadas passa a apresentar seis camadas. Do ponto de vista filogenético, o complexo subicular foi a estrutura da formação hipocampal que proporcionalmente mais se desenvolveu comparando-se roedores e primatas⁶⁹. Este dado poderia justificar a detecção de nicho neurogênico em roedores na ZSG. Contudo, a presença de nicho neurogênico no complexo subicular destes animais merece ser reavaliada, principalmente porque algumas características dos neurônios e das conexões do complexo subicular de roedores⁶⁹ coincidem com achados de nosso estudo. Por exemplo, nossos achados não permitem precisar se DCX é expressa apenas no subículo ou se inclui o pré- e parassubículo, porque a marcação na localização destas duas últimas estruturas pode ser de axônios de neurônios do subículo que seguem inicialmente uma trajetória longitudinal antes de curvarem-se em direção à fímbria⁶⁹. É interessante notar também que a direção da marcação para DCX seguindo para a fímbria e não para o córtex entorrinal, que é outra projeção descrita para o subículo, sugere que DCX possa estar sendo expressa em tipo específico de células do subículo que segue esta trajetória, as células de disparo regular¹⁰⁶ (o outro tipo mais comum de células do subículo possui axônios que não seguem uma trajetória longitudinal em seu início e projetam-se em direção ao córtex entorrinal). Por outro lado, a marcação para DCX no pré-subículo e parassubículo pode estar também marcando células destas regiões porque ambas se projetam através da fímbria chegando, por exemplo, até os núcleos talâmicos anteriores⁶⁹.

Finalmente, a marcação para DCX pode estar mostrando, além de neurônios recém-formados, outros tipos celulares. De fato, uma alta taxa de neurogênese constitutiva não seria esperada na espécie humana¹⁰⁷ e parte do grupo de células DCX-positivas pode corresponder a neurônios em “modo de espera”⁴⁹. Neste sentido, todo o

processo de neurogênese constitutiva em primatas adultos não-humanos normalmente excede seis meses¹⁰⁸. Além disso, uma aceleração no processo de neurogênese talvez contribua para a tumorigênese. Assim, não deve ser coincidência que a proliferação e invasão de células de glioblastoma envolvam tanto células-tronco¹⁰⁹ quanto um conjunto de estruturas neurais, vasculares e da pia-máter referidas como estruturas secundárias de Scherer¹¹⁰: no lobo temporal, a localização das estruturas secundárias de Scherer é semelhante à da LECCEL.

4.5 Hipótese sobre o mecanismo de neurogênese na LECCEL

A distribuição na citoarquitetura cerebral encontrada para os marcadores analisados pode indicar a existência de uma estrutura contínua em que a neurogênese adulta ocorra de maneira orquestrada.

Desta maneira, as células nestina-positivas da ZSV podem constituir um reservatório de CTNs em estado quiescente, dado que estas células são capazes de se autorrenovar e de formar células neurais “in vitro”²⁷. Esta camada de células atinge a região da fissura coroideia e as estruturas nesta localização poderiam em conjunto modular a proliferação, migração (guiada pela membrana basal da pia-máter, por exemplo^{82,94}) e diferenciação celular, incluindo eventualmente a neurogênese. O arranjo das estruturas na topografia da fissura coroideia⁶⁶ é particularmente favorável a uma modulação da neurogênese, porque manteria um potencial nicho neurogênico em contato simultâneo com o sangue⁸² (através do plexo coroide) e com o LCR⁹⁹ (através do epêndima e da pia-máter) e sob a influência da atividade neuronal na fímbria. A atividade neuronal e fatores no sangue e no LCR sabidamente influenciam a neurogênese mamífera^{1,7,8}.

Seguindo a partir da topografia da fissura coroideia, é possível que algumas CTNs prossigam através da ZSP do lobo temporal medial em direção à ZSG ou ao complexo subicular. A migração para a ZSG deve ser menor, pelo que foi encontrado em relação à marcação para DCX. Esta migração ocorreria nas regiões em que as células granulares do giro denteado estão mais próximas da ZSP (Anexo B, Figuras 6, 7 e 10). A migração de CTNs para o complexo subicular deve ser maior porque a marcação para DCX é robusta nesta localização. Em resumo, o processo de neurogênese deve envolver a ZSV, ser modulado pelas estruturas relacionadas à fissura coroideia, e terminar com a formação de neuroblastos no complexo subicular.

A marcação para DCX coincidindo com a provável via eferente do hipocampo humano^{68,69,111} pode indicar que neuroblastos formados no complexo subicular apresentem crescimento axonal¹¹² guiado por neurônios imaturos⁴⁹ ou com alta plasticidade⁵⁵ nesta mesma via e que também expressam DCX.

A observação de uma camada endimária extraventricular na trajetória entre o complexo subicular e a fímbria é particularmente interessante no contexto da LECEL como potencial nicho neurogênico, porque células endimárias controlam o destino de células DCX-positivas através da via de sinalização das proteínas morfogenéticas de osso (BMPs, do inglês “bone morphogenetic proteins”)¹¹³. Nossa opinião é a de que as características da camada endimária descrita acima tornam o termo atualmente menos utilizado “zona subendimária”^{74,113} mais apropriado do que “zona subventricular”, porque ele descreve mais precisamente toda a potencial zona neurogênica abaixo do epêndima.

4.6 Direções futuras

Os resultados apresentados neste estudo têm a vantagem de terem sido obtidos diretamente a partir de tecido humano. Em geral, conclusões sobre a neurogênese humana adulta são inferidas através de dados obtidos com experimentos em roedores. No entanto, a demonstração do potencial neurogênico de supostas CTNs é dificultada pelas limitações quando se utiliza tecido humano. O método mais difundido para contornar este problema é através do ensaio de neuroesferas, a partir de amostras de lobos temporais obtidos em cirurgia de epilepsia⁹, mas a fisiopatologia desta síndrome pode influenciar os resultados. Devido a nossos resultados, mais três linhas de pesquisa podem ser consideradas para esclarecer a neurogênese humana adulta e desenvolver uma terapia de neurorregeneração. Estas linhas de pesquisa são o detalhamento do novo potencial nicho neurogênico descrito, a pesquisa da eventual extensão deste nicho para além da área estudada e o desenvolvimento de um ensaio clínico sobre a correlação entre prognóstico neurológico e capacidade de neurorregeneração.

4.6.1 Detalhamento das características da LECEL

4.6.1.1 Fenótipos

A história da criativa demonstração da neurogênese em cérebros humanos normais¹⁰ foi um marco neste campo e leva a supor que o detalhamento da LECEL, pelo uso da imuno-histoquímica, poderá produzir conhecimentos relevantes para a neurorregeneração.

Até o momento, pudemos primeiramente confirmar que prováveis CTNs existem na espécie humana de maneira semelhante à encontrada em outros mamíferos, o que é o conceito mais aceito na literatura. Além disso, mostramos que os nichos

neurogênicos conhecidos se conectam através da ZSP do lobo temporal medial, formando uma unidade na citoarquitetura cerebral. Finalmente, mostramos evidências da existência de uma fase intermediária entre a CTN e o neurônio maduro, o que sugere neurogênese em um nível modulado pelo microambiente.

Os fenótipos apresentados durante a diferenciação de uma CTN em neurônio maduro apresentam variações progressivas que podem ser pesquisadas através de diferentes marcadores, alguns dos quais foram avaliados neste estudo. Assim, a neurogênese pode ser avaliada na LECEL através de marcadores para CTNs (nestina, musashi, vimentina e GFAP), neuroblastos migratórios (DCX e PSA-NCAM)³⁵, neurônios imaturos (tubulina β -III)^{27,28} e neurônios maduros (MAP-2 e NeuN). Ainda em relação ao processo de neurogênese, células em divisão podem ser investigadas com o marcador Ki-67, com grau de certeza comparável à investigação com bromodeoxiuridina¹¹⁴. Por último, a matriz extracelular da LECEL pode ser investigada através da marcação pela laminina, componente da membrana basal, estrutura próxima à qual as células nestina-positivas foram normalmente encontradas e que constitui um possível substrato para organizar a migração celular durante a neurogênese^{115,116}.

Admite-se que as CTNs sejam uma subpopulação de astrócitos¹¹⁷, identificadas como células nestina-positivas e GFAP-positivas. No entanto, neste estudo confirmamos que células presentes nos nichos neurogênicos, como as ependimárias e endoteliais, apresentam expressão significativa de nestina (Anexo B, Figura 19), embora não se possa concluir a respeito de seu papel na neurogênese^{100,101}. Além disso, outros tipos celulares no encéfalo expressam nestina e podem participar da neurogênese, como os polidendrócitos¹¹⁸ e os pericitos^{86,119}. Os polidendrócitos são tidos como células progenitoras oligodendrogiais. Contudo, pesquisas recentes admitem sua potencial

capacidade de formação de células neuronais¹¹⁸. Nosso achado de marcação para DCX na fímbria reforça esta possibilidade. Um futuro estudo poderia buscar identificar polidendrócitos através de outro marcador deste tipo celular, o proteoglicano NG2¹¹⁸. Por sua vez, os pericitos são células perivasculares que entram na composição da unidade neurovascular e possuem potencial neurogênico^{86,119}. Os pericitos apresentam contratilidade, podendo ser identificados pela marcação para actina- α de músculo liso. Embora os pericitos também possam ser células NG2-positivas, sua relação com o endotélio facilitaria sua diferenciação em relação aos polidendrócitos.

As células endoteliais são outro tipo celular positivo para a nestina. Conforme discutido, CENPs indicariam a presença de vaso recém-formado no sistema nervoso central⁷⁹. A vasculogênese serviria de suporte para a neurogênese. Porém, não se pode descartar a hipótese de se tratar de apenas uma marcação inespecífica, sem vínculo com pluripotencialidade ou formação recente⁶⁵. Outro marcador para vaso recém-formado encontrado na literatura foi a molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário-1 (CEACAM-1, do inglês “carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1”)¹²⁰, que pode ser usada para esclarecer esta questão.

Uma potencial aplicação dos nossos achados seria a possibilidade de se obter no intraoperatório, de maneira mais efetiva, amostras contendo CTNs para estudos “in vitro”, devido à revelação de novas localizações destas células. No entanto, a falta do desenvolvimento de método para separação prospectiva das CTNs é outro obstáculo¹⁸, o que justifica a pesquisa de um marcador de superfície. Um candidato para esta finalidade é CD133, um marcador de CTN humana fetal¹²¹ e de célula-tronco tumoral em glioblastoma¹⁰⁹. Desta maneira, a pesquisa da marcação para CD133 e nestina na LECCEL poderia trazer contribuições tanto em medicina regenerativa quanto em neuro-oncologia.

4.6.1.2 Idade replicativa

Uma hipótese que surge a partir de nossos resultados é que se a LECCEL é um potencial nicho neurogênico, então as células contidas em sua localização anatômica estariam predominantemente em um estado quiescente e apresentariam menor idade replicativa¹²², ou seja, um estado de menor diferenciação. Uma estratégia para acessar esta questão pode ser o método pouco difundido denominado hibridização “in situ” fluorescente para telômero e imunomarcação (TELI-FISH, do inglês “telomere/immunostaining-fluorescence ‘in situ’ hybridization”)¹²³. O “rationale” para a escolha deste método baseia-se no fato de que, em geral, células com telômeros mais longos teriam menor idade replicativa e maior capacidade de sofrer mitose¹²². O método padrão-ouro para se estimar a extensão do telômero é o de “Southern blotting”, inviável para ser usado em encéfalos captados em autópsia. Alternativamente, a técnica de TELI-FISH pode ser aplicada a cortes de tecido humano, fixados em formalina e emblocados em parafina. Este método permite que o comprimento do telômero seja mensurado de maneira fidedigna quando comparado ao “Southern blotting”¹²³. Além disso, permite não só a análise de célula a célula, como a possibilidade de comarcação. A descrição do método foi bem detalhada pelos autores que o desenvolveram e sua adaptação ao protocolo desenvolvido por nosso grupo seria muito provavelmente factível. Assim, células nestina-positivas ou células positivas para marcadores de linhagem neuronal poderiam ser avaliadas em relação à idade replicativa através da comparação da extensão de seus telômeros com os de células maduras (por exemplo, prováveis CTNs versus astrócitos protoplásmicos, CENPs versus células endoteliais nestina-negativas e células positivas para DCX ou tubulina β -III versus neurônios maduros). Complementarmente, um dado que pode sugerir a incapacidade de divisão ou diferenciação (indicando falta de

especificidade de um suposto marcador de neurogênese) é a comarcação com uma proteína associada à senilidade (por exemplo, p53¹²⁴).

4.6.1.3 Destino das células-tronco neurais na LECCEL

A descrição de um potencial nicho neurogênico gera dúvidas quanto ao destino de células eventualmente formadas no encéfalo maduro. Neste aspecto, existem basicamente duas hipóteses: as células se integrariam à circuitaria neuronal, com expansão progressiva do número de células nas zonas neurogênicas, ou sofreriam processo de apoptose. Kuhn et al.¹²⁵ acessaram esta questão em roedores. Concluíram favoravelmente à existência do processo de apoptose em uma porcentagem das células recém-formadas, antes de sua maturação completa. Para isto, usaram o método da marcação da quebra da dUTP mediada pela desoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL, do inglês “terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling”). Este método pode ser empregado em estudos da neurogênese humana através de imuno-histoquímica. Neste caso, uma desvantagem técnica é o tempo entre o óbito e a fixação¹²⁶. Por outro lado, alterações relativamente simples, habitualmente usadas na imuno-histoquímica, permitem melhora na sensibilidade e especificidade do método¹²⁷, que também pode ser usado associadamente à marcação do núcleo e de outro anticorpo¹²⁸. Assim, o método TUNEL poderia indicar se uma parte da população de células detectadas através de marcadores de neurogênese na LECCEL teria como destino a apoptose ao invés da permanência em estado quiescente ou da diferenciação através de alguma linhagem neural.

4.6.1.4 Rastreamento da linhagem celular na neurogênese

Um desafio cuja solução teria um valor excepcional para o desenvolvimento de terapia de neuroregeneração é o rastreamento da linhagem das células envolvidas no processo de neurogênese humana adulta. Habitualmente, estudos com este objetivo utilizam a transdução de genes codificando proteínas fluorescentes no sistema nervoso central de embriões¹²⁹. Com finalidade semelhante, estudos sobre a “genealogia” a partir de células-tronco foram realizados em criptas intestinais humanas¹³⁰. Neste caso, os autores partiram do conceito de que modificações epigenéticas são mantidas em células-filhas. Comparações de padrões de metilação do DNA, entre células separadas por microdissecção a laser, permitiram rastrear linhagens celulares. Hipoteticamente, este método poderia ser aplicado para se obter mais informações sobre o processo da neurogênese no adulto, a partir de encéfalos humanos normais.

Alternativamente, o rastreamento poderia ser buscado através da detecção de uma proteína com expressão alterada por mutação, presente em uma linhagem celular, mas não nas demais células ao redor. A mutação da citocromo c oxidase, uma proteína da corrente respiratória, foi usada com este propósito em tecidos humanos não neurais¹³¹. Poderia ser uma alternativa para pesquisa de linhagem celular a partir de CTNs, com a ressalva de que a provável baixa taxa de divisão destas células diminui a probabilidade de ocorrência desta mutação.

O processo de neurogênese humana adulta pode ser estudado aproveitando-se de evidências sobre a transdiferenciação. Assim, Cogle et al.¹³² mostraram neurogênese humana adulta ocorrendo por transdiferenciação: em encéfalos de autópsias, marcadores de cromossomo Y foram detectados em neurônios (sem sinais de fusão celular) de mulheres com história de transplante de medula óssea de doador do sexo masculino. De

maneira semelhante, em camundongos, células-tronco placentárias de embriões do sexo masculino se diferenciaram em neurônios na progenitora¹³³. Esta transdiferenciação foi detectada pela pesquisa de marcadores do cromossomo Y no cérebro das progenitoras até um período pós-parto que corresponde a aproximadamente um terço do tempo de vida de camundongos. Se o mesmo ocorre na espécie humana, então a detecção de marcadores do cromossomo Y em neurônios de mulheres que geraram ao menos um filho do sexo masculino sugeriria a existência de neurogênese constitutiva durante a fase adulta.

Concluindo, a combinação de técnicas empregadas inicialmente com outras finalidades pode amplificar o conhecimento sobre o processo de neurogênese na LECCEL.

4.6.2 Extensão da LECCEL além do lobo temporal

Investigar se a LECCEL não é apenas parte de um potencial nicho neurogênico maior seria outra linha de pesquisa decorrente deste estudo. Se as características de neurogênese na LECCEL seguem o mesmo padrão além do lobo temporal (Anexo B, Figura 20), então a LECCEL é, de fato, parte de um anel neurogênico límbico. Esquemáticamente, o anel neurogênico límbico seria formado por um duplo “C”, estando um no interior do outro. O “C” externo seria formado principalmente pelo giro denteado e suas extensões (por exemplo, o “indusium griseum”), eventualmente englobando a ZSP do giro do cíngulo⁶⁷. O “C” interno seria formado principalmente pelo conjunto do plexo coroide e da fímbria-fórnix, sendo mais provavelmente um nicho neurogênico^{45,134}. O anel neurogênico límbico seria fechado pela ZSP do cérebro basal^{52,74,135} e pelo uncus, e seria mais evidente próximo aos órgãos circunventriculares¹⁰², em regiões nas quais uma maior expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2³⁵ ou nestina^{74,135} foram descritas. Camadas de células DCX-positivas (CCDPs) poderiam ser detectadas em outras comissuras, como as comissuras anterior e hipocampal dorsal. No hipotálamo, o núcleo

supra-quiasmático, que é o principal núcleo envolvido no controle de ritmos circadianos, poderia modular o destino das CTNs^{136,137}.

Nossos resultados podem ter relação com a localização previamente descrita como sendo a corrente migratória rostral humana, porque as figuras mostrando esta corrente parecem indicar a localização do fórnix²⁷⁻³⁰. Esta observação ajuda a esclarecer as controvérsias relacionadas à corrente migratória rostral humana. Assim, Sanai et al.²⁷ não encontraram marcadores de neurogênese distribuídos na forma de um feixe porque analisaram através de cortes coronais do cérebro humano uma área anterior ao fórnix. Por outro lado, Curtis et al.²⁸ encontraram marcadores relacionados à neurogênese, como a tubulina β -III, formando um feixe que segue do corno frontal (em área aparentemente posterior à analisada por Sanai et al.²⁷) através de uma trajetória inferior e medial ao corpo estriado que termina na topografia do cérebro basal. A morfologia do feixe marcado por tubulina β -III e a presença de células positivas para marcador de divisão celular PCNA²⁸ pode corresponder ao nosso achado de marcação por tubulina β -III na fímbria, contendo ao redor células nestina-positivas, com potencial para sofrer divisão celular e apresentar marcação para PCNA. Em resumo, uma explicação para as controvérsias relacionadas à corrente migratória rostral humana é que a estrutura identificada como sendo esta corrente na verdade corresponde ao prolongamento do sistema fímbria-fórnix, que contém fibras da via eferente do hipocampo iniciando no complexo subicular e terminando principalmente nos corpos mamilares.

4.6.3 Implicações da LECCEL como nicho neurogênico

4.6.3.1 Fisiologia

Nossos achados reforçam o conceito de um possível papel da neurogênese humana adulta na cognição^{58,59}. No entanto, este papel pode estar mais ligado à função dos neurônios piramidais do complexo subicular do que às células granulares do giro denteado. Assim, as hipóteses sobre a correlação entre neurogênese adulta e cognição talvez tenham que ser reformuladas e testadas com base neste novo achado. Uma limitação para descobrir uma possível função da neurogênese adulta ocorrendo no complexo subicular é que a função do complexo subicular em si é pouco conhecida. A expressão significativa de um marcador de neuroblasto e neurônio imaturo em uma trajetória provavelmente ligada a um tipo neuronal específico (células de disparo regular)¹⁰⁶, na principal via eferente da estrutura responsável pela consolidação da memória (hipocampo) e que possui conexões com outra estrutura ligada a esta mesma função (cíngulo retrosplenial) torna justificável, por exemplo, avaliar hipóteses que correlacionem neurogênese humana adulta com sono REM e consolidação da memória.

4.6.3.2 Patologia

A função da LECCEL pode ser pesquisada pela comparação de encéfalos normais com aqueles provenientes de indivíduos com história de doença que envolva o lobo temporal medial. Os estudos realizados com material humano sobre alteração de neurogênese em doenças neuropsiquiátricas^{60,61,139} analisaram principalmente a ZSG e o giro denteado obtidos em autópsias de indivíduos com história destas doenças. No entanto, outras áreas como o complexo subicular devem ser analisadas em função da descoberta de uma nova localização de expressão de marcadores de neurogênese.

4.6.3.3 Clínica

Uma limitação para o desenvolvimento de terapia de neuroregeneração é a ausência de métodos que monitorem simultaneamente a neurogênese induzida por lesão e os fatores clínicos que a influenciam. Um modelo para desenvolver esta monitoração pode aproveitar a relação entre a LECCEL e os órgãos circunventriculares, cujos vasos sanguíneos não compõem uma barreira hemato-encefálica. Também pode aproveitar a relação entre a LECCEL e o LCR, em contato com a superfície pial e a unidade neurovascular. A relação da LECCEL com o sangue e o LCR pode indicar que células e moléculas nestes compartimentos poderiam modular difusamente as fases iniciais da neurogênese, cujo prosseguimento dependeria de fatores do microambiente. Com base nesta hipótese, nós desenvolvemos um protocolo de estudo para correlação entre marcadores de neuroregeneração versus parâmetros clínicos, fisiológicos e bioquímicos, conforme acessados pela monitoração intensiva sistêmica e neurológica em doença neurológica aguda e grave. A realização deste protocolo de estudo foi recentemente viabilizada através da aprovação de financiamento pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)^{140,141}.

4.7 Conclusões e perspectivas

Este estudo mostra indícios de um novo nicho neurogênico na fase adulta da espécie humana. A taxa de neurogênese fisiológica neste nicho deve ser baixa, mas com potencial de aumento em resposta a lesão a um nível cuja repercussão clínica é desconhecida. A possibilidade de um nicho neurogênico estar relacionado ao sistema límbico é intrigante. Em 1878, Paul Broca descreveu o sistema límbico como uma “fronteira” dos hemisférios cerebrais¹⁴², em um estudo sem qualquer conexão aparente

com o manuscrito seminal publicado em 1873 por Camilo Golgi¹⁴³, descrevendo os métodos que sustentaram mais tarde as conclusões de Ramon y Cajal mencionadas na Introdução. Uma estratégia para contornar a falta de neuroregeneração clinicamente relevante pode ser estudar o sistema límbico como uma fronteira encefálica em termos de seu potencial neurogênico.

De fato, a hipótese de existência de um anel neurogênico límbico em humanos está sendo corroborada em nosso estudo atual (Nogueira et al., sob revisão). Neste estudo, um achado técnico foi que a imuno-histoquímica pelo método da biotina-estreptavidina (Anexo B, Figuras 12, 13 e 15 e referências 27 a 30) pode superestimar a expressão de um marcador em feixes neurais como a fímbria, porque a biotina também é expressa nesta região. No entanto, o uso de métodos livres de biotina também mostrou marcação por DCX e tubulina β -III (Nogueira et al., sob revisão) ao longo do circuito de Papez e em núcleos hipotalâmicos. Além disto, nós encontramos marcadores de CTNs em órgãos circunventriculares no continuum septo-hipotalâmico¹⁴². Concluindo, nossa pesquisa atual está corroborando e ampliando a hipótese de existência de um anel neurogênico límbico, porque marcadores de CTNs estão sendo encontrados em células dos órgãos circunventriculares, adjacentes a marcadores de neurogênese, que seguem a circuitaria neural entre o hipocampo e o hipotálamo.

5. ANEXOS

5.1 Anexo A. Tabelas

Tabela 1 – Anticorpos primários

Ac. 1 ^{ário}	Origem	Diluição	Catálogo	Fabricante	Fenótipo
Nestina	Poli-Rb	1 : 200 ¹	AB5922	Millipore ²	CTN
Nestina	Poli-Rb	1 : 100	ab93666	Abcam ³	CTN
Nestina	Mono-Ms	1 : 200	MAB5326	Millipore	CTN
Nestina	Mono-Ms	1 : 100	ab22035	Abcam	CTN
Musashi	Poli-Rb	1 : 200	AB5977	Millipore	CTN
Vimentina	Mono-Ms	1 : 500	M725	Dako ⁴	CTN / Astrócito
GFAP	Mono-Ms	1 : 2 000	Ab80842	Abcam	CTN / Astrócito
Ki-67	Poli-Rb	1 : 1 000	NCL-Ki67p	Vector ⁵	Proliferação
DCX	Poli-GP	1 : 1 500	AB5910	Vector	Neuroblasto
DCX	Poli-Rb	1 : 1 500	ab18723	Abcam	Neuroblasto
Tub. β-III	Mono-Ms	1 : 100	CBL412	Millipore	Neurônio imaturo
MAP-2	Poli-Rb	1 : 1 500	ab75079	Abcam	Neurônio maduro

Anticorpo primário (Ac. 1^{ário}); camundongo (Ms); cobaia (GP); coelho (Rb); monoclonal (Mono); policlonal (Poli); tubulina β -III (Tub. β -III).

¹ Imuno-histoquímica: fluorescente, 1 : 200; cromogênica, 1 : 5 000.

² Billerica, EUA.

³ Cambridge, EUA.

⁴ Glostrup, Dinamarca.

⁵ Burlingame, EUA.

Tabela 2 - Amostras utilizadas para análise dos marcadores

Marcador	Tecido	Justificativa
Nestina	Todos os blocos de cérebro	Pesquisa de nichos neurogênicos
Nestina	Glioblastoma	Controle positivo IHQ cromogênica
Nestina	Carcinoma hepatocelular	Controle positivo IHQ fluorescente
DCX	Cabeça e corpo do hipocampo esquerdo do caso n° 12*	Pesquisa de neurogênese constitutiva
Vimentina	Cortes do lobo temporal esquerdo do caso n° 12	Complemento dos achados para nestina
GFAP	Cabeça do hipocampo esquerdo do caso n° 12	Complemento dos achados para DCX
Tubulina β-III	Corpo do hipocampo direito do caso n°5	Complemento dos achados para DCX
MAP-2	Corpo do hipocampo esquerdo caso n° 12	Complemento dos achados para DCX
Musashi	Glioblastoma	Teste do glioblastoma como controle de marcadores para CTNs
Ki-67	Glioblastoma	Padronização da recuperação antigênica

Imuno-histoquímica (IHQ). *casos 5 e 12 escolhidos por melhores parâmetros dos fatores pré-fixação e melhor marcação pela nestina

Tabela 3 – Anticorpos secundários

Anticorpo secundário	Diluição	Catálogo	Fabricante
Burro anti-coelho	1 : 1 000	sc2089	Santa Cruz ¹
Burro anti-camundongo	1 : 1 000	sc2098	Santa Cruz
Cabra anti-cobaia	1 : 1 000	sc2440	Santa Cruz
Cabra anti-coelho	1 : 1 000	B8895	Sigma-Aldrich ²
Cabra anti-camundongo	1 : 200	B7151	Sigma-Aldrich

¹Santa Cruz, EUA.²Saint Louis, EUA.

Tabela 4 – Protocolo de imuno-histoquímica fluorescente

Fase	Descrição
1	Desparafinizar: manter lâminas em cuba(s) com xilol, a 60 °C, por 30 min.
2	Manter lâminas em cuba(s) com xilol, em temperatura ambiente (T.A.), por 20 min.
3	Re-hidratar: manter lâminas em cuba(s) com etanol a 100%, T.A., por 5 min. Desprezar a solução, trocar novamente por etanol a 100%, em T.A., por 5 min, por mais duas vezes (T.A., 3 x 5 min)
4	Trocar solução da(s) cuba(s), sucessivamente, por etanol a 95%, 90%, 80%, 70%, T.A., 5 min em cada etapa.
5	Diminuição da autofluorescência: Trocar solução da(s) cuba(s) por Sudan Black B a 1% em etanol a 70%, em T.A., por 30 min.
6	Trocar solução por solução salina tamponada por fosfato (PBS), T.A., 2 x 5 min.
7	Recuperação/desmarcamento antigênico: espirrar PBS em cada lâmina e transferir para cuba com tampão de 10 mM de citrato de sódio, pH 6,0.
8	Colocar a(s) cuba(s) em Becker e completar com o tampão de citrato de sódio, até cobrir a(s) cuba(s).
9	Manter em forno de micro-ondas, em potência máxima, até 1 min após solução entrar em ebulição (em geral, são necessários 6 min). Deixar esfriar em T.A. por 30 min. Trocar por PBS (3 x 5 min, T.A.).
10	Bloqueio de reações inespecíficas: Delimitar cortes com caneta hidrofóbica. Pipetar solução de albumina sérica bovina a 1% + soro do animal em que foi produzido o anticorpo secundário (1 : 20) em PBS-Triton a 0,2%. Manter em câmara úmida, em T.A., por 1 h. Em seguida, desprezar a solução e não lavar em PBS.
11	Anticorpo primário: Aplicar a solução com anticorpo primário, diluído em PBS-Triton (para cada corte, fazer o controle negativo, com PBS-Triton, excluindo o anticorpo primário). Manter em câmara úmida, a 4 °C, por 48 h (após 24 h, verificar se há necessidade de reposição da solução ou de umidificar a câmara).
12	Anticorpo secundário biotinilado: Desprezar a solução e colocar as lâminas em cuba(s) com PBS, em T.A., por 5 min. Trocar a solução por mais 2 x 5 min. Pipetar o anticorpo secundário biotinilado, diluído em PBS-Triton. Manter em câmara úmida, em T.A., por 90 min. (Obs: Considerar usar anticorpo secundário conjugado a sonda fluorescente e excluir etapa 13 – ver ítem 4.7 Conclusões e Perspectivas)
13	Estreptavidina conjugada a sonda fluorescente: Colocar as lâminas em cuba(s) com PBS, em T.A., por 3 x 5 min. Pipetar a estreptavidina conjugada a sonda fluorescente, diluída em PBS-Triton e armazenada em eppendorf protegido por papel alumínio. Fazer o procedimento em ambiente com baixa luminosidade. Manter por 1 h, em T.A., em câmara úmida escura.
14	Coloração dos núcleos: Lavar em cuba(s) protegida(s) da luz, em T.A., com PBS, por 3 x 5 min. Pipetar solução de Hoechst (ou DAPI) diluído em PBS-Triton, por 30 min, em câmara úmida escura.
15	Montagem: Lavar em cuba(s) protegida(s) da luz, em T.A., com PBS, por 3 x 5 min. Montar com “anti-fading” (Vectashield®), cobrir com lamínula e selar com esmalte incolor.
16	Quando armazenar, manter em caixa fechada, a 4 °C.

Tabela 5 – Dados sobre as autópsias e detecção de camada de células nestina-positivas na ZSV

Nº	Idade ¹	Antecedentes	Causa do Óbito	Tempo ²	CCNP ³
1	35	HAS	Aneurisma Ao	14 h 50 min	-
2	37	-	Aneurisma Ao	11 h 50 min	+
3	20	HAS	BCP	18 h 20 min	-
4	79	IAM	TEP	14 h	-
5	50	CA pulmonar	EAP	5 h 10 min	+
6	38	Etilista	HDA	16 h 40 min	-
7	54	CCC	TEP	19 h	-
8	59	CA pulmonar	BCP / TEP	16 h	+
9	73	Colangiocarcinoma	Colangite	9 h	+
10	23	HAS	TEP	22 h 35 min	-
11	56	Neoplasia M adrenal	BCP	14 h 05 min	+
12	49	CA boca/faringe	TEP	10 h 45 min	+
13	48	Etilismo, caquexia	Tb pulmonar	23 h 05 min	-
14	54	Marcapasso	IAM	14 h 50 min	-

Aorta (Ao); broncopneumonia (BCP); camada de células nestina-positivas (CCNP); carcinoma (CA); colecistite crônica calculosa (CCC); edema agudo de pulmão (EAP); hemorragia digestiva alta (HDA); hipertensão arterial sistêmica (HAS); infarto agudo do miocárdio (IAM); maligna (M); tromboembolismo pulmonar (TEP); tuberculose (Tb).

¹ Idade em anos.

² Tempo transcorrido entre o óbito e o início da fixação do tecido.

³ CCNP na ZSV da eminência colateral.

Tabela 6 – Detecção da camada de células nestina-positivas na ZSV da eminência colateral em função de fatores pré-fixação tecidual^{1,2}

Mann-Whitney U Test										
By variable NPCL										
Marked tests are significant at p <,05000										
	Rank Sum NPCL-	Rank Sum NPCL+	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N -	Valid N +	2*1sided exact p
AGE	50,00000	55,00000	14,00000	-1,22644	0,220032	-1,22779	0,219525	8	6	0,228438
TIME	80,00000	25,00000	4,00000	2,51744	0,011822	2,52021	0,011729	8	6	0,007992

Camada de células nestina-positivas (NPCL); idade de ocorrência do óbito (AGE); tempo transcorrido entre o óbito e o início da fixação do tecido (TIME).

¹ Tabela conforme mostrada no software “Statistica Trial Version”.

² Para teste unilateral: $p = 2 * 1\text{sided exact } p / 2$; portanto, para “AGE” $p = 0,114219$, para “TIME” $p = 0,003996$.

Tabela 7 – Tempo até o qual não há influência significativa na detecção de camada de células nestina-positivas na ZSV^{1,2}

variable	Mann-Whitney U Test By variable NPCL (TIME <= 1000 min) Marked tests are significant at p <,05000									
	Rank Sum -	Rank Sum +	U	Z	p-value	Z adjusted	p-value	Valid N -	Valid N +	2*1sided exact p
AGE	20,00000	35,00000	10,00000	-0,319801	0,749119	-0,319801	0,749119	4	6	0,761905
TIME	30,00000	25,00000	4,00000	1,599005	0,109820	1,603873	0,108743	4	6	0,114286

Camada de células nestina-positivas (NPCL); idade de ocorrência do óbito (AGE); tempo transcorrido entre o óbito e a fixação do tecido (TIME). (+) presença de NPCL; (-) ausência de NPCL.

¹ Tabela conforme mostrada no software “Statistica Trial Version”.

² Para teste unilateral: $p = 2 * 1\text{sided exact } p / 2$; portanto, para “AGE” $p = 0,3809525$, para “TIME” $p = 0,057143$.

5.2 Anexo B. Figuras

Figura 1. Dissecção do lobo temporal para estudo de nichos neurogênicos. As figuras correspondem a diferentes ângulos do lobo temporal: medial (A); ântero-medial, a partir do corpo do hipocampo (B); corte coronal no nível da amígdala (C); ínfero-medial, com corte expondo a cabeça do hipocampo (D). Para cada lobo temporal, foi padronizada a obtenção de 5 cortes: nos níveis da amígdala (A-I e C-I), da cabeça do hipocampo (limite posterior em A-II, limite anterior em D-II (a fatia posterior, identificada com asterisco, foi a usada para emblocamento na parafina)), do corpo do hipocampo (A-III e B-III), da parede ventricular, contendo a zona subventricular (B-IV), e do córtex lateral (neocórtex) (C-V). Os números 20 a 27 referem-se à citoarquitetura, os demais são denominados de acordo com a anatomia macroscópica. Legenda: giro semilunar, parte do uncus correspondente à superfície medial da amígdala (1), sulco semianular (2), giro ambiens (3), impressão do tentório (4), giro uncinado (5), sulco hipocampal anterior (6), banda de Giacomini (7), giro intralímbico (8), cabeça do hipocampo (9), sulco uncal (10), corno temporal do ventrículo lateral (11), corpo do hipocampo (12), fímbria (13), giro para-hipocampal (14), sulco fimbriodenteado (15), giro denteado (“margo denticulatus”) (16), sulco hipocampal (17), eminência colateral (18), giro fusiforme (19), camada granular do giro denteado (20), “cornu Ammonis” (CA) 4 (CA4) (21), CA3 (22), CA2 (23), CA1 (24), subículo (25), pré-subículo (26), fissura hipocampal (27), ínsula (à esquerda, sulco limitante inferior da ínsula) (28), giro temporal superior (29), giro temporal médio (30), giro temporal inferior (31), sulco temporal superior (32), sulco temporal inferior (33), sulco occipitotemporal (34), sulco colateral (35), recesso uncal (36), amígdala (37), trato óptico (38), superfície pósteromedial do uncus (inclui os giros uncinado e intralímbico e a banda de Giacomini) (39), grupos de núcleos da amígdala (basolateral (a), central (b) e córtico-medial (c)). O asterisco indica fatia usada para obtenção do bloco contendo a cabeça do hipocampo. As setas indicam uma linha cuja coloração lembra a da substância cinzenta em uma localização por onde passa uma camada de células DCX-positivas, que penetram no giro para-hipocampal a partir do complexo subicular (cabeça de seta).

Figura 2. Aspectos técnicos da marcação para nestina. Cortes da ZSV obtidos do mesmo bloco (um espécime é mostrado em (C)). Imagem de microscopia de fluorescência (verde, nestina; azul, núcleo marcado por Hoechst) (A). Imagem de microscopia de campo claro (B). Em (A) e (B) os cortes foram fotografados na totalidade através de campos adjacentes com magnificação de 40x. Em seguida, as imagens foram editadas lado a lado com o uso de Photoshop, para uma visão ampla do corte em uma única imagem. O epêndima aparece acima nas figuras. A espessura da CCNP varia, sendo mais larga quando próxima a vasos sanguíneos da ZSV (linhas em (A) e (B)). Esta variação é demonstrada mais claramente com esta técnica, em que a análise de áreas mais vascularizadas (cabeças de seta) e menos vascularizadas (seta) pode ser simultânea. Os asteriscos mostram uma fina camada anuclear sob a camada de células endoteliais. A autofluorescência não foi diminuída apenas nas hemácias, que por sua localização no interior de vasos são facilmente distinguidas das células realmente marcadas por nestina. Um dado de grande relevância é que os resultados sobre a localização citoarquitetônica das células nestina-positivas foi o mesmo para os métodos imunofluorescente (A) e imunoenzimático (B). Da mesma maneira, a morfologia das células nestina-positivas mostradas pelo método imunoenzimático (setas em (D)) corresponde à morfologia das células nestina-positivas mostrada por imagens dos microscópios de epifluorescência (setas em (E)) e confocal (setas em (F)). Estes achados em conjunto reforçam a conclusão sobre a especificidade da marcação para nestina mostrada nas figuras seguintes, a despeito de uma marcação de fundo inespecífica. As imagens de imunofluorescência nesta figura foram obtidas durante a padronização do protocolo de imuno-histoquímica por fluorescência, dois anos após o emblocamento na parafina; os mesmos resultados não foram obtidos três anos após, provavelmente por perda de antigenicidade (como discutido no texto). Setas em (C): vasos sanguíneos superficiais; nesta localização a probabilidade de presença de células nestina-positivas é maior. Cabeças de seta em (D) e (E): camada endotelial. Barras de escala: (A) e (B) = 200 μ m; (D), (E) e (F) = 20 μ m.

Figura 3. Controles para marcação para nestina. Carcinoma hepatocelular é um controle positivo para marcação para nestina, especialmente útil se o anticorpo primário reage exclusivamente com nestina humana e para o método imunofluorescente. A marcação para nestina no carcinoma hepatocelular (A – C) mostra um padrão não descrito previamente, embora prontamente identificável, de estrutura semelhante a sinusóides, principalmente devido à marcação de células endoteliais do tumor (setas em (G)). O embocamento na parafina desta amostra de carcinoma hepatocelular foi realizado após a retomada deste estudo, quando a marcação para nestina não foi mais conseguida nas amostras de cérebro, provavelmente por perda de antigenicidade. Controle negativo (D – F); coloração por hematoxilina-eosina da amostra de carcinoma hepatocelular (G). Controle positivo de nestina pelo método imunoenzimático (H) em glioblastoma, que não é um controle positivo confiável para o método imunofluorescente devido à intensa autofluorescência. Controle negativo para nestina (I) no giro denteado humano mostrando uma marcação de fundo inespecífica. Setas (C): células endoteliais nestina-positivas. Cabeças de seta: autofluorescência de hemácias. Barras de escala: 50 μ m.

Figura 4. Aspectos técnicos da imuno-histoquímica para outros marcadores relacionados à neurogênese. Glioblastoma (GBM) (coloração por hematoxilina-eosina em (A)) é um controle positivo adequado para musashi (B), um marcador de CTNs, devido à sua marcação intensa e difusa. A marcação para Ki-67 (C) pode ser identificada em glioblastoma com a inclusão de recuperação antigênica no protocolo de imuno-histoquímica. Barras de escala: 50 μ m.

Figura 5. CCNP na ZSP da amígdala. Esta figura mostra o limite medial, anterior e superior da área analisada (as setas indicam a superfície pial). Em (A), as letras B, D e F identificam as localizações anatômicas das imagens correspondentes. As cabeças de seta em (B) e as linhas pontilhadas em (C) mostram a CCNP na ZSP relacionada ao sulco endorrinal, contornando o trato óptico (OT) e alcançando a ZSP da amígdala (Amy). Os asteriscos em (B) e (E) identificam o lado do limite entre a amígdala e o tracto óptico. As figuras (C) e (E) são imagens em maior magnificação obtidas a partir dos campos de imagem mostrados em (B) e (D), respectivamente, mostrando a morfologia das células nestina-positivas (cabeças de seta). Seguindo inferiormente, a Figura (F) mostra a CCNP na porção média da amígdala. Note que na amígdala algumas células nestina-positivas estão em localização mais profunda do que a ZSP, definida aqui como a região até 200 μm abaixo da pia-máter. Cabeça do hipocampo (HdHc); globo pálido (P); vaso sanguíneo (BV); ventrículo lateral (LV). Barras de escala: (B) = 500 μm ; (C) a (F) = 50 μm .

Figura 6. CCNP entre a ZSP e a ZSG na cabeça do hipocampo. A área entre as linhas pontilhadas em (A) e (B) mostram a CCNP correndo a partir da ZSP na borda inferior do uncus (A) até a camada de células granulares (GCL) (orientada verticalmente nesta região), terminando na ZSG. (B) e (C) são respectivamente imagens de visão magnificada dos retângulos inferior e superior em (A) (a parte superior de (C) está além da área mostrada em (A)). Sulco uncal, (US). Cabeça de seta: processos positivos para nestina. Setas: células nestina-positivas na ZSG. Barras de escala: (A) = 500 µm; (B) e (C) = 100 µm.

Figura 7. CCNP na transição entre a ZSP e ZSV (corpo do hipocampo). Esta figura é formada por imagens englobando a fíbria (F) e o giro denteado. O asterisco mostra a transição entre a pia-máter e o epêndima, que ocorre na fíbria. Nesta localização da ZSV (SVZ), o número de células nestina-positivas é mínimo. Este tipo celular é mais frequentemente observado na ZSP, especialmente próximo ao sulco fimbriodenteado (fds). Note a coloração mais escura da fíbria e da ZSV em comparação ao restante do corte. O mesmo padrão é observado para vimentina (Figura 18), outro marcador de CTNs, e coincide com a região de alta expressão de DCX. Especulativamente, este padrão poderia indicar uma expressão difusa, embora baixa, de marcadores de células progenitoras neurais localizadas na fíbria. Camada ependimária (E); “cornu Ammonis” (hipocampo propriamente) (CA); camada de células granulares (GCL); “margo denticulatus” do giro denteado (md); superfície pial (P). Inserção acima: visão magnificada do retângulo acima, mostrando células nestina-positivas (setas). Inserção abaixo: visão magnificada do retângulo abaixo, mostrando células nestina-positivas (setas), algumas delas apresentando processos longos (cabeças de seta). As linhas pontilhadas delimitam a CCNP na zona subpial. Barras de escala: figura maior = 100 μm ; inserções = 20 μm .

Figura 8. CCNP na ZSV. A partir da transição entre a ZSP e a ZSV, esta segue lateralmente através do corpo do hipocampo (Figura 7) e, em seguida, através da eminência colateral (Figura 2); na Figura 8, a ZSV é seguida anteriormente a partir deste nível, retornando novamente à topografia da amígdala, até o limite anterior da cabeça do hipocampo, a partir de onde se inicia o recesso uncal. Aqui, a CCNP também tende a ser mais larga próxima a vasos sanguíneos. Uma visão macroscópica é mostrada em (D), onde A, B e C indicam a topografia das respectivas figuras. Putâmen (1); globo pálido externo (2); globo pálido interno (3); fascículo uncinado e comissura anterior (4); trato óptico (5); ventrículo lateral (6); córtex entorrinal (7); amígdala (Amy, Amygdala); cabeça do hipocampo (HdHc, Head of the Hippocampus); epêndima (E); área no limite posterior do recesso uncal (Uncal Recess); vaso sanguíneo (BV). Setas: células nestina-positivas. Cabeças de seta: processos de células nestina-positivas através da camada endimária. Asterisco: vazio anuclear. Barras de escala: (A) e (B) = 50 μ m; (C) = 25 μ m.

Figura 9. Células nestina-positivas no espaço perivascular. O número de células nestina-positivas é maior no espaço perivascular na amígdala (B) do que no espaço perivascular no neocórtex (isocórtex) (A), que é mais distante da LECCEL. Algumas células nestina-positivas mostram características de astrócitos da unidade neurovascular (setas em (A), (B) e (C)). Sob certas circunstâncias, astrócitos maduros podem mostrar características de CTNs. Epêndima (E); vaso sanguíneo (BV) (note que o endotélio também expressa nestina (ver Figura 19B)). Cabeças de seta: células nestina-positivas. Barras de escala: (A) e (B) = 50 μm ; (C) = 20 μm .

Figura 10. Limites da CCNP no lobo temporal. A Figura (A) mostra que a CCNP segue lateralmente na ZSP do corpo do hipocampo (BdHc) (cabeças de seta) e termina sob o sulco hipocampal (HS) (asterisco). A Figura (B) é uma visão magnificada do retângulo em (A). As linhas pontilhadas identificam a conexão entre a ZSP e a ZSG, onde a seta aponta para uma célula nestina-positiva. Note a presença de um vaso sanguíneo (BV) onde a CCNP é mais espessa. A Figura (C) mostra uma linha de células nestina-positivas adjacente ao fundo de um sulco do neocórtex (NeoCx), um achado incomum. Complexo subicular (SC); giro denteado (DG); “margo denticulatus” do giro denteado (MD); sulco fimbriodenteado (FDS); sulco hipocampal (HS). Barras de escala: (A) = 500 µm; (B) = 200 µm; (C) = 50 µm.

Figura 11. Anatomia macroscópica do caso estudado para marcação para DCX. Esta figura mostra uma visão inferior de parte de ambos os hemisférios e do tronco encefálico, evidenciando uma anatomia macroscópica normal. Hemisférios direito (R) e esquerdo (L). As principais estruturas relacionadas a nichos neurogênicos são destacadas como se segue: giro para-hipocampal (1); uncus (2); subículo (3); cabeça do hipocampo (4); amígdala (5); ventrículo lateral (corno temporal) (6); substância perfurada anterior (topografia relacionada ao córtex piriforme) (7).

Figura 12. Marcação para DCX na cabeça do hipocampo. A marcação para DCX (vermelha) é detectada como uma camada contínua na cabeça do hipocampo. Superior e medialmente (A), a CCDP pode ser observada na ZSV do hipocampo propriamente (“cornu Ammonis” (CA)), mostrando aspecto granular a uma magnificação de 40x. Em alguns pontos, a marcação para DCX contorna os núcleos, mas ela é mais observada no neuropilo. A partir do limite lateral da cabeça do hipocampo (B), DCX marca fibras cortadas em um plano tangencial (setas em (B – E)). O mesmo padrão é observado no lado da eminência colateral (CE). As camadas endimárias de ambos os lados se fundem (asterisco em (B)) e seguem uma trajetória extraventricular (asteriscos em (C)) (veja também Figuras (1B) e inserção na Figura 17). A CCDP segue a mesma trajetória (C), formando dois feixes separados que não cruzam a camada endimária extraventricular. Estes feixes são formados a partir de uma confluência no interior do giro para-hipocampal (pela definição da anatomia macroscópica) de fibras provenientes do complexo subicular (S). (F) mostra imagem de controle negativo no nível da camada de células granulares (GCL). Os núcleos estão marcados em azul por DAPI. Vazio anuclear (G). Barras de escala: 20 μm.

Figura 13. Marcação para DCX no corpo do hipocampo. A CCDP (verde) é observada na fímbria (letra F, em (A)) e na ZSV do hipocampo propriamente (“cornu Ammonis” (CA)), onde sua espessura varia (A – C). A CCDP mostra uma marcação intensa próxima à camada endimária extraventricular (D) (veja a Figura 12C para a marcação na região equivalente na cabeça do hipocampo). Finalmente, a CCDP alcança a região do complexo subicular (S). Algumas fibras desta camada cruzam-se com outras (cabeça de seta em (E)) que correm paralelas à superfície pial. A Figura (F) mostra o controle negativo, no nível da camada de células granulares (GCL). Os núcleos estão marcados em azul por DAPI. Lado da eminência colateral (CE). As setas apontam para fibras DCX-positivas em (B) e (E) e para marcação perinuclear por DCX em (C). Asteriscos: camada endimária (asterisco amarelo: transição entre a superfície pial (cabeça de seta em (A)) e a camada endimária). Barras de escala: 20 μ m.

Figura 14. Marcação para GFAP na cabeça do hipocampo. Uma intensa marcação para GFAP (verde) é observada no vazio anuclear da ZSV (A) e na glia limitans da ZSP (B e C). Além disso, diferentemente da marcação para DCX, a marcação para GFAP é observada dentro da linha formada pelos núcleos das células ependimárias extraventriculares (asterisco em D). “Cornu Ammonis” (hipocampo propriamente) (CA); eminência colateral (CE); córtex entorrinal (EC); pré-subículo (PrS); subículo (S); sulco uncal (US). Barras de escala: 20 µm.

Figura 15. Marcação para tubulina β -III e DCX no corpo do hipocampo. Em (A), tubulina β -III (verde) pode ser observada em corpos celulares de neurônios piramidais (seta) e fibras neuronais (cabeça de seta) no hipocampo propriamente (“cornu Ammonis” (CA)), ao contrário do que ocorre na marcação para DCX. Por outro lado, a marcação para tubulina β -III (B) é similar à marcação para DCX na fímbria (F) (ver Figura (13A)), embora menos difusamente distribuída. (C) mostra que o corpo do hipocampo no caso analisado nesta figura apresenta um padrão de marcação para DCX (verde) na ZSV hipocampal similar àquele apresentado pelo caso analisado nas Figuras 12 e 13. Os núcleos estão marcados em azul por Hoechst. “Margo denticulatus” do giro denteado (MD); sulco fimbriodenteado (FDS). Setas: superfície pial (B) e células DCX-positivas (C). Cabeça de seta em (C): camada endimária. Barras de escala: 20 μ m.

Figura 16. Marcação para MAP-2 no corpo do hipocampo. O marcador de neurônio maduro MAP-2 (vermelho), mostrado em corpos celulares de neurônios piramidais em (A) (magnificação maior em (B)) não mostram marcação na ZSV, contrariamente a DCX. Os núcleos estão marcados em azul por DAPI. Camada piramidal (PL). Setas: neurônios piramidais. Cabeça de seta: camada ependimária. Barras de escala: 20 µm.

Figura 17. Resultados deste estudo comparados com a visão mais comum sobre a localização de nichos neurogênicos. Esta figura mostra uma visão ântero-medial do lobo temporal medial, em um corte coronal na junção entre a cabeça e o corpo do hipocampo. As zonas atualmente consideradas como sendo nichos neurogênicos são identificadas por linhas pretas. As linhas pontilhadas azul e vermelha identificam a CCNP e a CCDP, respectivamente. A CCNP é menos evidente na ZSG do que na ZSV e ZSP. Apenas a porção mais medial da eminência colateral está incluída na análise de marcação para DCX. A CCDP é mínima no lado do giro denteado do sulco hipocampal e ausente na ZSG. A inserção mostra uma visão posterior da junção entre a cabeça e o corpo do hipocampo; a linha identificada entre as duas setas corresponde à visão macroscópica da região que contém as duas colunas de CCDP relacionadas à camada ependimária extraventricular. Eminência colateral (1); corpo do hipocampo (2); fímbria (3 e cabeça de seta); sulco fimbriodenteado (4); giro denteado (“margo denticulatus”) (5); sulco hipocampal (6); giro para-hipocampal (superfície medial, visão macroscópica) (7); subículo (8); córtex entorrinal (9) (pré-subículo e parassubículo estão localizados entre (8) e (9)); para-hipocampo (citoarquitetura) (10); giro para-hipocampal (corte coronal, anatomia macroscópica) (11); uncus (12); ZSV hipocampal (a); ZSV (eminência colateral) (b); ZSG (c).

Figura 18. Marcação para vimentina. Vimentina é um suposto marcador de CTNs. Na ZSV (SVZ em (A) e (B)), a vimentina marca a camada endimária e o vazio anuclear (lado esquerdo das imagens), assim como prováveis CTNs (seta em (B)). A marcação para vimentina no corpo do hipocampo (C) e na ZSG (SGZ em (D)) é similar à marcação para nestina nestas regiões. Note a camada mais larga de células vimentina-positivas no sulco fimbriodenteado (seta em (C)) e a coloração mais escura na fímbria (letra F em (C)), comparado ao restante do parênquima (ver também Figura 7). Contudo, a vimentina é um marcador de CTNs menos específico do que a nestina, porque também marca astrócitos protoplásmicos (setas em (E) (amígdala) e em (F) (neocórtex)). Camada de células granulares (GCL); camada molecular (ML); hilo (H). Seta em (D): processo celular nestina-positivo na GCL, prolongamento de uma célula nestina-positiva da ZSG. Cabeça de seta em (F): endotélio marcado por vimentina. Barras de escala: 50 μ m.

Figura 19. Marcação para nestina em células ependimárias e endoteliais. Em (A), um corte tangente à parede anterior do corno temporal do ventrículo lateral mostra um grupo de células ependimárias nestina-positivas. Parte da marcação desta figura é provavelmente proveniente de processos de CTNs da ZSV que atingem a camada ependimária. Em (B), a seta aponta para um grupo de vasos sanguíneos contendo CENPs, que geralmente são prontamente identificadas e distinguidas dos demais tipos celulares nestina-positivos. As células ependimárias e endoteliais apresentam um papel não totalmente conhecido nos nichos neurogênicos. Barras de escala: 50 μ m.

Figura 20. Parâmetros anatômicos de um hipotético anel neurogênico límbico. (A) mostra uma visão inferior e medial de uma região analisada neste estudo. Note a proximidade entre a topografia do córtex piriforme (asterisco), do uncus (4) e da fissura coroideia, onde o plexo coroide (1) e a fímbria (2) estão localizados (a seta aponta para a região na qual a relação entre o plexo coroide e a fímbria (“taenia fimbriae”) foram mantidas durante a dissecação). (B) mostra a imagem de uma área não analisada neste estudo, mas que sob o ponto de vista citoarquitetônico é uma extensão da área analisada. Esta figura é uma visão posterior e medial do hemisfério esquerdo, onde a cavidade ventricular está aberta, expondo a cauda do hipocampo (7), acima da qual a fímbria e o plexo coroide são identificados. Giro denteado e “margo denticulatus” (3); giro para-hipocampal (5); trato óptico (6).

6 Referências

1. Curtis MA, Eriksson PS, Faull RLM. Adult human neurogenesis: a response to cell loss and new circuitry requirements? In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editores. *Adult neurogenesis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. p619-43.
2. Colucci-D'Amato L, Bonavita V, di Porzio U. The end of the central dogma of neurobiology: stem cells and neurogenesis in adult CNS. *Neurol Sci*. 2006;27:266-70.
3. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962;135:1127-8.
4. Goldman SA, Nottebohm F. Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:2390-4.
5. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255:1707-10.
6. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60:585-95.
7. Kempermann G. *Adult neurogenesis 2*. New York: Oxford University Press; 2011. p158-84: Neurogenesis in the adult subventricular zone and olfactory bulb.
8. Kempermann G. *Adult neurogenesis 2*. New York: Oxford University Press; 2011. p185-215: Adult hippocampal neurogenesis.
9. Kirschenbaum B, Nedergaard M, Preuss A, Barami K, Fraser RAR, Goldman SA. "In vitro" neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cerebral Cortex*. 1994;4:576-89.
10. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998;4:1313-7.
11. Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M. Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2005;19:436-50.
12. Blümcke I, Schewe JC, Normann S, Brüstle O, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*. 2001;11:311-21.
13. Pincus DW, Restelli CH, Barry J, Goodman RR, Fraser RAR, Nedergaard M, Goldman SA. "In vitro" neurogenesis by adult human epileptic temporal neocortex. *Clin Neurosurg*. 1997;44:17-25.
14. Pincus DW, Keyoung HM, Restelli CH, Goodman RR, Fraser RAR, Edgar M, Sakakibara S, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA. Fibroblast growth factor-2 / brain-derived neurotrophic factor – associated maturation of new neurons generated from adult human subependymal cells. *Ann Neurol*. 1998;43:576-85.
15. Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res*. 1999;253:733-6.
16. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*. 1999;156:333-44.

17. Pagano FS, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells*. 2000;18:295-300.
18. Roy NS, Benraiss A, Wang S, Fraser RAR, Goodman R, Couldwell WT, Nedergaard M, Kawaguchi A, Okano H, Goldman SA. Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J Neurosci Res*. 2000;59:321-31.
19. Roy NS, Wang S, Jiang L, Kang J, Benraiss A, Restelli CH, Fraser FAR, Couldwell WT, Kawaguchi A, Okano H, Nedergaard M, Goldman SA. "In vitro" neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*. 2000;6:271-7.
20. Akiyama Y, Honmou O, Kato T, Uele T, Hashi K, Kocsis KD. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2001;167:27-39.
21. Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF, Bloch JJ, Déglon N, Kostic C, Zurn A, Aebischer P. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol*. 2001;170:48-62.
22. Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein AS, Gage FH. Progenitor cells from human brain after death. *Nature*. 2001;411:42-3.
23. Liu Z, Martin LJ. Olfactory bulb core is a rich source of neural progenitor and stem cells in adult rodent and human. *J Comp Neurol*. 2003;459:368-91.
24. Nunes MN, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann II G, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med*. 2003;9:439-47.
25. Westerlund U, Moe MC, Varghese M, Johnsen JB, Ohlsson M, Langmoen IA, Svensson M. Stem cells from the adult human brain develop into functional neurons in culture. *Exp Cell Res*. 2003;289:378-83.
26. Bédard A, Parent A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004;151:159-68.
27. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004;427:740-4.
28. Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelsø C, Holtås S, van Roon-Mom WMC, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RLM, Eriksson PS. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*. 2007;315:1243-9.
29. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, Gupta N, Berger MS, Huang E, Garcia-Verdugo JM, Rowitch DH, Alvarez-Buylla A. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 2011;478:382-6.
30. Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, Zhang J, Wei B, Ma T, Zhang Q, Zhang Y, Chen R, Song H, Yang Z. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res*. 2011;21:1534-50.
31. Ponti G, Peretto P, Bonfanti L. Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits. *PLoS One*. 2008;3:e2366.

32. Bifari F, Decimo I, Chiamulera C, Bersan E, Malpeli G, Johansson J, Lisi V, Bonetti B, Fumagalli G, Pizzolo G, Krampera M. Novel stem/progenitor cells with neuronal differentiation potential reside in the leptomeningeal niche. *J Cell Mol Med*. 2009;13:3195-208.
33. Xue JH, Yanamoto H, Nakajo Y, Tohnai N, Nakano Y, Hori T, Iihara K, Miyamoto S. Induced spreading depression evokes cell division of astrocytes in the subpial zone, generating neural precursor-like cells and new immature neurons in the adult cerebral cortex. *Stroke*. 2009;40: e606-13.
34. Ray J. Monolayer cultures of neural stem/progenitor cells In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editores. *Adult neurogenesis*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. p135-58.
35. Bernier PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A. Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res*. 2000;37:67-78.
36. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol*. 2006;494:415-34.
37. Waldvogel HJ, Curtis MA, Baer K, Rees MI, Faull RL. Immunohistochemical staining of post-mortem adult human brain sections. *Nat Protoc*. 2006;1:2719-32.
38. Beesley JE. *Immunohistochemistry and in situ hybridization in the biomedical sciences*. Boston: Birkhäuser; 2001.
39. Korzhevskii DE, Gilyarov A. Optimization of a method for the immunocytochemical detection of nestin in paraffin sections of the rat brain. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38:135-7.
40. Saini A. New lens offers scientist a brighter outlook. *Science*. 2012;355:1562-3.
41. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:2510-22.
42. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998;92:63–72.
43. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2005;21:1-14.
44. Plümpe T, Ehninger D, Steiner B, Klempin F, Jessberger S, Brandt M, Römer B, Rodriguez GR, Kronenberg G, Kempermann G. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci*. 2006;7:77.
45. Kronenberg G, Wang LP, Geraerts M, Babu H, Synowitz M, Vicens P, Lutsch G, Glass R, Yamaguchi M, Baekelandt V, Debyser Z, Kettenmann H, Kempermann G. Local origin and activity-dependent generation of nestin-expressing protoplasmic astrocytes in CA1. *Brain Struct Funct*. 2007;212:19-35.
46. Verwer RW, Sluiter AA, Balesar RA, Baayen JC, Noske DP, Dirven CM, Wouda J, van Dam AM, Lucassen PJ, Swaab DF. Mature astrocytes in the adult human neocortex express the early neuronal marker doublecortin. *Brain*. 2007;130:3321-35.

47. Liu YW, Curtis MA, Gibbons HM, Mee EW, Bergin P, Teoh HH, Connor B, Dragunow M, Faull RL. Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human. *Eur J Neurosci.* 2008;28:2254-65.
48. Cai Y, Xiong K, Chu Y, Luo DW, Luo XG Yuan XY, Struble RG, Clough RW, Spencer DD, Williamson A, Kordower JH, Patrylo PR, Yan XX. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. *Exp Neurol.* 2009;216:342-56.
49. Marichal N, García G, Radmilovich M, Trujillo-Cenóz O, Russo RE. Enigmatic central canal contacting cells: immature neurons in "standby mode"? *J Neurosci.* 2009;29:10010-24.
50. Gomez-Climent MA, Guirado R, Varea E, Nàcher J. "Arrested development". Immature, but not recently generated, neurons in the adult brain. *Arch Ital Biol.* 2010;148:159-72.
51. Fung SJ, Joshi D, Allen KM, Sivagnanasundaram S, Rothmond DA, Saunders R, Noble PL, Webster MJ, Weickert CS. Developmental patterns of doublecortin expression and white matter neuron density in the postnatal primate prefrontal cortex and schizophrenia. *PLoS One.* 2011;6:e25194.
52. Klempin F, Kronenberg G, Cheung G, Kettenmann H, Kempermann G. Properties of doublecortin-(DCX)-expressing cells in the piriform cortex compared to the neurogenic dentate gyrus of adult mice. *PLoS One.* 2011;6:e25760.
53. Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2011;17:409-18.
54. Guo F, Maeda Y, Ma J, Xu J, Horiuchi M, Miers L, Vaccarino F, Pleasure D. Pyramidal neurons are generated from oligodendroglial progenitor cells in adult piriform cortex. *J Neurosci.* 2010;30:12036-49.
55. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One.* 2010;5: e8809.
56. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 1999;2:266-70.
57. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors T. Learning enhances adult neurogenesis in the adult hippocampal formation. *Nature Neurosci.* 1999;2:260-5.
58. Kempermann G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci.* 2008;31:163-9.
59. Deng W, Aimone JB, Gage FG. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010;11:339-50.
60. Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res.* 2009;63:155-64.
61. Kempermann G. *Adult neurogenesis* 2. New York: Oxford University Press; 2011. p518-88: Medicine.
62. Coras R, Siebzehnrbuhl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blümcke I. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain.* 2010;133:3359-72.
63. Aboody K, Capela A, Niazi N, Stern JH, Temple S. Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta Stone. *Neuron.* 2011;70:597-613.

64. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*. 2009;158:1021-9.
65. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2000;425:479-94.
66. Wen HT, Rhoton AL Jr, de Oliveira E, Cardoso AC, Tedeschi H, Baccanelli M, Marino R Jr. Microsurgical anatomy of the temporal lobe: part 1: medial temporal lobe anatomy and its vascular relationships as applied to amygdalohyppectomy. *Neurosurgery*. 1999;45:549-91.
67. Gloor P. *The temporal lobe and limbic system*. New York: Oxford University Press; 1997. p591-721: The amygdaloid system.
68. Duvernoy H. *The human hippocampus*. Berlin: Springer; 2005. e-book.
69. Amaral D, Lavenex P. Hippocampal neuroanatomy. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press; 2007. p37-114.
70. Mai JK, Paxinos G, Voss T. *Atlas of the human brain*. Amsterdam: Elsevier; 2008.
71. Ghorpade A, Bruch L, Persidsky Y, Chin B, Brown WHC, Borgmann K, Persidsky R, Wu L, Holter S, Cotter R, Faraci J, Heilman D, Meyer V, Potter JF, Swindells S, Gendelman HE. Development of a rapid autopsy program for studies of brain immunity. *J Neuroimmunol*. 2005;163:134-44.
72. Kretschmar H. Brain banking: opportunities, challenges and meaning for the future. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:70-7.
73. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, Badie C, Hewitt SM. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2011;59:356-65.
74. Gu H, Wang S, Messam CA, Yao Z. Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain. *Brain Res*. 2002;943:174-80.
75. Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3:279-88.
76. Stojnik T, Rosland GV, Sakariassen PO, Kavalari R, Lah T. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol*. 2007;68:133-44.
77. Buchwalow IB, Böcker W. *Immunohistochemistry: basics and methods*. Berlin: Springer; 2010. p1-8: Antibodies for immunohistochemistry.
78. Abbott A. Tissue-bank shortage: Brain child. *Nature*. 2011;478:442-3.
79. Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D: Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev*. 2004;13:658-64.
80. Lardon J, Rومان I, Bouwens L. Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Biol*. 2002;117:535-40.
81. Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P. Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:697-706.
82. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke*. 2007;38:3032-39.
83. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2004;41:864-880.

84. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010;468:824-8.
85. Niki T, Pekny M, Hellemans K, Bleser PD, Berg KV, Vaeyens F, Quartier E, Schuit F, Geerts A. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;29:520-7.
86. Dore-Duffy P, Katychhev A, Wang X, Van Buren E. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:613-24.
87. Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS. A novel prognostic subtype of human HCC derived from hepatic progenitor cells. *Nat Med*. 2006;12:410-16.
88. Yang XR, Xu Y, Yu B, Zhou J, Qiu SJ, Shi GM, Zhang BH, Wu WZ, Shi YH, Wu B, Yang GH, Ji Y, Fan J. High expression levels of putative hepatic stem/progenitor cell biomarkers related to tumour angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2010; 59:953-62.
89. Tsuchiya A, Kamimura H, Tamura Y, Takamura M, Yamagiwa S, Suda T, Nomoto M, Aoyagi Y. Hepatocellular carcinoma with progenitor cell features distinguishable by the hepatic stem/progenitor cell marker NCAM. *Cancer Lett*. 2011;309:95-103.
90. Costa MR, Kessaris N, Richardson WD, Götz M, Hedin-Pereira C. The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 2007;27:11376-88.
91. Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. 2010;464:554-61.
92. Ohira K, Furuta T, Hioki H, Nakamura KC, Kuramoto E, Tanaka Y, Funatsu N, Shimizu K, Oishi T, Hayashi M, Miyakawa T, Kaneko T, Nakamura S. Ischemia-induced neurogenesis of neocortical layer 1 progenitor cells. *Nat Neurosci*. 2010;13:173-9.
93. Petit A, Sanders AD, Kennedy TE, Tetzlaff W, Glattfelder KJ, Dalley RA, Puchalski RB, Jones AR, Roskams AJ. Adult spinal cord radial glia displays a unique progenitor phenotype. *PLoS One*. 2011;6:e24538.
94. Ponti G, Crociara P, Armentano M, Bonfanti L. Adult neurogenesis without germinal layers: the "atypical" cerebellum of rabbits. *Arch Ital Biol*. 2010;148:147-58.
95. Roelofs RF, Fischer DF, Houtman SH, Sluijs JA, Van Haren W, Van Leeuwen FW, Hol EM. Adult human subventricular, subgranular, and subpial zones contain astrocytes with a specialized intermediate filament cytoskeleton. *Glia*. 2005;52:289-300.
96. Yanamoto H, Miyamoto S, Tohnai N, Nagata I, Xue JH, Nakano Y, Nakajo Y, Kikuchi H. Induced spreading depression activates persistent neurogenesis in the subventricular zone, generating cells with markers for divided and early committed neurons in the caudate putâmen and cortex. *Stroke*. 2005;36:1544-50.
97. Urbach A, Redecker C, Witte OW. Induction of neurogenesis in the adult dentate gyrus by cortical spreading depression. *Stroke*. 2008;39:3064-72.
98. Bosche B, Graf R, Ernestus RI, Dohmen C, Reithmeier T, Brinker G, Strong AJ, Dreier JP, Woitzik J, Members of the Cooperative Study of Brain Injury

- Depolarizations (COSBID). Recurrent spreading depolarizations after subarachnoid hemorrhage decreases oxygen availability in human cerebral cortex. *Ann Neurol*. 2010;67:607-17.
99. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006;311:629-32.
 100. Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci*. 2009;12:259-67.
 101. Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:153-63.
 102. Bennett L, Yang M, Enikolopov G, Iacovitti L. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci*. 2009;41:337-47.
 103. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 2007;10:1369-76.
 104. Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, Sestan N, Garcia-Verdugo J, Alvarez-Buylla A, Jan LY, Jan YN. Postnatal deletion of Numb/Numbl like reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell*. 2006;127:1253-64.
 105. Zhang X, Jin G, Li W, Zou L, Shi J, Qin J, Tian M, Li H. Ectopic neurogenesis in the forebrain cholinergic system-related areas of a rat dementia model. *Stem Cells Dev*. 2011;20:1627-38.
 106. Spruston N, McBain C. Structural and functional properties of hippocampal neurons. In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press; 2007. p133-202.
 107. González-Martínez JA, Bingaman WE, Toms SA, Najm IM. Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain. *J Neurosurg*. 2007;107:628-35.
 108. Kohler SJ, Williams NI, Stanton GB, Cameron JL, Greenough WT. Maturation time of new granule cells in the dentate gyrus of adult macaque monkeys exceeds six months. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:10326-31.
 109. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432:396-401.
 110. Louis DN, Reifenberger G, Brat DJ, Ellison DW. Tumours: introduction and neuroepithelial tumours. In: Love S, Louis DN, Ellison DW, editors. *Greenfield's neuropathology*. London: Hodder Arnold; 2008. p.1821-2000.
 111. Canteras NS, Swanson LW. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol*. 1992;324:180-94.
 112. Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszynski MH. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell* 2012;150:1264-73.
 113. Gajera CR, Emich H, Lioubinski O, Christ A, Beckervordersandforth-Bonk R, Yoshikawa K, Bachmann S, Christensen EI, Götz M, Kempermann G, Peterson AS,

- Willnow TE, Hammes A. LRP2 in ependymal cells regulates BMP signaling in the adult neurogenic niche. *J Cell Sci.* 2010;123:1922-30.
114. Eisch AJ, Mandyam CD. Adult neurogenesis: can analysis of cell cycle proteins move us "Beyond BrdU"? *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8:147-65.
 115. Ma DK, Ming G, Gage FH, Song H. Neurogenic niches in the adult mammalian brain. In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editores. *Adult neurogenesis.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. p207-25.
 116. Lie DC, Gotz M. Adult neurogenesis: similarities and differences in stem cell fate, proliferation, migration, and differentiation in distinct forebrain regions. In: Gage FH, Kempermann G, Song H, editores. *Adult neurogenesis.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. p227-66.
 117. Kriegstein A, Alvarez-Buylla. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:149-84.
 118. Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:9-22.
 119. Fisher M. Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke.* 2009;40:S13-5.
 120. Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichensperner H, Kilic N, Ergün S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development.* 2006;133:1543-51.
 121. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:14720-5.
 122. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature.* 2010;464:520-8.
 123. Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, March GE, De Marzo AM. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol.* 2002;160:1259-68.
 124. Oeseburg H, de Boer RA, van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch.* 2010;459:259-68.
 125. Kuhn HG, Biebl M, Wilhelm D, Li M, Friedlander RM, Winkler J. Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: a role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 2005;22:1907-15.
 126. Lucassen PJ, Chung WC, Vermeulen JP, Van Lookeren Campagne M, Van Dierendonck JH, Swaab DF. Microwave-enhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. *J Histochem Cytochem.* 1995;43:1163-71.
 127. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem.* 1998;46:327-34.
 128. Whiteside G, Munglani R. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections—an update. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1998;3:52-3.
 129. Wang X, Tsai JW, Imai JH, Lian WN, Vallee RB, Shi SH. Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex. *Nature.* 2009;461:947-55.
 130. Yatabe Y, Tavaré S, Shibata D. Investigating stem cells in human colon by using methylation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 10839-10844.

131. Fellous TG, McDonald SAC, Burkert J, Humphries A, Islam S, De-Alwis NM, Gutierrez-Gonzalez L, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, El-Bahrawy M, Turnbull DM, Taylor RW, Greaves LC, Chinnery PF, Day CP, Wright NA, Alison MR. A methodological approach to tracing cell lineage in human epithelial tissues. *Stem Cells*. 2009;27:1410-20.
132. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet*. 2004;363:1432-37.
133. Zeng XX, Tan KH, Yeo A, Sasajala P, Tan X, Xiao ZC, Dawe G, Udolph G. Pregnancy-associated progenitor cells differentiate and mature into neurons in the maternal brain. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1-12.
134. Seri B, Herrera DG, Gritti A, Ferron S, Collado L, Vescovi A, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Composition and organization of the SCZ: a large germinal layer containing neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cereb Cortex*. 2006;16(Suppl 1):i103-11.
135. Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ON, Kalil RE. Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *PLoS One*. 2011;6:e18535.
136. Geoghegan D, Carter DA. A novel site of adult doublecortin expression: neuropeptide neurons within the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *BMC Neurosci*. 2008;9:2.
137. Janich P, Pascual G, Merlos-Suárez A, Batlle E, Ripperger J, Albrecht U, Cheng HY, Obrietan K, Di Croce L, Benitah SA. The circadian molecular clock creates epidermal stem cell heterogeneity. *Nature*. 2011;480:209-14.
138. Kempermann G. *Adult neurogenesis* 2. New York: Oxford University Press; 2011. p518-88: Medicine.
139. Coras R, Siebzehnrbu FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, Villmann C, Hahnen E, Neuhuber W, Weigel D, Buchfelder M, Stefan H, Beck H, Steindler DA, Blümcke I. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain*. 2010;133:3359-72.
140. <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-55t5v9/> Acessado em 06 Janeiro 2014.
141. http://www.cnpq.br/web/guest/chamadas-publicas?p_p_id=resultadosportlet_WAR_resultadoscnpqportlet_INSTANCE_0ZaM&idDivulgacao=3241&filtro=resultados&detalha=chamadaDetalhada&exibe=exibe&id=466-1-1888&idResultado=466-1-1888. Acessado em 06 Janeiro 2014.
142. Lautin A. *The limbic brain*. New York: Kluwer Academics / Plenum Publishers; 2001. p1-53: Broca's lobe.
143. Jones EG. Cajal's debt to Golgi. *Brain Res Rev*. 2011;66:83-91.