



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS MÉDICAS

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

**DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL, NEUROPROTEÇÃO E EFEITOS ANTI-
-INFLAMATÓRIOS DO CONJUGADO LDE/METOTREXATO APÓS ISQUEMIA
CORTICAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA 1 EM RATOS
ADULTOS**

Belém-PA
2017

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

**DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL, NEUROPROTEÇÃO E EFEITOS ANTI-
-INFLAMATÓRIOS DO CONJUGADO LDE/METOTREXATO APÓS ISQUEMIA
CORTICAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA 1 EM RATOS
ADULTOS**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em
Oncologia e Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em
Oncologia e Ciências Médicas, Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Coorientador: Prof. Dr. Rommel Burbano

Belém-PA
2017

Dados Internacionais de Catalogação-de-Publicações (CIP)

P436 Pereira, Edmundo Luís Rodrigues
Distribuição tecidual, neuroproteção e efeitos anti-inflamatórios do conjugado LDE/metotrexato após isquemia cortical induzida por microinjeções de endotelina 1 em ratos adultos / Edmundo Luís Rodrigues Pereira; orientador, Wallace Gomes Leal; coorientador, Rommel Burbano. - 2017.
101 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2017.

1. Córtex motor. 2. Isquemia. 3. Neuroproteção. 4. Neuroinflamação. 5. Nanotecnologia. I. Leal, Wallace Gomes, orient. II. Burbano, Rommel, coorient. III. Título.

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

**DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL, NEUROPROTEÇÃO E EFEITOS ANTI-
-INFLAMATÓRIOS DO CONJUGADO LDE/METOTREXATO APÓS ISQUEMIA
CORTICAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA 1 EM RATOS
ADULTOS**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em
Oncologia e Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em
Oncologia e Ciências Médicas, Universidade Federal do Pará.

DATA DA DEFESA: 05/04/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Wallace Gomes Leal (PPGOCM – UFPA) – Orientador
Dr. em Neuropatologia Experimental, Prof. Associado do Instituto de Ciências Biológicas
Coordenador do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental
Universidade Federal do Pará

Prof. Rommel Mário Rodriguez Burbano (PPGOCM – UFPA) - Coorientador
Dr. em Ciências Biológicas (Biologia Genética), Prof. Titular Genética Universidade Federal do Pará

Prof. Raul Cavalcante Maranhão (InCor – FMUSP)
Dr. em Ciências (Fisiologia Geral), Prof. Livre-Docente em Bioquímica Clínica
Prof. Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
Diretor do Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor/FMUSP)

Prof. Rosivaldo dos Santos Borges (Faculdade de Farmácia – UFPA)
Dr. em Neurociências e Biologia Celular, Prof. Química Farmacêutica e Química Medicinal
Universidade Federal do Pará

Profa. Elizabeth Sumi Yamada (PPGOCM – UFPA)
Dra. em Neurociências e Biologia Celular, Profa. de Bioquímica e Fisiologia
Universidade Federal do Pará

Prof. Sidney Emanuel Batista dos Santos (PPGOCM – UFPA)
Dr. em Ciências Biológicas (Biologia Genética), Prof. Associado Universidade Federal do Pará

*“Qual a mais difícil de todas as coisas?
A que imaginas ser a mais fácil:
ver com a visão dos teus olhos
aquilo que está diante deles.”*
- Fausto, Goethe-

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo Deus, força criadora capaz de organizar o caos.

Ao meu Pai, José Edmundo, por incentivar minha carreira de médico.

À minha Mãe, Carmen Silvia, por seu belo exemplo de constância e paciência.

Ao meu irmão, José Almir, bom amigo professor, homem digno e correto.

À minha doce irmã, Carmen Silvia, por seu apoio e amizade permanentes.

À minha amada esposa, Andrea, autora dos melhores momentos de minha vida.

À filha Preciada e à linda netinha Eloah, aos filhos José Pedro 'Rico', João 'Jon-John' Pojucan, Carmen 'Guapita', Juliana 'Bailarina' e Santiago 'Guaperas', pela chance que me deram de ser pai.

Aos meus sobrinhos José Alberto e Ricardinho, pela alegria e felicidade de ser tio.

Aos cunhados tio Lúcio e Marisita, por sua cativante presença na nossa bela família.

Ao prezado amigo prof. Eduardo Costa, grande exemplo de professor e mestre.

Ao estimado prof. Cristóvam Diniz, primeiro estímulo na neurociências.

Meu mais reverente agradecimento ao Sensei Shigueto Yamazaki (8o. Dan), por ter-me incentivado e ter-me promovido no mais difícil tempo da minha vida.

RESUMO

O acidente vascular encefálico isquêmico (AVEi) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em adultos no mundo inteiro. Atualmente, a única terapia farmacológica disponível para tratar essa desordem neural aguda emprega um agente trombolítico de custo elevado, que deve ser administrado em até 4 horas do início dos sintomas, trazendo consigo o significativo risco de transformar a área inicialmente oligêmica em uma hemorragia cerebral de proporções catastróficas. Nas últimas décadas, nanopartículas especialmente configuradas para ter maior afinidade com certos tecidos e maior difusibilidade através de barreiras biológicas têm sido empregadas como veículos para carrear agentes terapêuticos. Entre estas, a nanopartícula lipídica lipossomal LDE, conjugada ao agente Metotrexato (cLDE/MTX), tem sido testada com sucesso em vários modelos experimentais de inflamação, revelando resultados promissores. Considerando que a modulação do processo inflamatório que acompanha o infarto cerebral possui relevância prognóstica, a presente pesquisa investigou os efeitos do cLDE/MTX em um modelo experimental de isquemia cerebral induzida pelo agente vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1) no córtex cerebral de ratos adultos. Na primeira fase do estudo, foi investigado por meio de cintilografia o comportamento da LDE triciada (LDE3H⁺), injetada pela via caudal, frente à barreira hematoencefálica (BHE) em animais *sham* (N=18) e em animais submetidos à isquemia focal com injeção de ET-1 (80pMol/μl) diretamente no córtex frontal (N=5). Em seguida, avaliaram-se os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do cLDE/MTX (1 mg/kg) injetado pela veia caudal, em animais isquêmicos (N=5), com o grupo controle que recebeu apenas LDE. Todos os animais foram perfundidos com solução salina a 0,9%; e paraformaldeído, a 4%, 7 dias após a indução isquêmica. Os achados histopatológicos foram avaliados pela coloração com violeta de cresila e imuno-histoquímica para corpos neuronais adultos (anti-NeuN), astrócitos (anti-GFAP) e micróglia (anti-Iba1). Os resultados encontrados demonstraram que a LDE3H⁺ atravessa a BHE tanto nos animais *sham* quanto nos animais isquêmicos, e o tratamento com cLDE/MTX não reduz a área total de infarto primário, mas reduz consideravelmente a ativação microglial no centro da lesão, induzindo, ainda, a preservação neuronal na periferia do infarto, quando comparado com os animais controles, injetados apenas com a LDE não conjugada (P<0.01). Por fim, a astrocitose normalmente observada na isquemia cerebral manteve-se inalterada. Os resultados indicam que o cLDE/MTX é um promissor agente anti-inflamatório e neuroprotetor neste modelo experimental de acidente vascular encefálico isquêmico. Estudos futuros são desejáveis para ampliar os conhecimentos acerca desses resultados, incluindo modelos animais com sobrevida mais prolongada.

Palavras-Chave: Córtex Motor. Isquemia. Neuroproteção. Neuroinflamação. LDE. Nanotecnologia.

ABSTRACT

Ischemic stroke is one of the leading causes of morbidity and mortality in adults worldwide. Currently, there is only a single pharmacological therapy available to treat such neural disorder, using a high-cost thrombolytic agent, which must be administered within 4 hours of the onset of symptoms, but with a significant risk of transforming the initially oligoemic area into a catastrophic cerebral haemorrhage. In the last decades, nanoparticles with high affinity for certain types of tissues and specially configured with an enhanced diffusibility through biological barriers, have been employed as vehicles to carry therapeutic agents. Among these, the novel liposomal nanoparticle LDE conjugated to the agent methotrexate (cLDE / MTX) has been successfully tested in several experimental models of inflammation, with promising results. Considering that modulation of the inflammatory process that accompanies cerebral infarction is of prognostic significance, the present study investigated the effects of cLDE / MTX upon an experimental model of cerebral ischemia induced by the vasoconstrictor agent endothelin-1 (ET-1) in the cerebral cortex of adults rats. During the first phase of the study, the behavior of tritiated LDE particles (LDE^{3H+}) concerning the blood-brain barrier (BBB), once injected through the caudal vein, was evaluated in either sham animals (N = 18) and animals submitted to ET-1 injection (80pMol / MI) directly into the frontal cortex (N = 5). Further, the anti-inflammatory and neuroprotective effects of cLDE / MTX (1 mg / kg), also injected by caudal vein, were investigated in ischemic animals (N = 5), with the control group (N = 5) receiving only free LDE. All animals were perfused with 0.9% saline and 4% paraformaldehyde 7 days after ischemic induction. Histopathological findings were evaluated by staining with cresyl violet and immunohistochemistry for adult neuronal bodies (anti-NeuN), astrocytes (anti-GFAP) and microglia (anti-Iba1). The results showed that LDE^{3H+} positively crosses BBB in both sham animals and ischemic animals, and that cLDE / MTX treatment, despite the fact that it reduces not the total area of primary infarction, was able to considerably reduce microglial activation phenomenon at the center of the lesion, inducing as well a significant neuronal preservation at the periphery of the infarction, when compared to the control animals, injected only with unconjugated LDE (P <0.01). At last, the astrogliosis phenomena usually encountered in cerebral ischemia remained unchanged. The results indicate that cLDE / MTX is a promising anti-inflammatory and neuroprotective agent in such experimental model of ischemic stroke. Future studies are desirable in order to increase knowledge about these outcomes, including in animal models with longer survivals.

Key words: Stroke. Neuroinflammation. Neuroprotection. Therapy. Liposomes. Methotrexate.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
ANOVA	Análise de Variância
Apo	Apolipoproteína
ATP	Adenosina Trifosfato
AVE	Acidente Vascular Encefálico
AVEi	Acidente Vascular Encefálico isquêmico
BCNU	Carmustina (bis-cloroetilnitrosourea)
BHE	Barreira hematoencefálica
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
cLDE/MTX	Conjugado LDE / Metotrexato
CPM	Counts per minute (Contagem por minuto)
ddMTX	didodecil methotrexate
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELSA	Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto
EPR	Enhanced Permeability Retention Effect
ERONs	Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio
ET-1	endotelina-1
EUA	Estados Unidos da América
FAD	Dinucleotídio de flavina e adenina
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein (Proteína Glial Fibrilar Ácida)
HL60	Linhagem celular de células da leucemia humana promielocítica
HMGB-1	high mobility group box 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
i.p.	Intraperitoneal
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IGF-1	Insulin-like growth factor 1 receptor (Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina)
IL-10	Inteleucina-10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
InCOR/FMUSP	Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IP3	Inositol trifosfato
K562	leucemia eritroide
KBr	Brometo de potássio
kDa	KiloDalton (Unidade de massa atômica)
LDE	Emulsão de baixa densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-dopa	Levo-dopa
M1	Micróglia tipo 1
M2	Micróglia tipo 2

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína quimiotática de monócitos)
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein (Proteína inflamatória de macrófagos)
MTX	Metotrexato
NAD	Nicotinamida adenina nucleotídio
NIH	National Institute of Health
NMDA	N-Metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NT2N	Teratocarcinoma-derived neuron-like cells (Linhagem celular derivada de teratocarcinoma semelhantes a neurônios)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli ADP-Ribose Polimerase
PC	Fosfatidilcolina
P _i	Fósforo inorgânico
PKC	Proteína Quinase
polietilenoglicol-	Polietilenoglicol conjugado à superóxido dismutase
SOD	
PTX	Paclitaxel
RL	Radicais livres
rLDL	Receptores de LDL
RNA	ácido ribonucleico
Rpm	rotações por minute
rtPA	Recombinant Tissue Plasminogen Activator (Ativador do Plasminogênio Tissular Recombinate)
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TGF- β	Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)
TIPE-2	TNF α -inducible protein 8-like 2 (Fator 2 semelhante à Proteína 8 alfa-induzível de TNF)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor – α (Fator de Necrose Tumoral alfa)
tPA	tissue Plasminogen Activator (Ativador do Plasminogênio tissular)
TRPM	Transient Receptor Potential ion channels for Melastatin (Canais iônicos de Pontencial de receptor transitório para Melastatina)
UFPA	Universidade Federal do Pará
VEGF	Factor de crescimento endothelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa mostrando incidência de AVE ajustada à população da OMS por quartis... 20
Figura 2 -	Glicólise aeróbica..... 27
Figura 3 -	Sequência temporal dos mecanismos fisiopatológicos de morte celular na isquemia cerebral..... 28
Figura 4 -	Reação de Produção das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERON's) ... 33
Figura 5 -	Modelo temporal da dinâmica de ativação microglial..... 38
Figura 6 -	Evolução temporal da neuroinflamação após injúria isquêmica..... 39
Figura 7 -	Comparação entre o capilar sistêmico e o capilar cerebral..... 43
Figura 8 -	Escala retratando o tamanho relativo de objetos em dimensões nano, micro e macroscópica..... 49
Figura 9 -	Nanopartículas lipídicas..... 51
Figura 10 -	Estrutura comparada da LDE com a LDL nativa..... 52
Figura 11 –	Aparato estereotáxico Stoelting 51500D 58
Figura 12 –	Fixação da cabeça do animal no aparato estereotáxico 58
Figura 13 –	Identificação de sutura coronal, sutura sagital e bregma 59
Figura 14 –	Orifício de trepanação do crânio..... 59
Figura 15 –	Posicionamento da microagulha de punção cortical..... 59
Figura 16 –	Inserção cortical da microagulha de punção para injeção de ET-1 59
Figura 17 –	Encéfalo com área de hemorragia cortical puntiforme indicando o local da injeção de ET-1 64
Figura 18 –	Encéfalo no interior de tubo estéril para proceder a extração lipídica..... 64
Figura 19 -	Área de infarto em animais isquêmicos tratados com LDE livre (A-B) e com o conjugado LDE/MTX. 71

Figura 20 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a ativação microglial (células Iba1+). Microglia não ativada no lado contralateral (A-C).....	73
Figura 21 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a ativação de astrócitos (células GFAP+). Animais isquêmicos tratados com LDE (A-C) ou com o conjugado LDE/MTX (D- F).....	74
Figura 22 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a preservação neuronal (células NeuN+) após lesão isquêmica do córtex motor.	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Epidemiologia do acidente vascular encefálico. Incidência, prevalência e mortalidade (1990-2013).	18
Gráfico 2 -	As 10 principais causas de morte no mundo em 2012.....	19
Gráfico 3 -	AVE Isquêmico: Proporções entre casos novos, mortes, sobreviventes e sequelas permanentes.	20
Gráfico 4 -	Detecção relativa (%) de LDE no encéfalo dos animais (n = 29).....	70
Gráfico 5 -	Quantificação do número de células microgliais ativadas arredondadas (fagócitos).	73
Gráfico 6 -	Quantificação do número neurônios na periferia do infarto (Células NeuN).	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Prevalência e incidência aproximada de AVEs em alguns países asiáticos.	22
Tabela 2 -	Amostragem comparativa da biodisponibilidade da LDE em diferentes áreas do encéfalo de ratos wistar na ausência de lesão isquêmica - Captação LDE/g de tecido (%).	69
Tabela 3 -	Grupo 1: Animais <i>sham</i> tratados com LDE/3H ⁺ (n = 18).	69
Tabela 4 -	Grupo 2: Animais isquêmicos tratados com LDE/3H ⁺ (n = 10).	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	18
1.2	FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO	25
1.2.1	Fisiologia Cerebral.....	25
1.2.2	Respiração Celular Aeróbica (Via de Embden-Meyerhof-Parnas)	26
1.2.3	Respiração Anaeróbica	30
1.2.4	Neuroinflamação.....	34
1.2.4.1	Microglia.....	37
1.2.4.2	Neutrófilos	40
1.3	TERAPIA FARMACOLÓGICA PARA A ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA	41
1.4	BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	43
1.5	COLESTEROL E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	46
1.5.1	Transporte Sérico do Colesterol (LDL)	47
1.6	NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA	49
1.6.1	Emulsão Lipídica – LDE	52
1.7	METOTREXATO: APLICAÇÕES NA PESQUISA.....	53
1.8	HIPÓTESE E PARADIGMA EXPERIMENTAL	55
1.9	OBJETIVOS	56
1.9.1	Objetivo Geral.....	56
1.9.2	Objetivos Específicos	56
2	MATERIAIS E MÉTODOS	57
2.1	ANIMAIS	57
2.2	MODELO DE ISQUEMIA FOCAL	57
2.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	60
2.4	MÉTODO DE PREPARO DO LDE	61
2.5	BIODISPONIBILIDADE DA LDE NO ENCÉFALO.....	61
2.6	TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX.....	62
2.7	EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE.....	63
2.8	HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA	64

2.8.1	Identificação da Área da Lesão	64
2.8.2	Protocolo de Imunoistoquímica	65
2.9	ANÁLISE QUALITATIVA	66
2.10	ANÁLISE QUANTITATIVA	67
2.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
3	RESULTADOS	68
3.1	LDE TRICIADO ATRAVESSA A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	68
3.2	O TRATAMENTO COM LDE/MTX NÃO REDUZ A ÁREA DE INFARTO PRIMÁRIO, MAS REDUZ O INFILTRADO INFLAMATÓRIO ASSOCIADO À ISQUEMIA CORTICAL INDUZIDA PELA ET-1	71
3.3	O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX DIMINUI A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MICROINJEÇÕES DE ET-1	72
3.4	O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA A ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR ET-1	74
3.5	O TRATAMENTO COM CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA A ÁREA PRIMÁRIA DE INFARTO, MAS INDUZ PRESERVAÇÃO NEURONAL NA PERIFERIA DA LESÃO	75
4	DISCUSSÃO	77
4.1	O CONJUGADO LDE/MTX ATRAVESSA A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E PODE VEICULAR DE MODO MAIS EFICAZ AGENTES NEUROPROTETORES... ..	77
4.2	O CONJUGADO LDE/MTX NÃO DIMINUI A ÁREA PRIMÁRIA DE INFARTO, MAS INDUZ NEUROPROTEÇÃO NA PERIFERIA DA LESÃO	78
4.3	CONJUGADO LDE/MTX INIBE A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS	80
4.4	O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA O PADRÃO DE ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL DO CÓRTEX MOTOR	82
5	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) pode ser acometido por doenças agudas e crônicas. No primeiro caso, a morte das células nervosas ocorre em questão de minutos, horas ou dias, com perda irreparável da área envolvida. Neste grupo, incluem-se algumas das principais desordens encontradas na prática clínica, como os traumatismos do SNC e os acidentes vasculares encefálicos (AVEs). Já no segundo caso, predominam enfermidades de natureza crônica e degenerativa, tais como as doenças de *Parkinson* e de *Huntington*, o mal de *Alzheimer*, a Esclerose Lateral Amiotrófica e a Epilepsia, em que a perda celular e os défices neurológicos se instalam gradualmente, ao longo de meses, de anos ou até mesmo de décadas (DEMUTH *et al.*, 2017; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

Entre as enfermidades agudas, o Acidente Vascular Encefálico isquêmico (AVEi) (do grego ισχαιμία (*ischaimía*) - interrupção de sangue) é uma das doenças mais encontradas em adultos, resultado da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo para determinada área do encéfalo. Uma vez privadas de oxigênio e glicose, as células nervosas sofrem um verdadeiro colapso energético e o microambiente torna-se tóxico o suficiente para determinar a morte de toda a área afetada, evento facilmente reconhecido em razão das manifestações clínicas, como distúrbios de fala e consciência e défices motores. A situação de oligoemia desencadeia uma série de reações bioquímicas que geralmente levam a danos permanentes nas células da área acometida (DEMUTH *et al.*, 2017; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

A diminuição da oferta de sangue para uma determinada região do encéfalo está vinculada a fatores locais e sistêmicos e a uma série de situações individuais e ambientais (genética, hábitos de vida, estresse etc.), que concorrem para desenvolver a doença, tendo como causa mais frequente a oclusão do lúmen de artérias extracranianas ou intracranianas devido a presença de um trombo em uma área de ateroma (do grego ἀθήρα (*athera*) - aveia), a região nodular inflamatória que se forma gradualmente na parede íntima das artérias, pelo acúmulo progressivo de colesterol e cálcio na íntima do vaso, parte do processo de aterosclerose (do grego ἀρτηρία (*artēria*), artéria, e σκλήρωσις (*sklerosis*), endurecimento), fazendo parte do curso natural de envelhecimento dos seres humanos (BOUSSEL *et al.*, 2011; DEMUTH *et al.*, 2017; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010; SPENCE, 2016; SWIRSKI; WEISSLEDER; PITTET, 2009).

A aterosclerose é uma síndrome inflamatória crônica, caracterizada pela invasão e pelo acúmulo de elementos celulares (leucócitos, macrófagos), seguida da proliferação de células da camada íntima e muscular, gerando uma placa (ateromatosa) constituída por material degenerativo fibrótico, que reduz progressivamente o calibre do vaso e altera a dinâmica circulatória. Essa lesão do endotélio vascular, componente da Tríade de *Virchow*, induz o surgimento de estase venosa e hipercoagulabilidade local, favorecendo a agregação de plaquetas e de outros elementos sanguíneos, com a formação de trombos, os quais podem ocluir totalmente a luz do vaso e/ou se desprender (situação conhecida como tromboembolia), impactando em um vaso distal e obstruindo, desse modo, a circulação à jusante (KOWOLL *et al.*, 2016).

Com frequência um pouco menor, outros tipos de anormalidades circulatórias também podem ocasionar a interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo. Entre essas, destacam-se as arritmias cardíacas – em especial a fibrilação atrial crônica –, a hipotensão arterial, os traumatismos com dissecação arterial, algumas desordens inflamatórias sistêmicas com predileção por vasos de pequeno e médio calibres (doença de *Behçet*, lúpus eritematoso sistêmico), infecções, coagulopatias, leucoses e tromboflebites com trombose de veias cerebrais, também podem causar distúrbios circulatórios no encéfalo, reduzindo ou interrompendo a irrigação e causando infarto venoso com edema cerebral e alteração da função neurológica (BOUSSEL *et al.*, 2011; DEMUTH *et al.*, 2017; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010; SWIRSKI; WEISSLEDER; PITTET, 2009).

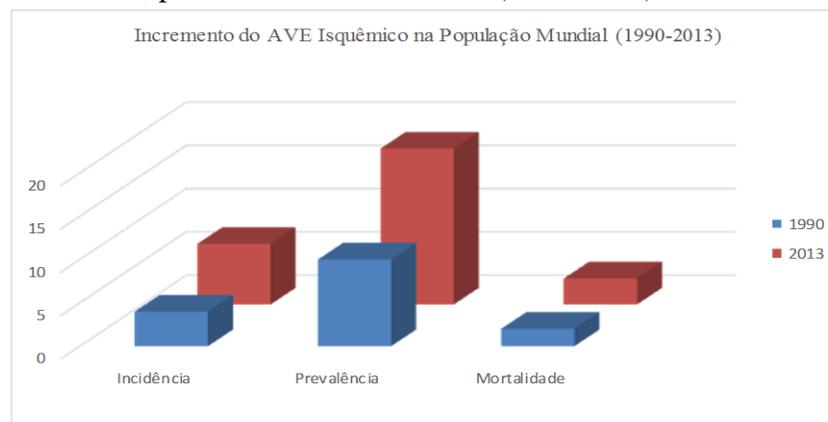
Independente da origem ou causa imediata, a doença cerebrovascular isquêmica constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade na população adulta e idosa no mundo todo, sendo responsável por significativa parcela de gastos com pesquisas e métodos de tratamento para recuperar as mazelas decorrentes da doença. Apesar desta elevada ocorrência na população, existe, por outro lado, uma surpreendente carência de métodos terapêuticos capazes de prevenir e tratar a enfermidade, razão pela qual o AVEi ocupa uma das principais preocupações em termos de saúde pública na maioria dos países, fazendo desta afecção um dos maiores desafios da Medicina moderna e gerando uma necessidade crítica para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas neuroprotetoras (BOUSSEL *et al.*, 2011; DEMUTH *et al.*, 2017; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010; SWIRSKI; WEISSLEDER; PITTET, 2009).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

A isquemia aguda do tecido cerebral possui elevada incidência e prevalência em todos os países do globo, levando a significativo número de pacientes com sequelas neurológicas e óbitos em decorrência de complicações advindas da doença. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se a ocorrência de aproximadamente 800.000 casos de AVE a cada ano, sendo que, na China, a enfermidade pode atingir até 1,5 milhão de pessoas anualmente (LLOYD-JONES et al., 2009). No Brasil, onde não há notificação compulsória, os dados são escassos e menos precisos. Ainda assim, segundo estimativas do Ministério da Saúde, cerca de 200.000 pessoas são afetadas a cada ano, acarretando aproximadamente 129.000 mortes e um número desconhecido de pacientes que sobrevivem com sequelas permanentes (LOTUFO, 2005).

Estudos epidemiológicos indicam que a incidência global da enfermidade cerebrovascular possui uma conformação ascendente com o passar dos anos (FEIGIN; KRISHNAMURTHI et al., 2015) (Gráfico 1). Isso se deve, em parte, a uma reduzida consciência da população a respeito da exposição a fatores de maior risco (dieta aterogênica, obesidade, sedentarismo) aliados a um controle ineficiente das comorbidades associadas (hipertensão arterial, diabetes), fato mais relevante ainda em países com baixos Índices de Desenvolvimento Humano (IDH) (KRISHNAMURTHI *et al.*, 2015; TAYLOR *et al.*, 1996). Isso levou países desenvolvidos a classificar os AVEs como doenças prioritárias, incentivando programas para implementar métodos preventivos e otimizar os cuidados de assistência aos doentes (KRISHNAMURTHI *et al.*, 2015; TAYLOR *et al.*, 1996).

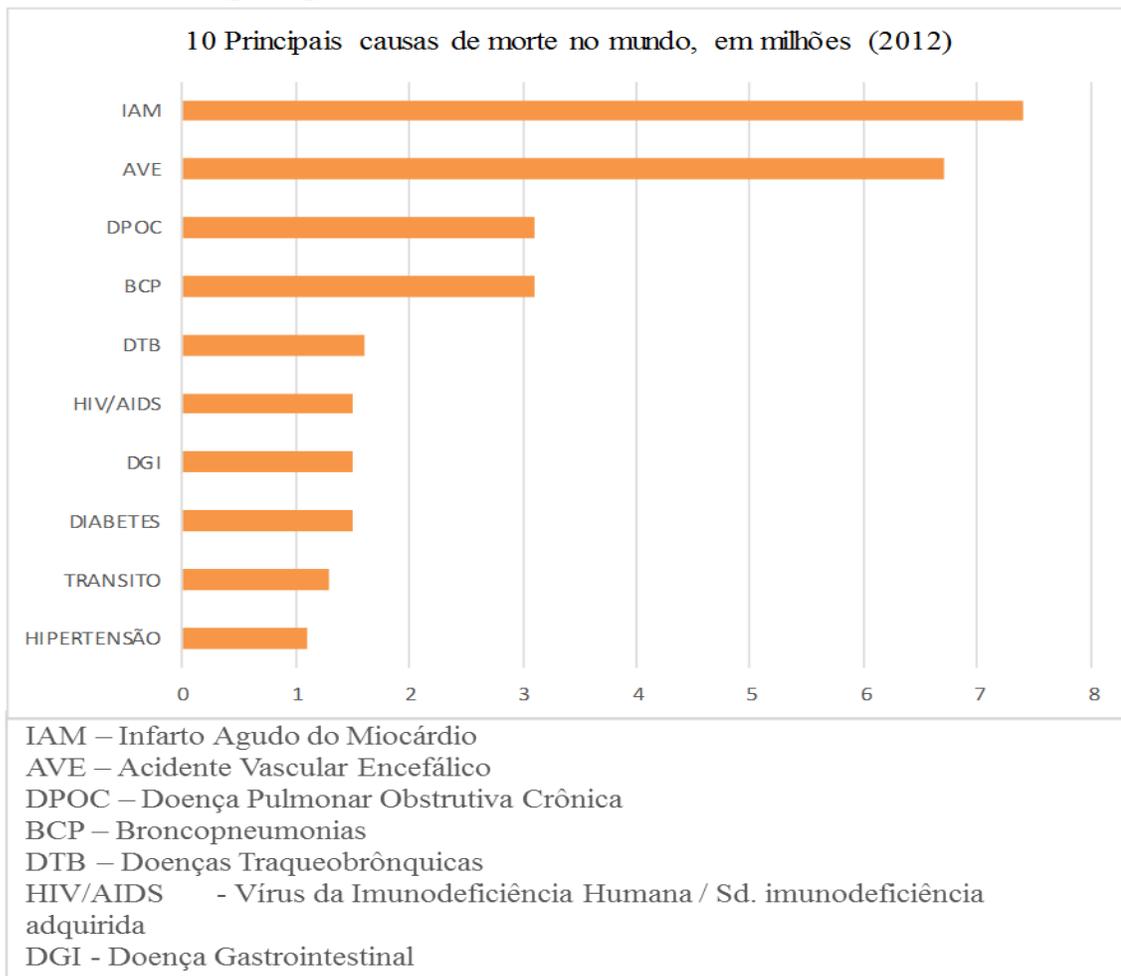
Gráfico 1 - Epidemiologia do acidente vascular encefálico. Incidência, prevalência e mortalidade (1990-2013).



Fonte: Feigin, Krishnamurthi *et al.* (2015a).

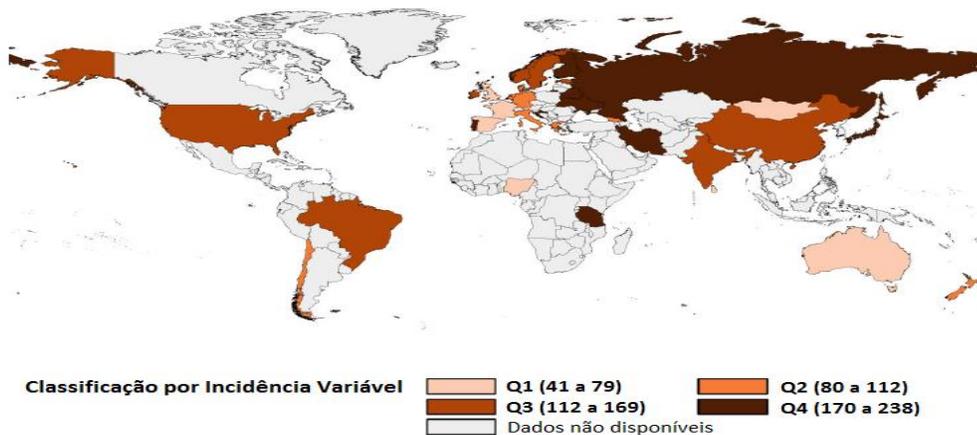
Ainda, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, de 2012, a doença vascular isquêmica do coração e do encéfalo representaram, naquele ano, respectivamente, a primeira e segunda causa de morte em adultos no mundo inteiro e a terceira causa mais frequente de incapacidade (ajustada para a idade) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) (Gráfico 2). Tipicamente, o AVE isquêmico surge com mais frequência a partir dos 45 anos de idade, atingindo o ápice entre pessoas de 60-65 anos, afetando ambos os sexos de maneira equivalente (KRISHNAMURTHI et al., 2015), e, quando reunidas, essas duas enfermidades constituem a principal causa de morbidade e mortalidade na população adulta do mundo contemporâneo (Figura 1), representando considerável fonte de sofrimento individual, familiar e contribuindo significativamente para onerar o ônus com saúde pública.

Gráfico 2 - As 10 principais causas de morte no mundo em 2012.



Fonte: World Health Organization (2016).

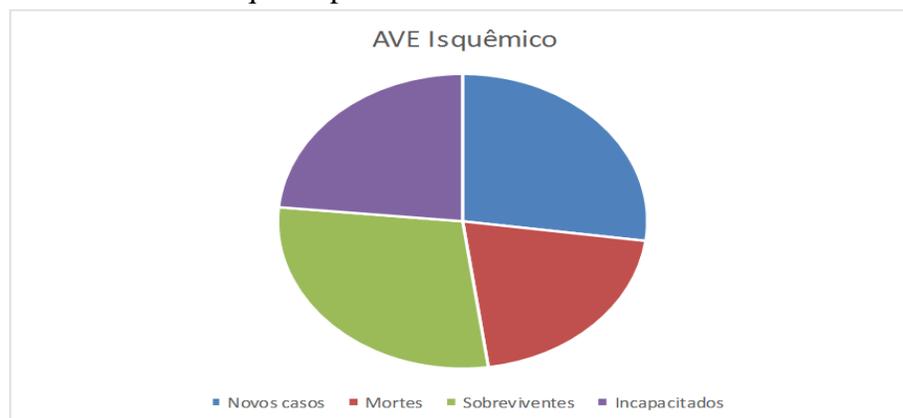
Figura 1 – Mapa mostrando a incidência de AVE ajustada para a população da OMS por quartis.



Fonte: Thrift *et al.* (2017).

Em termos globais, a doença possui distribuição ubíqua, com tendência um pouco maior naqueles países com IDH menos favorecido, possivelmente pela carência de cuidados preventivos. Calcula-se que aproximadamente 260 pessoas por cada 100.000 habitantes por ano sejam acometidas, representando uma prevalência de 30 milhões de pessoas afetadas, o que corresponde a mais de 25 milhões de doentes, considerando somente o AVEi (OVBIAGELE *et al.*, 2013). Esses eventos respondem por cerca de 80% dos novos casos, levando a quase 30 milhões de sobreviventes ao episódio inicial e aproximadamente 6,5 milhões das mortes diretamente relacionadas ao AVE, gerando mais de 113 milhões de pessoas incapacitadas em consequência de um infarto no tecido cerebral (Gráfico 3) (FEIGIN *et al.*, 2010; FEIGIN; MENSAH *et al.*, 2015).

Gráfico 3 - AVE Isquêmico: Proporções entre casos novos, mortes, sobreviventes e sequelas permanentes.



Fonte: Epidemiology (2016).

Baseando-se nessas informações, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prevê que, ao longo dos próximos anos, a doença siga afetando um número cada vez maior de pessoas e mantenha-se entre as primeiras colocadas no *ranking* de causas mais comuns de incapacidade em adultos ao redor do mundo, levando a uma expectativa de que o valor notificado em 1990, indicando que mais de 38 milhões de pacientes afligidos por esse mal quase duplique em 2020 para prováveis 61 milhões, mesmo quando são levadas em conta diferenças relevantes, relacionadas à idade da população, à etnia, à distribuição geográfica, ao IDH e às ações preventivas implementadas pelas agências reguladoras de saúde nos diferentes países dos cinco continentes (EPIDEMIOLOGY, 2016).

Segundo relatórios de agências europeias de saúde, apenas no continente europeu, com mais de 700 milhões de habitantes (EUROPE population live, 2016) e uma população composta majoritariamente por idosos, a prevalência dos AVEs é estimada em acima de 1 milhão de eventos por ano, com a previsão de incremento gradual e progressivo ao longo do tempo, até atingir um patamar de 1,5 milhão de casos/ano em 2025, estimando-se um custo com gastos relacionados à AVE próximo de 27 bilhões de euros/ano, somente com os pacientes que tiveram um AVE com déficit neurológico mantido e sequelas permanentes, excluídos os casos de doença vascular isquêmica transitória (TRUELSEN *et al.*, 2006).

Quando se analisa países do continente asiático, região que possui quase dois terços da população mundial – um contingente populacional ao redor de 4,5 bilhões de habitantes (ASIA population live, 2016), dotado de impressionante diversidade populacional, apenas no que se refere ao extremo leste do continente, a enfermidade responde por 60% da mortalidade mundial ligada à doença cerebrovascular, sendo que a maioria dos eventos (40%) acontece naqueles países situados mais ao sul do continente, como Índia, Paquistão, Bangladesh e Sri Lanka, regiões muito populosas que albergam cerca de 22% da população mundial, e onde predominam condições socioeconômicas mais precárias e, portanto, com baixo IDH (ANDERSON, 2016).

Apesar de ser o mais robusto dos continentes e contar com a maior população do planeta, com mais da metade da população mundial e a maior densidade demográfica por quilômetro quadrado da terra, muitos países do continente asiático carecem de estudos epidemiológicos acurados, e as agências governamentais responsáveis pelo cadastro, pela coleta e pela organização de dados não disponibilizam ou não possuem informações atualizadas e

confiáveis sobre a situação da doença cerebrovascular naquela região do planeta. Os dados mais confiáveis sobre o tema podem ser obtidos pela China e pela Índia, países que abrigam juntos mais de 50% da população asiática, compostos por duas etnias muito distintas, mas que transmitem um panorama bastante realista acerca do tema na Ásia como um todo (MEHNDIRATTA *et al.*, 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência e incidência aproximada de AVEs em alguns países asiáticos.

PAÍS	PERÍODO	PREVALÊNCIA	INCIDÊNCIA
China	1985-1991	260-719	116-219
Coreia	2004-2005	1590	216
Índia	2003-2005	545	145

Fonte: Mehndiratta *et al.* (2014).

Nota: Prevalência: por cada 100.000 habitantes /Incidência: por cada 100.000 habitantes por ano

Por outro lado, quando se observam as informações sobre o tema, disponibilizadas pelas agências nacionais de saúde na América do Norte, onde os Estados Unidos da América é o país mais representativo, com população superior a 300 milhões de habitantes (USA population live, 2016), relatos indicam que mais de seis milhões de pessoas com idade acima de 20 anos receberam um diagnóstico de AVE somente entre os anos de 2009 e 2012 – o que leva a uma prevalência geral estimada em 2,6% da população, mostrando, ainda, que a doença é mais comum em idosos da raça negra, que pertencem a faixas socioeconômicas menos favorecidas da população, a maioria delas residentes na Região Sudoeste do país (MOZAFFARIAN, 2016).

A análise dos dados coletados na ampla série de trabalhos científicos acerca da epidemiologia das doenças circulatórias e da doença cerebrovascular existentes naquele país, permite inferir que as projeções possuem uma clara tendência para estabilidade, possivelmente como resultado de inúmeras campanhas intensivas implementadas nas últimas décadas, com o intuito de identificar, resgatar, transportar e tratar precocemente uma pessoa que acaba de sofrer um ataque isquêmico cerebral, aliado ainda à instituição de programas e medidas para prevenir a enfermidade, por meio da redução de hábitos nocivos (tabagismo, sedentarismo, etilismo etc.) e controle de comorbidades, tais como hipertensão arterial, diabetes e dislipidemias (MOZAFFARIAN, 2015).

No Brasil, os dados são muito mais escassos e menos precisos, possivelmente em razão de os registros disponíveis serem oriundos, em grande parte, dos sistemas públicos de

assistência, nos quais a precariedade e a notória desorganização imperam, fato reforçado, ainda, pela ausência de necessidade em se notificar compulsoriamente a doença cerebrovascular. Ainda assim, o Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil), investigação multicêntrica de coorte com o propósito de investigar a incidência e os fatores de risco para doenças crônicas, detectou uma prevalência de AVEs da ordem de 1,3% entre a idade de 35 e 74 anos, com cerca de 70 mil mortes a cada ano, sendo a principal causa de incapacidade entre nós.

Em termos regionais, os principais trabalhos versando sobre esse assunto avaliam o perfil da população de grandes cidades do Sul, do Sudeste e do Nordeste do País, tais como Porto Alegre, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Salvador e Recife, não se encontrando com facilidade informes mais detalhados sobre a real situação existente nos grandes mas pouco populosos estados do Centro-Oeste e do Norte, e sequer menção ainda aos casos existentes da doença em áreas mais longínquas, como aquelas situadas, por exemplo, em longínquos interiores e regiões fronteiriças da Amazônia. Ainda assim, em 2007, a OMS alocou o Brasil na sexta posição entre os países com maior índice de acometimentos por AVE, sendo o país da América latina de incidência mais elevada de AVE, indicando um problema grave de saúde pública (LOTUFO, 2005; LOTUFO; BENSENOR, 2007).

Mesmo considerando tais limitações, os dados disponíveis entre nós são concordantes com os informes globais, pelo menos em termos de morbimortalidade, os quais indicam que o AVE ocupou a terceira causa de incapacidade e a segunda causa de morte em adultos, no mundo, durante o ano de 2012. As taxas de mortalidade globais do AVE são superadas apenas pelas taxas observadas na sua doença congênere, o infarto do miocárdio, significando dizer que, em média, uma pessoa morre a cada quatro minutos no mundo inteiro, em razão de um AVE, sendo que aproximadamente 30% das pessoas morrem nos primeiros dias ou nas primeiras semanas que se seguem ao AVE, e outros 30% seguem com incapacidade motora e/ou cognitiva permanente para o resto da vida (BARKER-COLLO *et al.*, 2015).

Alguns estudos demonstram diminuição das mortes relacionadas à doença cerebrovascular; essas estatísticas dizem respeito essencialmente aos países mais desenvolvidos, indicando que as medidas preventivas e corretivas aplicadas por aqueles Estados têm sido eficazes a ponto de produzir um impacto positivo para influenciar a história natural e controlar a doença, informação ratificada ao se confrontar os 5 milhões de mortes atribuídas aos AVEs em países de baixa renda, contra apenas 1,6 milhão de mortes observadas nos países com melhor

qualidade de vida e assistência médica preventiva, fato que reflete o papel indispensável da prevenção dos fatores de risco como medida de primeira linha para controlar o problema, segundo a World Health Organization (2016).

De fato, em função da intervenção dos sistemas governamentais responsáveis pela saúde nessas áreas mais evoluídas do mundo contemporâneo, a quantidade de pacientes que sobrevivem a um infarto cerebral praticamente dobrou em apenas duas décadas (1990-2010). Por outro lado, esse fato implica, também, a existência de um grande contingente de pessoas portando défices neurológicos (hemiplegias, distúrbios de fala) permanentes e sequelas neurológicas definitivas, existindo algumas projeções prevendo para o ano de 2030 que aproximadamente 77 milhões de pessoas necessitarão de constantes cuidados e assistência continuada em razão de sequelas neurológicas, determinando um custo social e econômico bastante significativo (BEJOT *et al.*, 2016; BEJOT; DAUBAIL; GIROUD, 2016).

Entre o universo de sequelas mais comumente encontradas na doença cerebrovascular isquêmica, destacam-se défices motores, distúrbios da fonação e alterações cognitivas, em geral altamente incapacitantes. Esses défices neurológicos resultam do acometimento de áreas motoras cerebrais localizadas, a maior parte das vezes, no hemisfério dominante, que, na maioria das pessoas destras, é o esquerdo, possivelmente pela distribuição preferencial de sangue para áreas de funcionalidade elevada (DONG *et al.*, 2016). Por esse motivo, o comprometimento neurológico mais comum é a hemiplegia direita acompanhada de distúrbios da fala (afasias), alteração do campo visual (hemianopsias) e disfunção das funções mentais superiores, como raciocínio e memória (DONG *et al.*, 2016).

Uma vez estabelecida a lesão anóxica, a área afetada perde imediatamente a sua funcionalidade e, em pouco tempo, ocorre morte celular maciça, com o tecido adotando a configuração de uma área de necrose, com lesão irreversível (encefalomalácia) dos elementos tissulares. Uma vez estabelecidos como permanentes, os défices neurológicos oriundos desta situação anormal do cérebro constituem um grave problema social, considerando que mais da metade dos pacientes passa a ter dependência pessoal ou institucional importante e quase absoluta para o restante de suas vidas, requerendo constante auxílio de terceiros e por parte das equipes de saúde, necessitando de benefício social e/ou auxílio doença, o que onera mais ainda o custo da saúde pública (LUKER *et al.*, 2015).

Este panorama pouco animador tornou o AVE uma das doenças contemporâneas de maior importância epidemiológica e clínica em todo o mundo, havendo grande preocupação por parte da comunidade científica. Apesar disso, existe surpreendente escassez de tratamentos farmacológicos capazes de prevenir ou minimizar os danos encefálicos implicados com o infarto cerebral. A única medicação autorizada para uso em humanos é o agente trombolítico ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tPA), que restaura a patência de artérias cerebrais obstruídas por trombos, mas beneficia pouquíssimos pacientes em função da limitada janela terapêutica e dos sérios efeitos colaterais, que incluem o risco de transformação hemorrágica da área originalmente isquêmica, agravando a lesão inicial (LO, 2008).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

As alterações fisiopatológicas advindas da interrupção de oxigênio e glicose para o tecido nervoso resultam de uma série de reações bioquímicas que resultam na liberação de moléculas deletérias para a célula, desencadeando vias bioquímicas relacionadas a indução de morte celular e promovendo um estado inflamatório regional que acentua o dano inicial.

1.2.1 Fisiologia Cerebral

Mesmo representando apenas 2% do peso corporal, o encéfalo é o órgão do corpo humano que mais requer oxigênio e glicose, consumindo até 72 litros de O₂ e 150 gramas de glicose a cada 24 horas, o que corresponde ao redor de 15% do fluxo sanguíneo corporal e a 20% do O₂ total disponível na circulação (MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010). Isso explica o porquê de qualquer mudança no aporte de sangue para o encéfalo ser altamente prejudicial para o funcionamento da estrutura e é por essa razão, também, que mecanismos reflexos atuam ininterruptamente para manter constante a passagem de cerca de 55 mL de sangue por cada 100 gramas de tecido nervoso por minuto, equivalente a quase 750 mL de sangue/minuto, considerando um cérebro adulto de 1350 gramas (IADECOLA; ANRATHER, 2011a, 2011b; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

O fluxo contínuo de sangue do coração para o cérebro é proveniente das artérias carótidas e vertebrais, localizadas no pescoço, em duas vias distintas de distribuição sanguínea: o

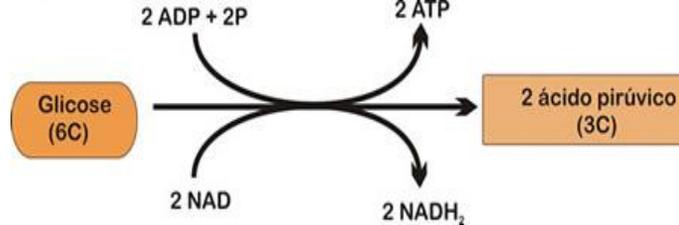
sistema carotídeo, responsável por irrigar os 2/3 anteriores do encéfalo (lobos frontais, temporais e parietais) e o sistema vertebrobasilar, responsável pela irrigação do cerebelo, tronco cerebral e lobos occipitais. Uma vez no interior do crânio, os dois sistemas unem-se por artérias comunicantes, formando uma rede anastomótica conhecida como polígono de Willis, com o intuito de permitir uma eventual redistribuição de sangue entre os dois sistemas, mantendo a circulação de sangue por todo o encéfalo, caso ocorra uma obstrução em alguns dos troncos arteriais situados ao longo desses dois sistemas (PAPANTCHEV *et al.*, 2013).

Graças a esta peculiar rede arterial e a um mecanismo de autorregulação eficiente, a perfusão cerebral mantém-se constante ao longo do tempo, variando entre 50 e 54 mL de sangue para cada 100 g de tecido cerebral por minuto. Em condições patológicas, variações fora desses limites determinam disfunção neurológica, como ocorre na hiperemia, situação que pode determinar hipertensão intracraniana, ou como ocorre na isquemia, quando a oligoemia determina hipóxia/anóxia do tecido. Neste caso, considera-se uma situação de isquemia cerebral quando a redução do fluxo sanguíneo atinge valores inferiores a 18 a 20 mL/100g/min, sendo que abaixo de 8 a 10 mL/100g/min, independente do tempo de duração, surgem lesões irreversíveis em virtude de morte celular (WILLIE, 2013; WILLIE *et al.*, 2013).

1.2.2 Respiração Celular Aeróbica (Via de Embden-Meyerhof-Parnas)

Foram necessários mais de 100 anos para se desvendar por inteiro a via metabólica que os seres vivos utilizam para extrair energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato, $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$), a partir da ruptura da glicose disponibilizada pelo sangue (“glicólise”, $\gamma\lambda\upsilon\kappa\upsilon\varsigma$ *glykís* “açúcar”, e $\lambda\upsilon\sigma\iota\varsigma$ *lýsis* – “dissolução”). Por impescindir do O_2 para ocorrer, o processo ficou conhecido como “respiração celular” ou “glicólise aeróbica” (Figura 2), uma cadeia de reações catabólicas que se passa no interior da célula pela quebra de moléculas de açúcar, aminoácidos e ácidos graxos na presença de um agente oxidante acceptor de elétrons, o oxigênio molecular (O_2). A quebra das ligações moleculares libera energia química para ser empregada na biossíntese, locomoção ou transporte de moléculas através da membrana celular (ALBERTS; BRAY; WATSON, 2008).

Figura 2 - Glicólise aeróbica



Fonte: Nelson e Cox (2014).

Este tão peculiar sistema de reações exotérmicas e espontâneas, do tipo ‘redox’ (oxidação-redução), que tem lugar nas cristas mitocondriais, é conhecido como “cadeia transportadora de elétrons da célula” e possui como objetivo primordial o transporte de elétrons até um aceptor final, o próprio oxigênio, situado na extremidade de baixa energia da cadeia, na qual acontece a redução do O_2 e a formação do ATP, molécula dotada de alto conteúdo energético. Trata-se de um mecanismo bastante engenhoso, posto que utiliza o ATP como fonte primária de energia para conseguir formar os seus próprios precursores, i.e., ADP (Adenosina Difosfato), disponibilizando *Ad infinitum* energia para o funcionamento das células (ALVES-FILHO; PALSSON-MCDERMOTT, 2016).

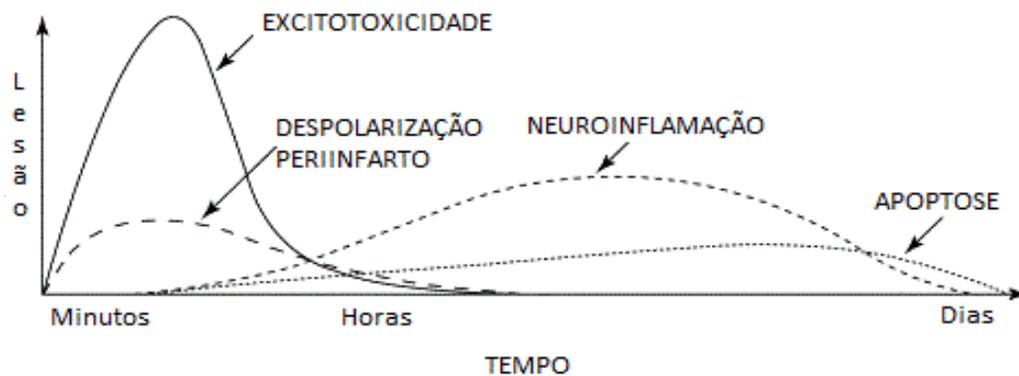
Em condições normais de aerobiose, a circulação sanguínea provém o oxigênio necessário para que ocorra a quebra fisiológica da glicose como meio de produzir o substrato energético para o perfeito funcionamento das células, sendo formado ainda, além do ATP, um composto contendo um ácido carboxílico, o ácido pirúvico (piruvato, $C_3H_3O_3^-$), intermediário que possui papel importante em várias vias metabólicas. O piruvato pode ser formado pela glicólise aeróbica e convertido, de modo reverso, novamente em glicose (gliconeogênese) ou em ácidos graxos, por meio de reações que envolvem a acetil coenzima A. Além disso, serve de substrato para a síntese do aminoácido alanina e pode ser ainda convertido em etanol ou em ácido láctico no processo de fermentação (SIMS; MUYDERMAN, 2010).

Em contrapartida, nas condições anaeróbicas, em vez de piruvato, a glicólise fornece, ao término, o ácido láctico (lactato, $C_3H_5O_3^-$), composto que possui um grupo hidroxil adjacente ao grupo carboxil, que, na forma conjugada (lactato), possui também papel essencial em vários processos bioquímicos, por exemplo, durante intensa atividade física ou em situações de grande demanda energética, quando a produção desse elemento se torna benéfica por auxiliar na regeneração de NAD^+ , que é empregado na oxidação de grupos fosfatos, garantindo, assim, a produção de energia (CHAMORRO *et al.*, 2012). Nessas situações patológicas, com reduzida

oferta de O_2 , o lactato faz-se acompanhar de número excessivo de radicais livres (RL), resultando em toxicidade local e dano estrutural às células (REHNCRONA *et al.*, 1981).

Portanto, a falência do metabolismo celular observada em uma área cerebral que sofre uma redução ou interrupção do fluxo sanguíneo e torna-se isquêmica traduz essencialmente um distúrbio energético intimamente relacionado à respiração das células e aos respectivos processos metabólicos que se desenrolam no citoplasma e no interior das mitocôndrias, a organela responsável por extrair energia bioquímica da glicose ($C_6H_{12}O_6$), na presença do O_2 . Instantes após a interrupção do fornecimento de O_2 e glicose, surge uma complexa sequência de eventos patológicos, que incluem: a. excitotoxicidade, b. despolarização periinfarto, c. inflamação, d. apoptose (Figura 3), cujo resultado final será a morte das células nervosas, dentro de horas ou dias (MANZANERO; SANTRO; ARUMUGAM, 2013).

Figura 3 - Sequência temporal dos mecanismos fisiopatológicos de morte celular na isquemia cerebral.



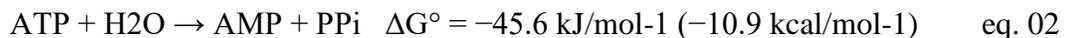
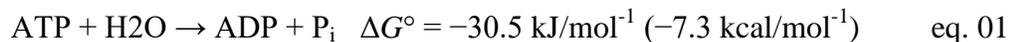
Fonte: Dirnagl *et al.* (1999).

Sumariamente, a glicólise aeróbica nos seres eucariotas processa-se em quatro estágios sucessivos. Na etapa citoplasmática, a glicólise forma o piruvato, que sofre descarboxilação na presença do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), formando acetil coenzima A (AcoA, $C_{23}H_{38}N_7O_{17}P_3S$), a qual é transportada à mitocôndria para dar andamento na síntese de ATP (ALBERTS; BRAY; WATSON, 2008). Nas cristas mitocondriais, a AcoA sofre oxidação, originando um ácido tricarboxílico conhecido como ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), elemento que inicia e encerra a série de reações bioquímicas conhecidas como o Ciclo do Ácido Cítrico, ou Ciclo de Krebs, epônimo que homenageia seu descobridor, Adolf Krebs (1900-1981). É nesta

etapa que se formam aminoácidos relevantes para a fisiologia e a patologia cerebral, como o aspartato e o glutamato (CHAMORRO *et al.*, 2016).

O ATP (KARL LOHMANN, 1929), nucleotídeo formado por adenosina, ribose e três grupos fosfato ($-\text{PO}_4$), é precursor de certas coenzimas importantes, tais como NAD^+ , FAD e a coenzima A, e participa da síntese do DNA e do RNA (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002). Porém, a mais relevante função desempenhada por essa estrutura diz respeito ao transporte e à transferência de energia química nas células, atividade indispensável para a fotofosforilação, a fermentação e a respiração aeróbica. Graças a essa propriedade intrínseca da molécula, o ATP é considerado como a unidade de ‘moeda corrente’ para transferência de energia nas células, atuando especialmente nos processos de fosforilação (adição) e desfosforilação (remoção) de grupos PO_4^{3-} presentes nas estruturas orgânicas, em particular para ativar ou desativar uma proteína (JOHNSON; NOBLE; OWEN, 1996).

Ao se efetuar a quebra da ligação covalente do último grupo fosfato do ATP, surgem ADP (Adenosina Difosfato – $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$) e Fósforo inorgânico (P_i , fosfato [PO_4^{3-}]), equação 1, que, por sua vez, origina AMP (Adenosina Monofosfato – $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_7\text{P}$), monômero do RNA (equação 2), cuja forma cíclica atua como segundo mensageiro, regulando inúmeros processos biológicos em praticamente todas as células animais (NELSON; COX, 2008). A concentração intracelular de ATP é da ordem de 1^{-10} mM, e uma única molécula armazena cerca de 30,5 kJ/mol (~ 7 kcal/mol) nas ligações covalentes de suas moléculas de fosfato (PO_4^{3-}), participando das duas etapas da respiração celular, como substrato energético na glicólise e como produto final do ciclo do ácido cítrico (ERECINSKA; SILVER, 1989).



Fonte: Gajewski, Steckler e Goldberg (1986).

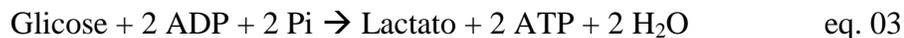
Em termos teóricos, formam-se, na cadeia da respiração celular, 36 moléculas de ATP por cada molécula hidrolisada de glicose, sendo importante observar que o ciclo inteiro é modulado e alterado por várias enzimas, podendo, ainda, ser profundamente afetado pelas concentrações locais do íon cálcio (Ca^{+2}) (GAJEWSK; STECKLER; GOLDBERG, 1986). Em

situações patológicas em que o microambiente conta com baixa disponibilidade de O₂, a extração energética passa a ser insatisfatória e ineficiente, já que, enquanto na glicólise aeróbica resultam 36 moles de ATP por mol de glicose, a glicólise, na ausência de O₂, produz tão somente 2 moles de ATP por mol de glicose - um mecanismo incapaz de manter as atividades normais das células e, portanto, prejudicial à sobrevivência destas (GAJEWSK; STECKLER; GOLDBERG, 1986).

1.2.3 Respiração Anaeróbica

Como indicado anteriormente, a glicólise aeróbica é uma via metabólica absolutamente condicionada à presença do O₂ inspirado pelos pulmões e transferido para a corrente sanguínea para obter energia da quebra das moléculas de glicose. Em situações anormais (hipóxia, anóxia, parada cardiorespiratória, choque etc.), em que a disponibilidade de O₂ se encontra restrita, as mitocôndrias passam a atuar de maneira disfuncional, elevando o consumo de ATP, acabando por determinar um colapso energético da célula. Para manter seu funcionamento normal, a célula lança mão de um recurso provisório, buscando extrair energia alternativa da glicólise, mesmo na ausência do oxigênio, estratégia conhecida como “glicólise anaeróbia” (equação 3) (GAJEWSK; STECKLER; GOLDBERG, 1986).

Metabolismo anaeróbio:



Esse recurso é limitado, dado que suporta apenas 2-4 minutos as demandas energéticas da célula, rendendo somente duas moléculas de ATP para cada molécula de glicose utilizada. Mesmo levando em conta que a velocidade de obtenção de ATP é 100 vezes maior que aquela da glicólise aeróbica, este valor é muito pequeno para suprir as demandas energéticas da célula, já que representa menos de 5% do potencial energético de cada molécula de glicose, ao contrário da glicólise aeróbia, cuja eficiência energética é próxima de 90% para cada molécula de glicose hidrolisada. Além de ser um modo ineficiente para extrair energia, também é uma cadeia de produção tóxica, gerando excesso de radicais livres e lactato, reduzindo o pH local (acidose láctica), e tornando o meio extremamente deletério para as células (GAJEWSK; STECKLER; GOLDBERG, 1986).

Uma vez que se instala um estado de reduzida oferta de O₂ ou de anaerobiose, os processos ativos de manutenção da homeostase celular são imediatamente alterados, surgindo prontamente um grave desequilíbrio iônico em razão da paralisação dos mecanismos responsáveis por conservar estável a quantidade de íons no interior da célula, por exemplo, a bomba de solutos por meio da membrana plasmática. Uma das principais consequências disso é a ocorrência de uma elevação abrupta das concentrações de sódio e de cálcio no citoplasma, acarretando edema celular e grande hiperexcitabilidade da rede neural, com aumento da demanda energética, fato que aprofunda ainda mais o sofrimento tissular ocasionado pela redução do aporte de O₂ (DEL ARCO, 2016).

O cálcio (Ca⁺⁺) é um dos íons mais relevantes na fisiopatologia do infarto cerebral. Em excesso no interior da célula nervosa, interage com as vesículas sinápticas dos terminais nervosos (telodendros), induzindo uma liberação maciça do neurotransmissor excitatório glutamato (ácido D-glutâmico, C₅H₉NO₄). O glutamato em excesso promove ativação descomedida dos receptores N-Metil-D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), canais proteicos relacionados ao trânsito dos cátions sódio e cálcio através da membrana plasmática, aprofundando o estado de desequilíbrio iônico no interior da célula e desencadeando o fenômeno da excitotoxicidade (OLNEY, 1969), um dos eventos mais importantes da lesão neural, que acompanha a isquemia cerebral (BARRETO *et al.*, 2011; GREWER *et al.*, 2008; LAI *et al.*, 2011; SEIDEL *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013).

A excitotoxicidade (OLNEY, 1969) diz respeito à maciça liberação com bloqueio de recaptação do neurotransmissor excitatório glutamato, pela falência energética da célula. O excesso de glutamato superativa vias sinalizadoras que reforçam o influxo de cálcio, gerando um ciclo vicioso, cujo resultado é o dano tissular e apoptose das células nervosas (HAYASHI, 1954; WATKINS; JANE, 2006). Esse evento patológico que acompanha a isquemia cerebral pode também ser encontrado em outras doenças do SNC, como *Alzheimer* e esclerose lateral amiotrófica. Apesar de os estudos translacionais terem falhado em demonstrar a eficiência de inúmeros agentes testados para neutralizar a excitotoxicidade, este ainda tem sido um importante foco das pesquisas buscando tratamento para a injúria hipóxica ao tecido nervoso (RAJAH; DING, 2017).

Outra consequência do influxo excessivo de cálcio para o citoplasma é a ativação constitutiva (permanente) de vias sinalizadoras, tais como as fosfolipases (IP₃, diacilglicerol), a

proteinoquinase (PKC) e a calmodulina. Estas vias estão relacionadas a diversos tipos de processos metabólicos, a maioria dos quais é mediado por proteases autolíticas, lipases lipossomais e endonucleases. Tais enzimas são responsáveis pela: a. conversão de mediadores pró-inflamatórios da via do ácido araquidônico ($C_{20}H_{32}O_2$) – o ácido graxo essencial, presente nos fosfolípidios e em membranas celulares -, e b. participam de certos mecanismos de morte celular programada e de lesão mitocondrial, causando a liberação de espécies reativas de oxigênio e outras enzimas que contribuem para agravar a apoptose e o dano tissular (SCHULZ; WELLER; MOSKOWITZ, 1999; WON; KIM; GWAG, 2002).

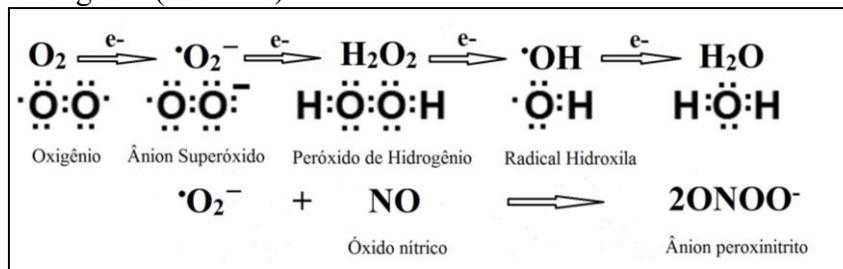
As mitocôndrias são as organelas encarregadas da transferência de elétrons na cadeia transportadora até o aceptor final. Nesse processo, formam, em condições fisiológicas, certos tipos de moléculas e íons, os quais possuem, como peculiaridade, elétrons não pareados (livres) na última camada orbital, característica esta que confere a essas mesmas estruturas uma facilidade ímpar para reagir prontamente com outros compostos presentes nas redondezas, como as lipoproteínas estruturais e o próprio DNA. Conhecidas como radicais livres (RL), são liberadas em grandes quantidades logo em seguida ao dano mitocondrial induzido pela lesão hipóxica, acumulando-se em quantidades e afetando o funcionamento e a estrutura das células, possuindo papel crucial no dano tissular final observado nos AVEs isquêmicos (DEMUTH *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2017; LO; NING, 2016a).

O número exorbitante de radicais altamente reativos é reforçado por um comprometimento de certos mecanismos de remoção destes (a seguir), incrementando a toxicidade e tornando o microambiente insalubre para as células (CHO *et al.*, 2005). Esta condição, conhecida como “estresse oxidativo”, é particularmente adversa para a sobrevivência das células nervosas e tem sido associada, também, com outras enfermidades neurológicas de caráter degenerativo crônico, tais como mal de *Parkinson*, *Alzheimer*, esclerose lateral amiotrófica e alguns tipos de câncer, e da própria aterosclerose (THANAN *et al.*, 2014). Por essa razão, o estresse oxidativo é considerado atualmente como o evento fisiopatológico mais relevante para o surgimento da doença cerebrovascular isquêmica (PRADEEP *et al.*, 2012).

Entre os principais RL derivados do metabolismo de oxigênio, destacam-se as Espécies Reativas do Oxigênio e Nitrogênio (ERONs), com ênfase para o Ânion Superóxido (O_2^-) e para o Óxido Nítrico (NO), cuja combinação produz o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), outro potente oxidante ligado ao dano celular, em virtude de sua ação altamente lesiva sobre o

DNA (CHRISOBOLIS *et al.*, 2011; STEINERT; CHERNOVA; FORSYTHE, 2010; WANG *et al.*, 2014). Essas reações desproporcionadas ocorrem por dismutação¹ enzimática, sendo que o passo inicial é a redução univalente do oxigênio molecular (O₂) em superóxido (O₂⁻). Nas condições basais, entre 2-5 % do contingente total de elétrons não completa a série inteira, originando precocemente ERNONS, conforme as reações abaixo (Figura 4) (CHRISOBOLIS *et al.*, 2011; STEINERT; CHERNOVA; FORSYTHE, 2010; WANG *et al.*, 2014).

Figura 4 - Reação de Produção das espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERON's).



Fonte: Halliwell (1992).

Uma vez que o ânion superóxido é naturalmente formado na mitocôndria, mecanismos antioxidantes – representados por enzimas e cofatores (alfa-tocoferol, Vitamina A, C, D, E) – se responsabilizam por neutralizar a toxicidade deste elemento (MANZANERO; SANTRO; ARUMUGAM, 2013). Entre as enzimas antioxidantes, destacam-se (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017): a) Superóxido Dismutase (SOD), dotada de potente atividade anti-inflamatória, que catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio; b) catalase, encontrada nos peroxissomos orbitando as mitocôndrias, incumbida da reação com o peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio; c) glutathione peroxidase, que reduz o peróxido de hidrogênio dos lipídios, formando hidroperóxidos lipídicos e seus correspondentes alcoólicos, por meio de pequenas proteínas contendo enxofre, chamadas glutathionas.

Normalmente, esses mecanismos antioxidantes neutralizam os excessos ou efeitos tóxicos dos ERONs, transformando-os em oxigênio e em peróxido de hidrogênio, acompanhados de resíduos menos deletérios. Entretanto tal conversão não é 100% eficiente, e peróxidos residuais permanecem no interior da célula, participando das próximas reações (KUMAR *et al.*,

¹ Dismutação: tipo de reação redox em que um elemento da reação participa tanto como agente oxidante quanto como agente redutor para formar dois produtos distintos.

2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017). Em situações de anaerobiose, quando o acúmulo de ERONs supera a capacidade dos sistemas neutralizantes, a célula passa a sofrer de estresse oxidativo, pela pronta interação química destes com as estruturas lipídicas e proteicas constituintes das células, desnaturando e desativando enzimas, desestruturando as membranas lipídicas e danificando o DNA (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017).

Logo, no caso da isquemia cerebral, os dois principais sistemas de enzimas antioxidantes – Superóxido Dismutase (SOD) e Óxido Nítrico Sintetase (NOS) – representam o mais valioso recurso de que as células nervosas dispõem para se adaptar, de imediato, à situação adversa imposta pela privação de oxigênio e glicose, desempenhando, assim, um papel crucial em termos de neuroproteção (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017). Além do excesso de RL, outros fatores contribuem para a morte das células nervosas, como a ativação das cascatas da lipoxigenase e da Poli ADP-Ribose Polimerase (PARP), a formação de poros mitocondriais de transição e a ativação e o desequilíbrio iônico amplificado em razão do recrutamento secundário dos potenciais de ação dos canais de cálcio-dependentes (TRPM) (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017).

Muito embora a produção inadequada de ERONs seja o fator mais determinante na fisiopatologia do sofrimento neural ligado à hipóxia cerebral, estando diretamente vinculada à cadeia de processos patológicos que acaba por resultar na morte das células nervosas (apoptose) durante a isquemia cerebral, recentemente a pesquisa científica voltou sua atenção para algumas das interações positivas existentes entre os ERONs e as células do organismo, tais como expressão gênica, translação proteica, indução de respostas imunológicas contra agentes hostis e modulação da resposta inflamatória vinculada ao insulto isquêmico, sendo esta última, em especial, uma das áreas preferenciais de investigação com o objetivo de desenvolver agentes capazes de neutralizar os efeitos danosos do excesso de ERONs durante a isquemia cerebral (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; YAMAMOTO, 2017).

1.2.4 Neuroinflamação

A inflamação que surge na área de infarto, após a oclusão arterial por um trombo ou êmbolo, é um estado de ativação imunitária que se instala rapidamente, podendo manter-se por semanas e até meses após o insulto. Considerando que a maioria dos casos de infarto resulta da

degeneração e ruptura de placas ateroscleróticas na parede do(s) vaso(s) residente(s), deve ser levado em conta, também, a presença de um processo inflamatório crônico preexistente, acometendo tanto os vasos (ateroscleróticos) como o próprio tecido irrigado por esses vasos. O fenômeno conta com a participação de mediadores humorais dotados de atividades enzimática, quimiotática e vasogênica, de células residentes do neurópilo e células de defesa circulantes na corrente sanguínea, atraídas pelos sinais neuroquímicos liberados no local da lesão (BRAMBILLA; COUCH; LAMBERTSEN, 2013; LIMA *et al.*, 2016; MURRAY *et al.*, 2013; VAY *et al.*, 2016).

Uma vez privado de glicose e oxigênio, o tecido cerebral passa por modificações adaptativas e protetivas para garantir a sobrevivência das suas células. Tais alterações, resultado da ativação de uma cascata de eventos, também induzem efeitos deletérios, que reforçam a toxicidade e a morte das células gliais e dos neurônios. Entre esses eventos, destaca-se, como os mais relevantes, a emissão de sinais para a ativação do complemento e da micróglia, promovendo, ainda, a atração de leucócitos para a área afetada. Além disso, a micróglia ativada libera citocinas dotadas de propriedades anti-inflamatórias ou proinflamatórias, as quais exercem, respectivamente, efeitos protetores ou deletérios para o tecido, na dependência do grau de isquemia e do tempo decorrido do insulto (LEONARDO; PENNYPACKER, 2016).

Portanto, mesmo sendo uma resposta protetora adaptativa buscando neutralizar a injúria e restaurar as células e o tecido lesado, o estado de neuroinflamação possui um mecanismo dual, o qual, em parte, age atenuando a lesão inicial e, em parte, acentua mais ainda o estado de inflamação com agravamento da lesão inicial, motivo pelo qual numerosas linhas de investigação têm tentado modular esse mecanismo para preservar o tecido neural (BRAMBILLA; COUCH; LAMBERTSEN, 2013; LIMA *et al.*, 2016; MURRAY *et al.*, 2013; VAY *et al.*, 2016).

Os sinais de sofrimento celular modificam o estado de repouso vigilante da micróglia e dos astrócitos, cuja ativação se faz acompanhar de alterações morfológicas e funcionais. Nessas circunstâncias, a resposta imunitária segue uma sequência temporal constituída por uma sucessão padronizada dos elementos participantes (Figura 6), encetada pelo surgimento, logo no primeiro dia, de neutrófilos e de micróglia ativada. Após o primeiro dia, os neutrófilos sofrem declínio gradual, correspondendo ao aumento de macrófagos M1, cuja população fica mais evidente entre os 3º-5º dias, atingindo o ápice na primeira semana. Esse remanejamento celular é acompanhado da produção de citocinas proinflamatórias, que incluem interleucina-1, interleucina-6 e fator de

necrose tumoral-alfa (CARDOSO *et al.*, 2013; DOS SANTOS PICANCO-DINIZ; GOMES-LEAL, 2007; FRANCO *et al.*, 2012; GOMES-LEAL *et al.*, 2004; GOMES-LEAL; CORKILL; PICANCO-DINIZ, 2005a; SCHNELL *et al.*, 1999; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008).

O comportamento ambíguo da micróglia contribui tanto para reparar e regenerar o tecido (atividade neuroprotetora), quanto para exacerbar a lesão (atividade proinflamatória). A resposta proinflamatória pode ser bloqueada pelo agente minociclina, um antibiótico altamente lipofílico do grupo das tetraciclina, capaz de induzir uma redução da perda axonal e do fenômeno de morte celular em cérebros isquêmicos de ratos. Outras enfermidades, como esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de *Huntington* e enfermidade de *Parkinson*, também apresentam essa resposta dúbia da micróglia, que pode ser bloqueada pela inibição de enzimas inflamatórias, como a Óxido Nítrico Sintetase (NOS), 5-lipoxigenase, e o fator de necrose tumoral-alfa (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; GOMES-LEAL, 2012; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999).

Tal efeito protetor da minociclina foi reproduzido em vários modelos experimentais de traumatismo da medula espinhal, demonstrando-se que o tratamento com a substância induz considerável neuroproteção pelo bloqueio do recrutamento de macrófagos hematogênicos (POPOVICH *et al.*, 1999). Estes outros resultados semelhantes levam a crer que o tratamento anti-inflamatório das lesões encefálicas e espinhais com minociclina é eficiente e seguro, podendo ser muito benéfico quando instituído na fase aguda do AVE isquêmico (LAMPL *et al.*, 2007; FAGAN *et al.*, 2010). Isso é mais relevante, ainda, considerando que a minociclina, apesar de se fazer acompanhar de feitos pleiotrópicos, possui notável ação sobre a atividade micróglial (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999).

Se, por um lado, a atividade proinflamatória pode ser deletéria ao tecido em sofrimento isquêmico, aprofundando o grau de lesão inicial, por outro, as células micrógliais/macrofágicas também atuam induzindo um efeito neuroprotetor após trauma (KIGERL *et al.*, 2009; RAPALINO *et al.*, 1998; SHECHTER *et al.*, 2009) ou isquemia (LALANCETTE-HEBERT *et al.*, 2007; NEUMANN *et al.*, 2006; NEUMANN *et al.*, 2008). Um ou outro comportamento ocorre na dependência da diferenciação fenotípica que a micróglia sofre a partir do momento em que é ativada, parecendo que esta ação dúbia possa ser influenciada pelo ambiente patológico e que ligantes podem ativar diferentes receptores na membrana micróglial, ativando suas ações deletérias e/ou protetoras (GOMES-LEAL, 2012).

Esse paradoxo advém da programação intrínseca de micróglia, responsável por reconhecer e neutralizar agentes infecciosos agressores, em resposta a estímulos liberados pelas células em sofrimento. Uma vez ativada, a micróglia passa a sofrer alterações de forma e de comportamento, liberando substâncias reativas dotadas de atividade enzimática, como peróxido, óxido nítrico, suerpóxido, interleucinas, entre outros. Tais moléculas enzimáticas determinam uma resposta apropriada da micróglia anti-inflamatória, no entanto, em outras situações de agressão (trauma, isquemia), a micróglia é logo direcionada ao fenótipo proinflamatório, ativando mecanismos de morte que, normalmente, eliminariam patógenos biológicos, mas passam a eliminar, não intencionalmente, neurônios e células da glia, indistintamente (BOCHE; PERRY; NICOLL, 2013).

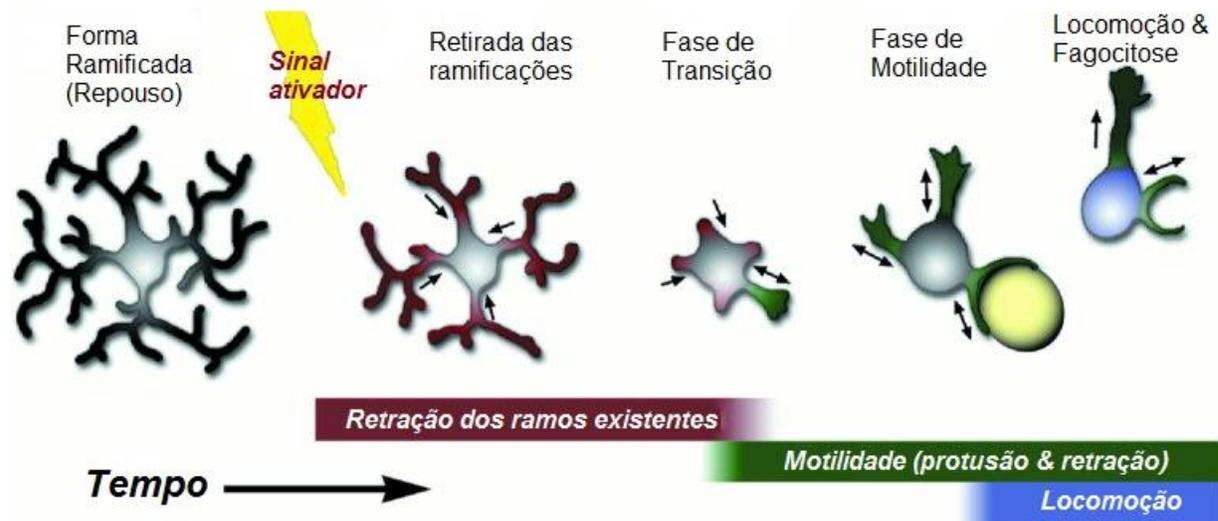
Por razões circulatórias, o afluxo das células de defesa para a área isquêmica é bem mais significativo nas margens periféricas da lesão (zona de penumbra) que no centro (core), área de maior privação de sangue, a partir da obstrução do vaso sanguíneo responsável por irrigar a área. Nesse centro, em que a disfunção energética celular é suficientemente intensa para provocar morte celular irreversível, as possibilidades terapêuticas são limitadas, diferente da periferia, em que a existência de grande rede de vasos colaterais suporta um aporte sanguíneo mínimo, capaz de permitir a sobrevivência das células locais, um fato que possibilita um número relativamente vasto de potenciais alvos celulares e moleculares para intervenção e terapêutica (BRAMBILLA; COUCH; LAMBERTSEN, 2013; LIMA *et al.*, 2016; MURRAY *et al.*, 2013; VAY *et al.*, 2016).

1.2.4.1 Micróglia

A Barreira Hematoencefálica (BHE) isola o SNC da circulação sistêmica e a defesa do tecido nervoso contra agentes biológicos ou agressões patogênicas (traumas, hemorragias, etc.) depende essencialmente da micróglia (BARRON, 1995; DEL RIO-HORTEGA, 1919). Estas células correspondentes aos macrófagos representam quase 15% da população celular do encéfalo, e costumam ser encontradas em situação de ‘repouso’ (vigilância) sofrendo transformação em resposta a alterações no microambiente adotando a capacidade de se deslocar e fagocitar bactérias e tecidos desvitalizados (CHEN; TRAPP, 2016; GINHOUX *et al.*, 2010; GOMES-LEAL, 2012; PERRY; ANDERSSON; GORDON, 1993; RANSOHOFF; PERRY, 2009).

Este potencial para transformação fenotípica determina uma participação da micróglia inteiramente vinculada aos requerimentos locais. Na forma ramificada, conhecida como “de repouso”, a mesma permanece imóvel, mas em estado de constante vigilância, podendo permanecer assim horas ou dias, até que surjam estímulos nocivos, situação em que as ramificações altamente sensíveis sofrem imediata retração, se transformando gradualmente na morfologia ameboide e levando a célula à tarefa de encontrar e identificar o agente agressor para neutralizá-lo. Sinais agressores, como glutamato, citocinas, fatores de necrose celular, alterações iônicas, induzem a micróglia a mudar para o fenótipo “ativado”, forma dotada de ampla capacidade fagocítica e capaz de realizar um trabalho interativo com linfócitos T e astrócitos, passando a fagocitar debris e células apoptóticas e a promover o reparo do tecido (CHOUDHURY; DING, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Modelo temporal da dinâmica de ativação microglial.

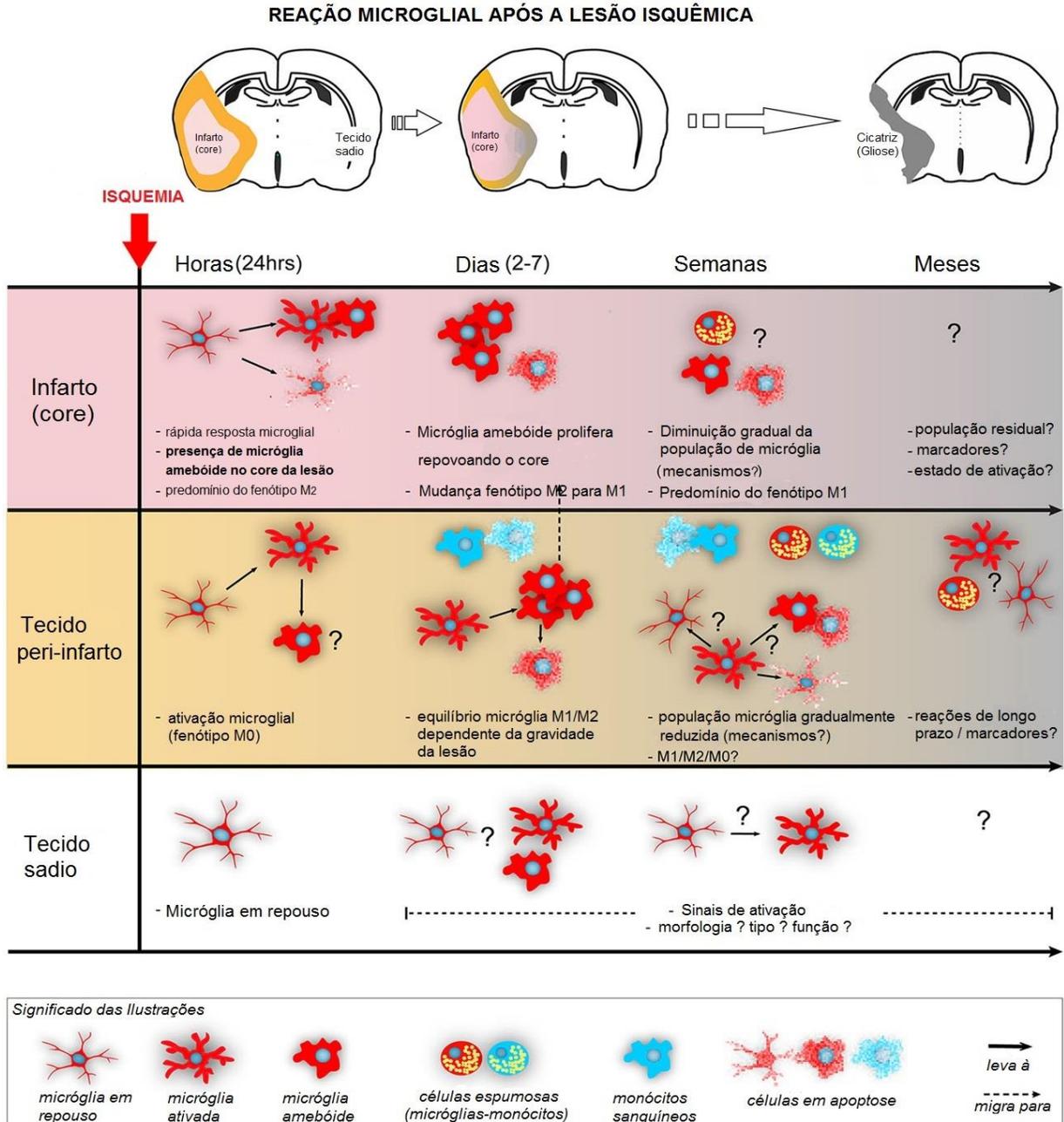


Fonte: Stence N, et al.

Após ativação, a população microglial aumenta exponencialmente, com um ápice em 2-3 dias, mas mantendo-se funcional por semanas, o que se faz por meio de dois tipos fenotípicos distintos: “M1” (proinflamatório, ativação precoce) e “M2” (neuroprotetor, ativação tardia). Ambos liberam citocinas, quimocinas, mediadores oxidativos e fatores neurotróficos que atuam na inflamação, agravando ou atenuando o problema, mas, do ponto de vista fisiopatológico, predomina, no contexto do infarto cerebral, o fenótipo M1, produtor de espécies reativas de

oxigênio e nitrogênio (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). A ativação microglial pode ter duração prolongada, induzindo fluxo permanente de linfócitos circulantes para a área cerebral afetada e promovendo gradual dano na mielina central, meses após o insulto inicial (HU *et al.*, 2012, 2015; XIA *et al.*, 2015) (Figura 6).

Figura 6 - Evolução temporal da neuroinflamação após injúria isquêmica.



Fonte: Lourbopoulos *et al.* (2015).

1.2.4.2 Neutrófilos

Oriundos da circulação periférica, os leucócitos podem ser encontrados até 30 minutos após a interrupção de sangue para o tecido nervoso, aumentando sua população até atingir um pico em 2-3 dias. Em contraste, os monócitos recrutados alcançam a área isquêmica entre o terceiro e o sétimo dia. Ambas as células participam ativamente dos mecanismos adaptativos (neuroplasticidade, remodelamento), buscando restaurar ou limitar o dano (DOWNES; CRACK, 2010; EASTON, 2013). Essas flutuações na população de células inflamatórias, ao longo do tempo, são acompanhadas, também, pela presença de substâncias mediadoras dotadas de propriedades que favorecem (proinflamatórias) ou reduzem (anti-inflamatórias) a intensidade da inflamação que acompanha a isquemia do tecido nervoso (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais mediadores inflamatórios que participam do AVEi

PROINFLAMATÓRIOS			
Citocinas	TNF- α	Micróglia/macrófago, astrócitos, neurônios e células endoteliais	Elevação de 0.5–6h, pico entre 12–24h mantém-se elevado por dias
	IL-1 β	Micróglia/macrófago, astrócitos, neurônios e células endoteliais	Elevação de 2–6h, pico entre 12–24h
	IL-6	Micróglia/macrófago, astrócitos, neurônios e células endoteliais	Elevação a partir de 10h, pico em 18h
Quimiocinas	MCP-1	Neurônio, astrócitos e micróglia	Elevação a partir de 3–6h, pico entre 12h e 48 hs
	MIP-1 α	Neurônio e micróglia	Elevação em 2h, pico em 4h
ANTI-INFLAMATÓRIOS			
	IL-10	Micróglia/macrófago, Th1, Th2, células B e astrócitos	Elevação em 12h, pico em 72h
	TGF- β	Micróglia/macrófago	Elevação em 3h, pico em 24h
	TIPE-2	Micróglia/macrófago	Elevação em 3h, pico em 48h
	IGF-1	Micróglia, astrócitos e células endoteliais	Elevação em 12h, pico em 24h

Fonte: Jin *et al.* (2013).

1.3 TERAPIA FARMACOLÓGICA PARA A ISQUEMIA CEREBRAL AGUDA

O principal recurso terapêutico disponível para tratar infarto cerebral consiste na reperfusão do tecido isquêmico. Isso pode ser conseguido por meio da desobstrução (trombólise) mecânica, pela inserção de dispositivos metálicos tubulares e fenestrados ('stents'), guiados por cateter endovascular, os quais realizam a remoção ou esfacelam o trombo, restaurando a luz do vaso (angioplastia) (GINSBERG, 2008; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010), ou pelo uso do agente químico ativador de plasminogênio tecidual rtPA (Recombinant Tissue Plasminogen Activator), uma proteína que catalisa a conversão do plasminogênio em plasmina, responsável pela fibrinólise, e, na verdade, a única alternativa disponível, aprovada atualmente para uso em seres humanos (CARPENTER *et al.*, 2011; KABLAU *et al.*, 2011).

Muito embora a trombólise química com o rtPA seja bastante eficiente na tarefa de dissolver trombos e desobstruir a artéria ocluída, há dois fatores críticos que limitam o método: a) o tratamento deve, obrigatoriamente, ser iniciado em um exíguo prazo – até 3 a 4h do início dos sintomas, sob pena do tecido isquêmico sofrer uma necrose irreversível (CARPENTER *et al.*, 2011; KABLAU *et al.*, 2011) e b) existe uma considerável chance de transformação hemorrágica (até 40% dos casos) da área isquêmica, dando origem a hematomas intracerebrais geralmente catastróficos, uma complicação pouco aceita do ponto de vista racional, considerando que a maioria dos pacientes já possui um *déficit* neurológico instalado com a privação de sangue para o cérebro (KABLAU *et al.*, 2011).

Uma consideração relevante faz-se necessária para ambos os métodos de trombólise: haja vista que quase a totalidade dos eventos isquêmicos cerebrais acontece no domicílio, no trabalho ou na rua, isto é, distante do ambiente hospitalar. Apenas uma reduzida parcela de pacientes irá receber a terapia trombolítica a tempo de se beneficiar (CARPENTER *et al.*, 2011; KABLAU *et al.*, 2011; SAVER *et al.*, 2009). Isso é crucial, em se tratando de metrópoles, posto que a mobilidade urbana restrita constitui regra, dificultando o ingresso da vítima, no tempo hábil de tratamento, nos hospitais terciários, nos quais essas terapias trombolíticas se encontram disponíveis. Tais considerações demandam alternativas farmacológicas menos complexas e passíveis de administração (ex: sublingual) logo nos primeiros instantes de um ictus vascular cerebral (DEMUTH *et al.*, 2017; KOH; PARK, 2017; LEVY *et al.*, 2016).

Em vista disso, inúmeras substâncias têm sido testadas em ensaios pré-clínicos, muitas delas com resultados bastante animadores. Entre estas, destacam-se a Lifarizina, bloqueador dos canais de cálcio e sódio; o Gavestinel, bloqueador seletivo da glicina no receptor NMDA, portanto antagonistas glutamatérgicos; o Verapamil, também bloqueador do canal de cálcio e alguns agentes antioxidantes, como o Tocoferol e o Resveratrol. Esses produtos demonstraram efeitos neuroprotetores bastante significativos em roedores submetidos à isquemia cerebral (GINSBERG, 2008), porém a aplicação dessas substâncias em seres humanos com diagnóstico de AVEi mostrou-se ineficiente, frustrando as expectativas iniciais, mantendo, em aberto, a opção para o emprego de novas estratégias de tratamento do AVEi (DEMUTH *et al.*, 2017; GINSBERG, 2008; KOH; PARK, 2017; LEVY *et al.*, 2016).

De modo semelhante, terapias celulares, por injeção intra-arterial ou diretamente na área afetada, ou pela instilação intracisternal/intraventricular de material contendo células-tronco, surgiram como uma promissora modalidade de tratamento para melhorar a recuperação e reduzir as taxas de défices neurológicos permanentes. O emprego de células-tronco sanguíneas do cordão umbilical, da medula óssea, neurais e da linhagem celular imortalizada (NT2N) foram igualmente empregadas em modelos experimentais de AVEi (LINDVALL; KOKAIA, 2010, 2011), revelando efeitos neuroprotetores, entretanto, em razão de restrições técnicas e ético-legais, a utilização em humanos segue pendente, não existindo, portanto, comprovação definitiva de eficácia do método (BUZHOR *et al.*, 2014; KOH; PARK, 2017; LEVY *et al.*, 2016).

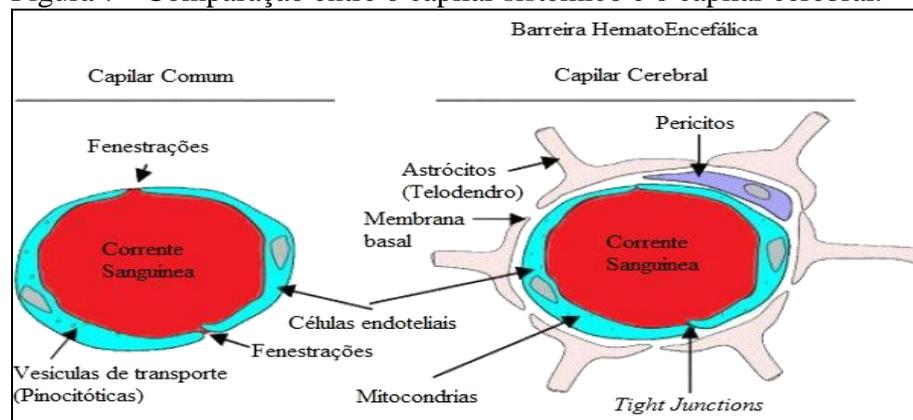
Por fim, o uso de substâncias terapêuticas conjugadas a nanopartículas dotadas com propriedades físico-químicas peculiares – tais como elevada difusibilidade por barreiras biológicas (ex. barreira hematoencefálica) e alta seletividade para tecidos alvo, com incremento da substância ativa na área de lesão, tem se mostrado promissor. Uma das vantagens do método é configurar as partículas de acordo com as características do tecido alvo, dotando-as de elevada especificidade e seletividade para áreas de lesão, com significativa redução dos efeitos tóxicos observados nos métodos convencionais de tratamento. Essa estratégia vem sendo empregada em ensaios clínicos no combate a várias doenças sistêmicas, incluindo neoplasias, artrites e enfermidade cardiovascular isquêmica, com resultados preliminares igualmente animadores (BERTATO *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2016; OCCHIUTTO *et al.*, 2016; POZZI *et al.*, 2015).

1.4 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Tradicionalmente é imputado à BHE o ônus de ser o maior óbice no tratamento das enfermidades neurológicas quando da administração sistêmica (intravenosa) de medicamentos. Isso porque o peculiar arranjo existente entre o neurópilo e os vasos capilares cerebrais, em que a disposição de células endoteliais firmemente justapostas (*tight junctions*) é quase que totalmente envolvida pelas extremidades (telodendro) dos astrócitos e avolumada pela interposição de pericitos permeados entre o telodendro e a célula endotelial, estabelece um filtro único e altamente seletivo para substâncias presentes na corrente sanguínea, permitindo a passagem de uma minoria de substâncias configuradas especialmente com esse fito, presentes na luz do vaso para o interstício nervoso (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016).

Essa curiosa interface, cujo fundamento anatômico é representado pela unidade neurovascular descrita acima, impede o acesso de agentes biológicos, de neurotoxinas lipofílicas e das moléculas farmacologicamente ativas disponíveis a partir da corrente sanguínea, praticamente isolando o SNC da circulação sistêmica, exceção feita à água, a alguns gases (O₂, NO), que atravessam por difusão passiva, e a algumas moléculas cruciais para o funcionamento neural, como a glicose e alguns aminoácidos, que são transportados seletivamente. Logo essa verdadeira trincheira dotada de impressionante seletividade representa um formidável mecanismo de defesa do SNC, está ausente em apenas poucos locais do encéfalo, como a área postrema, neurohipófise, pineal e eminência média (órgãos circunventriculares), conforme Figura 7 (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016).

Figura 7 - Comparação entre o capilar sistêmico e o capilar cerebral.



Fonte: Blood ..., 2016.

Desta forma, para que determinada substância farmacologicamente ativa exerça efeitos apreciáveis no SNC após administração pela corrente sanguínea, a mesma deverá possuir suficiente estabilidade metabólica para neutralizar a degradação hepática da substância e uma estrita compatibilidade físico-química com a BHE, caso contrário, terá que ser captada e transportada por processo de transferência ativa, empregando uma proteína transmembrana, a *p-glicoproteína* com gasto energético, por meio de um mecanismo de efluxo dependente de ATP, lembrando que a principal função dessa proteína é atuar como uma bomba de efluxo de substâncias, exteriorizando aquilo que não for desnecessário ou nocivo à economia celular (HAWKINS; DAVIS, 2005; HAWKINS; VINA, 2016).

Em termos práticos, isso significa dizer que apenas 2% das substâncias com tamanho molecular até 450 Da conseguem acessar efetivamente o tecido cerebral, e nenhuma droga de elevado peso molecular consegue atravessar a BHC. Resumindo, menos de 5% do total de 7.000 drogas disponíveis para aplicação médica estão habilitadas para serem utilizadas como agentes terapêuticos para tratar enfermidades neurológicas (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016). Nesse grupo muito restrito de substâncias que adentram o SNC por difusão passiva, atravessando a membrana celular (difusão transcelular), incluem-se, por exemplo, a L-dopa, que sofre descarboxilação da hidroxifenilalanina em dopamina, estratégia amplamente utilizada no tratamento da doença de *Parkinson* (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016).

Importante ressaltar, também, que, nesse grupo tão seletivo de substâncias dotadas de habilidade para atravessar a BHE, existe uma restrição terapêutica enorme, posto que essas substâncias só são capazes de tratar apenas quatro categorias de desordens do SNC: desordens afetivas (benzodiazepínicos, antipsicóticos, antidepressivos), dor crônica (derivados da morfina), epilepsia (fenobarbital, fenitoína, carbamazepina etc.) e enxaqueca (rizatriptan). Essa limitação implica, portanto, uma demanda permanente por novas substâncias dotadas de ação terapêutica sobre o SNC, capazes de superar a BHE e/ou de estratégias alternativas capazes de facilitar ou incrementar o acesso de medicamentos para aumentar as opções de tratamento das doenças que acometem o SNC (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016).

Frente a condições patológicas, tais como traumatismos, infecções/inflamações, neoplasias e isquemia, a funcionalidade da BHE encontra-se comprometida. Portanto, em tese, qualquer agressão ao SNC é capaz de alterar um ou mais elementos constituintes da unidade neurovascular, afetando a permeabilidade da barreira, fenômeno que pode ser constatado por

exames de imagem - com mais nitidez pela ressonância magnética -, pela retenção anômala de contraste endovenoso ou pela presença de líquido no entorno da lesão, o chamado 'edema cerebral', que pode ser de natureza vasogênica (extracelular), por causa da alteração da permeabilidade vascular e/ou alteração da pressão intravascular, ou o edema citotóxico (intracelular), por anormalidade no transporte iônico para dentro e para fora da célula (PARDRIDGE, 2005a, 2005b, 2016).

No caso da doença cerebrovascular isquêmica, o comprometimento da BHE associa-se a uma cascata de eventos moleculares desencadeados da hipóxia das células formadoras da unidade neurovascular (LANGFORD; MASLIAH, 2001; MINAMI, 2011). Esse evento inicial é mediado pela síntese de citocinas inflamatórias, como IL-1beta e TNF-alfa, VEGF e ácido nítrico, prontamente acompanhado da liberação de metaloproteinases, as quais determinam a degradação das proteínas responsáveis pelas *tight junctions*, e seguido por intenso afluxo celular (leucócitos), característico da resposta neuroinflamatória, levando a estresse oxidativo, com dano às células endoteliais, o que contribui, por sua vez, para piorar o edema original (LANGFORD; MASLIAH, 2001; MINAMI, 2011).

Além dos fatores acima citados, certas espécies reativas do oxigênio, em particular o radical superóxido (O_2^-), também são implicadas na patogenia da quebra da BHE, em função de sua notória influência sobre a permeabilidade vascular, havendo vários trabalhos demonstrando a participação desse radical na gênese dos edemas cerebrais que circundam os tumores cerebrais primários e secundários (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; RASTOGI *et al.*, 2016; YAMAMOTO, 2017), o que pode ser demonstrado pela contração e diminuição de intensidade do edema cerebral após a utilização de inibidores do superóxido, tais como a superóxido dismutase recombinante ou o polietilenoglicol-SOD, fato que tem sido objeto de relevantes investigações para fomentar a criação de novos agentes antiedema (KUMAR *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; RASTOGI *et al.*, 2016; YAMAMOTO, 2017).

Em suma, essas características da BHE levam a crer que o defeito quase universal que afeta a barreira frente a distintas patologias seja multimodal, ocorrendo pela sinergia de diversos fatores que atuam alterando a unidade neurovascular. A existência ubíqua de tal particularidade no contexto da patologia cerebral isquêmica pode justificar o emprego de estratégias que direcionem agentes farmacologicamente ativos de maneira regional, para uma área específica (inflamação), como parece ser o caso de nanopartículas lipossolúveis

configuradas com elevado coeficiente de difusão e dotadas de articular tropismo para tecidos com atividade inflamatória, o que tornaria essas partículas as candidatas ideais para o tratamento do infarto cerebral (BERTATO *et al.*, 2012; KRETZER *et al.*, 2016; LUCAS *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2013; OCCHIUTTO *et al.*, 2016; POZZI *et al.*, 2015).

1.5 COLESTEROL E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O químico francês Jean-Pierre Couerbe (COUERBE, 1834) foi o primeiro a chamar atenção para a importância do colesterol como substância indispensável ao SNC, enfatizando em seu trabalho o papel clínico e fisiológico da mesma no cérebro humano, apontando a desproporcional concentração desse esterol no encéfalo, órgão que representa somente 2% de toda a massa corporal, mas contém aproximadamente 25% de todo o colesterol do corpo humano. No SNC, o colesterol está presente quase que totalmente (99%) na forma esterificada livre, e a maioria (70%) participa da estrutura e função da membrana plasmática das células nervosas e na bainha de mielina que envolve os axônios dos neurônios. O restante (30%) é utilizado como substrato para a formação e o funcionamento dos astrócitos e dos neurônios (DIETSCHY; TURLEY, 2001).

A mielina é substância gordurosa esbranquiçada, que circunda os axônios, está presente nas vias neurais, em especial na coroa radiada, tronco cerebral e medula espinhal, fornecendo a coloração característica da substância branca do SNC. Constituída essencialmente por água (40%); e o restante, por uma massa composta de lipídios (70-85%), em que predomina o colesterol, os fosfolipídios e os glicoesfingolipídios, em uma razão equivalente a 4: 4: 2, sendo o restante (15-30%) composto por proteínas. A mielinização dos axônios é comandada pelos oligodendrócitos, a partir da deposição concêntrica de mielina em volta do axônio dos neurônios, formando uma camada insulante dotada de propriedades elétricas essenciais para a transmissão dos impulsos nervosos (STEPHANOVA, 2001).

Ao contrário do colesterol plasmático, cujo *turnover* é de apenas alguns dias, a produção de colesterol no cérebro adulto é muito baixa, variando de 6 meses até 5 anos, graças à síntese *in situ* e também a um eficiente mecanismo de reutilização, necessário para manter a homeostase lipídica. O colesterol existente no SNC sofre excreção por meio da conversão enzimática utilizando a 24-hidroxilase, resultando no metabólito 24S-hidroxicolesterol

(Cerebrosterol, $C_{27}H_{46}O_2$), com uma estrutura molecular compatível para atravessar, por difusão passiva (sem gasto energético), a BHE para a circulação sistêmica, fazendo desse produto a principal forma de eliminação, e, ao mesmo tempo, um confiável marcador para analisar o metabolismo cerebral do colesterol (BJORKHEM *et al.*, 1997, 1998; LUTJOHANN *et al.*, 2001).

Apesar de a BHE evitar a difusão de moléculas maiores, sabe-se que as células endoteliais existentes no cérebro adulto conseguem captar a lipoproteína de baixa densidade (LDL), utilizando-se, para tal, de receptores presentes na membrana celular de suas células, dotados de configuração espacial específica para a partícula LDL. Após a ligação espacial, a LDL é transferida para o interior da célula nervosa, onde prossegue com a cadeia metabólica (DEHOUCK *et al.*, 1992, 1997). Defeitos nessa sequência levam a graves distúrbios funcionais e estruturais do SNC (muitos incompatíveis com a vida), os quais prejudicam a condução do impulso nervoso, originando vários tipos de desordens, como esclerose múltipla, as doenças de *Alzheimer* e de *Niemann-Pick* (FRALDI *et al.*, 2010; GIUDETTI *et al.*, 2016).

Ainda está pouco clara a maneira pela qual os neurônios dependem ou são supridos de colesterol ou de outros metabólitos pelos astrócitos, muito menos a maneira pela qual a substância é transportada de uma célula para a outra. No entanto é provável que a grande importância do colesterol para a neurociência resida no fato de que o endotélio do capilar cerebral é dotado de receptores específicos para captar a lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo, portanto, capaz de transportar essas partículas até o interior das células nervosas, o que parece representar uma estratégia ímpar de tratamento para as enfermidades que acometem o SNC, utilizando a LDL como veículo para transportar substâncias farmacologicamente ativas e com ação terapêutica (ZHANG; QIANG, 2015).

1.5.1 Transporte Sérico do Colesterol (LDL)

Em face de sua reduzida solubilidade no meio aquoso, o colesterol é uma das várias moléculas hidrofóbicas presentes no organismo que necessita ser transportado através da corrente sanguínea, até alcançar seu destino final, no interior das células (MYANT, 1982, 1983). O principal ‘veículo’ de transporte para o colesterol é a LDL (*Low-density lipoprotein*), partículas discoidais complexas, de natureza anfipática, ou seja, que possuem, ao mesmo tempo,

propriedades lipofílicas e hidrofílicas. Essas partículas são compostas por uma camada exterior de proteínas (Apolipoproteínas) e lipídios, o que faz com que sejam solúveis em água, permitindo que circulem em meio aquoso, como a corrente sanguínea, sob a forma de emulsão (SIMONS; IKONEN, 2000).

A superfície interna da estrutura de uma lipoproteína possui natureza hidrofóbica, solúvel, portanto em gordura; assim, uma vez ligadas a lipídios, são passíveis de serem transportadas pela corrente sanguínea. Uma vez no interior da partícula LDL, o colesterol fica protegido do meio externo aquoso, no caso o sangue, com quem interage por meio de uma carapaça hidrofílica, onde predominam fosfolipídios e apoproteínas hidrofílicas. Além de representar um modo engenhoso para transportar o colesterol pela circulação, as lipoproteínas são dotadas também de ‘sinalizadores’ celulares, que possibilitam a sua identificação e o seu direcionamento para determinados tipos específicos de tecidos com demanda de colesterol, como é o caso do fígado e do cérebro, e de alguns tecidos patológicos, como inflamação e neoplasia (MYANT, 1982, 1983).

As apolipoproteínas são as estruturas da molécula que possibilitam a ligação específica da lipoproteína com os receptores de membrana existentes na célula alvo. Entre as várias apolipoproteínas identificadas, a do tipo B (ApoB-100) responde primariamente pelo transporte de LDL (GU *et al.*, 2010; RICHARDSON *et al.*, 2005; SEGREST *et al.*, 2000) e cabe a esta o papel de transportar aproximadamente 70% do colesterol plasmático total. Cada partícula de LDL contém uma molécula de ApoB-100 e aproximadamente 1500 moléculas de éster de colesterol, circundado por uma carapaça de fosfolipídios, colesterol livre, constituindo partículas com diâmetro aproximado de 22nm, ou seja, em dimensão nanométrica (PENCINA *et al.*, 2015; PETERSON *et al.*, 1991).

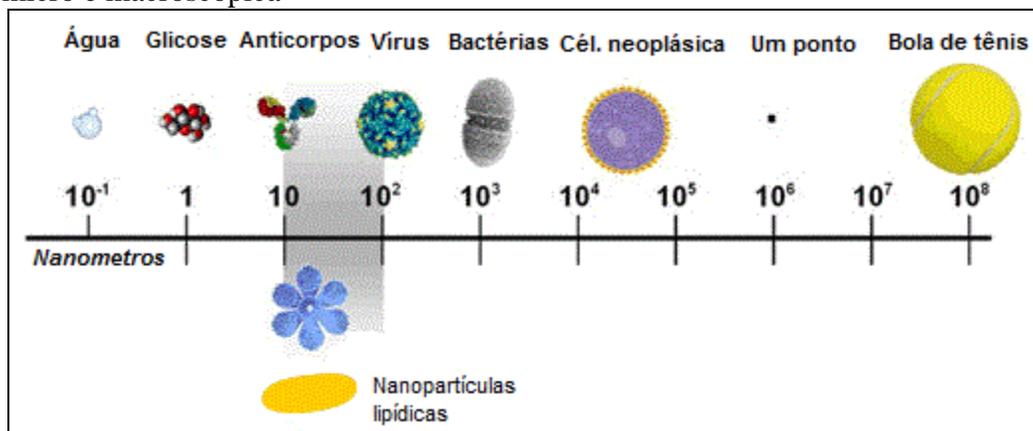
Uma vez alcançando os tecidos alvo, as partículas de LDL ligam-se especificamente a receptores de membrana (rLDL) e são admitidas no interior das células por endocitose, enfatizando que, no cérebro, a célula endotelial do capilar é a responsável por esse trabalho de internalização. Uma vez no interior da célula, são degradadas nos lisossomos e liberadas na forma de colesterol livre para serem usadas na síntese de membranas, produção de hormônios esteroides e consumo energético, sofrendo metabolismo e excreção. No entanto, ainda é pouco clara a forma como são transportadas no interior das células nervosas (MYANT, 2012; NORUM *et al.*, 1983). Em alguns casos, esses receptores de LDL se encontram em número bastante

elevado, como observado em certas células inflamatórias e neoplásicas (GONIAS; CAMPANA, 2014).

1.6 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA

A nanotecnologia (FEYNMAN, 1961) é um novo ramo da ciência em que a aplicação na Medicina ('nanomedicina') promete revolucionar a triagem, o diagnóstico e o tratamento de certas afecções humanas ao utilizar ferramentas moleculares biocompatíveis, baseando-se no princípio de que todo o trabalho que ocorre no interior das células faz-se em escala manométrica, já que as dimensões de seus participantes mais expressivos, como água, glicose, anticorpos, proteínas, enzimas e receptores de membrana, estão situados nestas reduzidas dimensões (Figura 8). Atualmente, vários centros ao redor do mundo trabalham para melhorar a eficácia, a segurança e a sensibilidade de nanoinstrumentos desenvolvidos para um fim ou doença específica, inclusive algumas que acometem o SNC (EUSTAQUIO; LEARY, 2016; KEY; LEARY, 2014; LEARY *et al.*, 2005; PROW *et al.*, 2004; RYU *et al.*, 2014; VENTOLA, 2012a, 2012b, 2012c; WHITE-SCHENK; SHI; LEARY, 2015; ZARBIN *et al.*, 2010, 2012).

Figura 8 - Escala retratando o tamanho relativo de objetos em dimensões nano, micro e macroscópica



Fonte: NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer (2017).

A nanomedicina diz respeito à possibilidade de serem criadas estruturas dotadas de atividade biológica com tamanho entre 1 e 100 nanômetros, ou seja, a matéria em dimensões

atômicas e moleculares, com base na manipulação de átomos ou moléculas individuais. O termo “nano” refere-se ao “nanômetro” (nm), subunidade do metro que corresponde a 1×10^{-9} metros (um milionésimo de milímetro ou um bilionésimo de metro). Para termos de comparação, o átomo possui tamanho médio de 0,1 nm (10^{-1}), enquanto a dupla hélice do DNA tem diâmetro aproximado de 2 nm. Alguns especialistas afirmam que a nanomatéria conserva várias de suas propriedades originais mesmo fora desses limites, pelo que tais parâmetros devem ser compreendidos apenas em termos conceituais (MCNEIL, 2005; POLAK; SHEFI, 2015; PROW *et al.*, 2004; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

A Nanomedicina inaugura uma nova maneira de assistência à saúde, oferecendo a possibilidade de se conseguir diagnósticos cada vez mais precoces para, logo em seguida, implementar tratamentos mais efetivos e seguros, reduzindo custos e toxicidade da terapia. Além disso, o método proporciona individualizar o tratamento com base nas informações concernentes ao tipo específico de enfermidade que acomete um indivíduo em particular, contemplando as características peculiares e genômicas de cada pessoa, no contexto da doença, para, então, definir uma conduta a cada uma das situações específicas em questão. Desse conceito, adveio, também, o neologismo “teranostica”, que indica realizar, em tempo único, diagnóstico e tratamento para a situação específica do paciente (VENTOLA, 2012a, 2012b, 2012c).

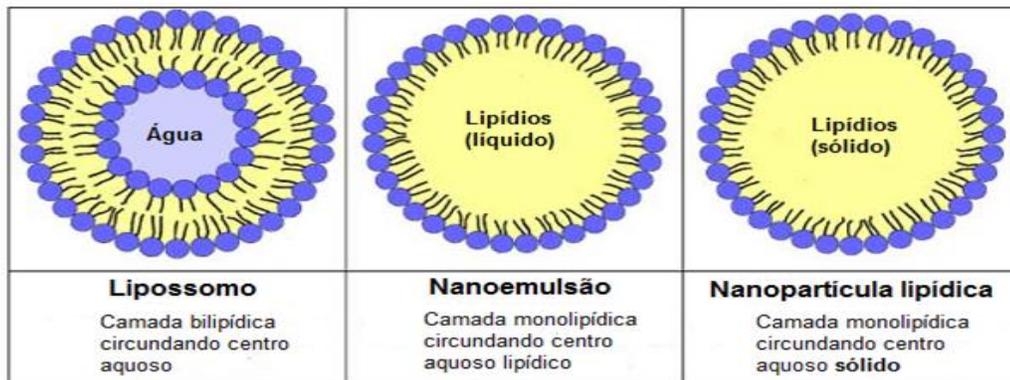
Nesse tamanho reduzido, a matéria deixa de seguir as leis da Física Clássica para se submeter às leis da Física Quântica, passando a se comportar de modo distinto do de seu correspondente macroscópico. Tais propriedades físicas e químicas peculiares incluem, entre outros, elevado coeficiente de difusibilidade por barreiras biológicas, maior área de superfície, forças de interação mais firmes e grande estabilidade química em meio aquoso. Também possibilitam a combinação com substâncias dotadas de atividade biológica, originando moléculas conjugadas que podem ser direcionadas para determinado tipo de tecido, no qual essas mesmas forças físico-químicas aprimoram a interação entre o nanoconjugado e as células do tecido, favorecendo a internalização da substância ativa (VENTOLA, 2012a, 2012b, 2012c).

A descoberta desses atributos das nanopartículas converteram-nas em candidatas ideais para auxiliar o tratamento de várias enfermidades, tais como câncer, hipercolesterolemia, doenças inflamatórias e infecciosas, entre outras, por oferecer uma estratégia extraordinária para distribuir substâncias farmacologicamente ativas, de maneira específica, personalizada, minimamente invasiva e virtualmente destituída dos efeitos tóxicos encontrados na terapêutica

convencional. Um dos maiores truismos desses conjugados é que se prestam a servir de veículos a substâncias ativas, assegurando a chegada do agente terapêutico no tecido alvo, com notável precisão e seletividade (BOBO *et al.*, 2016), garantindo um tratamento com eficácia superior aos métodos convencionais (MCNEIL, 2005; POLAK; SHEFI, 2015; PROW *et al.*, 2004; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

Entre os principais materiais autorizados para uso em saúde, destacam-se: a) materiais lipídicos; b) metais nobres; c) semicondutores; d) nanotubos de carbono e fullerenos; e) óxidos metálicos e estruturas correlatas; f) compostos nanofosforados conceituais (MCNEIL, 2005; POLAK; SHEFI, 2015; PROW *et al.*, 2004; RADOMSKA *et al.*, 2016). No caso dos materiais lipídicos, as principais formas de interesse clínico são os lipossomos, as nanoemulsões e as nanopartículas lipídicas sólidas (Figura 9), estruturas concêntricas mono ou bilamelares, dotadas de membrana fosfolipídica na sua porção mais externa, utilizadas para transportar drogas hidrofílicas em seu interior ou drogas hidrofóbicas em sua camada fosfolipídica, um arranjo que lembra bastante as partículas carreadoras do colesterol, como a LDL (FARAJI; WIPF, 2009).

Figura 9 - Nanopartículas lipídicas



Fonte: Uchechi, Ogbonna e Attama (2014).

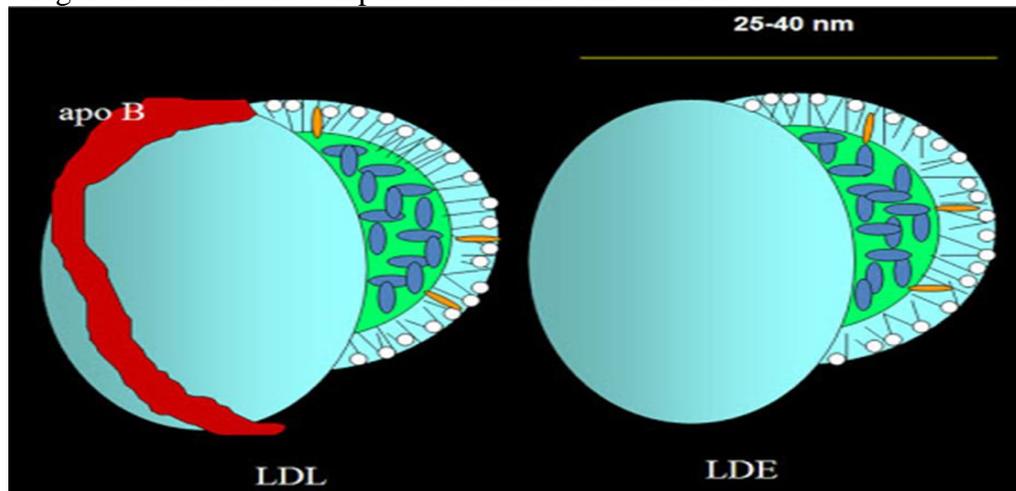
No meio das diversas propriedades das nanopartículas lipídicas que despertam interesse clínico, uma delas destaca-se prioritariamente: a facilidade de distribuição dessas estruturas em tecidos patológicos, tais como certos tipos de câncer e processos inflamatórios/proliferativos, fenômeno conhecido genericamente como ‘efeito de retenção por permeabilidade aumentada’ (*EPR – Enhanced permeability retention effect*) (MATSUMURA; MAEDA, 1986). Esse comportamento advém da presença de vasos sanguíneos defeituosos

neoformados (neoangiogênese), acrescida de desregulação nos receptores para LDL, os quais se encontram em número significativamente elevado, quando comparados com tecidos normais, facilitando a chegada desta classe de partículas no interior desses tecidos (AZZOPARDI; FERGUSON; THOMAS, 2013; MAEDA, 2013; MELLO *et al.* 2016).

1.6.1 Emulsão Lipídica – LDE

Há cerca de vinte anos, Maranhão e colaboradores desenvolveram um sistema lipídico estrutural e funcionalmente muito semelhante à lipoproteína de baixa densidade (LDL). Manipulado sob a forma de emulsão (LDE), é constituída por nanopartículas com tamanho médio de 30 nm, compostas por diferentes lipídios– *fosfatidilcolina, triglicérides, colesterol e ésteres de colesterol* – em proporções conhecidas (MARANHAO *et al.*, 1993). A LDE difere da LDL nativa pela ausência do componente proteico (Apolipoproteínas), que pode ser obtido facilmente da interação da LDE com as próprias lipoproteínas plasmáticas, havendo especial afinidade com a Apo-E (Figura 10). Isso facilita o reconhecimento da LDE pelos receptores LDL (rLDL), possibilitando a internalização (endocitose) da partícula (MARANHAO *et al.*, 1993).

Figura 10 - Estrutura comparada da LDE com a LDL nativa.



Fonte: Maranhão et al. (2012)

Esse análogo semissintético da LDL tem sido testado com sucesso em vários modelos experimentais e em alguns ensaios clínicos como veículo para transportar substâncias

anti-inflamatórias e quimioterápicas, tais como o paclitaxel (LUCAS *et al.*, 2015; MARANHÃO *et al.*, 2008; OCCHIUTTO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2002); a carmustina (MARANHÃO *et al.*, 2002) e o metotrexato (BULGARELLI *et al.*, 2012, 2013; DAMINELLI *et al.*, 2016). A vantagem de conjugar agentes farmacologicamente ativos com a LDE reside na expressiva atenuação dos efeitos colaterais habitualmente observados com o uso isolado desses agentes, acrescido, ainda, de uma eficácia maior, mesmo quando são utilizadas concentrações abaixo da dose terapêutica mínima (RODRIGUES *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A notável eficiência desses conjugados deve-se, em parte, pela proeminente afinidade entre as células constituintes de tecidos patológicos em estado de hipermetabolismo (neoplasia, inflamação) e a LDL, resultado da avidez que essas células possuem para utilizar o colesterol como um substrato imprescindível para a síntese de novas células-filhas, bem como para suprir as elevadas demandas metabólicas das células de tecidos patológicos. Para isso, apelam para uma prodigiosa superexpressão dos receptores para LDL (rLDL), na membrana plasmática de suas células, podendo atingir números bastante expressivos, na ordem de cem mil até um milhão por célula em certas neoplasias, contrastando com o tecido nervoso normal, em que o número de rLDL é relativamente escasso (MALETINSKÁ *et al.*; 2000; PITAS *et al.* 1987).

1.7 METOTREXATO: APLICAÇÕES NA PESQUISA

O metotrexato (MTX, $C_{20}H_{22}N_8O_5$, 2,4-diamino, N^{10} -metilpteroil ácido glutâmico, ácido pentanodioico) é um inibidor do folato, com atividade antiproliferativa e imunossupressora. Sua ação antineoplásica faz-se por bloqueio enzimático da dihidrofolato redutase, enzima formadora do ácido fólico, metabólito indispensável para a síntese do nucleotídeo timidina, componente do DNA (CHOY; SCOTT, 1997; EMERY; SUAREZ-ALMAZOR 2003; MILLER; RANATUNGA, 2012; MOURA *et al.*, 2011; SCHIFF, 1997). No caso da inibição de atividade inflamatória, o mecanismo parece ser bem mais complexo, ocorrendo por meio de múltiplas ações, que incluem antagonismo fólico e inibição de eicosanoides e metaloproteinases, gerando acúmulo de adenosina, com bloqueio da proliferação leucocitária e a correspondente produção de TNF, IL8 e IL12, entre outros (BROWN; PRATT; ISAACS, 2016; CUTOLO *et al.*, 2001).

Muito utilizado no tratamento de doenças inflamatórias de natureza autoimune, como a artrite reumatoide, e no combate a certos tumores sólidos e malignidades hematológicas (ABOLMAALI; TAMADDON; DINARVAND, 2013), o MTX possui algumas desvantagens limitantes, que incluem a toxicidade sistêmica (mielossupressão), a baixa estabilidade em meio aquoso (meia-vida curta), a reduzida difusibilidade por barreiras biológicas e o surgimento de resistência (VISENTIN *et al.* 2012). Por isso algumas estratégias foram desenvolvidas para tornar o tratamento mais eficaz e seguro, como o incremento da lipofilicidade pela inserção de grupos lipofílicos na molécula, e a utilização de sistemas de veiculação, tais como lipossomos, dendrímeros, micelas e nanopartículas sólidas (MELLO *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011).

Em se tratando do uso de nanopartículas lipídicas sólidas conjugadas ao MTX, foi observado que esta formulação melhora a estabilidade, a filtração, a biodegradação e a liberação da substância ativa, ao mesmo tempo em que elimina os efeitos tóxicos sistêmicos, precisamente por direcionar, de forma seletiva, o conjugado até o tecido-alvo (rico em receptores lipídicos), e por controlar a liberação da substância ativa, elevando significativamente a taxa de internalização do MTX nas células. Preparada com lipídios biocompatíveis, essas nanopartículas possuem excelente biodegradabilidade e mínima toxicidade, sendo livres, portanto, de solventes orgânicos, razão pela qual têm sido uma das primeiras escolhas para encapsular o MTX no tratamento de doenças proliferativas e inflamatórias (RUCKMANI *et al.* 2006).

Alguns anos atrás, Moura *et al.* (2011) desenvolveram uma formulação combinando um derivado lipofílico do MTX - o didodecil metotrexate (ddMTX) com a LDE - para obter uma nanoemulsão conjugada (LDE-ddMTX), dotada de partículas com tamanho médio de 60 nm, elevada estabilidade, baixa toxicidade, com eficácia bem superior ao uso isolado do MTX, o qual sofre exuberante captação por parte das células da linhagem HL60 (leucemia mieloide humana) e K562 (leucemia eritroide) (MOURA *et al.*, 2011). A seguir, investigaram a ação do LDE/MTX como anti-inflamatório em artrites induzidas por antígeno, observando notável controle da inflamação, concluindo que esse sistema de veiculação do MTX representa uma valiosa estratégia no tratamento de doenças neoplásicas e inflamatórias (MELLO *et al.*, 2013).

Em um comunicado mais recente, o mesmo autor demonstrou visível atenuação das placas ateroscleróticas e do processo inflamatório vascular induzidos por hipercolesterolemia experimental em coelhos, utilizando os agentes paclitaxel (PTX) e metotrexato (MTX), respectivamente, combinados a nanopartículas LDE. Esse trabalho destacou extensa captação do

conjugado pelo tecido inflamatório, fato que sugere - a exemplo do que ocorre com as neoplasias - a presença de avantajado número de receptores para a LDL nativa (e por analogia, para a LDE) nos tecidos inflamatórios, ratificando a importância desse veículo biológico conjugado ao MTX e a várias outras substâncias farmacologicamente ativas para ampliar a eficácia do tratamento de distúrbios inflamatórios (BULGARELLI, *et al.* 2013; DAMINELLI *et al.*, 2016; MELLO *et al.*, 2016; SHIOZAKI *et al.*, 2016).

1.8 HIPÓTESE E PARADIGMA EXPERIMENTAL

Um dos aspectos mais marcantes das enfermidades que acometem o SNC é a dificuldade de recuperação *ad integrum* do tecido lesado. Mesmo com todo o progresso e a evolução da ciência médica, os recursos terapêuticos disponíveis mostram-se ineficientes em termos de curabilidade ou então excessivamente deletérios em razão de seus efeitos tóxicos, principalmente no que diz respeito ao combate a neoplasias ou a insultos isquêmicos, exceção feita a certas infecções, como as meningites bacterianas, passíveis de tratamento por antibioticoterapia (GINSBERG, 2008; LINDVALL; KOKAIA, 2010, 2011). Esta constatação reforça a necessidade de novas metodologias que utilizem os resultados da pesquisa básica em pesquisas com potencial relevância clínica e aplicabilidade aos seres humanos.

Até o momento, inexistente uma substância neuroprotetora eficaz e aprovada para uso em humanos, no contexto da isquemia encefálica (GINSBERG, 2008; GOMES-LEAL, 2012). Porém, considerando que a inflamação exacerbada oriunda da intensa ativação microglial é um dos principais fatores que incrementam a morte celular na área de infarto (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), vários estudos pré-clínicos têm proposto modular o grau de ativação microglial, com o intuito de induzir neuroproteção nas áreas isquêmicas (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012), como pode ser observado na inibição microglial pelo antibiótico minociclina, que protege a substância branca da região estriatal em isquemia aguda, induzindo a neuroproteção e a preservação das células nervosas (GUIMARAES *et al.*, 2010; HAMBY *et al.*, 2007).

Entre as inúmeras substâncias testadas com esse fito, o imunossupressor MTX tem sido investigado como agente limitante da inflamação que acompanha a doença coronariana isquêmica, o processo de aterosclerose e certas formas de artrite (BULGARELLI *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011). Mais ainda, foi constatado que o

emprego da nanopartícula LDE como veículo para o MTX (cLDE/MTX) incrementa o poder anti-inflamatório e apura a eficácia terapêutica deste (MELLO *et al.*, 2013). O presente estudo é pioneiro ao investigar a influência do cLDE/MTX sobre a neuroinflamação que acompanha a isquemia cerebral, buscando comprovar o efeito anti-inflamatório e neuroprotetor desse conjugado sobre áreas de isquemia cortical induzidas por microinjeções e endotelina-1 (ET-1) em ratos adultos.

1.9 OBJETIVOS

A presente pesquisa buscou determinar a utilidade da nanopartícula lipídica LDE como veículo para carrear substâncias farmacologicamente ativas até o encéfalo, com o intuito de tratar várias das enfermidades do SNC que cursam com neuroinflamação.

1.9.1 Objetivo Geral

Investigar a distribuição tecidual e os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do cLDE/MTX em modelo experimental de isquemia cortical induzido por microinjeções de endotelina-1 (ET-1), em ratos adultos.

1.9.2 Objetivos Específicos

- a. Investigar a distribuição tecidual da nanopartícula lipídica tritiada LDE/3H⁺ e do cLDE/MTX, avaliando o comportamento destes em relação à barreira hematoencefálica íntegra em ratos Wistar adultos e naqueles ratos submetidos à isquemia focal do córtex;
- b. Investigar, qualitativamente e quantitativamente, a influência do cLDE/MTX sobre a área de infarto, após a indução de isquemia cortical com ET-1;
- c. Investigar, qualitativamente e quantitativamente, o efeito do tratamento com cLDE/MTX sobre a preservação neuronal, após isquemia cortical com ET-1;
- d. Investigar o efeito do tratamento com cLDE/MTX sobre o padrão de ativação micróglial, astrocitose e morte celular, no modelo experimental proposto.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos wistar representam um modelo muito utilizado e bastante fidedigno para estudos experimentais sobre a doença cerebral vascular isquêmica humana.

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos adultos, machos, da raça Wistar, todos em bom estado geral, com peso variando entre 150 e 300 g., submetidos a duas etapas distintas e sequenciais de investigação: na primeira etapa, avaliou-se o comportamento da nanopartícula LDE/H⁺ frente à BHE íntegra e com lesão isquêmica induzida pela substância vasoconstrictora Endotelina-1 (ET-1); na segunda fase, foram investigados os efeitos anti-inflamatório e neuroprotetor do cLDE/MTX sobre as áreas de isquemia cortical induzidas pela ET-1.

Parte dos animais foi cedida pelo biotério central da Universidade Federal do Pará, parte cedida pelo biotério da Universidade Estadual do Pará e pelo biotério da Universidade de Lisboa (Portugal). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de maneira estandarizada e em obediência às normas sugeridas pela *Society for Neuroscience*, pelo *National Institute of Health* (NIH, USA), pelo Conselho Nacional de Controle de Animais de Experimentação (CONCEA) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Lisboa e do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA). Após eutanásia programada nos estudos com LDE triciado, os órgãos de interesse foram pré-processados localmente, no laboratório de Citogenética da UFPA, sendo, logo em seguida, encaminhados para análise e detecção no Laboratório de Metabolismo de Lípidos do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCOR/FMUSP).

2.2 MODELO DE ISQUEMIA FOCAL

O modelo experimental proposto na presente pesquisa foi implementado no laboratório de Neuroinflamação e Neuroproteção da UFPA, em estudos prévios, buscando avaliar os efeitos locais e regionais de uma isquemia subcortical induzida por um potente

vasoconstrictor, o peptídeo Endotelina-1 (ET-1) (AGNATI *et al.*, 1991; FUXE *et al.*, 1989). Para tal, os animais foram submetidos uniformemente à injeção de 1 μ L (40 pmol) de ET-1 no córtex motor direito, com o fito de provocar a isquemia local, conforme demonstrado por trabalhos de investigação precedentes (FRANCO *et al.*, 2012). Todos os procedimentos foram realizados com técnica padronizada, em animais anestesiados por cloridrato de cetamina (72 mg/Kg) e cloridrato de xilazina a 2% (9 mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p).

Logo que constatada a sedação por meio do teste dos reflexos corneano e da retirada da pata, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico Stoelting 51500D (Stoelting Co. Wood Dale, IL, EUA) (Figura 11). Com a cabeça do animal fixa e imóvel entre os pinos preensores do aparato (Figura 12), realizou-se incisão longitudinal mediana a partir da linha interorbitária em sentido posterior, até a região nucal, utilizando lâmina de bisturi Aço Carbono nº 23 (Feather Safety Razor Co. LTD). Estancada hemorragia de vasos sangrantes com auxílio de pinças hemostáticas tipo Kelly, procedeu-se o afastamento da pele e do periósteo com o intuito de identificar as referências ósseas, no caso as suturas sagital, coronal e o bregma, a confluência das mesmas (Figura 13), pontos referências para realizar a trepanação (abertura do crânio) óssea. As trepanações foram realizadas utilizando broca ranhurada tipo Carbide com haste longa nº 8, conectada a motor Odontológico de Suspensão Mini Beltec™ de alta rotação (rotação máxima de acionamento 15.000rpm), situando-se o orifício na calota craniana imediatamente anterior à sutura coronal e a cerca de um centímetro da linha média (Figura 14).

Figura 11 – Aparato estereotáxico Stoelting 51500D

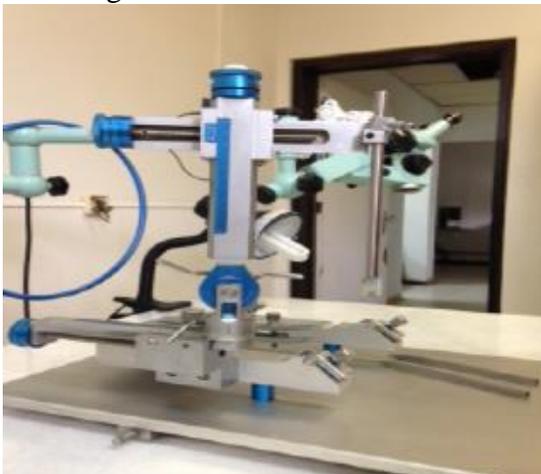


Figura 12 – Fixação da cabeça do animal no aparato estereotáxico



Figura 13 – Identificação de sutura coronal, sutura sagital e bregma



Figura 14 – Orifício de trepanação do crânio



Figura 15 – Posicionamento da microagulha de punção cortical

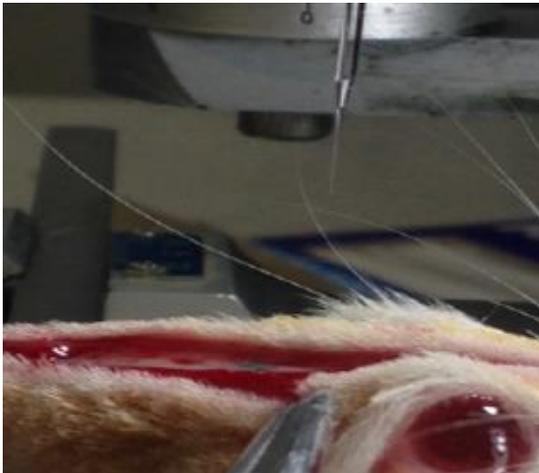


Figura 16 – Inserção cortical da microagulha de punção para injeção de ET-1



Fonte: Elaboração própria, 2017.

Uma vez aberta a membrana dural e exposta a superfície do córtex frontal, posicionou-se a microagulha de punção (Figura 15), injetando-se 1 μ L (40 pmol) da ET-1 na substância branca subcortical, segundo coordenadas estereotáxicas específicas (Figura 16): a. médio-lateral: 2,3; b. antero-posterior: 1,2; c. dorso-ventral: 0,4, respectivamente, a partir da superfície cortical (PAXINOS *et al.*, 1980). Nos animais controle, injetou-se volume idêntico (1 μ L) de diluente (Solução salina, a 0,9%) contendo corante azul de colanil para identificar a área da lesão após a retirada do encéfalo. Em seguida ao procedimento cirúrgico, os animais foram

mantidos com água e comida à vontade, por um período de 7 dias, período em que foi procedida a eutanásia por overdose anestésica.

2.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com o intuito de se averiguar a hipótese formulada acima, foram propostos os seguintes grupos experimentais, que foram distribuídos ao longo de duas etapas consecutivas:

I ETAPA: AVERIGUAÇÃO DA BIODISPONIBILIDADE DA NANOPARTÍCULA LDE/H+ NO ENCÉFALO

- **Grupo 1 - Animais sem isquemia, tratados apenas com LDE/3H⁺:** Este grupo foi constituído por animais saudáveis, sem lesão cortical induzida, tratados apenas com a emulsão LDE/3H⁺ (n = 18), na dose de 200 microlitros (480.000 cpm). Sete dias após o tratamento, foram sacrificados, para averiguar a presença da partícula LDE/H⁺ no encéfalo dos animais com a BHE íntegra;
- **Grupo 2 - Animais isquêmicos, tratados apenas com LDE/3H⁺:** Este grupo foi constituído por animais isquêmicos (n = 5) tratados, 24 após a lesão induzida pela ET-1, com administração parenteral da emulsão LDE/3H⁺, na dose de 200 microlitros (480.000 cpm). Sete dias após o tratamento, os animais foram sacrificados com overdose anestésica para averiguar o comportamento da nanoemulsão, diante da BHE associada à lesão cerebral isquêmica.

II ETAPA: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CONJUGADO LDE/MTX SOBRE A ÁREA DE ISQUEMIA

- **Grupo 3 - Animais isquêmicos tratados com cLDE/MTX:** Este grupo foi constituído por animais isquêmicos tratados, 4 horas após a lesão, com emulsão cLDE/MTX(1mg/Kg) por intravenosa (N=5), e perfundidos 7 dias após a indução isquêmica para averiguar os possíveis efeitos do conjugado LDE/MTX sobre a área de isquemia.

2.4 MÉTODO DE PREPARO DO LDE

A nanopartícula LDE é um análogo da LDL (Low-density Lipoprotein), idealizada pelo prof. Raul Cavalcante Maranhão, do Laboratório de Metabolismo de Lipídios do InCor / FMUSP, com estudos que apresentam particular relevância na doença vascular coronariana e em alguns tipos de câncer sistêmico (COUTO *et al.*, 2007; MARANHAO *et al.*, 2008; VINAGRE *et al.*, 2007). A nanoemulsão LDE é passível de ser conjugada a agentes terapêuticos (anti-inflamatórios, antineoplásicos, neuroprotetores) e já mostrou ser muito eficiente como veículo para transportar quimioterápicos (paclitaxel, etoposídeo, BCNU), levando a tratamentos com toxicidade bastante reduzida, quando comparada à terapia convencional, utilizando somente o agente não conjugado (MARANHAO *et al.*, 2002; MELLO *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011; TAVARES *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A preparação pode ser obtida de uma mistura composta de 40 mg de colestiriloleato, 20 mg de fosfatidilcolina de ovo, 1 mg de trioleína e 0,5 mg de colesterol. A emulsificação de lipídios é feita por irradiação ultrassônica prolongada em meio aquoso, procedimento em dois passos, utilizando, ainda, a ultracentrifugação (3700 rpm, 20 minutos) da emulsão original com ajustes de densidade pela adição de brometo de potássio (KBr). A nanoemulsão lipídica é dialisada com solução Tris (pH 8,05), passada em filtro de 0,22 µm para ser esterilizada e utilizada em experimentos. O tamanho médio das nanopartículas é verificado por analisador de nanopartículas Zeta (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) a 25° C e armazenada em tubos estéreis, apirogênicos, a 4°C (MARANHAO *et al.*, 1993).

2.5 BIODISPONIBILIDADE DA LDE NO ENCÉFALO

Buscando estimar o comportamento da LDE diante da BHE, empregaram-se as nanopartículas LDE sinalizadas com lípidos radioativos triciados ($^3\text{H}^+$), administrando a nanoemulsão marcada por via parenteral, em dose única estandarizada (200 microlitros ~ 480.000 cpm) em 29 animais. Após 24 horas, os animais receberam injeção letal, sendo prontamente perfundido com solução salina, sem paraformaldeído, com retirada dos principais órgãos (grupo I, ratos 1 a 7) e, a partir do oitavo roedor, foram retirados apenas o encéfalo, o fígado e o músculo reto abdominal direito para estudo, os quais foram limpos e acondicionados

em solução fisiológica gelada, para, logo em seguida, serem pesados e macerados por material obtuso (pilão), até adquirirem aspecto pastoso.

O processamento das amostras incluiu a adição de 10 mL de metanol (Merck), sendo, então, agitadas em vortex. A seguir, foram adicionados 20 mL de clorofórmio (Merck), e o composto foi enviado para repouso noturno resfriado a 4° C, para separar os componentes lipídicos da fase aquosa – a técnica para extração do colesterol livre e esterificado (método de Folch, 1957). Em seguida à extração lipídica, as amostras foram filtradas e receberam tratamento com solução contendo 5 mL de clorofórmio e 7 mL de água destilada, sendo levadas novamente ao repouso noturno resfriado. A seguir, adicionaram-se ao infranadante 4 mL da solução de Folch (Clorofórmio/Metanol/H₂O), na proporção de 3:48:47, seguido de novo repouso noturno resfriado.

Na última etapa do procedimento, o material resultante do processamento descrito acima foi acondicionado em tubos de ensaio estéreis e cuidadosamente inseridos em isopores contendo gelo seco, sendo, então, transportados até o laboratório de lipídes do InCor/FMUSP. No laboratório, as amostras foram transferidas para tubos de cintilação secos por evaporação total dos solventes (Speed Vac[®], Thermo Scientific), sendo, então, homogeneizados com 5 mL da solução cintiladora (Ultima Gold XR, Perkin Elmer). Finalizando o procedimento, a radioatividade foi medida no espectrômetro de cintilação líquido (*Liquid Scintillation Analyzer*, 1600TR Tri-Carb, Packard), sob a utilização Speed STAR Plus Vers. 5.01 da Diamond Computers, e os valores tabulados em planilha do Excel (Microsoft[®], 2016), para avaliação ulterior.

2.6 TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX

Para testar se o conjugado LDE/MTX possui efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios após uma isquemia cortical, os animais dos grupos 3 e 4 foram submetidos a microinjeções corticais de ET-1, conforme protocolo utilizado no laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental da UFPA (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2016; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008). Quatro horas após a indução isquêmica, animais do grupo 3 (N = 5) receberam, pela veia caudal, o conjugado LDE/MTX (1 mg/Kg). Os animais do grupo 4 receberam apenas a LDE tritiada (N=5). Sete dias após a indução

isquêmica, foram submetidos à eutanásia, já que, neste modelo experimental, o pico de neuroinflamação na lesão cerebral isquêmica ocorre no 7º dia após a injeção de ET-1 (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; LOPES *et al.*, 2016; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008).

2.7 EUTANÁSIA E COLETA DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

No 7º dia após lesão isquêmica por ET-1, os animais foram examinados e anestesiados por via intraperitoneal, com uma overdose da mistura contendo cloridrato de cetamina (72 mg/Kg) e xilazina (9 mg/Kg). Uma vez constatada a parada cardiorespiratória, procedeu-se à toracotomia mediana, com exposição do saco pericárdico, o qual foi aberto para visualizar o coração e o átrio, sendo, então, realizadas auriculotomia e ventriculotomia esquerda, para inserção das cânulas de perfusão, as quais foram direcionadas até a porção inicial da aorta, procedendo-se à perfusão sistêmica com solução salina 0,9% heparinizada, seguida pelo fixador paraformaldeído a 4%. Os encéfalos foram dissecados e posfixados por 24 horas, utilizando-se o mesmo fixador utilizado na etapa de perfusão.

Após abertura da calota craniana, os encéfalos foram inspecionados, identificando-se o local da punção cortical no córtex frontal direito (Figura 17), e a seguir removidos em bloco após secção das estruturas anatômicas preensoras dos mesmos a caixa craniana. Após lavagem com soro fisiológico corrente, os mesmos foram inseridos em tubos plásticos estéreis para processamento e extração lipídica (Figura 18), a qual era precedida por etapas sequenciais de posfixação e crioproteção utilizando o seguinte protocolo: a) solução crioprotetora a 25% (30 minutos); b) solução crioprotetora a 50% (4 – 6 horas); c) solução crioprotetora a 100% (24 – 48 horas).

Figura 17 – Encéfalo com área de hemorragia cortical puntiforme indicando o local da injeção de ET-1



Fonte: Elaboração própria, 2017.

Figura 18 – Encéfalo no interior do tubo estéril para proceder a extração lipídica



Após a crioproteção, o tecido foi congelado em gel de imersão para criostato (Tissue Tek) a -55°C em criostato provido de efeito Peltier (Carl Zeiss, Mícron, Alemanha). Secções coronais do encéfalo com espessura de $20\ \mu\text{m}$ foram obtidas. Sendo que algumas secções de $50\ \mu\text{m}$ também serão coletadas para colorações de rotina. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por período mínimo de 24 horas, sendo guardadas em *freezer* a -20°C , para posterior imunistoquímica e demais procedimentos de interesse.

2.8 HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação de cortes histológicos das áreas encefálicas por meio de colorações específicas é um método bastante eficiente para averiguar as características da lesão induzida, permitindo, assim, avaliar os efeitos do tratamento realizado.

2.8.1 Identificação da Área da Lesão

A área correspondente à lesão isquêmica foi visualizada nos cortes com espessura de $50\ \mu\text{m}$, previamente corados pela técnica de Nissl ou pela coloração para hematoxilina-eosina. A

zona de injeção de ET-1 foi reconhecida pela presença do corante azul de Colanyl (Colanyl Blue A2R 500[®], Clariant International LTD. Muttenz, Switzerland) e pela palidez macroscópica, característica das áreas com ausência de corpos neuronais e / ou necrose tecidual, comumente observadas em lesões cerebrais isquêmicas induzidas pela ET-1. As células do processo isquêmico foram visualizadas por imunistoquímica, utilizando anticorpos marcadores de neurônios, micróglia, astrócitos e de apoptose, conforme descrito na seção seguinte.

2.8.2 Protocolo de Imunoistoquímica

Na presente investigação experimental foram utilizados os seguintes Anticorpos:

- a) Anti-NeuN (1:100, Chemicon): Marcador de neurônios maduros. Reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios diferenciados (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992);
- b) Anti-Iba1 (1:1000, Wako): Marcador geral de micróglia/macrófago. Reconhece uma proteína quelante de cálcio expressa exclusivamente em micróglia (ITO *et al.*, 1998);
- c) Anti-ED-1 (Serotec[®], 1:200): Marcador de micróglia/macrófagos ativados. Marca um epítipo na membrana de lisossomas de macrófagos ativados (DIJKSTRA *et al.*, 1985);
- d) Anti-GFAP (Dako, 1:1000): Proteína ácida fibrilar glial. Marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL *et al.*, 2004);
- e) Anti-caspase-3 (1:200; Promega, anti-active[®]): marcador clássico de apoptose (GOMES-LEAL *et al.*, 2006).

Esse protocolo de reconhecimento celular utilizando imunistoquímica aplicado em estudos prévios de isquemia cortical induzida por ET-1 (GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL *et al.*, 2004; GOMES-LEAL; CORKILL; PICANCO-DINIZ, 2005b). As lâminas gelatinizadas previamente montadas com as secções do encéfalo correspondendo às áreas isquêmicas foram retiradas do *freezer* e secas na estufa, por 30 minutos, a 37°C, e lavadas em PBS (tampão fosfato salina), sob agitação constante por 5 minutos, para, em seguida, serem imersas em tampão borato (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear[®]) a 65°C, durante 20 minutos, e resfriadas na mesma

solução, em temperatura ambiente, pelo mesmo período de tempo 1 (GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL *et al.*, 2004; GOMES-LEAL; CORKILL; PICANCO-DINIZ, 2005b).

Na sequência, as secções foram lavadas novamente em PBS, por 5 minutos, e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck®) (1 mL de peróxido de hidrogênio/100mL de metanol), para inibir a peroxidase endógena das células do tecido analisado. A partir daí, foi iniciado o processo imunoistoquímico propriamente dito, no qual as secções foram novamente lavadas em PBS, desta vez, com solução de PBS/Tween® (5 minutos), e incubadas em soro normal de cabra (anticorpo anti-Iba1, anti-GFAP and anti-caspase-3) ou soro normal de cavalo (para marcação com anti-ED1, anti-NeuN e anti-GFAP), ambos em diluição de 10%, durante 1 hora. Após esse período, as secções foram incubadas em anticorpo primário, durante uma noite, de acordo com a diluição previamente mencionada.

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PBS/Tween®, 5 minutos) e incubadas em anticorpo secundário biotilado anticoelho feito em cabra (1:200; Iba1), anticamundongo feito em cavalo (1:100; ED1 e NeuN), por 2 horas. Uma hora antes do término da incubação no anticorpo secundário, foi preparada a solução de ABC (avidina-biotina-peroxidase - kit ABC dos laboratórios Vector®) e esta permaneceu em repouso até sua utilização. Após nova lavagem, as secções foram incubadas no ABC por mais 2 horas. Em seguida, quatro novas lavagens (PBS/Tween®, 5 minutos) foram feitas para posterior revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich) e, ao final, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas entre lâmina e lamínula.

2.9 ANÁLISE QUALITATIVA

Com o intuito de identificar, avaliar e caracterizar as modificações nos constituintes celulares existentes nas amostras submetidas a tratamento com ET-1 e LDE/MTX, todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e imunoistoquímicos foram inspecionadas com microscópio óptico (Nikon® Eclipse 50i), para qualificar as alterações decorrentes do tratamento, com relevância especial para as áreas isquêmicas contidas nos encéfalos tratados. Para tal, as imagens de secções contendo campos isquêmicos mais evidentes foram identificadas no encéfalo dos animais submetidos à isquemia, selecionadas com auxílio do programa de computador Motic® 2.5 e registradas com Câmara Digital acoplada ao microscópio óptico.

2.10 ANÁLISE QUANTITATIVA

A avaliação quantitativa do número células NeuN+ (neurônios), macrófagos/micróglia (Iba1 ou ED+) ativados utilizou objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm² acoplada à ocular de microscópio óptico (Nikon® – Eclipse 50i), contando 3 secções por animal, 3 a 4 campos por secção. Para NeuN+, quantificaram-se quatro campos de contagem na periferia da área de lesão primária: dois campos laterais e dois campos mediais em relação ao centro do infarto. Para células microgliais Iba1+, contaram-se três campos não sobrepostos no centro do infarto, pois é nesta região que se encontra o maior número de fagócitos, contando-se apenas células arredondadas Iba1+ (macrófagos), para determinar quantitativamente o efeito do cLDE/MTX no aspecto morfológico de maior ativação microglial em células arredondadas (macrófagos).

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados histológicos dos animais perfundidos foram avaliados com parâmetros de estatística descritiva média, erro padrão e desvio padrão para todos os dados quantitativos. Foi utilizado o teste T de Student para amostras não pareadas para a comparação entre os grupos LDE não conjugado e não conjugado com MTX. O nível de significância foi de $p < 0.05$ = significativo e $p < 0.01$ = altamente significativo. Utilizaram-se os programas Microsoft Excel e GraphPad Prism (5.0) para a análise estatística e a confecção dos gráficos. Para análise da biodisponibilidade de LDE/3H⁺ e de LDE/MTX no encéfalo dos animais, utilizaram-se os testes não paramétricos U de Mann-Whitney, Kruskal-Willis e análise do Coeficiente de Correlação. Em todos os dados disponíveis, aplicou-se, ainda, o teste prévio de normalidade.

3 RESULTADOS

Descrição do comportamento biológico da nanopartícula LDE frente à BHE na forma livre e conjugada ao agente MTX (LDE/MTX), e o efeito do conjugado LDE/MTX sobre áreas de isquemia cortical induzida.

3.1 LDE TRICIADO ATRAVESSA A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

Na primeira fase do estudo, foi investigado o comportamento da partícula LDE triciada diante da BHE, nos animais sham, em que se encontra íntegra, enquanto nos animais submetidos à isquemia pela ET-1, o processo inflamatório altera as propriedades fisiológicas da barreira. Ao analisar as amostras tissulares do encéfalo por meio da cintilografia, a partícula LDE foi detectada em todos os animais avaliados (Tabela 2 a Tabela 4). Observando as concentrações relativas da partícula nas amostras, identificou-se a apresentação de um padrão uniforme de distribuição em áreas distintas do encéfalo (hemisférios, cerebelo e tronco cerebral) em ambos os grupos, com discreto predomínio das concentrações de LDE no tronco encefálico ($p < 0.05$) nos animais sham do grupo I.

O padrão das concentrações relativas da partícula LDE encontrada nos diversos órgãos dos animais seguiu aquelas descritas em estudos prévios (MARANHÃO et al., 1993; POZZI et al., 2015), com evidente preponderância de captação da partícula pelo fígado em um extremo, e no outro extremo, os menores valores detectados correspondem ao músculo reto abdominal e ao encéfalo (Tabela 2 a Tabela 4). Finalmente, as concentrações relativas da partícula LDE detectada nos animais (Gráfico 4) sham demonstravam concentrações variáveis, mas destituídas de significância estatística em relação àquelas encontradas nos animais isquêmicos ($p < 0.05$), sugerindo que a lesão cerebral focal induzida pela ET-1 no córtex frontal, aparentemente, não altera a maneira de distribuição da partícula.

Tabela 2 - Amostragem comparativa da biodisponibilidade da LDE em diferentes áreas do encéfalo de ratos wistar na ausência de lesão isquêmica - Captação LDE/g de tecido (%)

ANIMAL	ET-1	Hemisf D	Hemisf E	Cerebelo	TC	Músculo	Fígado
R1	+	0,21	0,16	0,34	0,41	0,81	17,79
R2	+	0,13	0,12	0,16	0,12	2,5	9,34
R3	-	0,053	0,043	0,195	0,044	0,421	3,036
R4	-	0,11	0,1	0,09	0,1	2,83	10,04
R5	+	0,99	0,76	0,8	1,18	1,54	95,74
R6	+	1,18	1,45	1,78	1,5	1,62	92,47
R7	+	1,89	2,17	3,77	1,83	3,54	86,81

Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: ET-1 = Endotelina-1; TC = Tronco Cerebral.

Tabela 3 - Grupo 1: Animais *sham* tratados com LDE/3H+ (n = 18).

Animal	Encéfalo	Músculo	Fígado
1	35	144	9450
2	36	37	9926
3	74	137	9789
4	35	116	9847
5	61	132	9807
6	15	154	8304
7	80	55	9864
8	77	156	9767
9	33	29	9957
10	14	517	9469
11	41	81	1779
12	16	250	934
13	19	42	3035
14	10	283	1004
15	12	154	9574
16	18	162	9247
17	38	354	8681
18	42	20	2238

Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Níveis de radioatividade detectados (cpmb / grama tecido)

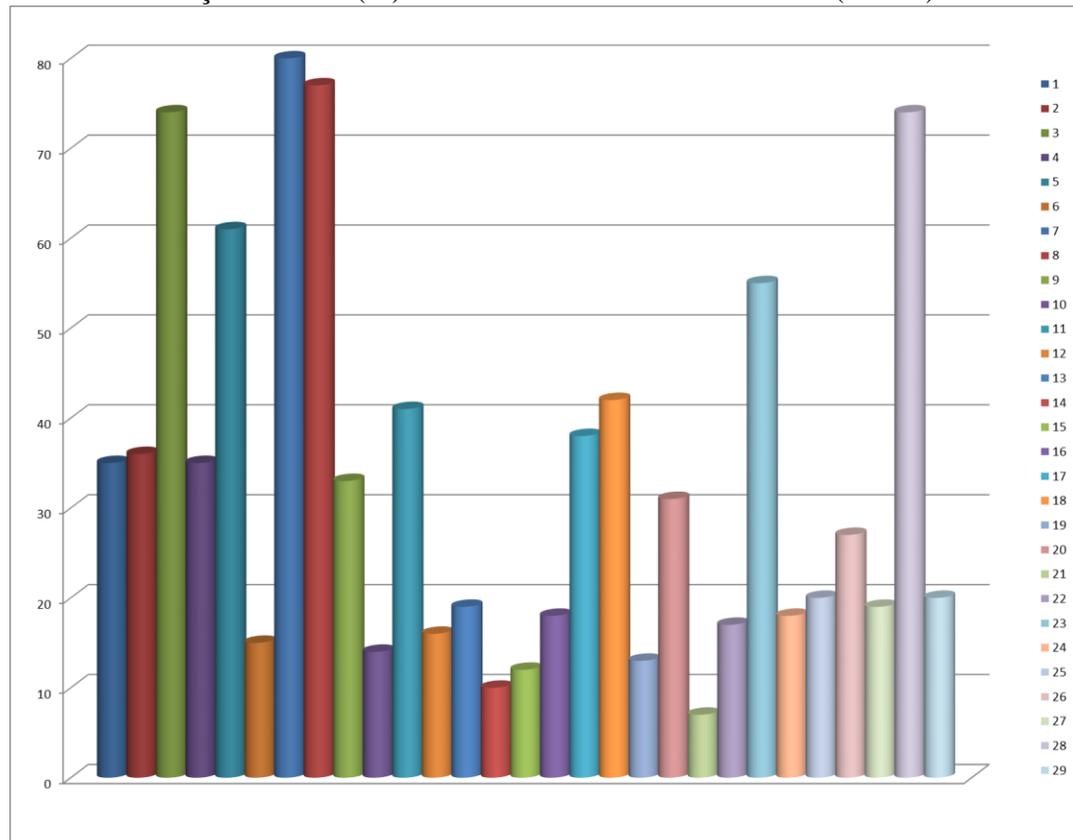
Tabela 4 - Grupo 2: Animais isquêmicos tratados com LDE/3H⁺ (n = 10).

Animal	Encéfalo	Músculo	Fígado
19	13	7	550
20	31	11	812
21	7	27	652
22	17	24	719
23	55	22	2423
24	18	25	1578
25	20	31	2159
26	27	18	668
27	19	21	827
28	74	26	442
29	20	68	2540

Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Níveis de radioatividade detectados (cpmb / grama tecido)

Gráfico 4 - Detecção relativa (%) de LDE no encéfalo dos animais (n = 29)

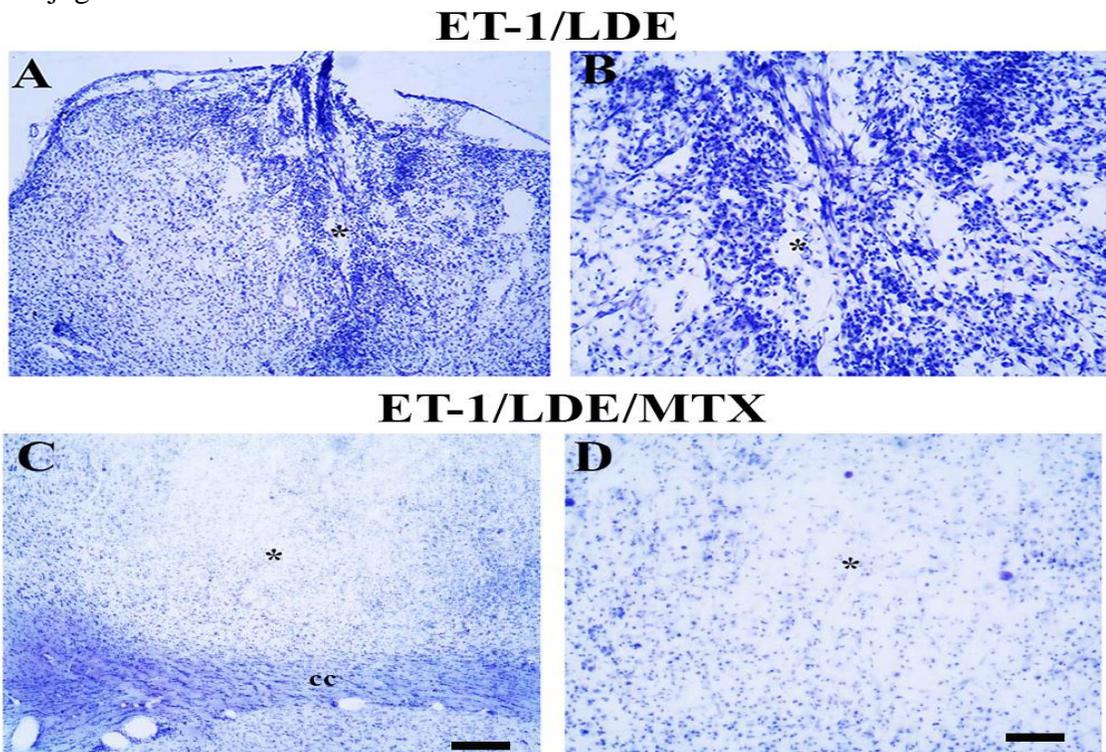


Fonte: Elaboração própria, 2017.

3.2 O TRATAMENTO COM LDE/MTX NÃO REDUZ A ÁREA DE INFARTO PRIMÁRIO, MAS REDUZ O INFILTRADO INFLAMATÓRIO ASSOCIADO À ISQUEMIA CORTICAL INDUZIDA PELA ET-1

Nesta etapa, foi investigada a influência do conjugado LDE/MTX sobre o padrão lesivo isquêmico induzido pela ET-1, incluindo o infiltrado inflamatório e a área de infarto resultante nos animais tratados com o conjugado LDE-MTX ou naqueles controles que só receberam a LDE. Os resultados mostraram que os animais isquêmicos tratados com LDE sem o agente MTX apresentaram a lesão isquêmica clássica, com predomínio de células mononucleares na área lesada, indicando que a partícula LDE não possui efeito anti-inflamatório (Figura 19). Por outro lado, os animais tratados com o conjugado LDE/MTX apresentaram significativa redução na intensidade da inflamação, sendo que os dois grupos apresentaram áreas de infarto muito semelhantes, sugerindo que o MTX não possui ação sobre a área de isquemia primária.

Figura 19 - Área de infarto em animais isquêmicos tratados com LDE livre (A-B) e com o conjugado LDE/MTX.



Fonte: Elaboração própria, 2017.

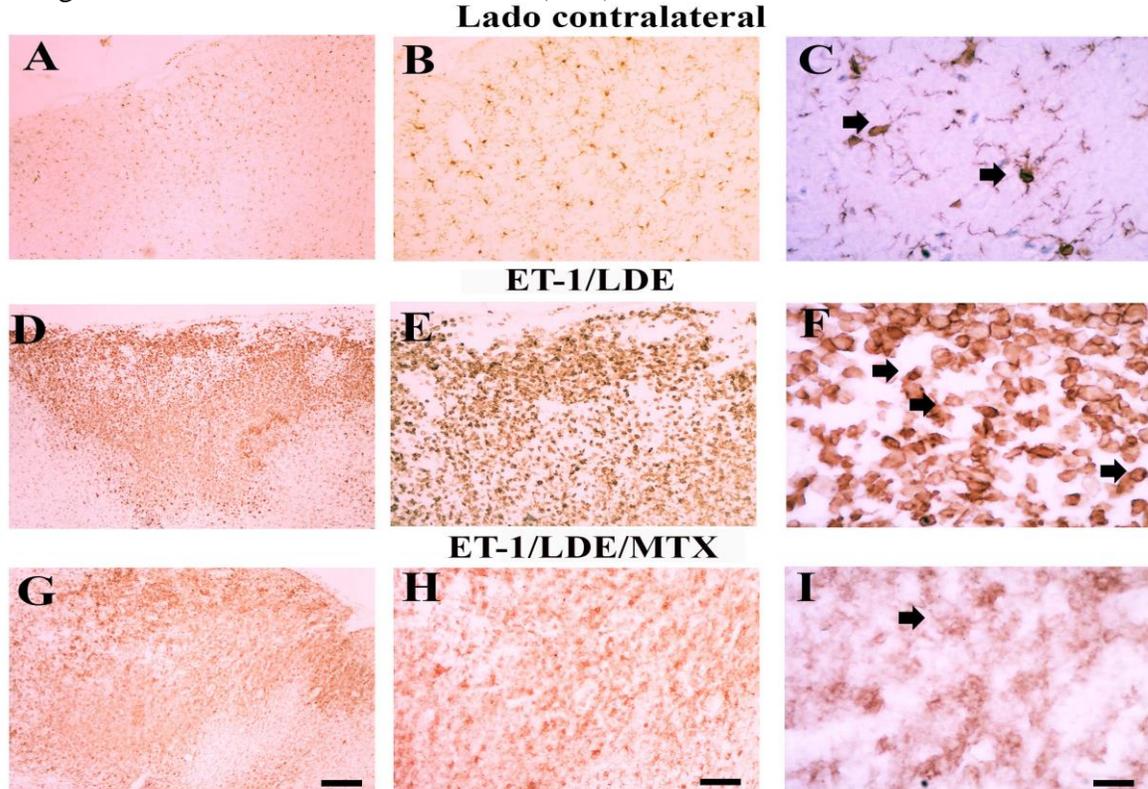
Nota: Asterisco indica área central típica do infarto induzido pela ET-1. Em ambos os grupos, a área de infarto não foi alterada, mas houve diminuição do infiltrado inflamatório no grupo tratado com o conjugado LDE/MTX (C-D). Escalas: A, C: 200 μ m; B, D: 80 μ m.

3.3 O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX DIMINUI A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MICROINJEÇÕES DE ET-1.

O efeito do conjugado LDE/MTX sobre a ativação microglial foi verificado pela marcação da microglia ativada e não ativada com um marcador específico de micróglia, o anticorpo Iba1 (ITO *et al.*, 1998) (Figura 20). Nos animais isquêmicos e tratados apenas com a LDE livre, foi encontrada intensa ativação microglial, predominando micróglia arredondada, com morfologia de fagócito no centro da lesão isquêmica, enquanto na periferia observou-se predomínio de micróglia com aspecto ameboide (Figura 20 D–F). Por outro lado, animais tratados com cLDE/MTX tiveram considerável diminuição da ativação microglial (Figura 20 G–I), da micróglia arredondada e da ameboide, indicando que o MTX é potente inibidor microglial, ainda que destituído de efeitos sobre a área primária de infarto (violeta de cresila).

Tal desfecho permite inferir que o conjugado LDE/MTX possui expressiva influência inibitória sobre a inflamação que acompanha a isquemia cerebral induzida por ET-1, interferindo nas células microgliais, demonstrada pela menor ativação das mesmas no grupo de animais tratados com o conjugado LDE/MTX. Este resultado é ratificado pela análise quantitativa (Gráfico 5), onde se observa que o número de células arredondadas Iba1 + (fagócitos) encontradas foi estatisticamente menor nos animais tratados com o conjugado LDE/MTX (6.55 ± 1.28), comparado com animais controle, tratados apenas com a LDE livre (67.17 ± 4.19) (Figura 20, $P < 0.01$).

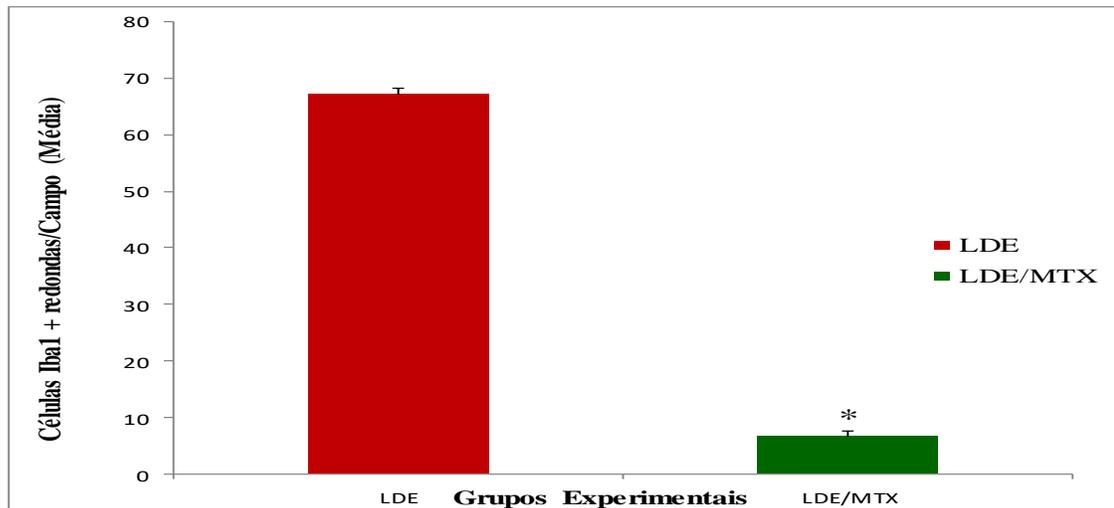
Figura 20 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a ativação microglial (células Iba1+).
 Micrógliã não ativada no lado contralateral (A-C).



Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Animais isquêmicos tratados com LDE (D-F) ou com o conjugado LDE/MTX (G-I). O conjugado LDE/MTX diminui intensamente a ativação microglial. B-C, E-F, H-I são aumentos progressivos de A, D, G, respectivamente. As setas apontam para micrógliã redonda (fagócitos) Iba⁺⁺. Escalas: A, D, E: 200 μ m; B, E, H: 80 μ m; C, F, I: 80 μ m.

Gráfico 5 - Quantificação do número de células microgliais ativadas arredondadas (fagócitos).



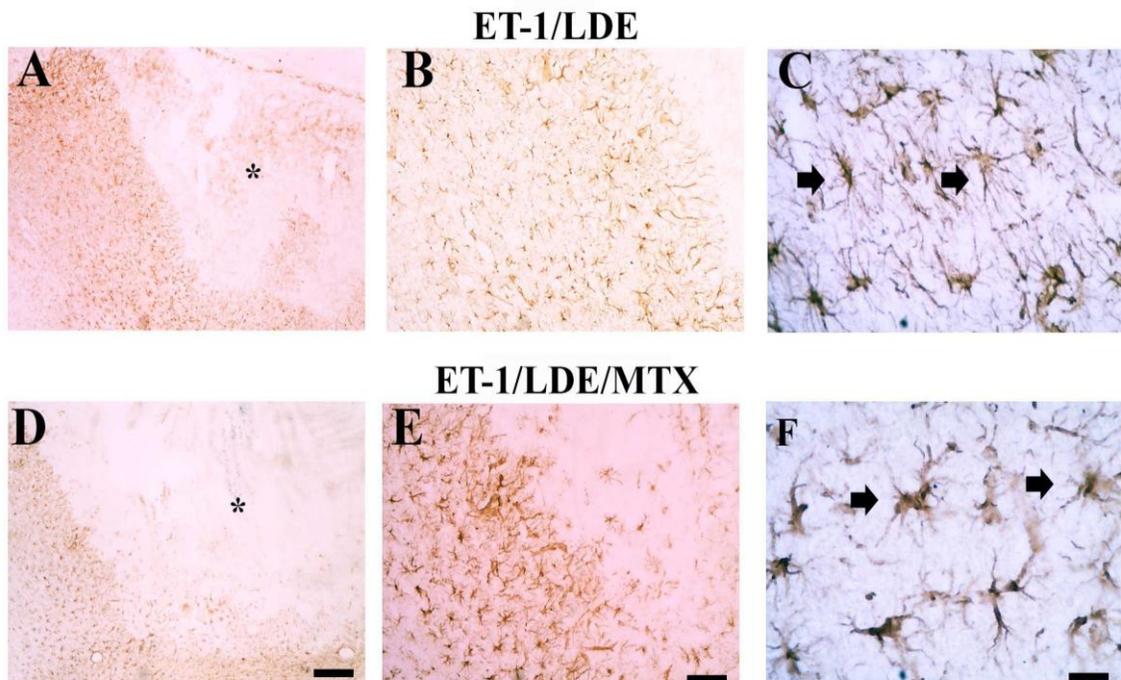
Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Houve intensa diminuição da ativação microglial (* $P < 0.01$, teste t de Student não pareado).

3.4 O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA A ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR ET-1

A avaliação do efeito do conjugado LDE/MTX sobre a astrocitose no modelo de isquemia cortical induzida por ET-1 empregou a técnica de imunohistoquímica com a Proteína Glial Fibrilar Ácida (Glial Fibrillary Acidic Protein - GFAP), marcador clássico para astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004). Nos animais isquêmicos tratados apenas com a LDE não conjugada, observou-se a ausência de astrócitos no centro da lesão, mas uma marcante astrocitose (astrócitos ativados) nas margens da isquemia (Figura 21 A, B e C). Um padrão similar de astrocitose foi encontrado nos animais tratados com o conjugado LDE/MTX (Figura 21 D-F), indicando que o MTX não possui efeito significativo sobre a astrocitose. Neste método, não foi quantificado o número de astrócitos, já que o padrão de reatividade mostrou-se similar em todos os animais.

Figura 21 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a ativação de astrócitos (células GFAP+). Animais isquêmicos tratados com LDE (A-C) ou com o conjugado LDE/MTX (D-F).



Fonte: Elaboração própria, 2017.

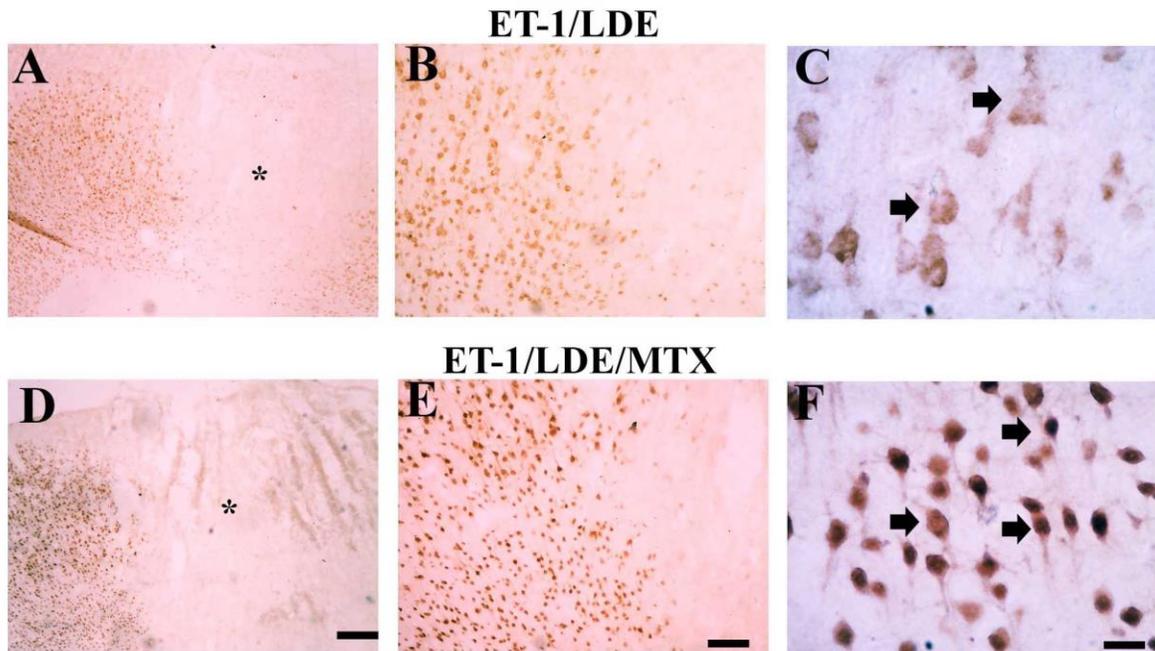
Nota: Não houve diferença no padrão de astrocitose nos dois grupos. B-C, E-F são maiores aumentos de A, D, respectivamente. O asterisco demarca o centro da lesão. As setas apontam para astrócitos GFAP+. Escalas: A, D: 200 μ m; B, E: 80 μ m; C, F: 20 μ m.

3.5 O TRATAMENTO COM CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA A ÁREA PRIMÁRIA DE INFARTO, MAS INDUZ PRESERVAÇÃO NEURONAL NA PERIFERIA DA LESÃO

Nesta etapa do estudo, foi investigada a influência do conjugado cLDE/MTX sobre a preservação neuronal na área isquêmica, após microinjeções focais de ET-1. Em geral, a quantidade de células encontradas no centro das lesões isquêmicas induzidas costuma ser bastante reduzida ou até mesmo ausente nesses casos (Figura 22 D), não sendo constatada nenhuma diferença no padrão celular esperado, ao se avaliar a área de lesão isquêmica primária dos animais tratados com o conjugado LDE/MTX e naqueles espécimes tratados apenas com LDE livre, não conjugada (Figura 22 A-D). Não obstante, nas áreas mais periféricas das lesões (penumbra), pode-se observar maior preservação de corpos celulares (Figura 22 E-F), fato que foi confirmado por meio da análise quantitativa (Gráfico 6).

Do mesmo modo, tal desfecho permite inferir a existência de um efeito neuroprotetor expressivo do conjugado LDE/MTX nas áreas mais periféricas (penumbra) da isquemia cortical induzida pela ET-1, uma vez que a contagem do número de células NeuN+ revelou que os animais tratados com o conjugado LDE/MTX apresentaram maior número de corpos neuronais por campo (60.28 ± 1.37), quando comparado com aqueles animais que foram tratados apenas com o LDE não conjugado (18.86 ± 0.88) (Figura 22, $P < 0.01$). A presença de uma população superior de corpos neuronais em áreas periféricas dos animais tratados com o conjugado cLDE/MTX depreende uma ação protetora do agente MTX sobre os neurônios existentes na área de hipóxia, por um mecanismo ainda desconhecido.

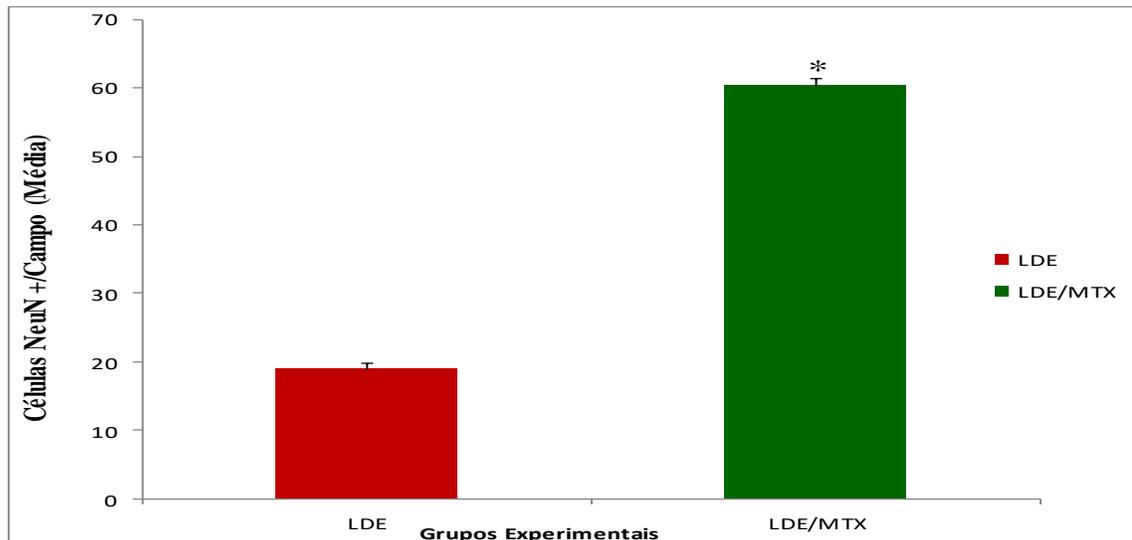
Figura 22 - Efeito do conjugado LDE/MTX sobre a preservação neuronal (células NeuN+) após lesão isquêmica do córtex motor.



Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Animais isquêmicos tratados com LDE (A-C) ou com o conjugado LDE/MTX (D-F). O tratamento com o conjugado LDE/MTX aumentou a preservação neuronal (D-F). O asterisco demarca o centro da lesão. As setas apontam para corpos neuronais NeuN+. Escalas: A, D: 200 μ m; B, E: 80 μ m; C, F: 20 μ m.

Gráfico 6 - Quantificação do número neurônios na periferia do infarto (Células NeuN).



Fonte: Elaboração própria, 2017.

Nota: Houve considerável preservação neuronal na periferia do infarto (* $P < 0.01$, teste t de Student não pareado).

4 DISCUSSÃO

A presença da nanopartícula LDE no encéfalo de todos os animais tratados infere que a mesma seja dotada de características que a habilitem a atravessar a BHE. Ainda que conjugada ao agente MTX, a mesma se revela eficiente para alcançar a área de neuroinflamação induzida pelo evento isquêmico acarretado pela injeção de ET-1.

4.1 O CONJUGADO LDE/MTX ATRAVESSA A BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E PODE VEICULAR DE MODO MAIS EFICAZ AGENTES NEUROPROTETORES

Na primeira etapa da investigação, procurou-se avaliar o comportamento da nanopartícula lipídica LDE diante da BHE. Para tal, essa nanopartícula foi marcada com trício (trício; τρίτος - *trítos*), um isótopo radioativo do Hidrogênio (H^3) emissor de partículas β radioluminescentes, bastante empregado em Química Analítica como radiomarcador de substâncias para análise de biodisponibilidade de partículas triciadas para detecção por cintilografia líquida (HERBERG, 1960). Isso se fez necessário já que a condição *sine qua non* para o sucesso do tratamento do SNC é, precisamente, a existência da BHE, que impede a difusão da maioria (>95%) das substâncias injetadas pela corrente sanguínea de atingir o âmago do tecido nervoso, no qual exercerá seu efeito terapêutico.

Injetada por via intravenosa (veia caudal), a LDE pode ser detectada em todas as amostras estudadas (n=29), indicando, assim, que essa nanopartícula possui os requisitos necessários para atravessar a BHE, corroborando, então, a investigação posterior para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do Metotrexato, quando conjugado com a nanopartícula (cLDE/MTX), no modelo de isquemia cerebral focal induzida por microinjeções de ET-1. A detecção da LDE em animais saudáveis, não submetidos ao procedimento cirúrgico para a lesão cortical isquêmica pela ET-1, indica que, diante de condições patológicas (infarto cerebral, neoplasias, abscessos), em que existe uma ostensiva ruptura da BHE, a partícula pode apresentar uma distribuição bem mais significativa ainda (BULGARELLI *et al.*, 2013; KRETZER *et al.*, 2016; LEITE *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2013; OCCHIUTTO *et al.*, 2016; POZZI *et al.*, 2015).

Estudos prévios utilizando modelo experimental de artrite e arteriosclerose em coelhos demonstraram que o conjugado cLDE/MTX é mais eficaz que o MTX isolado para

induzir efeitos anti-inflamatórios (BULGARELLI *et al.* 2013; MELLO *et al.*, 2013). Esses achados respaldaram o emprego deste conjugado no presente modelo experimental, em que se observou um efeito atenuador do cLDE/MTX no processo inflamatório habitualmente encontrado em áreas de isquemia induzida por ET-1, sugerindo um acesso facilitado do MTX pela conjugação à LDE, em razão de suas características intrínsecas, que a habilitam como estrutura compatível para atravessar a BHE, consignando que o exato mecanismo pelo qual a LDE atravessa a BHE ainda requer investigações adicionais, em estudos futuros.

Adicionalmente, pode-se constatar, também, que os animais submetidos à isquemia focal por microinjeções de ET-1 no córtex motor, seguido do tratamento com cLDE/MTX ou somente com a LDE livre, sofreram uma característica lesão isquêmica focal, ocupando quase todas as camadas da substância cinzenta cortical, semelhante aos achados encontrados em estudos prévios, utilizando o mesmo modelo experimental (FRANCO *et al.*, 2012). Aqui, como esperado, as lesões se fizeram acompanhar por conspícua área de infarto, perda neuronal e intensa ativação microglial e astrocitose, e o tratamento com cLDE/MTX não foi capaz de reduzir a área primária de infarto nem a astrocitose, entretanto induziu preservação neuronal na periferia da lesão, inibindo, de maneira notória, a intensidade da ativação microglial.

4.2 O CONJUGADO LDE/MTX NÃO DIMINUI A ÁREA PRIMÁRIA DE INFARTO, MAS INDUZ NEUROPROTEÇÃO NA PERIFERIA DA LESÃO

No tocante à área primária de infarto (centro ou core), constatou-se que os animais tratados com cLDE/MTX não apresentam alterações no padrão clássico de isquemia cortical induzidas pela ET-1. Essa área central representa a área primária de infarto correspondente ao território irrigado majoritariamente pelo(s) vaso(s) ocluído(s) após a microinjeção intracerebral de ET-1, que corresponde à mesma área primária de infarto encontrada nos acidentes encefálicos isquêmicos de humanos (MERGENTHALER; DIRNAGL; MEISEL, 2004; MERINO; WARACH, 2010). Neste caso, deduz-se que o conjugado não sofre difusão até a área primária em virtude da interrupção do(s) vaso(s) nutridor (es) principal(is) e/ou pela paucidade de circulação colateral existente na área, fato observado também em infartos cerebrais humanos.

Em razão disso, esta é a região em que, tradicionalmente, a morte celular ocorre de modo mais exuberante e rápido, coincidindo, ainda, com o território em que se observa a taxa

mais modesta de recuperação, explicando, em parte, o porquê da ineficiência de agentes neuroprotetores experimentais para restaurar o tecido lesado. Em contrapartida, nas margens do core (penumbra), existe uma irrigação colateral garantida pela rede anastomótica dos capilares arteriais, que possibilita uma nutrição mínima na região do infarto. Isso determina que a intensidade do dano seja bem menor, por manter a área minimamente oxigenada, viabilizando a sobrevivência celular da região, além de permitir o acesso de agentes neuroprotetores dotados da habilidade de limitar a extensão do dano.

Ainda que ambos os grupos experimentais, i.e, animais isquêmicos tratados apenas com LDE e animais que receberam cLDE/MTX, não tenham apresentado alterações na área primária de infarto, o grupo que recebeu o conjugado cLDE/MTX, em contraste, apresentou significativa preservação celular nas áreas mais periféricas da lesão isquêmica (penumbra), sugerindo a existência de efeito neuroprotetor do MTX em ambientes com suprimento mínimo de O₂ capazes de evitar apoptose, o resultado natural da degeneração secundária por acidose metabólica, excitotoxicidade, estresse oxidativo e neuroinflamação. Neste contexto, é bastante provável que o mecanismo exitoso do MTX como agente neuroprotetor na isquemia cortical se desenrole no âmbito deste estado inflamatório do tecido nervoso (LO; DALKARA; MOKOWITZ 2003; LO; MOKOWITZ; JACOBS, 2005; LO; NING, 2016a).

Ainda que o(s) mecanismo(s) exato(s) por meio do(s) qual (is) o MTX proteja os neurônios na periferia do infarto seja(m) desconhecido(s), parece razoável acreditar que esse efeito ocorra – pelo menos em parte - por certas ações anti-inflamatórias classicamente conhecidas deste agente, como observadas em outros estados inflamatórios, tais como a artrite reumatoide, em que este análogo do folato inibe a proliferação excessiva de células imunes e limita a produção de citocinas. No caso do infarto cortical induzido por ET-1, as evidências indicam que a modulação da ativação micróglia seja o mecanismo de neuroproteção (CARDOSO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2012; HAMBY *et al.*, 2007; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), o que é de grande relevância clínica já representar promissora estratégia terapêutica.

O grande interesse do conjugado LDE/MTX como agente neuroprotetor justifica-se pelo fato da inexistência de medicamentos disponíveis com essas características para uso em humanos. A única substância utilizada no AVE isquêmico agudo é o tPA, um trombolítico ativador de plasminogênio tecidual recombinante, que possui uma janela terapêutica muito reduzida em termos temporais (deve ser utilizado em até 4 horas do início dos sintomas) (YEO *et*

al. 2013). Seu efeito neuroprotetor dá-se indiretamente, por restaurar a irrigação sanguínea nas áreas hipoperfundidas, algumas vezes, à custa de efeitos colaterais bastante desagradáveis, tais como a transformação hemorrágica da área originalmente isquêmica, complicação potencialmente fatal, que aumenta muito as chances de morte ou de sequelas permanentes (LINDGREN *et al.*, 1996; SAVER *et al.*, 2009).

Desde a descoberta de seus efeitos anti-inflamatórios (1948), o MTX tem sido muito utilizado em várias desordens orgânicas. Em baixas doses, mostra-se muito útil para inibir a atividade inflamatória presente em doenças do tecido conjuntivo, como artrite reumatoide, doença de *Crohn* e espondilite anquilosante. Quando utilizado em doses elevadas, é eficiente para controlar doenças proliferativas e certos tipos de câncer, tais como leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma, linfomas, câncer de mama, pulmão e bexiga (MELLO *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011). Em ambos os casos, o emprego desse agente origina, com frequência, uma grande variedade de efeitos colaterais em razão da toxicidade, principalmente sintomas gastrointestinais, mielossupressão e hepatotoxicidade, normalmente requerendo a interrupção do tratamento (CAMPBELL *et al.*, 2016).

Estudos investigativos buscando reduzir a toxicidade e incrementar a eficiência do MTX concluíram que combinar este agente à LDE poderia ser uma estratégia exitosa. De fato, essa associação apresentou efeitos bastante animadores, com redução da toxicidade aliada a um aumento simultâneo na eficiência da substância, conforme demonstrado no modelo de artrite induzida em coelhos, no qual uso do MTX comercial não conjugado demonstrou ser inferior ao tratamento com o conjugado cLDE/MTX para reduzir o infiltrado leucocitário (MELLO *et al.*, 2013). Outrossim, os resultados obtidos na presente pesquisa demonstraram que conjugar o MTX à LDE é eficiente para reduzir a neuroinflamação, protegendo neurônios e inibindo a ativação microglial na zona de penumbra isquêmica.

4.3 CONJUGADO LDE/MTX INIBE A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX MOTOR DE RATOS

Uma dos resultados mais expressivos da presente investigação foi demonstrar uma redução considerável da ativação microglial nos animais isquêmicos tratados com o cLDE/MTX. Nesses casos, foi constatada uma redução da micróglia arredondada Iba1+ - que representa o

aspecto morfológico mais fagocítico das células microgлияis - tanto no centro quanto na periferia da lesão, indicando um efeito anti-inflamatório do MTX sobre a área afetada. Esta ação moduladora da ativação microgлияl empregando o MTX acoplado à nanopartícula lipídica LDE está sendo descrita pela primeira vez, por esta pesquisa, e está em concordância com outros trabalhos que descrevem os efeitos anti-inflamatórios do conjugado cLDE/MTX em outros modelos experimentais sistêmicos (MELLO *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2011).

Investigações utilizando a minociclina, um antibiótico do grupo das tetraciclina (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), o anti-inflamatório não esteroide inibidor da ciclooxigenase, a indometacina (LOPES *et al.*, 2016), e a substância PJ34, potente inibidora da poli(ADP-ribose) polimerase, demonstraram que a inibição da ativação microgлияl induz neuroproteção efetiva na área isquêmica estriatal, induzida por ET-1 (LOPES *et al.*, 2016), fato que foi concomitante com o aumento da neurogênese endógena e a preservação neuronal, sem modificar a área primária de infarto. Por outro lado, o tratamento com a minociclina foi capaz de reduzir, consideravelmente, a área de infarto cortical e estriatal, utilizando o modelo experimental de oclusão da artéria cerebral média em ratos isquêmicos adultos (FRANCO *et al.*, 2012; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999).

A modulação da ativação microgлияl observada com o emprego do MTX possui analogia com os efeitos neuroprotetores dos agentes acima descritos. Apesar de as células microgлияis serem primariamente benéficas e neuroprotetoras após um insulto ao tecido nervoso (ex: isquemia), seus efeitos subsequentes podem ser, consideravelmente, prejudiciais, caso ocorra uma ativação permanente, excessiva e descontrolada, o que é comumente observado na isquemia cerebral (GOMES-LEAL, 2012). Nessas condições, as células microgлияis liberam quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico, radicais livres e outros compostos, todos dotados de grande toxicidade neuronal, induzindo essas células ao sofrimento e à apoptose (BURGUILLAS *et al.*, 2011; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; HAYAKAWA *et al.*, 2008; GOMES-LEAL, 2012).

Outro fator importante que participa da neuroinflamação ligada à isquemia do tecido nervoso é um mediador similar à citocina *high mobility group box 1* (HMGB-1), proteína de grupo diferente das histonas ligantes de DNA, liberada em grandes quantidades no meio celular, após eventos isquêmicos e contribui, sobremaneira, para o fenômeno de neuroinflamação e lesão secundária (KIM *et al.*, 2006). Altos níveis de HMGB-1 extracelular são vistos em lesões isquêmicas do encéfalo, e este mediador pode ser detectado em níveis elevados no sangue de

pacientes com AVEi, podendo vir a ser útil como marcador da doença (MUHAMMAD *et al.*, 2008). Um dos mecanismos neuroprotetores da minociclina ocorre inibindo a liberação extracelular de HMGB-1 pela micróglia, supondo-se que tal efeito protetor ocorra de modo similar com o emprego do MTX na isquemia cerebral (HAYAKAWA *et al.*, 2008).

4.4 O TRATAMENTO COM O CONJUGADO LDE/MTX NÃO ALTERA O PADRÃO DE ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL DO CÓRTEX MOTOR

Os astrócitos representam as principais células da glia e são os elementos mais numerosos do SNC, correspondendo a uma média de 2-7 astrócitos para cada neurônio (BUFFO; ROLANDO; CERUTI; 2010; PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014; PEKNY *et al.*, 2016). Essas células detêm inúmeras funções, incluindo seu papel relevante como um dos componentes da resposta inflamatória logo após lesões no SNC, participando ativamente nos processos de regeneração, de sinaptogênese e de reparo (MOLOFSKY *et al.*, 2014; TSAI *et al.*, 2012). Por esse motivo, a presente pesquisa investigou os efeitos do tratamento com cLDE/MTX sobre a astrocitose, já que essas células participam do crescimento axonal após lesão neural aguda, contribuindo para melhor ou pior recuperação do tecido (BARRITT *et al.*, 2006; BRADBURY *et al.*, 2002; BRADBURY; CARTER, 2011).

Apesar de a astrocitose e a gliose (cicatriz) não representarem um componente significativo para o padrão lesivo no presente modelo de lesão isquêmica utilizando a ET-1, considerando que astrócitos reativos podem ser encontrados esparsos e em pequenas quantidades na área de penumbra, julgou-se relevante investigar eventuais alterações nesses componentes da resposta inflamatória diante do conjugado cLDE/MTX, tendo sido constatado que a presença do MTX conjugado à LDE não influenciou o padrão de ativação astrocitária. Importante consignar a ausência de astrócitos no centro da lesão, já que, como era de se esperar, essas células morrem logo que se instala o processo isquêmico, conforme descrito nos modelos de lesão excitotóxica da medula espinal de ratos (GOMES-LEAL *et al.*, 2004).

Mesmo sabendo-se que a astrogliose (cicatriz glial) é considerada prejudicial para o correto crescimento dos axônios ao longo do tempo, sabe-se, também, que ela representa uma barreira conspícua para isolar o cérebro normal da lesão, impedindo o alastramento de fatores lesivos até o tecido adjacente, melhorando, assim, o prognóstico da agressão ao SNC. Por outro

lado, lembrando que astrócitos são os principais armazenadores do glutamato, principal neurotransmissor excitatório do SNC (ANDERSON; SWANSON, 2000; WESTBROOK, 1993), os astrócitos contribuem para aprofundar o sofrimento celular na lesão isquêmica por excitotoxicidade (MATUTE; DOMERCQ; SANCHEZ-GOMEZ, 2006), sugerindo-se estudos futuros empregando diferentes metodologias com o cLDE/MTX, para verificar outros eventuais efeitos sobre a astrocitose.

5 CONCLUSÕES

A pesquisa demonstrou que a nanopartícula lipídica LDE é dotada de características físico-químicas que a habilitam para atravessar a BHE. Isso foi comprovado tanto nos ratos saudáveis, nos quais a BHE se encontrava íntegra, quanto no grupo de animais submetidos a lesão cortical pela ET-1, com a BHE localmente comprometida.

Mesmo tendo sido detectada em concentrações pequenas, e sem predileção por nenhuma área íntegra ou lesionada em particular, os resultados atestam que a LDE se propaga pelo SNC, um achado relevante, considerando que grande parte das doenças que acometem o SNC costumam cursar com ostensivo comprometimento da BHE, levando a crer que a LDE seja capaz de experimentar uma difusão bem mais pródiga e alcançar concentrações mais significativas em situações patológicas.

Muito embora o tratamento de animais com isquemia cortical induzida com cLDE/MTX não tenha influenciado o processo de astrocitose, a aplicação do conjugado inibiu a ativação microglial, tendo sido detectado sinais evidentes de neuroproteção nas áreas de penumbra. Apesar da LDE ter ação inerte na área de neuroinflamação, a presença do MTX induziu significativa atividade anti-inflamatória na zona de penumbra, concluindo-se que a LDE possa vir a ser um veículo assaz vantajoso para direcionar, seletivamente e com virtual ausência de toxicidade, substâncias farmacologicamente ativas para tratar a doença cerebrovascular isquêmica e outras enfermidades do SNC, o que poderá ser verificado em futuros ensaios clínicos.

REFERÊNCIAS

- ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; DINARVAND, R. A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 71, n. 5, p. 1115-30, may 2013.
- AGNATI, L. F. et al. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. **Ital J Neurol Sci**, v. 12, n. 3 Suppl 11, p. 49-53, jun. 1991.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; WATSON, J. (Ed.). **Molecular biology of the cell**. Internal organization of the cell. 14. Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. 5th ed. [S.l.]: Garland Science, 2008. Part IV, p. 813-879.
- ALVES-FILHO, J. C.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M. Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. **Front Immunol**, v. 7, p. 145, 2016.
- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2000.
- ANDERSON, C. S. Organizational Update: Asia Pacific Stroke Organization. **Stroke**, v. 47, n. 4, p. e70-1, apr. 2016.
- ASIA population live. Disponível em: <<http://www.worldometers.info/world-population/asia-population/>>. Acesso em: 7 dez. 2016.
- AZZOPARDI, E. A.; FERGUSON, E. L.; THOMAS, D. W. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 2, p. 257-74, feb. 2013.
- BARKER-COLLO, S. et al. Sex Differences in Stroke Incidence, Prevalence, Mortality and Disability-Adjusted Life Years: Results from the Global Burden of Disease Study 2013. **Neuroepidemiology**, v. 45, n. 3, p. 203-14, 2015.
- BARRETO, G. et al. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 11, n. 2, p. 164-73, jun. 2011.
- BARRITT, A. W. et al. Chondroitinase ABC promotes sprouting of intact and injured spinal systems after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 26, n. 42, p. 10856-67, oct. 2006.
- BARRON, K. D. The microglial cell. A historical review. **J Neurol Sci**, v. 134 Suppl, p. 57-68, dec. 1995.
- BEJOT, Y.; DAUBAIL, B.; GIROUD, M. Epidemiology of stroke and transient ischemic attacks: Current knowledge and perspectives. **Rev Neurol (Paris)**, v. 172, n. 1, p. 59-68, jan. 2016.

- BEJOT, Y. et al. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. **Presse Med.**, v. 45, n. 12, Pt 2, p. e391-e398, dec. 2016.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5th ed. New York: W H Freeman, 2002.
- BERTATO, M. P. et al. Plasma kinetics of an LDL-like nanoemulsion and lipid transfer to HDL in subjects with glucose intolerance. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 67, n. 4, p. 347-53, 2012.
- BJORKHEM, I. et al. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O₂ techniques in vivo and in vitro. **J Biol Chem**, v. 272, n. 48, p. 30178-84, nov. 1997.
- BJORKHEM, I. et al. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. **J Lipid Res**, v. 39, n. 8, p. 1594-1600, aug. 1998.
- BLOOD Brain Barrier Picture. Disponível em: <<http://brainpictures.org/Blood-Brain-Barrier-Picture.php>>. Acesso em: 23 dez. 2016.
- BOCHE, D.; PERRY, V. H.; NICOLL, J. A. R. Review: activation patterns of micrógliia and their identification in the human brain. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 3-18, 2013.
- BOUSSEL, L. et al. Ischemic stroke: etiologic work-up with multidetector CT of heart and extra- and intracranial arteries. **Radiology**, v. 258, n. 1, p. 206-12, jan. 2011.
- BRADBURY, E. J.; CARTER, L. M. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. **Brain research bulletin**, v. 84, n. 4-5, p. 306-16, mar. 2011.
- BRADBURY, E. J. et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 636-640, 2002.
- BRAMBILLA, R.; COUCH, Y.; LAMBERTSEN, K. L. The effect of stroke on immune function. **Mol Cell Neurosci**, v. 53, p. 26-33, mar. 2013.
- BROWN, P.M.; PRATT, A.G.; ISAACS, J.D. Mechanism of action of methothrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. **Nat Rev Rheumatol**. v. 12, n. 12, p. 731-742, 2016.
- BUFFO, A.; ROLANDO, C.; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 77-89, jan. 2010.
- BULGARELLI, A. et al. Anti-atherogenic effects of methotrexate carried by a lipid nanoemulsion that binds to LDL receptors in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 27, n. 6, p. 531-539, dec. 2013.

BULGARELLI, A. et al. Treatment with methotrexate inhibits atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 308-14, apr. 2012.

BURGUILLOS, M. A. et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 319-24, apr. 2011.

BUZHOR, E. et al. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases. **Regen Med**, v. 9, n. 5, p. 649-72, sept. 2014.

CAMPBELL, J.M. et al. Methotrexate-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 78, n. 1, p. 27-39, 2016.

CARDOSO, M. M. et al. Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 197-205, feb. 2013.

CARPENTER, C. R. et al. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke beyond three hours. **The Journal of emergency medicine**, v. 40, n. 1, p. 82-92, jan. 2011.

CHAMORRO, A. et al. The immunology of acute stroke. **Nature reviews. Neurology**, v. 8, n. 7, p. 401-410, jul. 2012.

CHAMORRO, V. et al. Effects of Quercetin in a Rat Model of Hemorrhagic Traumatic Shock and Reperfusion. **Molecules**, v. 21, n. 12, dec. 2016.

CHEN, Z.; TRAPP, B. D. Microglia and neuroprotection. **J Neurochem**, v. 136, Suppl 1, p. 10-17, jan. 2016.

CHO, S. et al. The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2504-2512, mar. 2005.

CHOUDHURY, G. R.; DING, S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. **Neurobiology of Disease**, v. 85, p. 234-244, 2016.

CHOY, E. H.; SCOTT, D. L. Drug treatment of rheumatic diseases in the 1990s. Achievements and future developments. **Drugs**, v. 53, n. 3, p. 337-348, mar. 1997.

CHRISOBOLIS, S. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 16, p. 1733-1745, 2011.

CONHEÇA o ELSA. Disponível em: <<http://www.elsa.org.br/oelsabrasil.html>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

COUTO, R. D. et al. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids**, v. 42, n. 5, p. 411-418, may 2007.

CUTOLO M, et al. Anti-inflammatory mechanisms of methothrexate in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 60, n. 8, p. 729-735, 2001.

DAMINELLI, E. N. et al. Reduction of Atherosclerotic Lesions by the Chemotherapeutic Agent Carmustine Associated to Lipid Nanoparticles. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 30, n. 5, p. 433-443, oct. 2016.

DEHOUCK, B. et al. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. **J Cell Biol**, v. 138, n. 4, p. 877-889, aug. 1997.

DEHOUCK, M. P. et al. Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. **J Neurochem**, v. 58, n. 5, p. 1790-1797, may 1992.

DEL ARCO, A. Calcium regulation of mitochondrial carriers. **Biochemic Biophys Acta.**, v. 1863, n. 10, p. 2413-2421, oct. 2016.

DEL RIO-HORTEGA, P. El tercer elemento de los centros nerviosos. I. La microglia em estados normal. II. Intervencio de la microglia en los processos. III. Natureza proplable de la microglia. **Bol Soc Espanola Biol**, n. 9, p. 69-120, 1919.

DEMUTH, H. U. et al. Recent progress in translational research on neurovascular and neurodegenerative disorders. **Restor Neurol Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 87-103, 2017.

DIETSCHY, J.M.; TURLEY, S.D. Cholesterol metabolism in the brain. **Curr Opin Lipidol.**, v. 12, n. 2, p. 105-112, 2001.

DIJKSTRA, C. D. et al. Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. **Immunology**, v. 55, n. 1, p. 23-30, 1985.

DIRNAGL, U. et al. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v.22, n.9, p.391-397, 1999.

DONG, Y. et al. The Montreal Cognitive Assessment is superior to National Institute of Neurological Disease and Stroke-Canadian Stroke Network 5-minute protocol in predicting vascular cognitive impairment at 1 year. **BMC Neurol**, v. 16, p. 46, apr. 2016.

DOS SANTOS, C. D.; PICANCO-DINIZ, C. W.; GOMES-LEAL, W. Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain research**, v. 1172, p. 130-44, oct. 2007.

DOWNES, C. E.; CRACK, P. J. Neural injury following stroke: are Toll-like receptors the link between the immune system and the CNS? **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 8, p. 1872-1888, aug. 2010.

EASTON, A. S. Neutrophils and stroke - Can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? **Int Immunopharmacol**, jul. 2013.

ELSA-Brasil. Disponível em: <<http://www.elsa.org.br>> Acesso em: 15 de março de 2017)

EMERY, P.; SUAREZ-ALMAZOR, M. Rheumatoid arthritis. **Clin Evid**, n. 9, p. 1349-1371, jun. 2003.

EPIDEMIOLOGY. Disponível em: <<http://www.strokeforum.com/overview/epidemiology>>. Acesso em: 20 maio 2016.

ERECIŃSKA, M.; SILVER, I.A. ATP and brain function. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 2-19, 1989.

EUROPE population live. Disponível em: <<http://www.worldometers.info/world-population/europe-population/>>. Acesso em: 7 dez. 2016.

EUSTAQUIO, T.; LEARY, J. F. Nanobarcoded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nanomedicine: Quantitative studies of cell-nanoparticle interactions by scanning image cytometry. **Cytometry A**, v. 89, n. 2, p. 207-216, feb. 2016.

FAGAN, S. C. et al. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 41, n. 10, p. 2283-2287, oct. 2010.

FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 8, p. 2950-2962, apr. 2009.

FEIGIN, V. L. et al. Epidemiology of ischaemic stroke and traumatic brain injury. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 24, n. 4, p. 485-494, dec. 2010.

FEIGIN; V.L.; KRISHNAMURTHI, R.V. et al. Update on the Global Burden of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in 1990-2013: The GBD 2013 Study. **Neuroepidemiology**, v. 45, n. 3, p. 161-176, 2015.

FEIGIN, V.L.; MENSAH, G.A. et al. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study. **Neuroepidemiology**, v. 45, n. 3, p. 230-236, 2015.

FEYNMAN, R.P. There's plenty of room at the bottom. **Miniaturization**, v. 282, p. 295-296, 1961.

FRALDI, A. et al. Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. **EMBO J.**, v. 29, n. 21, p. 3607-3620, nov. 2010.

FRANCO, E. C. et al. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neuroscience research**, v. 73, n. 2, p. 122-32, jun. 2012.

- FUXE, K. et al. Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. **Acta Physiol Scand**, v. 137, n. 1, p. 155-156, sept. 1989.
- GAJEWSKI, E.; STECKLER, D.; GOLDBERG, R. Thermodynamics of the hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate to adenosine 5'-diphosphate. **J.Biol.Chem.**, v. 261, n. 27, p. 12733-12737, 1986.
- GINHOUX, F. et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 841-845, nov. 2010.
- GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, sept. 2008.
- GIUDETTI, A. M. et al. The Role of Brain Cholesterol and its Oxidized Products in Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 13, n. 2, p. 198-205, 2016.
- GOMES-LEAL, W. **Inflamação aguda, resposta glial e degeneração axonal em um modelo de excitotoxicidade na medula espinhal**. 2002. 197f. Tese (Doutorado em Neuropatologia Experimental) - Departamento de Morfologia, CCB, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.
- GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-356, may 2012.
- GOMES-LEAL, W. et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-467, dec. 2004.
- GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, dec. 2005a.
- GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain research**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, dec. 2005b.
- GOMES-LEAL, W. et al. Neurotropism and neuropathological effects of selected rhabdoviruses on intranasally-infected newborn mice. **Acta Trop**, v. 97, n. 2, p. 126-139, feb. 2006.
- GONIAS, S.L.; CAMPANA, W.M. LDL Receptor-Related Protein-1. A regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. **Am J Pathol.**, v. 184, n. 1, p. 18-27, 2014.
- GREWER, C. et al. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. **IUBMB Life**, v. 60, n. 9, p. 609-619, sept. 2008.
- GU, F. et al. Structures of discoidal high density lipoproteins: a combined computational-experimental approach. **J Biol Chem**, v. 285, n. 7, p. 4652-4265, feb. 2010.

GUIMARAES, J. S. et al. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. **Brain Res**, v. 1329, n. 6, p. 182-193, mar. 2010.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. In: *FREE radicals in the brain*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. p. 21-40.

HAMBY, A. M. et al. Use of a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. **Stroke**, v. 38, n. 2, Suppl, p. 632-636, feb. 2007.

HAWKINS, B. T.; DAVIS, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 2, p. 173-185, jun. 2005.

HAWKINS, R. A.; VINA, J. R. How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier. **Biology (Basel)**, v. 5, n. 4, oct. 2016.

HAYAKAWA, K. et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, v. 39, n. 3, p. 951-958, mar. 2008.

HAYASHI, T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. **Keio J. Med.**, n.3, p. 192-193, 1954.

HERBERG, R. Jo. Determination of carbon-14 and tritium in blood and other whole tissues. Liquid scintillation counting of tissues. **Analytical chemistry**, v. 32, n. 1, p. 42-46, 1960.

HU, X. et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. **Nat Rev Neurol**, v. 11, n. 1, p. 56-64, jan. 2015.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 43, n. 11, p. 3063-3070, nov. 2012.

HU, Z. et al. The Emerging Role of Epigenetics in Cerebral Ischemia. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 3, p. 1887-1905, apr. 2017.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature medicine**, v. 17, n. 7, p. 796-808, jul. 2011a.

IADECOLA, C.; ANRATHER, J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. **Nat Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 1363-1368, 2011b.

ITO, D. et al. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 57, n. 1, p. 1-9, jun. 1998.

JIN, R. et al. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 6, n. 5, p. 834-851, 2013.

JOHNSON, L.N.; NOBLE, M.E.M.; OWEN, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. **Cell**, v. 85, n. 2, p. 149-158, 1996.

KABLAU, M. et al. Predictors and early outcome of hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke. **Cerebrovascular diseases**, v. 32, n. 4, p. 334-41, 2011.

KEY, J.; LEARY, J. F. Nanoparticles for multimodal in vivo imaging in nanomedicine. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 711-726, 2014.

KIGERL, K. A. et al. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13435-13444, oct. 2009.

KIM, J. B. et al. HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. **J Neurosci**, v. 26, n. 24, p. 6413-6421, jun. 2006.

KOH, S. H.; PARK, H. H. Neurogenesis in Stroke Recovery. **Transl Stroke Res**, v. 8, n. 1, p. 3-13, feb. 2017.

KOWOLL, C. M. et al. Severe Cerebral Venous and Sinus Thrombosis: Clinical Course, Imaging Correlates, and Prognosis. **Neurocrit Care**, v. 25, n. 3, p. 392-399, dec. 2016.

KRETZER, I. F. et al. Simvastatin increases the antineoplastic actions of paclitaxel carried in lipid nanoemulsions in melanoma-bearing mice. **Int J Nanomedicine**, v. 11, p. 885-904, 2016.

KRISHNAMURTHI, R. V. et al. Stroke Prevalence, Mortality and Disability-Adjusted Life Years in Adults Aged 20-64 Years in 1990-2013: Data from the Global Burden of Disease 2013 Study. **Neuroepidemiology**, v. 45, n. 3, p. 190-202, 2015.

KUMAR, A. et al. Role of Glutathione-S-transferases in neurological problems. **Expert Opin Ther Pat**, v. 27, n. 3, p. 299-309, mar. 2017.

LAI, P.C. et al. Ceftriaxone attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. **J. Biome Sci.**, v. 21, n. 18, p. 69, sept. 2011.

LALANCETTE-HEBERT, M. et al. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **J Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 2596-2605, mar. 2007.

LAMPL, Y. et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. **Neurology**, v. 69, n. 14, p. 1404-1410, oct. 2007.

LANGFORD, D.; MASLIAH, E. Crosstalk between components of the blood brain barrier and cells of the CNS in microglial activation in AIDS. **Brain Pathol**, v. 11, n. 3, p. 306-312, jul. 2001.

LEARY, S. P. et al. Toward the emergence of nanoneurosurgery: part I--progress in nanoscience, nanotechnology, and the comprehension of events in the mesoscale realm. **Neurosurgery**, v. 57, n. 4, p. 606-634, discussion 606-634, oct. 2005.

LEITE, A. C., JR. et al. Use of combined chemotherapy with etoposide and methotrexate, both associated to lipid nanoemulsions for atherosclerosis treatment in cholesterol-fed rabbits. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 29, n. 1, p. 15-22, feb. 2015.

LEKER, R. R. et al. Novel therapies for acute ischemic stroke. **Isr Med Assoc J**, v. 8, n. 11, p. 788-792, nov. 2006.

LEONARDO, C.C.; PENNYPACKER, K.R. The Function of Cytokines in Ischemic Stroke. In: _____. **Non-Neuronal Mechanisms of Brain Damage and Repair After Stroke**. [S.l.]: Springer International Publishing, 2016. p. 303-323.

LEVY, M. et al. Regenerative cellular therapies for neurologic diseases. **Brain Res**, v. 1638, n. Pt A, p. 88-96, may 2016.

LIMA, R. R. et al. Neurodegeneration and Glial Response after Acute Striatal Stroke: Histological Basis for Neuroprotective Studies. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 3173564, 2016.

LINDGREN, A. et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in stroke patients. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 27, n. 6, p. 1066-1071, jun. 1996.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 1, p. 29-40, jan. 2010.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 42, n. 8, p. 2369-2375, aug. 2011.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 119, n. 3, p. 480-486, jan. 2009.

LO, E. H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 497-500, may 2008.

LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature reviews neuroscience**, v. 4, p. 399-415, 2003.

LO, E. H.; MOSKOWITZ, M. A.; JACOBS, T. P. Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. **Stroke**, v. 36, n. 2, p. 189-192, feb. 2005.

LO, E. H.; NING, M. Mechanisms and challenges in translational stroke research. **J Investig Med**, v. 64, n. 4, p. 827-829, apr. 2016a.

LO, E. H.; NING, M. Mechanisms and challenges in translational stroke research. **J Investig Med**, mar. 2016b.

LOPES, R. S. et al. Indomethacin treatment reduces microglia activation and increases numbers of neuroblasts in the subventricular zone and ischaemic striatum after focal ischaemia. **J Biosci**, v. 41, n. 3, p. 381-394, sept.2016.

LOTUFO, P. A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 1, p. 3-4, jan. 2005.

LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. M. Improving WHO STEPS Stroke in Brazil. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 5, p. 387-388; author reply 388-389, may 2007.

LOURBOPOULOS A.; ERTÜRK, A.; HELLAL, F. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. **Front Cell Neurosci.**, v. 23, n. 9, p. 54, feb. 2015.

LUCAS, S. R. et al. Pilot clinical study of carmustine associated with a lipid nanoemulsion in combination with vincristine and prednisone for the treatment of canine lymphoma. **Vet Comp Oncol**, v. 13, n. 3, p. 184-193, sept. 2015.

LUKER, J. et al. Stroke Survivors' Experiences of Physical Rehabilitation: A Systematic Review of Qualitative Studies. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 96, n. 9, p. 1698-708 e10, sept. 2015.

LUTJOHANN, D. et al. Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol. **Acta Paediatr**, v. 90, n. 6, p. 652-657, jun. 2001.

MA, M. W. et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. **Mol Neurodegener**, v. 12, n. 1, p. 7, jan. 2017.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, n.15, p. 323-350, 1997.

MYANT, N.B. **Cholesterol Metabolism, LDL, and the LDL Receptor**. [S.l.]: Elsevier, 2012.

MAEDA, H. The link between infection and cancer: tumor vasculature, free radicals, and drug delivery to tumors via the EPR effect. **Cancer Sci**, v. 104, n. 7, p. 779-789, jul. 2013.

MALENTISKÁ L, et al. Human Glioblastoma Cell Lines: Levels of Low-Density Lipoprotein Receptor and Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein. **Cancer Research**. n. 60, p. 2300-2303, apr. 2000.

MANZANERO, S.; SANTRO, T.; ARUMUGAM, T. V. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 712-718, apr. 2013.

MARANHÃO, R.C. et a. **Estrutura comparada da LDE com a LDL nativa**. São Paulo: . Laboratório de Metabolismo de Lípidos - InCor – FMUSP, 2012.

- MARANHAO, R. C. et al. Metabolic behavior in rats of a nonprotein microemulsion resembling low-density lipoprotein. **Lipids**, v. 28, n. 8, p. 691-6, aug. 1993.
- MARANHAO, R. C. et al. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 49, n. 6, p. 487-498, jun. 2002.
- MARANHAO, R. C. et al. Paclitaxel associated with cholesterol-rich nanoemulsions promotes atherosclerosis regression in the rabbit. **Atherosclerosis**, v. 197, n. 2, p. 959-966, apr. 2008.
- MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. **Cancer Research**, v. 46, n. 12, pt. 1, p. 6387-6392, dec. 1986.
- MATUTE, C.; DOMERCQ, M.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. **Glia**, v. 53, n. 2, p. 212-224, jan. 2006.
- MCNEIL, S. E. Nanotechnology for the biologist. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 3, p. 585-594, sept. 2005.
- MEHNDIRATTA, M. M. et al. Stroke in Asia: geographical variations and temporal trends. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 85, n. 12, p. 1308-1312, dec. 2014.
- MELLO, S. B. et al. Intra-articular methotrexate associated to lipid nanoemulsions: anti-inflammatory effect upon antigen-induced arthritis. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 443-449, 2013.
- MELLO, S. B. et al. Anti-inflammatory effects of intravenous methotrexate associated with lipid nanoemulsions on antigen-induced arthritis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 71, n. 1, p. 54-58, jan. 2016.
- MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U.; MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, dec. 2004.
- MERINO, J. G.; WARACH, S. Imaging of acute stroke. **Nature reviews. Neurology**, v. 6, n. 10, p. 560-571, oct. 2010.
- MILLER, A. V.; RANATUNGA, S. K. Immunotherapies in rheumatologic disorders. **Med Clin North Am**, v. 96, n. 3, p. 475-496, ix-x, may 2012.
- MINAMI, M. Neuro-glio-vascular Interaction in Ischemic Brains. **Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 131, n. 4, p. 539-544, apr. 2011.
- MOLOFSKY, A. V. et al. Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. **Nature**, v. 509, n. 7499, p. 189-194, may 2014.
- MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-198, jul. 2010.

- MOURA, J. A. et al. Novel formulation of a methotrexate derivative with a lipid nanoemulsion. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2285-2295, 2011.
- MOZAFFARIAN, D. Diverging global trends in heart disease and type 2 diabetes: the role of carbohydrates and saturated fats. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 3, n. 8, p. 586-588, aug. 2015.
- MOZAFFARIAN, D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity: A Comprehensive Review. **Circulation**, v. 133, n. 2, p. 187-225, jan. 2016.
- MUHAMMAD, S. et al. The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 46, p. 12023-12031, nov. 2008.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, sept. 1992.
- MURRAY, K. N. et al. Systemic immune activation shapes stroke outcome. **Mol Cell Neurosci**, v. 53, p. 14-25, mar. 2013.
- MYANT, N. B. Cholesterol transport through the plasma. **Clin Sci (Lond)**, v. 62, n. 3, p. 261-271, mar. 1982.
- MYANT, N. B. The transport of cholesterol through the plasma in normal man. **Boll Soc Ital Biol Sper**, v. 59, n. 9, Pt. 2, p. 51-100, sept. 1983.
- NCI ALLIANCE FOR NANOTECHNOLOGY IN CANCER. **Understanding nanotechnology**. Disponível em: <<https://nano.cancer.gov/learn/understanding>>. Acesso em: 1 fev. 2017.
- NELSON, D.L.; COX, M.M.L. **Principles of Biochemistry: Nucleotides and Nucleic Acids**. 5th ed. 2008. cap. 8, p. 298.
- NEUMANN, J. et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 20, n. 6, p. 714-716, apr. 2006.
- NEUMANN, J. et al. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci**, v. 28, n. 23, p. 5965-5975, jun. 2008.
- NORUM, K. R. et al. Transport of cholesterol. **Physiol Rev**, v. 63, n. 4, p. 1343-1419, oct. 1983.
- OCCHIUTTO, M. L. et al. Paclitaxel Associated With Lipid Nanoparticles as a New Antiscarring Agent in Experimental Glaucoma Surgery. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 57, n. 3, p. 971-978, mar. 2016.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OLNEY, J. W. et al. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. **Science**, v. 254, n. 5037, p. 1515-1518, dec. 6 1991.

OVBIAGELE, B. et al. Forecasting the future of stroke in the United States: a policy statement from the American Heart Association and American Stroke Association. **Stroke**, v. 44, n. 8, p. 2361-7235, aug. 2013.

PAPANTCHEV, V. et al. The role of Willis circle variations during unilateral selective cerebral perfusion: a study of 500 circles. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 44, n. 4, p. 743-753, oct. 2013.

PARDRIDGE, W. M. The blood-brain barrier and neurotherapeutics. **NeuroRx**, v. 2, n. 1, p. 1-2, jan. 2005a.

PARDRIDGE, W. M. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 13, n. 7, p. 963-975, jul. 2016.

PARDRIDGE, W. M. Molecular biology of the blood-brain barrier. **Mol Biotechnol**, v. 30, n. 1, p. 57-70, may 2005b.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R.; EMSON, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **Journal of neuroscience methods**, v. 3, n. 2, p. 129-149, dec. 1980.

PEKNY, M. et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 3, p. 323-345, mar. 2016.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 30-38, apr. 2014.

PENCINA, M. J. et al. Apolipoprotein B improves risk assessment of future coronary heart disease in the Framingham Heart Study beyond LDL-C and non-HDL-C. **Eur J Prev Cardiol**, v. 22, n. 10, p. 1321-1327, oct. 2015.

PERRY, V. H.; ANDERSSON, P. B.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 7, p. 268-273, jul. 1993.

PETERSON, C. et al. Lipoproteins, malignancy, and anticancer agents. **Targeted Diagn Ther**, v. 5, p. 175-200, 1991.

PITAS, R.E. et al. Lipoproteins and Their Receptors in the Central Nervous System. **J Biol Chem.**, v. 262, n. 29, p.14352-14360, 1987.

- POLAK, P.; SHEFI, O. Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 1467-1479, aug. 2015.
- POPOVICH, P. G. et al. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 158, n. 2, p. 351-365, 1999.
- POZZI, F. S. et al. Plasma kinetics of an LDL-like non-protein nanoemulsion and transfer of lipids to high-density lipoprotein (HDL) in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Lipidol**, v. 9, n. 1, p. 72-80, jan./feb. 2015.
- PRADEEP, H. et al. Oxidative stress - assassin behind the ischemic stroke. **Folia Neuropathol**, v. 50, n. 3, p. 219-230, 2012.
- PROW, T. W. et al. Nanoparticles, molecular biosensors, and multispectral confocal microscopy. **J Mol Histol**, v. 35, n. 6, p. 555-564, aug. 2004.
- RADOMSKA, A.; LESZCZYSZYN, J.; RADOMSKI, M. W. The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. **Adv Clin Exp Med**, v. 25, n. 1, p. 151-162, jul./aug. 2016.
- RAJAH, G.B.; DING, Y. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: a concise review. **Neurosurgical Focus**, v. 42, n. 4, p. E2, 2017.
- RAMOS-CABRER, P. et al. Targeting the ischemic penumbra. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 42, n. 1, Suppl, p. S7-11, jan. 2011.
- RANSOHOFF, R.M.; PERRY, V.H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 119-145, 2009.
- RAPALINO, O. et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 814-821, 1998.
- RASTOGI, R. et al. NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. **Front Cell Neurosci**, v. 10, p. 301, 2016.
- REHNCRONA, S. et al. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 297-311, 1981.
- RICHARDSON, P.E. et al. Assembly of lipoprotein particles containing apolipoprotein-B: structural model for the nascent lipoprotein particle. **Biophys J**, v. 88, n. 4, p. 2789-2800, apr. 2005.
- RODRIGUES, D.G. et al. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. **J Pharm Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 765-772, jun. 2002.

RUCKMANI K, et al. Methotrexate Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Effective Treatment of Carcinoma*. **J Nanosci Nanotechnol.**, v. 6, n. 9-10, p.2991-2995, 2006.

RYU, J. H. et al. Theranostic nanoparticles for future personalized medicine. **J Control Release**, v. 190, p. 477-484, sept. 2014.

SAVER, J. L. et al. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for extended window acute stroke therapy trials. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 40, n. 7, p. 2594-600, jul. 2009.

SCHIFF, M. Emerging treatments for rheumatoid arthritis. **The American journal of medicine**, v. 102, n. 1A, p. 11S-15S, jan. 1997.

SCHNELL, L. et al. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 10, p. 3648-3658, oct. 1999.

SCHULZ, J.B.; WELLER, M.; MOSKOWITZ, M.A. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. **Annals of Neurology**, v. 45, n. 4, p. 421-429, apr. 1999.

SEGREST, J. P. et al. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. **Curr Opin Lipidol**, v. 11, n. 2, p. 105-115, apr. 2000.

SEIDEL, J. L. et al. Multifaceted roles for astrocytes in spreading depolarization: A target for limiting spreading depolarization in acute brain injury? **Glia**, v. 64, n. 1, p. 5-20, jan. 2016.

SHECHTER, R. et al. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. **PLoS Med**, v. 6, n. 7, p. e1000113, jul. 2009.

SHIOZAKI, A. A. et al. Treatment of patients with aortic atherosclerotic disease with paclitaxel-associated lipid nanoparticles. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 71, n. 8, p. 435-439, aug. 2016.

SIMONS, K.; IKONEN, E. How cells handle cholesterol. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1721-1726, dec. 2000.

SIMS, N.R.; MUYDERMAN, H. Mitochondria oxidative metabolism and cell death in stroke. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v.1802, n.1, p.80-91, 2010.

SOUZA-RODRIGUES, R.D. et al. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain research**, v. 1200, p. 78-88, mar. 2008.

SPENCE, J. David. Recent advances in pathogenesis, assessment, and treatment of atherosclerosis. **F1000Research**, v. 5, 2016.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 16, n. 4, p. 435-452, aug. 2010.

STENCE, N.; WAITE, M.; DAILEY, M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. **Glia**, v. 33, n. 3, p. 256-266, 2001.

STEPHANOVA, D. I. Myelin as longitudinal conductor: a multi-layered model of the myelinated human motor nerve fibre. **Biol Cybern**, v. 84, n. 4, p. 301-308, apr. 2001.

SWIRSKI, F. K.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 10, p. 1424-1432, oct. 2009.

TAVARES, E. R. et al. Reduction of atherosclerotic lesions in rabbits treated with etoposide associated with cholesterol-rich nanoemulsions. **Int J Nanomedicine**, v. 6, p. 2297-2304, 2011.

TAYLOR, T. N. et al. Lifetime cost of stroke in the United States. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1459-66, sept. 1996.

TEIXEIRA, R. S. et al. Delivery of daunorubicin to cancer cells with decreased toxicity by association with a lipidic nanoemulsion that binds to LDL receptors. **J Pharm Pharmacol**, v. 60, n. 10, p. 1287-1295, oct. 2008.

THANAN, Raynoo et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 193-217, 2014.

THRIFT, A.G. et al. Global stroke statistics. **International Journal of Stroke**, v. 12, n. 1, p. 13-32, 2017.

TRUELSEN, T. et al. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. **Eur J Neurol**, v. 13, n. 6, p. 581-598, jun. 2006.

TSAI, H. H. et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. **Science**, v. 337, n. 6092, p. 358-362, jul. 2012.

UCHECHI O.; OGBONNA, J. D. N.; ATTAMA, A. A. **Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery**. [S.l.]: InTech, 2014.

US POPULATION live. Disponível em: <<http://www.worldometers.info/world-population/us-population/>>. Acesso em: 7 dez. 2016.

VAY, S. U. et al. Minocycline mitigates the gliogenic effects of proinflammatory cytokines on neural stem cells. **J Neurosci Res**, v. 94, n. 2, p. 149-160, feb. 2016.

VENTOLA, C.L. The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. **P T.** v. 37, n. 9, p. 512-525, sept. 2012a.

VENTOLA, C.L. The nanomedicine revolution: part 2: current and future clinical applications. **P T.**, v. 37, n. 10, p. 582-591, oct. 2012b.

VENTOLA, C.L. The nanomedicine revolution: part 3: regulatory and safety challenges. **P T.**, v. 37, n. 11, p. 631-639, nov. 2012c.

VINAGRE, C.G. et al. Enhanced removal from the plasma of LDL-like nanoemulsion cholesteryl ester in trained men compared with sedentary healthy men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 4, p. 1166-1171, oct. 2007.

VISENTIN M, et al. The antifolates. **Hematol Oncol Clin North Am.**, v. 26, n. 3, p. 629-648, ix, jun. 2012.

WANG, J. F. et al. Role of hydrogen sulfide in secondary neuronal injury. **Neurochemistry international**, v. 64, p. 37-47, jan. 2014.

WANG, X. F. et al. Modulation of astrocytic glutamine synthetase expression and cell viability by histamine in cultured cortical astrocytes exposed to OGD insults. **Neuroscience letters**, jun. 2013.

WATKINS, J.C.; JANE, D.E. The glutamate story. **Br J Pharmacol.**, v. 147, Suppl. 1, p. S100–S108, jan. 2006.

WESTBROOK, G.L. Glutamate receptors and excitotoxicity. **Research Publications - Association For Research in Nervous and Mental Disease**, v. 71, p. 35-50, 1993.

WHITE-SCHENK, D.; SHI, R.; LEARY, J.F. Nanomedicine strategies for treatment of secondary spinal cord injury. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 923-938, 2015.

WILLIE, C.K. Uncoupling neurovascular coupling: putative pathways of cerebrovascular regulation? **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 8, p. 1215, oct. 2013.

WILLIE, C.K. et al. Maintained cerebrovascular function during post-exercise hypotension. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 6, p. 1597-1604, jun. 2013.

WON, S.J.; KIM, D.Y.; GWAG, B.J. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. **J Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 1, p. 67-86, jan. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health estimates**. Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/>. Acesso em: 20 maio 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Media centre, World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. Acesso em: 20 maio 2016.

XIA, C.Y. et al. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. **Int Immunopharmacol**, v. 25, n. 2, p. 377-382, apr. 2015.

YAMAMOTO, Y. Plasma marker of tissue oxidative damage and edaravone as a scavenger drug against peroxy radicals and peroxy nitrite. **J Clin Biochem Nutr**, v. 60, n. 1, p. 49-54, Jan 2017.

YEO, L.L, et al. Timing of recanalization after intravenous thrombolysis and functional outcomes after acute ischemic stroke. **JAMA Neurol.**, v. 70, n. 3, p. 353-358, mar. 2013.

YRJANHEIKKI, J. et al. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, nov. 1999.

ZARBIN, M. A. et al. Nanotechnology in ophthalmology. **Can J Ophthalmol**, v. 45, n. 5, p. 457-476, oct. 2010.

ZARBIN, M. A. et al. Regenerative nanomedicine and the treatment of degenerative retinal diseases. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 4, n. 1, p. 113-137, jan./feb. 2012.

ZHANG, J.; QIANG, L. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. **Protein Cell.**, v. 6, n. 4, p. 254-264, 2015.