



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

VANIA CASTRO CORRÊA

**PERDA NEURONAL, ATIVAÇÃO GLIAL, NEUROGÊNESE E
ALTERAÇÕES SENSORIO-MOTORAS APÓS ISQUEMIA FOCAL
NO CÓRTEX SOMESTÉSICO DE RATOS ADULTOS**

**Belém
2012**

VANIA CASTRO CORRÊA

**PERDA NEURONAL, ATIVAÇÃO GLIAL, NEUROGÊNESE E
ALTERAÇÕES SENSÓRIO-MOTORAS APÓS ISQUEMIA FOCAL
NO CÓRTEX SOMESTÉSICO DE RATOS ADULTOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado do curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Professor Doutor Wallace Gomes Leal

Belém

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

A Comissão Examinadora, abaixo assinalada, aprova a Tese de Doutorado

Em ____/____/____

PERDA NEURONAL, ATIVAÇÃO GLIAL, NEUROGÊNESE E
ALTERAÇÕES SENSÓRIO-MOTORAS APÓS ISQUEMIA FOCAL
NO CÓRTEX SOMESTÉSICO DE RATOS ADULTOS

Vânia Castro Corrêa

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal UFPA
(Orientador)

Prof. Dra Lucídia Fonseca Santiago
UFPA - Examinador

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
UFPA - Examinador

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho
UFPA - Examinador

Prof. Dra Édna Cristina Santos Franco
UFPA – Suplente

Dedico esta tese:

Ao Davi, por estar sempre presente, me incentivando, me apoiando, sem cobranças, me ajudando sem medir esforços.

As minhas filhas Heleni, Suelen e Sue Ann que souberam esperar, com paciência e carinho a concretização deste doutorado.

Esta vitória é nossa!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** acima de tudo, pela presença constante em todos os momentos da minha vida, me dando muita força e sabedoria para realizar este trabalho.

Ao meu orientador professor, doutor Wallace Gomes Leal por ter acreditado em mim. Por toda a confiança, amizade e estímulo. Por acreditar na potencialidade de seus alunos, sem distinção, com paciência, sempre com um sorriso no rosto, sabe conduzir os seus projetos, mesmo com suas ocupações profissionais e familiares.

Aos amigos e colegas de profissão Dinair e Enio, pela força, amizade e companheirismo nos momentos em que tudo parecia impossível, quando as dúvidas ainda estavam presentes. Mas, que aos poucos conseguimos traçar nossos caminhos e a superar nossas dificuldades.

Ao Elder, como exemplo de respeito e amizade. Por toda a ajuda que me deu na parte experimental de finalização deste trabalho. Como você sempre dizia: calma professora vai dar tudo certo. Tenho certeza que a sua estrela ainda vai brilhar muito, porque você merece tudo de bom.

Ao Ijair pela sua amizade, pela sua experiência com criostato pode me ajudar com os cortes dos encéfalos.

Ao Diego, que por algumas vezes me ajudou na montagem, daquele arsenal de lâminas, que não parecia ter fim.

Ao professor e doutor Carlomagno, pela amizade, inteligência, simplicidade de sempre, disponibilidade e atenção, sempre que eu precisei.

Ao professor e amigo Marcelo, pela postura que sempre teve no laboratório, pela inteligência e disposição em ajudar. Obrigada por me ajudar na tabulação dos dados dos testes comportamentais.

Obrigada, Antônia pela amizade, pelos bons momentos de risadas e descontração vividos no laboratório.

Aos doutores Carlomagno Pacheco Bahia, Lucília Fonseca Santiago e Manuel da Silva Filho, pelas correções e sugestões durante o exame de qualificação desta tese.

A todos os colegas do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental, que direta ou indiretamente me ajudaram. Aos que já estavam quando eu iniciei e aos que chegaram agora. Que sejam bem vindos!

Aos amigos João e Tadeu pela colaboração e disposição em ajudar sempre.

Ao seu Amarildo, pela ajuda constante com os animais do biotério da UFPA.

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram torcendo pelo meu sucesso.

As minhas funcionárias Daiane, Ieza, Darlen e dona Jacira que me ajudaram imensamente.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA.

Não é o desafio que define quem somos, nem o que podemos ser. O que nos define é como enfrentamos esses desafios: Incendiando as ruínas ou construindo um caminho através dele, em direção a liberdade.

Richard Back

RESUMO

O Acidente vascular encefálico (AVE) é considerado uma das mais importantes causas de morte e perda funcional no mundo. Poucas condições neurológicas são tão complexas e devastadoras, provocando déficits neurológicos incapacitantes ou óbito nos sobreviventes. As regiões corticais são comumente afetadas por AVE, o que resulta em perda sensorial e motora. O estabelecimento dos padrões neuropatológicos em regiões corticais, incluindo a área somestésica, é fundamental para a investigação de possíveis intervenções terapêuticas. No presente estudo, investigamos os padrões de perda neuronal, microgliose, astrocitose, neurogênese e os déficits funcionais no córtex somestésico primário de ratos adultos, submetidos a lesões isquêmicas focais, induzidas por microinjeções de 40 pMoles de endotelina-1 (ET-1). Foram utilizados 30 ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos jovens, pesando entre 250-280g. Os animais foram divididos em grupos isquêmicos (N= 21) e controle (N=9). Os mesmos foram perfundidos nos tempos de sobrevivência de 1, 3 e 7 dias. Os animais do grupo de 7 dias foram submetidos a testes comportamentais para avaliar a perda de função sensorio-motora. Seções foram coradas pela violeta de cresila, citocromo oxidase e imunomarcadas para identificação de neurônios (anti-NeuN), microglia ativada e não ativada (Iba-1), macrófagos/microglia ativados (ED-1), astrócitos (GFAP) e neuroblastos (DCX). As comparações estatísticas entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA), um critério com correção a *posteriore* de Tukey. Os animais isquêmicos apresentaram déficits sensorio-motores revelados pela Escala Neurológica de Bederson, Teste de Colocação da Pata Anterior e Teste do Canto. Microinjeções de ET-1 induziram lesão isquêmica focal na área somestésica primária com perda neuronal, astrocitose e microgliose progressivas principalmente nos tempos mais tardios. A coloração para citocromo oxidase revelou o campo de barris, mas, inesperadamente, marcou uma população de células inflamatórias com características de macrófagos na região isquêmica. Houve aumento do número de neuroblastos, principalmente ao sétimo dia, na zona subventricular do hemisfério isquêmico, em relação ao hemisfério contralateral e animais controle. Não houve migração significativa de neuroblastos no córtex somestésico isquêmico. Os resultados mostram que microinjeções de ET-1 são um método eficaz para indução de perda tecidual e déficits sensoriais no córtex somestésico primário de ratos adultos. Também se evidencia que a zona subventricular é influenciada por eventos isquêmicos distantes e que populações macrofágicas

parecem aumentar o padrão de expressão de citocromo oxidase. O referido modelo experimental pode ser utilizado em estudos futuros onde agentes neuroprotetores em potencial podem ser utilizados para minimizar as alterações neuropatológicas descritas.

Palavras-Chave: Isquemia Focal, Endotelina-1 (ET-1), Córtex Cerebral, Neuroinflamação, Microglia, Astrócitos.

ABSTRACT

Stroke is considered one of the most important causes of death and functional deficits in the world. Few neurological conditions are so complex and devastating, resulting in severe neurological deficits and death in the survivors. The cortical regions are commonly affected by stroke, resulting in sensory and motor loss. The establishment of neuropathological patterns in cortical regions, including the somatosensory area, is critical for the investigation of possible therapeutic interventions. In the present study, we investigated the patterns of neuronal loss, microgliosis, astrocytosis, neurogenesis and functional deficits in the primary somatosensory cortex of adult rats submitted to focal ischemia induced by microinjections of 40 pmol of endothelin-1 (ET-1). A total of 30 young adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of Wistar, weighing between 250-280g were used in the study. The animals were divided into ischemic (N = 21) and control (N = 9) groups. They were perfused at survival times of 1, 3 and 7 days. The 7 days animals were submitted to behavioral tests to evaluate sensorimotor impairment. Sections were stained with cresyl violet, cytochrome oxidase and immunostained to identify neurons (anti-NeuN), activated and non-activated microglia (Iba-1), activated macrophages/microglia (ED-1), astrocytes (GFAP) and neuroblasts (DCX). Statistical comparisons between groups were made by one analysis of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc test. The animals showed ischemic sensorimotor deficits revealed by Bederson Neurological Scale, Paw Placement and corner tests. Microinjections of ET-1 induced focal ischemic lesion in the primary somatosensory cortex with neuronal loss and progressive astrocytosis and microgliosis mainly in the late survival times. The cytochrome oxidase histochemistry revealed the barrel fields, but unexpectedly marked a population of inflammatory cells with macrophage characteristics in the ischemic region. Increased numbers of SVZ neuroblasts were observed mainly in late survival times of ipsilateral hemisphere in comparison to contralateral side and control animals. There was no significant migration of neuroblasts to the ischemic cortex. The results show that microinjections of ET-1 are an effective method for inducing tissue loss and sensorymotor deficits in the primary somatosensory cortex of adult rats. It was evident that the SVZ is influenced by distant ischemic events distant and that macrophage populations seem to increase the cytochrome oxidase expression. The implemented experimental model can be used in future studies, in

which potential neuroprotective drugs can be tested to minimize the described neuropathological alterations.

Keywords: Focal Ischemia, Endothelin-1 (ET-1), Cerebral Cortex, Neuroinflammation, Microglia, Astrocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS

AVE: Acidente Vascular Encefálico

AVES: Acidentes Vasculares Encefálicos

AMPA: Alfa-amino-3-hidróxi-metilsoxazolepropionato

AIDS: Síndrome da Deficiência Imuno Adquirida

BHE: Barreira Hemato Encefálica

CA1: Camada 1

Ca⁺⁺: Íon Cálcio

Cl⁻: Íon Cloro

CEPAE: Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação

CO: Citocromo Oxidase

EUA: Estados Unidos Americanos

ET-1: Endotelina 1

ET-2: Endotelina 2

ET-3: Endotelina 3

GFAP: Proteína Ácido Fibrilar Glial

KA: Kainato

K⁺: Íon Potássio

Mg⁺⁺: Íon magnésio

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

Na⁺ : Íon Sódio

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido Nítrico

O₂⁻: Radical Superóxido

PMBSF: Subcampo Pósterio Medial de Barris

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

SVZ: Zona subventricular dos Ventriculos Laterais

SGV: Zona Subgranular do Hipocampo

TGF- β 1: Fator de Crescimento de Fibroblastos

TNF α : Fator de necrose Tumoral

VPL: Núcleo Ventro Pósterio lateral

VPM: Núcleo Ventro Pósterio Medial

VIM: vimentina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Áreas sensoriais somáticas	20
Figura 2:	Vias sinápticas de processamento da informação sensorial das vibrissas para o córtex somestésico primário (S1) de roedores.....	21
Figura 3:	Animais alojados em gaiolas individuais	42
Figura 4:	Animal posicionado em uma mesa para o Teste de Colocação da Pata Anterior.....	46
Figura 5:	Aparato e animal durante a realização do Teste do Canto	47
Figura 6:	Vista dorsal do encéfalo do rato.....	48
Figura 7:	Escala Neurológica de Bederson. Média na graduação neurocomportamental alcançada entre os grupos.....	53
Figura 8:	Teste de Colocação da pata Anterior	54
Figura 9:	Teste do Canto. Contagem de retornos entre os lados direito (contralateral) e esquerdo (ipsilateral) a lesão.....	55
Figura 10:	Teste do Canto. Porcentagem de retornos entre os lados direito (contralateral) e esquerdo (ipsilateral) a lesão.....	56
Figura 11:	Relação espacial da lesão isquêmica na área somestésica primária demonstrada pela histoquímica para citocromo oxidase.....	58
Figura 12:	Análise histopatológica de secções coronais do córtex somestésico de ratos coradas pela violeta de cresila	60
Figura 13:	Perda neuronal após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, demonstrada pela imunistoquímica para NeuN.....	62
Figura 14:	Análise quantitativa da perda neuronal na área somestésica primária após isquemia focal.....	63
Figura 15:	Ativação microglial progressiva após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, marcada pela imunistoquímica para Iba1.....	65
Figura 16:	Análise quantitativa de células Iba1+ na área somestésica primária após isquemia focal.....	66

Figura 17:	Ativação microglial progressiva após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, marcada pela imunistoquímica para ED1.....	68
Figura 18:	Análise quantitativa de células ED1+ na área somestésica primária após isquemia focal.....	69
Figura 19:	Ativação progressiva de astrócitos após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, marcada pela imunistoquímica para GFAP.....	71
Figura 20:	Análise quantitativa de células GFAP+ na área somestésica primária após isquemia focal.....	72
Figura 21:	Isquemia focal no córtex somestésico influencia o número de neuroblastos na zona subventricular, revelada pela imunistoquímica para DCX.....	74
Figura 22:	Análise quantitativa do número de células DCX+ na zona subventricular após isquemia focal.....	75
Figura 23:	A isquemia focal induzida por microinjeções de ET-1 não induz migração significativa de neuroblastos para o córtex somestésico. ..	76

LISTA DE TABELA

Tabela 1:	Exame de déficit neurológico.....	45
-----------	-----------------------------------	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	O CÓRTEX SOMESTÉSICO PRIMÁRIO (S1).....	19
1.2	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE).....	22
1.3	FISIOPATOLOGIA DA LESÃO ISQUÊMICA	25
1.3.1	Excitotoxicidade	25
1.3.2	Extresse Oxidativo	29
1.3.3	Inflamação	30
1.3.3.1	Aspectos Gerais.....	30
1.3.3.2	Inflamação no Sistema Nervoso Central	31
1.3.3.3	Resposta Inflamatória Celular	32
1.3.4	Apoptose	36
1.4	NEUROGÊNESE CORTICAL NO CÉREBRO ADULTO.....	37
1.5	MODELO DE ISQUEMIA FOCAL POR INJEÇÃO DE ENDOTELINA-1 (ET-1).....	38
1.6	HIPÓTESE E PARADÍGMA EXPERIMENTAL.....	39
1.7	OBJETIVOS	40
1.7.1	Objetivo Geral	40
1.7.2	Objetivos Específicos	40
2	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
2.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
2.3	PROCEDIMENTOS PRÉ-INDUÇÃO ISQUÊMICA	42
2.4	MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CORTICAL FOCAL	43
2.5	ANÁLISE CLÍNICA E COMPORTAMENTAL	44
2.5.1	Escala Neurológica	44
2.5.2	Teste de Colocação da Pata Anterior	45
2.5.3	Teste do Canto	47
2.6	PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	48
2.7	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA	49
2.7.1	Visualização da Área de Lesão	49

2.7.2	Visualização da Área dos Campos de Barris.....	49
2.7.3	Estudos Imunohistoquímicos	49
2.7.4	Protocolo de Imunomarcção	50
2.8	ANÁLISE QUALITATIVA	51
2.9	ANÁLISE QUANTITATIVA	51
2.9.1	Método de Contagem.....	51
2.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
3	RESULTADOS	53
3.1	RESULTADOS NEUROCOMPORTAMENTAIS	53
3.1.1	Microinjeções de ET-1 Induzem Défcits Neurológicos Revelados pela Escala Neurológica de Bederson	53
3.1.2	Microinjeções de ET-1 no Córtex Somestésico Induzem Défcits Sensorio-Motores Revelados pelo Teste de Colocação da Pata Anterior	54
3.1.3	Animais isquêmicos Apresentam Assimetria de Retorno pelos Lados Esquerdo e Direito de Acordo com o Teste do Canto.....	55
3.2	MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZIRAM LESÃO ISQUÊMICA FOCAL NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA	57
3.3	MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZIRAM PERDA NEURONAL NA ÁREA SOMESTÉSICA	61
3.4	A ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 RESULTA EM ATIVAÇÃO MICROGLIAL PROGRESSIVA NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA.....	64
3.5	A LESÃO ISQUÊMICA INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZIU ATIVAÇÃO PROGRESSIVA DE ASTRÓCITOS NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA.....	70
3.6	ISQUEMIAS FOCAIS NO CÓRTEX SOMESTÉSICO E NEUROGÊNESE ENDÓGENA.....	73
3.6.1	A Isquemia no Córtex Somestésico Influencia o Número de Neuroblastos na Zona Subventricular	73
3.6.2	A Isquemia Focal Induzida por Microinjeções de ET-1 não Induz Migração Significativa de Neuroblastos para o Córtex Somestésico Primário.....	76
4	DISCUSSÃO.....	77
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	77

4.2	MICROINJEÇÕES DE ET-1 UM MÉTODO EFICAZ PARA INDUZIR DÉFICITS FUNCIONAIS MENSURÁVEIS: SIGNIFICADO PARA ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS.....	78
4.3	PERDA NEURONAL PROGRESSIVA APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL DO CÓRTEX SOMESTÉSICO PRIMÁRIO	80
4.4	O PAPEL DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS LESÃO ISQUÊMICA DO CÓRTEX SOMESTÉSICO.....	82
4.5	LESÃO ISQUÊMICA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ET-1 ESTIMULA UMA ATIVAÇÃO PROGRESSIVA DE ASTRÓCITOS NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA	84
4.6	NEUROGÊNESE APÓS ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX SOMESTÉSICO.....	86
5	CONCLUSÕES	89
6	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÓRTEX SOMESTÉSICO PRIMÁRIO (S1)

O Córtex cerebral é a fina camada de substância cinzenta que reveste o cérebro. É considerado uma das partes mais importantes do sistema nervoso central (SNC), onde ocorrem os níveis mais complexos do processamento sensorial, motor e cognitivo. O Córtex somestésico primário (S1) é onde ocorre o processamento das informações táteis. Em humanos, está situado na porção anterior do lobo parietal, especificamente no giro pós-central, e possui quatro áreas funcionais: as áreas 1, 2, 3a e 3b de Brodmann (Figura 1). Maior parte das fibras provenientes do (núcleo ventro-posterior-lateral VPL) do tálamo terminam nas áreas 3a e 3b, essas fazem projeção para as áreas 1 e 2, assim como para a área somestésica secundária (S2). (BEAR et al., 2008; LENT, R., 2001).

Em roedores, as vibrissas mistanciais são associadas a estruturas citoarquitetônicas chamadas de barris, estudados inicialmente pela técnica de Nissl por Woolsey & Van Der Loos (1970). Os barris relacionados com as vibrissas mistanciais são maiores que os demais barris relacionados com outras partes do corpo e, em cortes tangenciais paralelos as camadas corticais do cérebro, são dispostos em um arranjo regular de fileiras e colunas no chamado subcampo pósteromedial de barris (PMBSF) (Figura 2). Cada barril é separado um do outro por uma região de baixa densidade de corpos celulares chamados de septo ou córtex interbarril (WOOLSEY & VAN DER LOOS, 1970). O córtex somestésico primário (S1) nos ratos pode ser dividido em três zonas, diferenciadas entre si pela densidade de células na camada IV, chamadas de zona granular, perigranular e disgranular, respectivamente (CHAPIN et al., 1987; KORALEK et al., 1988; FABRI & BURTON., 1991). A região granular, que contém os barris, é caracterizada por camada IV bem desenvolvida, composta por mais células

estreladas. É o principal alvo da projeção ascendente do VPM do tálamo. A zona perigranular, por sua vez, apresenta baixa densidade de células na camada IV, ocupa as regiões de septo entre os barris, a região de transição entre a representação dos membros e uma região de transição entre S1 e S2 (KORALEK et al., 1990). Além disso, é densamente conectada com o hemisfério oposto através do corpo caloso (KORALEK et al., 1990). O córtex somestésico primário (S1) nos ratos processa informação tátil capturada pelas vibrissas, permitindo a esses animais perceberem ativamente características espaciais de textura, tamanho, forma e vibração imediatamente ao seu redor (ARONOFF et al., 2010; PETERSON, 2007). São conhecidas duas vias principais de processamento da informação sensorial nos ratos: a via “Leminiscal” que conduz informação das vibrissas, para o centro dos barris correspondentes, no córtex somestésico primário (S1), e a via “Paraleminiscal” que conduz a informação dos espaços entre as vibrissas para os septos entre os barris no PMBSF (S1), (PETERSON, 2007). A deflexão de uma vibrissa evoca potencial de ação em neurônios sensoriais do nervo trigêmeo, com liberação de glutamato na primeira estação sináptica no tronco encefálico (figura 2A). Os neurônios do tronco encefálico enviam informação sensorial para o tálamo, onde uma segunda sinapse glutamartérgica excita neurônios talamocorticais que projetam a informação para o PMBS (S1), (figura 2A), (PETERSON, 2007).

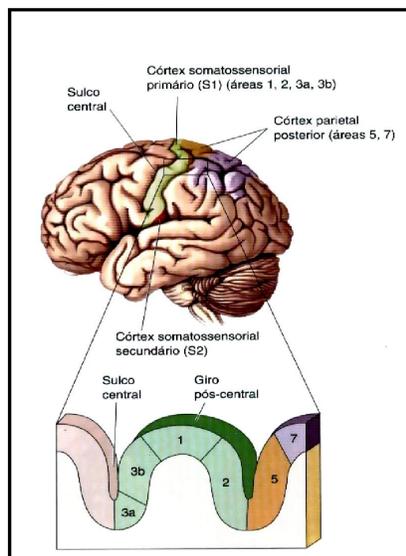


Figura 1. Áreas sensoriais somáticas do córtex humano. (Adaptada de Bear, 2008).

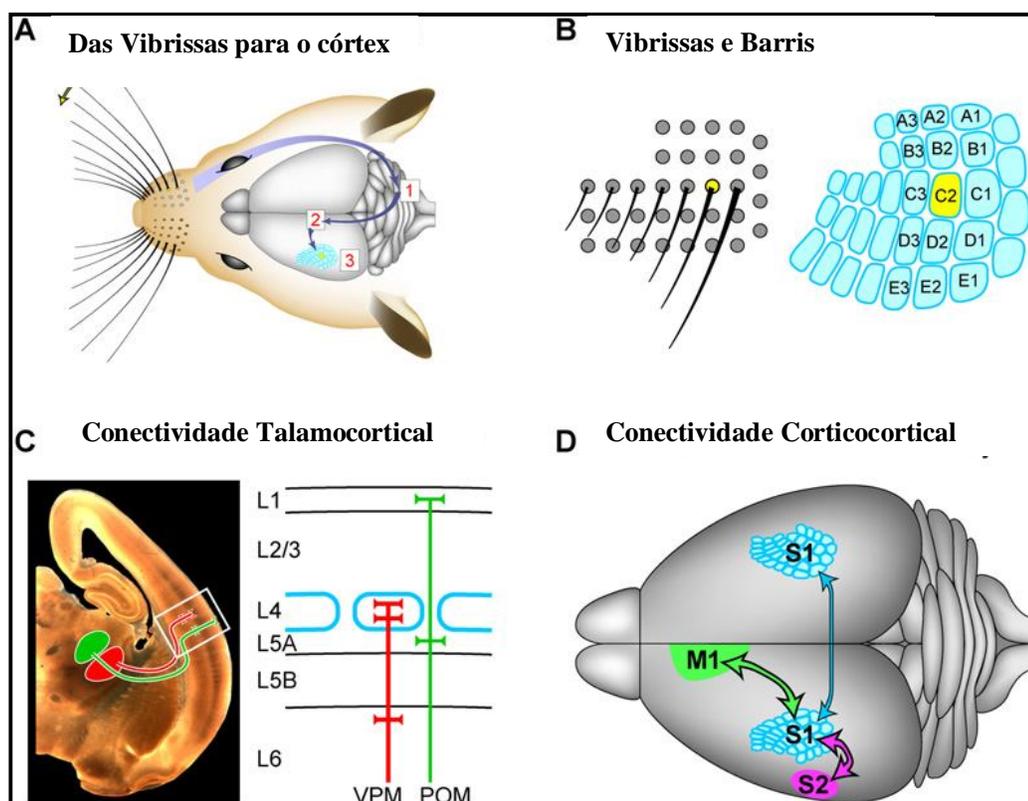


Figura 2. Vias Sinápticas de Processamento da Informação Sensorial das Vibrissas para o Córtex Somestésico Primário (S1) de roedores. Em (A), a deflexão de uma vibrissa evoca potencial de ação em neurônios sensoriais do nervo trigêmeo, com liberação de glutamato na primeira estação sináptica no tronco encefálico (1), os neurônios do tronco encefálico enviam informação sensorial para o tálamo (2), onde uma segunda sinapse glutamartérgica excita neurônios tálamocorticais que se projetam para (S1), (3). (B), o arranjo dos folículos, correspondentes às vibrissas no focinho do roedor (esquerda), os barris na camada IV do córtex somestésico primário (S1), (direita). A nomenclatura de ambas as vibrissas e barris em fileiras de A-E e as colunas 1-3, etc. A vibrissa C2 e o barril C2 estão marcados em amarelo. (C) Mostra duas vias tálamocorticais importantes e paralelas, para (S1). (D), Neurônios de (S1) são reciprocamente conectados com outras áreas através de sinapses corticocorticais: Córtex Somestésico Secundário (S2). Córtex Motor (M1) e

1.2 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

O Acidente vascular encefálico (AVE) é considerado uma das mais importantes causas de morte no mundo. Em torno de 15 milhões de pessoas é acometida por AVE todos os dias, resultando em torno de 6 milhões de mortes anualmente. (WOODRUFF et al., 2011; MACREZ et al., 2011; CHEN et al., 2011). Poucas condições neurológicas são tão complexas e devastadoras provocando em seus sobreviventes incapacidades permanentes, com déficits motores e sensoriais (YANG et al., 2011; JIN et al., 2010). Entre estas, podemos citar paralisia parcial (SCHAAR et al., 2010), distúrbios de memória, inteligência, linguagem e movimentos (LAKHAN et al., 2009; TORRIANI et al., 2008). A causa mais comum de AVE é a oclusão súbita de um vaso por trombose, em mais de 80% dos casos ou pode ser por embolismo em 15% dos casos. O AVE isquêmico ocorre em 85% dos casos e 15% é do tipo hemorrágico. (CEULEMANS et al., 2010; CHEN et al., 2011).

O AVE é determinado dentro de segundos após a diminuição do fluxo sanguíneo para uma determinada região do encéfalo, resultando em imediata baixa dos níveis de oxigênio e glicose para o tecido nervoso lesado, desencadeando uma série de eventos bioquímicos que começam pela desintegração da membrana celular e terminam com a morte neuronal (LAKHAN et al., 2009). A localização e o tamanho da área isquêmica do encéfalo podem variar, dependendo da artéria ocluída, sendo que a substância branca é mais resistente que a substância cinzenta, assim como certas populações de neurônios são seletivamente mais vulneráveis para a lesão isquêmica do que outros, como por exemplo, neurônios piramidais da camada 1 (CA1) do hipocampo (WOODRUFF et al., 2011).

A área do encéfalo que sofre completa abolição do suplemento sanguíneo (uma redução do fluxo sanguíneo para menos que 12 ml/100g/min.) é chamada de “Centro Isquêmico”. Onde ocorre completa ou quase completa falha energética, resultando em morte celular por necrose (CEULEMANS et al., 2010; WOODRUFF et al., 2011).

A área circunvizinha ao centro isquêmico é chamada de “Penumbra Isquêmica”. Esta área sofre baixa perfusão, durante o período da oclusão da artéria cerebral média e o suplemento sanguíneo colateral das artérias circunvizinhas garantem que ocorra uma circulação sanguínea de aproximadamente 30 ml/100g/min.) e que esta seja mantida (CEULEMANS et al., 2010). Consequentemente, o tecido nervoso na penumbra isquêmica permanece metabolicamente ativo (BROUGHTON et al., 2009) e potencialmente viável por 16-48hs (CEULEMANS et al., 2010). Após esse período, as células localizadas nesta região morrem lentamente por apoptose associadas ao processo inflamatório instalado (MERGENTHALER et al., 2004).

Nos Estados Unidos da América (EUA), os acidentes vasculares encefálicos (AVEs) constituem a terceira causa de morte (DEWAR et al., 1999), indo a óbito todos os anos cerca de 143.579 pessoas vítimas desta patologia. A incidência anual de AVE nos EUA é de 795.000 por ano, sendo que 610.000 correspondem a novos AVEs e 185.000 são AVEs recorrentes (<http://www.cdc.gov/stroke/facts.htm>). Em média, a cada 40 segundos ocorre um AVE nos E.U.A. A incidência é superior nas mulheres, com aproximadamente mais de 55.000 AVEs do que nos homens. O risco de sofrer um AVE é superior nos homens, sendo este ultrapassado pelas mulheres após os 85 anos de idade. O risco relativo homem/mulher de sofrer um AVE é de 1.25 (para as idades entre os 55 e 64 anos), 1.07 (para as idades entre 75 e 84 anos) e 0.76 (para as idades superiores a 85 anos), (LLOYD – JONES et al., 2009).

No Brasil, o AVE é uma das doenças que mais causam óbitos. Estima-se que em 2015 ocorram 18 milhões de casos novos. E em 2030, 23 milhões de novas ocorrências (LOTUFO et al., 2007). Segundo esses pesquisadores, os números atingem em torno de 100 mil vítimas por ano, provocando sequelas graves que atingem em torno de 50% dos sobreviventes.

Um estudo realizado em São Paulo, em 2004 (LOTUFO & BENSENHOR, 2004), avaliou o padrão de mortalidade por doença cerebrovascular estratificado por sexo e idade, categorizada em faixas etárias entre 30 e 39 anos até os 79 anos no período de 1997-2003. Os resultados demonstraram que a proporção de mortalidade por acidente vascular encefálico foi maior entre as mulheres de meia idade. A hemorragia meníngea (subaracnoidea) foi a causa mais frequente de mortalidade entre as mulheres do que entre os homens. A razão entre morte por doença cerebrovascular isquêmica em relação a hemorrágica foi de 0.59, para os homens e de 0.56 para as mulheres. O estudo concluiu que a mortalidade por AVE hemorrágico persiste, sendo maior nessa população do que em outros países do mundo (AIKAWA et al., 2005).

Lesões originadas por AVEs devem ser vistas como um problema de grande importância em saúde pública, não somente pelo índice de mortalidade, mas também pela incapacidade física e as sequelas que residem em grande parte dos sobreviventes (CARDOSO et al., 2004). Em um estudo realizado na cidade de Joinville, os resultados determinaram que a incidência anual de acidentes vasculares encefálicos nesta região é em torno de 156/100.000. A mortalidade anual padrão em Joinville foi relatada como aproximadamente 25/100.000 e a taxa de mortalidade para um período de 30 dias foi de 26%. (CABRAL et al., 1997). Considerando-se a alta incidência de condições neuropatológicas agudas em diversos países do mundo, incluindo o Brasil, pesquisas sobre os mecanismos patológicos subjacentes a estas doenças são de extrema importância para a perspectiva de novas abordagens terapêuticas.

Atualmente, inúmeros modelos experimentais de doenças neurodegenerativas agudas foram desenvolvidos e a fisiopatologia destas doenças está sendo investigada (DEWAR et al., 1999).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA LESÃO ISQUÊMICA

1.3.1 Excitotoxicidade

Excitotoxicidade é uma teoria importante e bem aceita, proposta por Olney e colaboradores em (1974), (OLNEY et al., 1974) para explicar os mecanismos básicos da fisiopatologia da isquemia cerebral. Esta teoria está fundamentada na liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios principalmente o glutamato (GAGLIARDI, 2000).

A sequência de eventos começa com a diminuição do fluxo sanguíneo cerebral restringindo a chegada de substratos, em especial o oxigênio e a glicose, ao encéfalo (DIRNAGL et al., 1999). Com a redução de sangue, as reservas energéticas são perdidas e consequentemente ocorre desequilíbrio iônico, despolarização neuronal e liberação do glutamato para o espaço extracelular (WOODRUFF et al., 2011; MOSKOWITZ et al., 2010). A ativação excessiva de receptores glutamatergicos induz alterações na concentração de íons intracelulares através do influxo do íon cálcio (Ca^{++}), íon sódio (Na^{+}), e íon cloreto (Cl^{-}) e efluxo de íon potássio (K^{+}) (WOODRUFF et al., 2011; MOSKOWITZ et al., 2010; DIRNAGL et al., 1999; MERGENTHALER et al., 2004).

O glutamato pode se ligar a uma grande variedade de receptores, os quais são do tipo ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores do tipo ionotrópicos são uma família de canais iônicos caracterizados de acordo com seu agonista mais seletivo: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidróxi-metilisoxazolepropionato (AMPA) e kainato (KA). Os receptores metabotrópicos acoplam-se a proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina

(proteínas-G), modulam a produção de segundos mensageiros intracelulares (CONN & PIN, 1997), promovem a modulação de efetores intracelulares e também podem ativar ou inibir diversos eventos de transdução do sinal celular (OBRENOVITCH & URENJAK, 1997).

Os receptores AMPA e KA são permeáveis a Na^+ e K^+ e são responsáveis pela rápida ativação da neurotransmissão excitatória no SNC, (BLEAKMAN & LODGE, 1998; SEGOVIA et al., 2001). Os receptores do subtipo NMDA ativam canais de Na^+ , K^+ , são altamente permeáveis ao Ca^{++} , são dependentes de voltagem e altamente regulados (SEGOVIA et al., 2001). Esses receptores apresentam três características importantes: 1 - Sob condições de repouso permanecem bloqueados por íons de Mg^{++} são abertos sob condições de despolarização neuronal, 2 - Quantidades significativas de Ca^{++} entram na célula durante a ativação deste receptor 3- A neurotransmissão mediada pelo receptor NMDA ocorre lentamente e continua por um período prolongado (OZAWA et al., 1998).

Os receptores de NMDA são regulados por glicina, poliaminas e por fosforilação. Sua atividade pode ser diminuída pela oxidação de grupos sulfidril em sítio redox (STONE & ADDAE, 2002). Os receptores glutamatérgicos estão entre as moléculas mais importantes, implicadas na comunicação entre neurônios pela sua extensa distribuição no SNC.

Estudos de clonagem e expressão gênica têm levado a identificação das subunidades dos receptores inotrópicos distribuídos da seguinte maneira: cinco subunidades para receptores de NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D), quatro para os receptores AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4) e cinco para receptores KA (GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2). São oito subtipos de receptores metabotrópicos, classificados em três subgrupos Grupo I: (mGluR1, e mGluR5), Grupo II: (mGluR2 e mGluR3) e Grupo III: (mGluR4, mGluR6 e mGluR7 e mGluR8), (PIN & DUVOISIN 1995).

A ativação dos receptores de NMDA produz ações diferentes tanto na vida como na morte neuronal excitotóxica, após uma lesão isquêmica ou trauma cerebral. Esta dupla ação

está relacionada com a composição das subunidades desses receptores (LIU et al., 2007). O bloqueio efetivo de receptores contendo subunidades NR1 e NR2B (sinápticos ou extrasinápticos), pelo antagonista RO-256981, sugere que este exerce um papel primário no desencadeamento da apoptose neuronal (LIU et al., 2007). Ao contrário, o bloqueio efetivo de receptores contendo subunidades, NR2A (sinápticos ou extrassinápticos) pelo antagonista NVP-AAMO77, sugere que este exerce um papel primordial na vida neuronal. Exercendo uma ação neuroprotetora tanto em receptores de NMDA como também em não receptores de NMDA (LIU et al., 2007).

Receptores do grupo I (mGluR1 e mGluR5) são predominantemente encontrados na membrana pós-sináptica de sinapses glutamatergias, tem a função de aumentar a excitotoxicidade neuronal pela modulação de receptores de NMDA e AMPA. Existem evidências que estes receptores aumentam a indução e progressão de morte neuronal excitotóxica (BRUNO et al., 2001). Os receptores do grupo II (mGluR2 e mGluR3) e do grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8), são encontrados em maior número nos terminais pré-sinápticos promovendo inibição da liberação de glutamato, também são muito expressados em astrócitos. Ambos os grupos de receptores promovem neuroproteção através da limitação de indução da excitotoxicidade (DOYLE et al., 2008).

Além de causar toxicidade para neurônios, o excesso de glutamato também pode estar envolvido na morte de células gliais. O glutamato pode induzir morte celular em astrócitos corticais (DAVID et al., 1996) e em oligodendrócitos (MATUTE et al., 2002). A microglia parece ser o tipo celular menos susceptível a excitotoxicidade. Isto é devido ao fato que estas células só expressam receptores para glutamato quando estão ativadas (MATUTE et al., 2002). As concentrações de glutamato, tanto no meio extracelular como na fenda sináptica, são extremamente controladas por mecanismos envolvendo enzimas e transportadores de glutamato em neurônios e células gliais (DANBOLT, 2001). Porém, durante as lesões agudas

do SNC, incluindo isquemia, trauma cranioencefálico, em doenças neurodegenerativas crônicas incluindo esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e a Síndrome da Deficiência Imuno Adquirida (AIDS), (LIPTON & ROSENBERG, 1994; HUGON et al., 1996), ocorre um acúmulo excessivo de glutamato no espaço extracelular e subsequente, sobre-ativação dos receptores desses aminoácidos.

O influxo excessivo de Na^+ é fator causador de tumefação intracelular e alteração do equilíbrio osmótico (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; MELDRUM, 2000b). A entrada excessiva de Ca^{++} na célula, ativa diversas proteases (por exemplo, calpaínas, fosfolipases e endonucleares) as quais podem degradar a maior parte dos componentes estruturais dos neurônios (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; MELDRUM, 2000b). Tem-se evidenciado, experimentalmente, que a ativação de certos tipos de fosfolipases durante excitotoxicidade pode degradar lipídios da membrana celular, que endonucleares podem degradar a célula (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990). Além de seus efeitos deletérios diretos, a ativação destas enzimas pode contribuir para a formação de radicais livres, tais como peroxinitrito e hidroxilas, substâncias extremamente lesivas (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; MELDRUM, 1994, 1998, 2000b). Por exemplo, fosfolipases ativadas por Ca^{++} podem induzir liberação de ácido araquidônico com formação subsequente de radicais livres (CHOI, 1988, 1992) Além disso, a ativação de receptores de NMDA induz a ativação da sintase do óxido nítrico (NO). O NO sintetizado por esta enzima, ao reagir com o ânion superóxido, pode produzir peroxinitrito e hidroxilas (LIPTON & CHOI, 1993; LIPTON & STAMLER, 1994; LIPTON & CHOI, 1998).

1.3.2 Estresse Oxidativo

A função fisiológica primária da mitocôndria é a geração de “adenosina trifosfato” (ATP), através da fosforilação oxidativa via transporte de elétrons. A superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como produtos gerados pela mitocôndria tem sido implicados com a lesão cerebral aguda (CHEN et al., 2011).

Os principais radicais livres formados a partir do oxigênio molecular são: o radical superóxido (O_2^-), importante na regulação vascular, e o radical hidroxila que tem alto potencial oxidante. Muitos estudos têm demonstrado que a reação de radicais de oxigênio representa papel importante na patogênese de várias doenças neurológicas tais como: isquemia, trauma e doenças neurodegenerativas. (SUGAWARA et al., 2004b). Outros estudos também sugerem que radicais de oxigênio são também envolvidos na morte celular. (LIU et al., 1998). A presença de radicais oxigenados indica lesão do tecido após reperfusão em muitos órgãos, incluindo coração, rins e encéfalo (LEWEN et al., 2000).

As mitocôndrias são particularmente afetadas, devido o transporte de elétrons pela membrana mitocondrial, podem ser inibidas pela produção de superóxidos e pelos altos níveis intracelulares de cálcio e sódio (LO et al., 2003).

Os mecanismos responsáveis pela indução de estresse oxidativo após a liberação excessiva de glutamato parecem envolver duas fases: a) Produção inicial de xantina oxidase, b) Uma fase tardia onde a produção de radicais livres intimamente relacionada a disfunção mitocondrial (ATLANTE & CALLISSANO, 2001; LEWEN et al., 2000). Além disso, a liberação de citocromo C pode induzir mais formação de radicais livres e disfunção celular incluindo lesão mitocondrial (LEWEN et al., 2000). Acredita-se que os mecanismos de defesa celulares envolvendo antioxidantes naturais estejam reduzidos em tais circunstâncias, levando a um considerável aumento do estresse oxidativo e lesão celular generalizada mediada por radicais livres (ATLANTE & CALLISSANO, 2001).

1.3.3 Inflamação

1.3.3.1 Aspectos Gerais

Inflamação é uma reação de defesa do organismo, cujo objetivo final é a eliminação da causa da lesão celular (CORAY & MICKE, 2002). É mediada por microorganismos, toxinas, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias causticas) necrose tecidual e/ou reações imunológicas (VILLARREAL et al., 2001; GOMES LEAL et al., 2002b). Embora a inflamação tenha sido reconhecida pelos egípcios, foi o escritor romano Celsius quem observou os aspectos básicos da resposta inflamatória, comumente presentes nos tecidos inflamados: rubor, edema, calor e dor (ALLAN & ROTTWELL, 2003).

A inflamação aguda é uma resposta rápida a um agente nocivo, encarregado de levar mediadores da defesa ao tecido lesado. Ela tem uma duração relativamente curta, durando alguns minutos, várias horas ou alguns dias, suas principais características são: a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação aguda possui três componentes principais: a) alterações no calibre do vaso que leva a um aumento no fluxo sanguíneo; b) alterações estruturais na microcirculação que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; c) emigração dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco de lesão e sua ativação para eliminar o agente lesivo (VILLARREAL et al., 2001; GOMES LEAL et al., 2002 b).

A inflamação crônica difere da aguda em alguns aspectos: enquanto a inflamação aguda é autolimitante, onde o patógeno é eliminado com subsequente reparo tecidual, na inflamação crônica o agente lesivo não é eliminado, resultando em um dano tecidual contínuo (WAKEFIELD & KUMAR, 2001). Histologicamente a inflamação crônica está associada com a presença de linfócitos e principalmente de macrófagos, ocorre também a proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tissular. (WAKEFIELD & KUMAR, 2001)

Reações vasculares e celulares da inflamação aguda e da crônica são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas, são produzidas e ativadas pelo estímulo da inflamação. Tais mediadores, agindo solitariamente, em conjunto ou em seqüência, amplificam a resposta e influenciam na sua evolução. São exemplos de processos inflamatórios crônicos: artrite reumatoide, asma, hanseníase, hepatite crônica, tuberculose e esclerose múltipla. (WAKEFIELD & KUMAR, 2001)

As respostas de defesa, incluindo inflamação, são geralmente benéficas ao organismo para limitar a sobrevivência e proliferação dos patógenos invasores, promover a sobrevivência do tecido, reparo, recuperação e conservar a energia do organismo. Entretanto, uma inflamação extensiva, prolongada, ou não regulada, é altamente prejudicial ao organismo (ALLAN & ROTTWELL, 2003).

1.3.3.2 Inflamação no Sistema Nervoso Central

O encéfalo apresenta características peculiares, como o seu confinamento no crânio, que limita o edema. Também apresenta a vascularização com junções fechadas, através da barreira hemato-encefálica (BHE) que limita a entrada de grandes moléculas e células circulantes. (PETTY & LO, 2002). Estas características determinam resposta inflamatória diferente de outros tecidos, as quais diversos autores chamaram de “privilégio imunológico” (LOTAN & SHCWATZ, 1994; HIRSCHBERG & SCHWARTZ, 1995; LAZAROV-SPIEGLER and RAPALINO, O. 1998; SCHWARTZ & KIPNES 2001a; SCHWARTZ & MOALEM, 2001b).

Vários autores estudaram respostas inflamatórias em diferentes tecidos e compararam sistematicamente a resposta inflamatória do encéfalo e da medula espinhal de ratos adultos, submetidos a pequenas lesões mecânicas e obtiveram os seguintes resultados: a medula espinhal apresentou resposta inflamatória mais intensa, sendo caracterizada por recrutamento

de maior quantidade de células da resposta inflamatória (SCHNELL et al., 1999). O recrutamento de neutrófilos pelo tecido nervoso do encéfalo lesado foi restrito às imediações do sítio da lesão, enquanto que na medula espinhal, os neutrófilos foram encontrados em uma área mais abrangente a partir do sítio da lesão (SCHNELL et al., 1999). Outros autores demonstraram que os encéfalos de ratos jovens são mais susceptíveis a estímulos inflamatórios, quando comparados a encéfalos de ratos adultos (BOLTON & PERRY, 1998).

1.3.3.3 Resposta Inflamatória Celular

Experimentalmente e clinicamente, o encéfalo responde a lesão isquêmica com um processo agudo e prolongado, caracterizado pela ativação rápida de células residentes (principalmente micróglia), produção de mediadores pró-inflamatórios e infiltração de vários tipos de células inflamatórias (incluindo neutrófilos, diferentes subtipos de células T, monócitos / macrófagos e outras células), (JIN et al., 2010).

Neutrófilos

Entre os diferentes tipos de leucócitos, os neutrófilos são os primeiros a se infiltrarem no encéfalo isquêmico (30 minutos após uma isquemia encefálica focal), sendo que o pico inicial vai de (1-3 dias), depois desaparecem ou diminuem rapidamente com o tempo (YILMAZ & GRANGER, 2008; KRIZ, 2006). Entretanto, os neutrófilos podem permanecer mais de 3 dias no encéfalo isquêmico, muito provavelmente, sua presença pode ser mascarada pelo grande acúmulo de microglia ativada/macrófagos no foco inflamatório (WESTON et al., 2007). Há evidências que essas células continuem, embora de forma reduzida entre 7-15 dias após a isquemia encefálica (WESTON et al., 2007).

Os neutrófilos são células que fisiologicamente agem por fagocitose, porém, podem potencializar a lesão isquêmica, através da secreção de substâncias deletérias ou mediadores

inflamatórios (WANG et al., 2007), tais como: iNOS, NADPH oxidase , myelooxidase, MMP8, MMP9 e elastases, espécies reativas derivadas do oxigênio (IADECOLA & ANRATHER 2012).

Macrófagos

Os monócitos sanguíneos são células não diferenciadas e precursores diretos de macrófagos. Dois tipos de populações diferentes de monócitos têm sido descritos em humanos e animais de experimentação de acordo com as suas superfícies de marcação e função. Os “monócitos Clássicos” produzem citosinas anti-inflamatórias IL-10, os monócitos pró-inflamatórios produzem TNF- α (IADECOLA et al., 2012). Após uma isquemia cerebral, monócitos inflamatórios são rapidamente recrutados para o sítio da lesão, onde são ativados e se tornam macrófagos (IADECOLA et al., 2012).

Microglia

As células microgliais são os macrófagos residentes do SNC e correspondem a cerca de 5 a 20 % da população glial no SNC. São importantes moduladores da resposta imune no encéfalo (CEULEMANS et al., 2010) e estão entre as primeiras células a responderem a lesão encefálica (JIN et al., 2010).

A microglia apresenta morfologia variada no encéfalo maduro. Quando em repouso, mostra uma morfologia ramificada, caracterizada por um pequeno corpo de onde saem processos ramificados (NEUMANN et al., 2006). Quando ativadas ou reativas, essas ramificações ficam mais espessas e evidentes. Nos processos degenerativos, principalmente de morte neuronal, aparece a forma fagocítica ou ameboide, caracterizada por uma forma mais arredondada (KETTENMANN & RANSON, 1995). Essas transformações na forma da célula são acompanhadas por mudanças no fenótipo celular, na produção e secreção de

citocinas, quimiocinas e na expressão de moléculas de MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) na membrana celular (LOKENS GAR et al., 2000).

Dados experimentais mostraram que a microglia residente é ativada dentro de minutos após o insulto isquêmico, produzindo mediadores inflamatórios, incluindo citosinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), (NAKAJIMA & KOHSAKA, 2004), radicais livres como (NO) e superóxido (LAKAN et al., 2009), metabólitos e ácidos graxos que exacerbam danos nos tecidos (BARONE et al., 1997; ROTHWELL et al., 1997). Estes eventos parecem preceder a infiltração de leucócitos para o encéfalo e pode desempenhar um papel crucial na mediação do aumento inicial da permeabilidade da BHE (YENANI et al., 2006).

A microglia ativada também parece desempenhar papel neuroprotetor após isquemia cerebral (STREIT, 2002; NAKAJIMA & KOHSAKA, 2004; NEUMAN et al., 2006; KATO et al., 2008). Este efeito protetor deve-se, provavelmente, a sua capacidade de eliminar excitotoxinas no espaço extracelular através da fagocitose de neutrófilos infiltrantes (DENES et al., 2007). A inibição da ativação microglial com tetraciclina (minociclina) induz neuroproteção em modelo experimental de AVE (MERGENTHALER et al., 2004).

Além disso, vários autores mencionam que a microglia também tem efeito benéfico na inflamação pela produção de vários fatores neurotróficos tais como neurotrofinas e fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos, o TGF- β 1), que estão envolvidos na sobrevivência neuronal e reparação de tecido nervoso em casos de lesão encefálica (STREIT, 2002; NAKAJIMA & KOHSAKA, 2004; NEUMAN et al., 2006; KATO et al., 2000).

Astrócitos

Os astrócitos fazem parte de mais de 50% da população de células da neurógli no SNC de mamíferos adultos (WOODRUFF et al., 2011), são células essenciais para a manutenção do SNC. Os astrócitos se proliferam e se diferenciam (*astrogliosis*) após AVE. Este evento coincide com o aumento da expressão da proteína ácido fibrilar glial (GFAP), (WANG et al., 2007; CEULEMANS et al., 2010).

Os astrócitos apresenta morfologia exuberante com muitos prolongamentos e núcleo esférico central, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1. São divididos em protoplasmáticos (tipo I), encontrados principalmente na substância cinzenta, e fibrosos (tipo II), achados ao longo dos tratos mielinizados (SUMMERS et al., 1995). Essas células caracterizam-se pela presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a GFAP e a vimentina (VIM), que servem como meio de identificação desse tipo celular em estudos *in situ* e em cultivo (MONTGOMERY, 1994). O estudo da expressão desses marcadores na linhagem astroglial demonstra que logo após o nascimento, há progressivo desaparecimento de VIM e substituição por GFAP. Porém, após uma agressão no SNC, além de ocorrer astrocitose, astrogliose e aumento na marcação de GFAP nos prolongamentos espessados, há recuperação da capacidade astrocitária em expressar VIM, desaparecida durante o desenvolvimento normal do tecido nervoso (BONDAN, 2003).

Os astrócitos participam da reparação do tecido nervoso, apresentando mudanças morfológicas. Essas mudanças incluem espessamento dos feixes de filamentos gliais com consequente aumento na marcação de GFAP (BONDAN, 2003; MONTGOMERY, 1994). Estas alterações são denominadas de gliose astrocitária, astrocitose, astrogliose reativa ou cicatriz glial. São chamadas “Isomórficas”, quando os processos astrocitários estão orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e

paralelo. E são chamadas “Anisomórficas”, quando sua disposição é irregular ao redor da lesão, geralmente acentuada com ruptura da BHE, (BIGNAMI & DAHL, 1994).

1.3.4. Apoptose

Os primeiros estudos de morte celular descreveram dois principais tipos morfológicamente distintos: Apoptose e necroses (KERR et al., 1972). A apoptose ou morte celular programada é um acontecimento comum, tanto em situações patológicas, contribuindo para fenômenos de inflamação e de disfunção orgânica, como em situações fisiológicas, como exemplo no decurso de processos de embriogênese. (SYNTICHAKI & TAVERNARAKIST, 2003).

A apoptose caracteriza-se pela ocorrência de várias alterações morfológicas das células afetadas: não há perda da integridade da membrana, porém, ocorre agregação e marginalização da cromatina, diminuição do volume citoplasmático e condensação do núcleo, fragmentação da célula em corpos apoptóticos e aumento da permeabilidade mitocondrial. Este processo requer energia e síntese de novas macromoléculas (SYNTICHAKI & TAVERNARAKIST, 2003).

Neste tipo de morte celular ocorre uma cascata de eventos bioquímicos, através da ativação de certas proteases: as Caspases que catalizam a destruição de células, existem latentemente em muitas delas como proteínas precursoras inativas e são ativadas por clivagem da proteína precursora. Caspase 1, 3, 8 e 9 estão envolvidas em isquemia encefálica, Caspase 8 e 9 são iniciadores de cascatas. A caspase 1 está envolvida na ativação de citosinas e faz a ligação entre inflamação e apoptose. (FRIENDLANDER, 2003; LOVE, 2003; MERGENTHALER et al.,2003).

Na apoptose são distinguidos dois tipos de ativação: intrínseca (basicamente mitocondrial) e extrínseca. A extrínseca é induzida por ativação do receptor (FAZ), através de

ligação do fator de necrose tumoral (TNF α), (MERGENTHALER et al.,2003). A morte celular por necrose não mostra as características macroscópicas, ultraestruturais e fisiológicas como da apoptose. Entretanto, a necrose é acompanhada por inchaço mitocondrial, dilatação do retículo endoplasmático e extensa vacuolização do citoplasma. (SYNTICHAKI & TAVERNARAKIST, 2003).

1.4 NEUROGÊNESE CORTICAL NO ENCÉFALO ADULTO

Na última década tem sido confirmados os dados pioneiros descritos por ALTMAN, (1965) de neurogênese em certas regiões de encéfalos adultos (ALVAREZ-BUYLLA & LIM, 2001; ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002; ALVAREZ-BUYLLA et al., 2002; DOETSCH et al., 1997). Sendo assim, duas regiões neurogênicas existem no encéfalo adulto: a zona subgranular hipocampal (SGZ), (KEMPERMANN & GAGE, 2000) e a zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais (DOETSCH et al., 1997; ALVAREZ-BUYLLA et al., 2002).

Em determinadas condições patológicas, incluindo trauma encefálico e acidente vascular encefálico, há migração de precursores de áreas neurogênicas para o parênquima neural lesionado (KOKAIA et al., 2006; LICHTENWALNER & PARENT, 2006; LI et al., 2004; YAMASHITA et al., 2006). No núcleo estriado, algumas dessas células tornam-se neurônios e expressam a grande maioria dos marcadores fenotípicos neuronais estriatais. A migração de neuroblastos para o núcleo estriado tem sido um fenômeno ocorrido em longo prazo, como a encontrada um ano após a oclusão da artéria cerebral média (THORED et al., 2006).

A reposição de células neuronais por células precursoras endógenas não parece ser um achado consistente do SNC de mamíferos adultos, fora da ZSV e ZSG. Reposição neuronal tem sido reportada em baixos níveis no córtex cerebral de ratos, após o dano seletivo de

células piramidais, na camada infragranular do neocortex em modelos experimentais (MAGAVI et al., 2000).

Em acidente vascular encefálico, a maioria dos estudos não reporta a neurogênese cortical, com exceção de um estudo (JIN et al., 2001). Neurogênese com reposição neuronal parece não existir na substância negra (RAKIC, 2002; KORNACK & RAKIC, 2001b; GOULD et al., 1999) e na medula espinhal (YAMAMOTO et al., 2001).

1.5 MODELO DE ISQUEMIA FOCAL POR INJEÇÃO DE ENDOTELINA-1 (ET-1)

Endotelina-1 (ET-1) é um potente vasoconstritor (YANAGISAWA et al., 1988a), que quando é injetado diretamente dentro do tecido nervoso (FUXE et al., 1997), reduz o fluxo sanguíneo encefálico local, para níveis que produzem lesão isquêmica (FUXE et al., 1997). No SNC de mamíferos, ET-1 é produzida em neurônios, no endotélio de microvasos encefálicos e em células gliais. Mas, também pode ser encontrada em outros tecidos, como os citados por MOTTE et al., (2005), incluindo pulmão, coração, fígado e algumas células circulantes.

No endotélio, atua através de receptores acoplados na proteína G. Sendo que os vários tipos de endotelina: ET-1, ET-2 e ET-3, que foram isolados originalmente do sobrenadante de cultura de células endoteliais aórticas bovinas (YANAGISAWA et al., 1988a; YANAGISAWA et al., 1988b), tem suas atividades mediadas por dois subtipos de receptores denominados: ET-A e ET-B (PARK & THORNHILL, 2000).

Os receptores ET-A tem alta especificidade por ET-1 e ET-2 e são encontrados mais facilmente em maior número em células musculares lisas das artérias piais (MASAKI & YANAGISAWA, 1992). Entretanto, os receptores ET-B não são seletivos e aceitam todos os tipos de endotelina (SAKURAI et al., 1990), estão localizados nas células endoteliais. Em condições fisiológicas, ET-1 contribuem significativamente para a regulação da pressão sanguínea e fluxo sanguíneo encefálico. Porém, ET-1 não é considerado como um agente

importante na patogênese da hipertensão arterial (HYNYNEN & KHALIL, 2006). ET-1 é um neuropeptídeo, influenciando a atividade de íons nos canais, efluxo de glutamato (ROZYEZKA et al., 2004), glicose (SANCHEZ – ALVAREZ et al., 2004), permeabilidade de junções gap (BLOMSTRAND et al., 2004) e sinalização de cálcio (VENANCE et al., 1997). Altos níveis de ET-1 foram encontrados no encéfalo de pacientes com desordens neurológicas tal como Alzheimer, hemorragias subaracnóideas, lesão cerebral traumática e isquemia (PETROV et al., 2002; ROGER et al., 2003), Vários trabalhos já comprovaram que a ET-1 é um peptídeo produtor de vasoconstrição endógena, que pode ser utilizado próximo da artéria cerebral média (BIERNASKIE et al., 2001; SHARKEY et al., 1994; WARD et al., 1998), microinjetado dentro de regiões selecionadas do encéfalo (FUXE et al., 1997; GILMOUR et al., 2004; HUGHES et al., 2003), ou aplicados diretamente na superfície cortical (FUXE et al., 1997) para produzir lesão isquêmica bem definida. Uma variação deste modelo foi apresentada por ADKINS-MUIR & JONAS, (2003), concluíram que a ET-1 pode produzir lesões pequenas e precisamente localizadas, com procedimentos cirúrgicos menos invasivos. Outros estudos também avaliaram os déficits comportamentais, provocados a partir de injeções intracorticais de ET-1 no córtex motor, (GILMOUR et al., 2004; WINDLE et al., 2006) e córtex somatosensorial (SOLEMAN et al., 2010).

1.6 HIPÓTESE E PARADÍGMA EXPERIMENTAL

O córtex cerebral é uma das regiões mais afetadas por eventos traumáticos e isquêmicos (DUNCAN et al., 2011; ARSENE et al., 2011; COOK et al., 2012). Em animais de experimentação e humanos, inúmeros déficits motores e sensoriais podem ocorrer após AVE, o que depende da intensidade e do local da lesão (DUNCAN et al., 2011; ARSENE et al., 2011; COOK et al., 2012). Como previamente mencionado, estes padrões lesivos são

acompanhados de perda neuronal e ativação glial (GILMOUR et al., 2004; WINDLE et al., 2006; SOLEMAN et al., 2010). No entanto, poucos estudos implementaram modelos experimentais com a descrição completa das alterações neuropatológicas e comportamentais após isquemia focal no córtex somestésico.

Na presente tese, utilizaremos o modelo experimental de isquemia focal provocada por microinjeções de ET-1 para verificarmos, em diferentes tempos de sobrevivência, os padrões histopatológicos subsequentes à isquemia focal induzida na substância cinzenta do córtex somestésico (S1) de ratos adultos. Também observaremos déficits funcionais sensório-motores, através de exame clínico e testes comportamentais.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 **Objetivo Geral**

Estabelecer os padrões de astrocitose, microgliose, perda neuronal e neurogênese em de ratos adultos submetidos à lesões isquêmicas focais, no córtex somestésico primário (S1), assim como os déficits funcionais ocasionados.

1.7.2 **Objetivos Específicos**

- a. Induzir lesão isquêmica focal no córtex somestésico para o estabelecimento do padrão temporal de evolução do processo lesivo;
- b. Investigar quais os padrões inflamatórios e neurodegenerativos produzidos através da lesão isquêmica com ênfase na atividade microglial;
- c. Avaliar se a lesão isquêmica produz neurogênese no córtex somestésico;
- d. Investigar qualitativamente e quantitativamente os déficits funcionais induzidos através de três testes comportamentais específicos para avaliar a perda de função sensorial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus Norvegicus*) da linhagem *Wistar*, machos, adultos, pesando em torno de 250-280g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram manipulados durante os experimentos de acordo com normas internacionais e pelas sugeridas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob licença (074-12) da Comissão de Ética em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará.

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais forma divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1- 1dia (N=10)

Animais isquêmicos injetados com ET-1 no córtex somestésico (N=7) e controle injetados com salina estéril (N=3).

Grupo 2 - 3dias (N=10)

Animais isquêmicos injetados com ET-1 no córtex somestésico (N=7) e controle injetados com salina estéril (N=3).

Grupo 3- 7dias (N=10)

Animais isquêmicos injetados com ET-1 no córtex somestésico (N=7) e controle injetados com salina estéril (N=3).

2.3 PROCEDIMENTOS PRÉ-INDUÇÃO ISQUÊMICA

Os animais do grupo de 7 dias foram separados com uma semana de antecedência da data prevista para a cirurgia. Foram ambientados e manipulados para reduzir reações de ansiedade e estresse durante os testes comportamentais, transferidos para gaiolas individuais (Figura 3), para que se adaptassem ao isolamento social. Os mesmos foram mantidos com água e comida, em uma sala adaptada para a realização dos testes. No dia anterior à indução isquêmica, foram registradas as linhas de base dos animais para os testes comportamentais, que consistiu em realizar os testes comportamentais (Teste de Colocação da Pata Anterior e Teste do Canto), antes que o animal sofresse prejuízo neurocomportamental através da indução isquêmica.



Figura 3. Animais alojados em gaiolas individuais

2.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA CORTICAL FOCAL

O modelo experimental de isquemia focal implementado em nossos estudos prévios (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al., 2012). Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p) de uma mistura de cloridrato de cetamina (72 mg/kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/kg). Os reflexos corneano e de retirada da pata foram testados antes dos animais serem posicionados no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). A estereotaxia foi realizada somente quando estes reflexos foram abolidos pela anestesia. Todas as coordenadas estereotáxicas foram obtidas de PAXINOS & WATSON, (2007). Para a injeção de ET-1 na substância cinzenta do córtex somestésico foram seguidas as seguintes coordenadas estereotáxicas: Antero-posterior: 1,3mm anterior ao bregma, médio-lateral: 4,5 mm e dorso-ventral: 0,3 a partir da superfície cortical.

Após a determinação da área de injeção, um pequeno orifício foi feito no crânio do animal, com auxílio de uma broca odontológica (carbaide número 6, Meisinger). A dura-máter sofreu uma incisão, e uma micropipeta de vidro com graduações de 1µl (Sigma, Brasil) com ponta de 10-20 µm foi posicionada de acordo com coordenadas estereotáxicas. 40 pMoles de ET-1 foram injetados por pressão no parênquima neural. Após a injeção, a micropipeta foi mantida no córtex por mais dois minutos, antes de ser lentamente retirada. Nos animais controle, injetou-se o mesmo volume do diluente. A fim de marcar a área de lesão, uma pequena quantidade do corante azul de colanil foi adicionada, tanto á solução contendo ET-1 como á solução controle. Após a cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida á vontade, durante os tempos de sobrevivência de 1, 3 e 7 dias.

2.5 ANÁLISE CLÍNICA E COMPORTAMENTAL

Para avaliar os déficits neurológicos, induzidos pela lesão isquêmica no córtex somestésico primário (S1), foram aplicados os seguintes testes:

- 1- Escala neurológica de Bederson (BEDERSON et al., 1986)
- 2- Teste de Colocação da Pata Anterior (SCHAAR et al., 2010; WEI et al., 2012)
- 3- Teste do Canto (SCHAAR et al., 2010)

OBS: O pesquisador que realizou os testes comportamentais estava cego com relação aos grupos experimentais.

2.5.1 Escala Neurológica

Bederson e colaboradores (1986) desenvolveram um exame neurológico simples e rápido que permite fazer uma quantificação crescente (de 0 a 3 pontos) do déficit neurológico adquirido 7 dias após a indução isquêmica na área sensório-motora para os animais dos grupos controle e isquêmicos.

A descrição da pontuação neste teste está descrita na tabela 1. No mesmo, os ratos foram sutilmente erguidos pelas caudas e colocados às proximidades da mesa de teste. Foram observadas atitudes flexoras das patas anteriores e o balanço corporal. Pontuação 0 (zero) foi dada aos animais que não manifestaram qualquer prejuízo na extensão das patas anteriores em direção à mesa de teste ou desvio corporal. Pontuação 1 (um) foi registrada aos animais que demonstraram desvios flexores no punho da pata anterior contralateral a lesão, sem modificações nos demais segmentos corporais. Pontuação 2 (dois) foi anotada aos animais

que ao serem erguidos manifestaram, além de anormalidade flexora, baixa resistência a desvios laterais na pata anterior contralateral a lesão. A pontuação 3 (três) foi dada aos animais que manifestaram, além de distúrbios flexores e reduzida resistência à manipulação lateral da pata anterior contralateral à lesão, desvios no tronco ou movimentos circulatorios no eixo corporal (BEDERSON et al, 1986; SCHAAR et al., 2010).

Tabela 1: Exame de déficit neurológico

Estado	Pontuação	Situação
Normal	Grade 0	Sem déficits observados
Moderado	Grade 1	Flexão do punho, pata contralateral.
Grave	Grade 2	Reduzida resistência a desvios laterais da pata, sem deslocamento do tronco.
	Grade 3	Mesmo déficit da grade 2, com movimentos anormais do tronco.

2.5.2 Teste da Colocação da Pata Anterior

As vibrissas dos ratos desempenham um papel muito importante na percepção sensorial (SCHALLERT & WOODLEE, 2005; SCHAAR et al., 2010). Este teste avalia a função sensório-motora e baseia-se na estimulação das vibrissas de um lado da face do animal e o reflexo de colocação das patas anteriores (HUA et al., 2002). O protocolo é realizado da seguinte maneira: O animal é segurado pelo dorso, com as patas penduradas e livres. O

experimentador faz movimentos superiores e inferiores, previamente, para facilitar o relaxamento muscular e eliminar movimentos abruptos (SCHAAR et al., 2010).

As vibrissas de cada lado da face são escovadas sobre as bordas de uma mesa (Figura4), o processo é repetido por dez vezes (SCHAAR et al., 2010). Segundo esses autores, os animais que não apresentam lesão isquêmica, tipicamente obtêm uma resposta de colocação da pata anterior, ipsilateral para o lado das vibrissas estimuladas sobre a mesa.

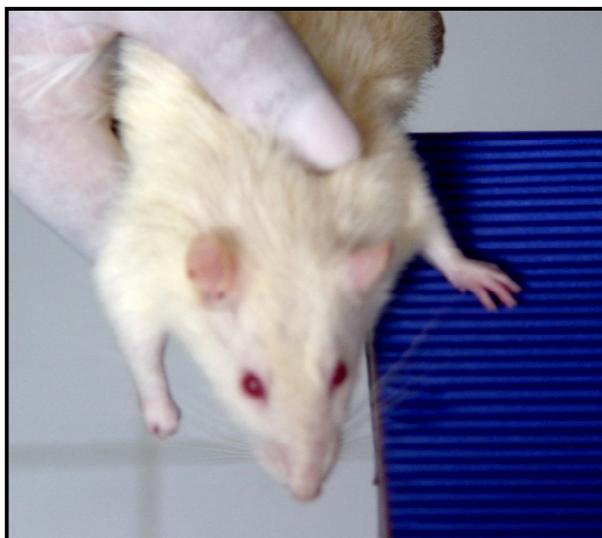


Figura 4. Animal posicionado em uma mesa para o teste de colocação da pata anterior.

Os animais com lesões isquêmicas unilaterais têm dificuldades na obtenção de uma resposta da colocação da pata anterior, contralateral a lesão isquêmica (HUA et al., 2002; SCHALLERT, 2006; LEASURE & SCHALLERT, 2004; SCHAAR et al., 2010). Poderá ser realizado o cálculo da porcentagem das respostas de colocação das patas ipsilateral e contralateral (SCHALLERT, 2002; WEI et al, 2012)

2.5.3 Teste do Canto

O teste do canto tem por objetivo fazer uma avaliação funcional, identificando e quantificando assimetrias sensório-motoras e posturais (SCHAAR et al., 2010). O aparato consiste em uma caixa de acrílico medindo em torno de 35 x 25 cm de largura por 30 cm de altura, na parte interna apresenta duas bordas fechadas em um ângulo de 30 graus (SCHAAR et al., 2010). Os animais são colocados em frente ao ângulo de 30° assim, ambos os lados das vibrissas são estimuladas, levando os animais a retornarem por um dos lados direito ou esquerdo (SCHAAR et al., 2010), (Figura 5). O número de retornos que o animal executa quando encontra o vértice do ângulo é registrado em uma ficha e os procedimentos são repetidos 10-30 vezes, durante intervalos de 5-10 minutos (SCHAAR et al., 2010). A cada retorno do animal o aparato é higienizado para eliminar pistas olfativas. Os animais com lesões isquêmicas unilaterais têm preferência pelo retorno do lado ipsilateral a lesão (HUA et al., 2002; CHEN et al., 2005; ZHANG et al., 2002).

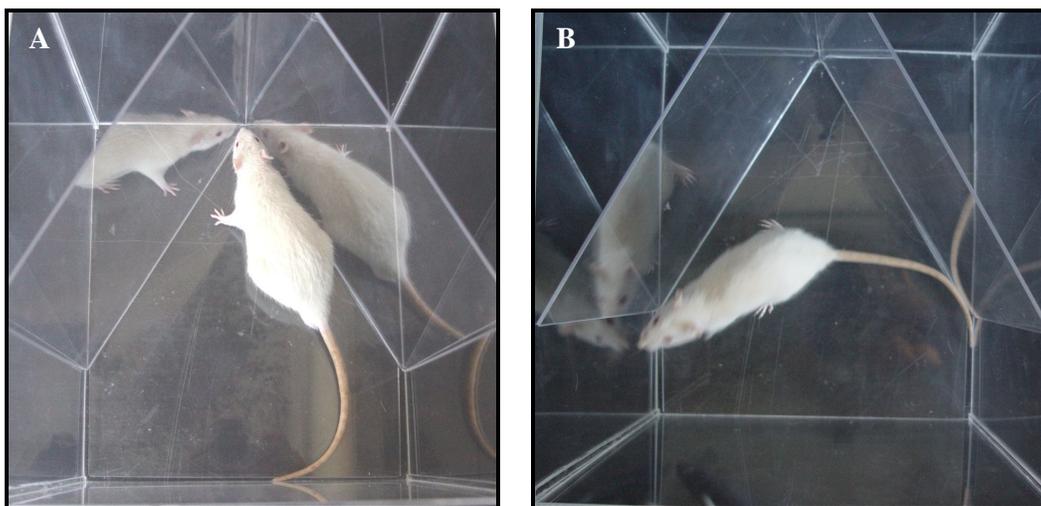


Figura 5: Aparato e animal durante a realização do Teste do Canto. Em (A), o animal posicionado no ângulo de 30° e em (B), o animal retornando pelo lado esquerdo ipsilateral.

2.6 PERFUSÃO E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais de todos os grupos experimentais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetanarcol[®], König, 72mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol[®], König, 9mg/kg). Quando foram abolidos os reflexos de retirada da pata e corneanos, os mesmos foram perfundidos, através do ventrículo esquerdo do coração, com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 250-300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Depois da retirada dos encéfalos (Figura 6), estes foram pós-fixados por 24h no mesmo fixador. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose, diluída em mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05M, pH (7,2 – 7,4).



Figura 6. Vista Dorsal do Encéfalo do Rato. A seta aponta para a área de injeção no Córtex Somestésico Primário (S1).

Os tecidos foram mantidos em solução crioprotetora com diferentes concentrações de acordo com o seguinte protocolo: crioprotetora a 25% (30 minutos), a 50% (4-6 h), a 100% (24-48 h). Após a crioproteção, os tecidos foram congelados em gel de imersão para criostato

(Tissue Tek) a -55°C em criostato provido de efeito Peltier (Zeiss, Mícron, Alemanha). Secções coronais de $20\ \mu\text{m}$ e secções tangenciais de $40\ \mu\text{m}$ de espessura, foram obtidas dos encéfalos com o auxílio do criostato. Algumas secções coronais de $50\ \mu\text{m}$ foram coletadas, para coloração de rotina. Para aumento da aderência, as lâminas foram mantidas á temperatura ambiente por no mínimo 24h. Após este período, as mesmas foram mantidas em um freezer a -20°C , aguardando imunohistoquímica ou outro procedimento.

2.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

2.7.1 Visualização da Área de Lesão

Para a visualização da área de lesão, utilizou-se a técnica de coloração com violeta de cresila, em secções com espessura de $50\ \mu\text{m}$. A zona de injeção de ET-1 pôde ser reconhecida pela presença do corante azul de colanil injetado com ET-1, ou pelo palor (ausência de corpos neuronais) e/ou necrose tecidual induzido pelo processo isquêmico.

2.7.2 Visualização do Campo de Barris

Para a visualização dos campos de barris, utilizou-se a histoquímica para citocromo oxidase (CO), em secções de $40\ \mu\text{m}$ em cortes tangenciais de animais isquêmicos.

2.7.3 Estudos Imunoistoquímicos

Para avaliar os padrões de astrocitose, microgliose, perda neuronal e neurogênese no modelo proposto, foram realizados uma série de estudos imunoistoquímicos. Para tanto, os seguintes anticorpos foram utilizados: A presença de microglia/macrófagos ativados foram identificadas pela imunomarcção com o anticorpo ED1 (1:200; Sorotec), que reconhece um

epítopo na membrana de lisossomas de macrófagos ativados (ROBINSON et al., 1986). A presença de corpos neuronais foi marcada com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon-Millipore), que reconhece um epítopo específico, no núcleo de neurônios maduros (MULLEN et al., 1992). A presença de células microgliais ativadas e não ativadas foi identificada pelo anticorpo Iba-1 (1: 1000; Wako), Uma proteína quelante de cálcio presente especificamente em microglia (ITO et al., 1998). Astrócitos foram marcados com o anticorpo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP), (1:200, DAKO,UK) (GOMES-LEAL et al., 2004). Neuroblastos foram identificados com o anticorpo anti-DCX (1:400; Santa Cruz), uma proteína associada a microtúbulos expressa em neurônios migratórios (MULLEN et al., 1992)

2.7.4 Protocolo de Imunomarcção

O protocolo utilizado foi previamente usado em (GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL et al., 2004, 2005). As lâminas com as secções montadas foram retiradas do freezer e colocadas na estufa (BrasDonto, BrClave[®]) à 40°C por 30 minutos. Em seguida, as secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica (Dako Pen, ref. S2002), lavadas em PBS por 3 minutos e imersas em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear) á temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções ficaram mais 20 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas em PBS por 3 minutos e submetidas ao tratamento com solução de metanol (QEEL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) (1ml de H₂O₂ para cada 100ml de metanol absoluto) sob agitação constante. As secções foram então lavadas (3 vezes, 3 minutos cada), em solução de PBS/Tween[®] (Sigma-Aldrich) e incubadas por 1h em soro normal de cavalo (NeuN, DCX, ED1) ou de cabra (GFAP) a 10% em câmara úmida. Depois, o excesso de soro normal foi retirado para incubação no anticorpo primário, por uma noite. No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 vezes, 3 minutos cada) na solução de PBS/Tween[®] e incubadas por 2h no anticorpo secundário, biotilado anti-camundongo

feito em cavalo (1:100; Vector) ou anti-coelho feito em cabra (1:200, vector) Após este período, três lavagens foram realizadas (3 minutos cada) em PBS/Tween para que as secções fossem incubadas no Complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain[®]) por 2h. As secções foram lavadas (4 vezes, 3 minutos cada), antes da revelação, utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas em uma solução contendo 250 ml de PB 0.1M (pH 7,2 – 7,4), juntamente com 125mg de DAB e 130 µl de H₂O₂. As mesmas foram monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação ficasse adequada. Após o término da revelação, as secções foram lavadas em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4), desidratadas em gradientes de álcool/ xileno e montadas em Entellan[®] (Merck).

2.8 ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções marcadas pelos diferentes métodos imunohistoquímicos e histoquímicos foram inspecionadas, em microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse 50i) e objetiva (plan 40x). Imagens de secções com campos mais ilustrativos, obtidas de animais isquêmicos e controle, foram obtidas com uso de uma câmara digital (Moticam 2500), acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Eclipse 50i).

2.9 ANÁLISE QUANTITATIVA

2.9.1 Método de Contagem

A contagem do número de macrófagos/microglia ativados (células ED1+), corpos neuronais (células NeuN+), microglia ativada e não ativada (células Iba1+), astrócitos (células

GFAP+), neuroblastos (células DCX+) de todos os grupos experimentais, foram realizadas utilizando-se um microscópio (Nikon modelo Eclipse E200) provido de uma gradícula de contagem (245 x 245 mm) na ocular (objetiva Plan 40x). Utilizou-se, nas contagens, três secções por animal e três campos por secção, nas regiões de maior densidade de células, considerando-se um campo central e dois campos adicionais com 1 mm de intervalo (1 mm lateral e 1 mm medial) em 4 ou 5 animais por grupo experimental. As médias das contagens e os desvios padrões foram obtidos e plotada em coordenadas cartesianas. Este protocolo de contagem foi previamente usado em nossos estudos (FRANCO et al., 2012)

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das contagens foram obtidas e plotadas em coordenadas cartesianas. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA), unicaudal um critério com correção a *posteriore* de Tukey para a comparação entre os grupos. O nível de significância foi de 95% e nível de confiança de ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas e a obtenção dos gráficos foram realizadas, utilizando-se os programas de computador (Bioestat 5.0), (GraphPad Prism 5.0) e (Microsoft Office Excel).

3. RESULTADOS

3.1 RESULTADOS NEUROCOMPORTAMENTAIS

3.1.1 Microinjeções de ET-1 induzem Déficits Neurológicos Demonstrados Pela Escala Neurológica de Bederson.

A escala neurológica de Bederson (BEDERSON et al., 1986) foi aplicada para analisar o grau de déficit neurológico, após uma semana de sobrevivência da lesão isquêmica. Neste tempo de sobrevivência, observou-se maior gravidade da lesão no grupo isquêmico ($2,8 \pm 0,2$), quando comparado aos animais do grupo controle ($1,3 \pm 0,3$). A diferença observada foi estatisticamente significativa (Teste t de Student, $p < 0,05$) (Figura 07).

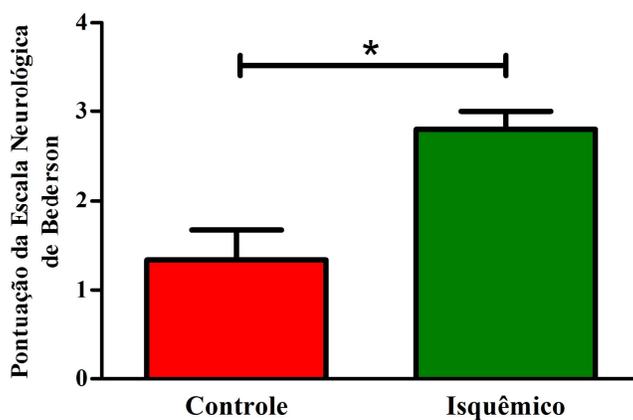


Figura 7. Escala Neurológica de Bederson. Média da graduação neucomportamental alcançada entre os grupos: controle e isquêmico. Teste t, $p=0,006$, * Diferença com significância estatística.

3.1.2 Microinjeções de ET-1 no Córtex Somestésico induzem Déficits Sensório-Motores Demonstrados pelo Teste de Colocação da Pata Anterior

Para avaliarmos o efeito da isquemia sobre o controle neural das patas ipsi e contralateral à lesão, utilizamos o teste de colocação da pata anterior. Houve simetria da percentagem da resposta motora entre animais da linha de base e controle injetados com salina estéril (Figura 8, $110 \pm 8,7\%$; e $112,3 \pm 6,2\%$; ANOVA, pós-teste de Tukey, $p > 0,05$). A comparação entre esses grupos não demonstrou assimetria do uso das patas (Figura 8). No entanto, microinjeções de ET-1 induziram assimetria no percentual de uso da pata não afetada em relação à afetada (contralateral ao córtex isquêmico) (ET-1: $283,2 \pm 50,0\%$; Salina: $110 \pm 8,7\%$; Linha de base: $112,3 \pm 6,2\%$; ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

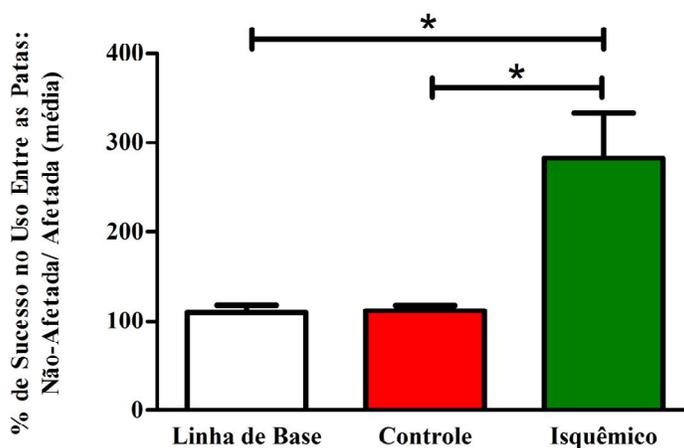


Figura 8: Teste de Colocação da Pata Anterior. Assimetria na resposta de apoio da pata anterior ipsilateral à vibrissa estimulada. Linha de Base (branco), 1dia antes da cirurgia e 7dias após nos grupos controle e Isquêmico. ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$; * Diferença com significância estatística.

3.1.3 Animais Isquêmicos Apresentam Assimetria de Retorno Pelos Lados Esquerdo e Direito de Acordo Com o Teste do Canto

O teste do canto (Figura 9), realizado um dia antes do processo cirúrgico, evidenciou simetria entre os lados de retorno dos animais (Linha de Base, Direito: $14,3 \pm 0,4$; e Esquerdo: $15,6 \pm 0,4$. Teste t, $p > 0,05$). Este achado foi mantido no grupo falso-operado, 7 dias após cirurgia (controle, direito: $12,6 \pm 0,3$; e esquerdo: $17,3 \pm 0,3$. Teste t, $p > 0,05$). Contudo, forte assimetria foi observada nos animais isquêmicos 7 dias após microinjeções de ET-1 (Direito: $10,6 \pm 1,5$; e Esquerdo: $19,4 \pm 1,5$. Teste t, $p < 0,05$). Portanto, os dados experimentais sugerem que a lesão isquêmica na área sensório-motora do córtex somestésico é a responsável pelo prejuízo neurocomportamental (Figura 9), evidenciado pela maior quantidade de retorno ipsilateral à lesão nos animais do grupo isquêmico (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

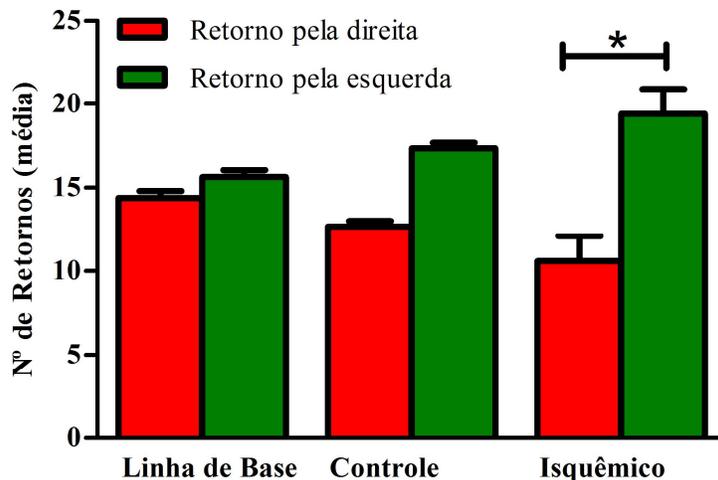


Figura 9: Teste do Canto. Contagem de retornos entre os lados direito (contralateral a lesão isquêmica) e esquerdo (lado ipsilateral a lesão isquêmica) do animal. Linha de Base, 1 dia antes da cirurgia e 7 dias após a indução isquêmica. ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$, * Diferença com significância estatística.

Os valores obtidos neste teste comportamental foram também expressos como taxa percentual de retorno entre as patas não afetada e afetada (Figura 10). Os resultados reforçam os dados obtidos anteriormente, onde os valores absolutos foram utilizados (linha de base: $110,0 \pm 5,7\%$; grupo controle: $137,3 \pm 6,3\%$; grupo isquêmico: $211,2 \pm 51,8\%$. ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Apesar da diferença matemática observada entre as médias dos Grupos Controle e Isquêmico, contudo, estes não foram significantes estatisticamente (respectivamente, $137,3 \pm 6,3\%$; e $211,2 \pm 51,8\%$. ANOVA, pós-teste de Tukey, $p > 0,05$).

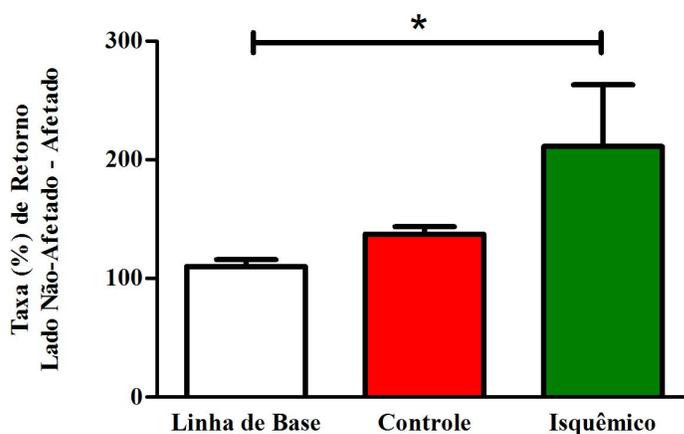


Figura 10: Teste do Canto. Percentagem de retornos entre os lados não afetado (ipsilateral) e afetado (contralateral) à lesão isquêmica do animal nos grupos experimentais. ANOVA, pós-teste de Tukey, $p > 0,05$ *Diferença com significância estatística.

3.2 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZIRAM LESÃO ISQUÊMICA FOCAL NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA

No presente trabalho, induziu-se isquemia focal através da administração de 40 pMoles de ET-1, na substância cinzenta do córtex somestésico de ratos adultos. Para a marcação morfológica desta área, utilizou-se a histoquímica para citocromo oxidase (CO) em cortes tangenciais de 40 μm . Observou-se que as injeções de ET-1 foram realizadas precisamente na área somestésica primária (S1), próximas aos campos de barris (Figura 11A). Diversas células inflamatórias (CO+) foram observadas, nas regiões em torno do sítio de injeção marcadas pela (CO). (Figura 11B). Estas células possuem a morfologia de macrófagos ativados, estudos futuros serão realizados para melhor identificação dessas células.

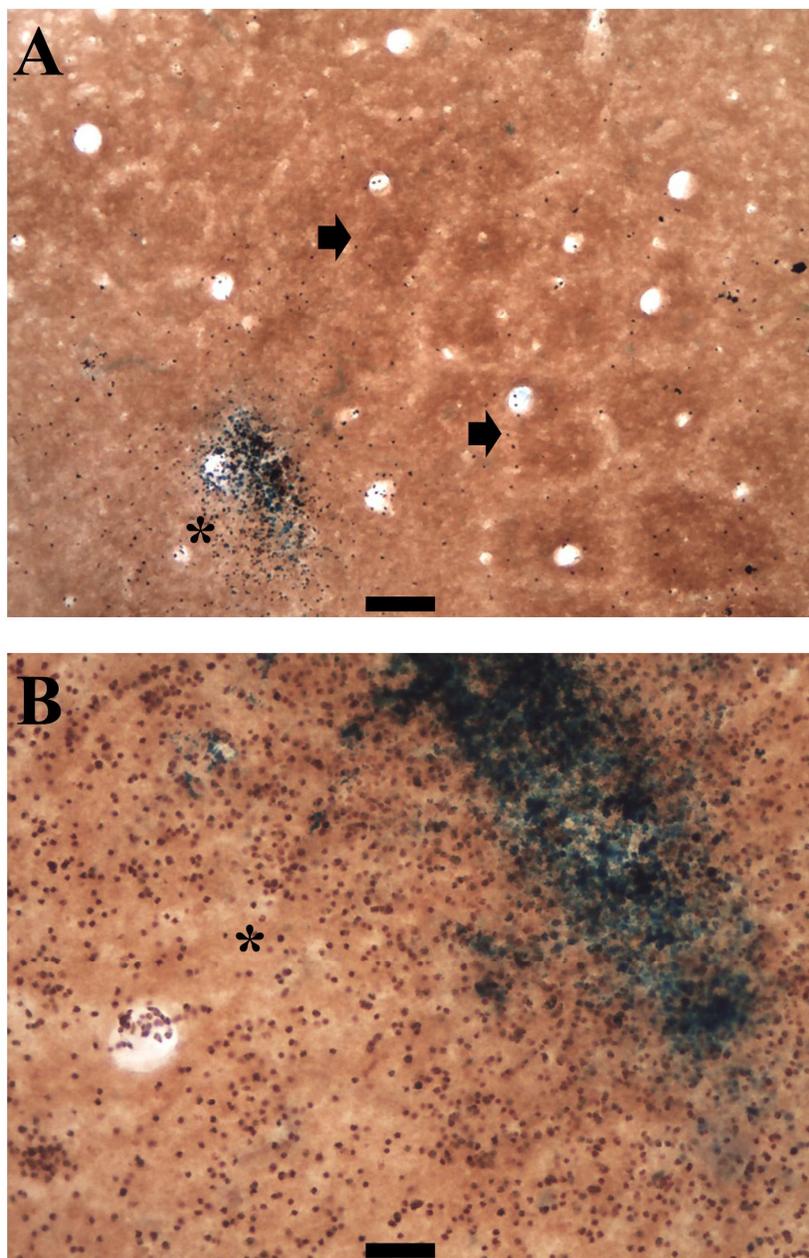


Figura 11. Relação espacial da lesão isquêmica na área somestésica primária demonstrada pela histoquímica para citocromo oxidase. Corte tangencial do córtex somestésico de um animal isquêmico injetado com endotelina -1 e perfundido 7 após a indução isquêmica. Asteriscos marcam o sítio de injeção menor aumento (A) e maior aumento (B) do mesmo campo. Em (A) a seta acima aponta para um barril e a seta em baixo aponta para o septo entre os barri. As células marcadas em (B) possuem a morfologia de macrófagos ativados (células arredondadas). Escalas: A (300 μ m); B (130 μ m).

A área de lesão foi visualizada através da coloração por violeta de cresila, em secções coronais de 50 μm (Figura 12). Para melhor visualização da área de injeção, administrou-se o corante azul de colanil juntamente com a ET-1. O sítio de injeção de ET-1 foi caracterizado pela presença do palor tecidual, (ausência de corpos de neurônios e células gliais) (Figura 12A e 12B) ou pela marcação intensa de células inflamatórias (Figura 12E e 12F).

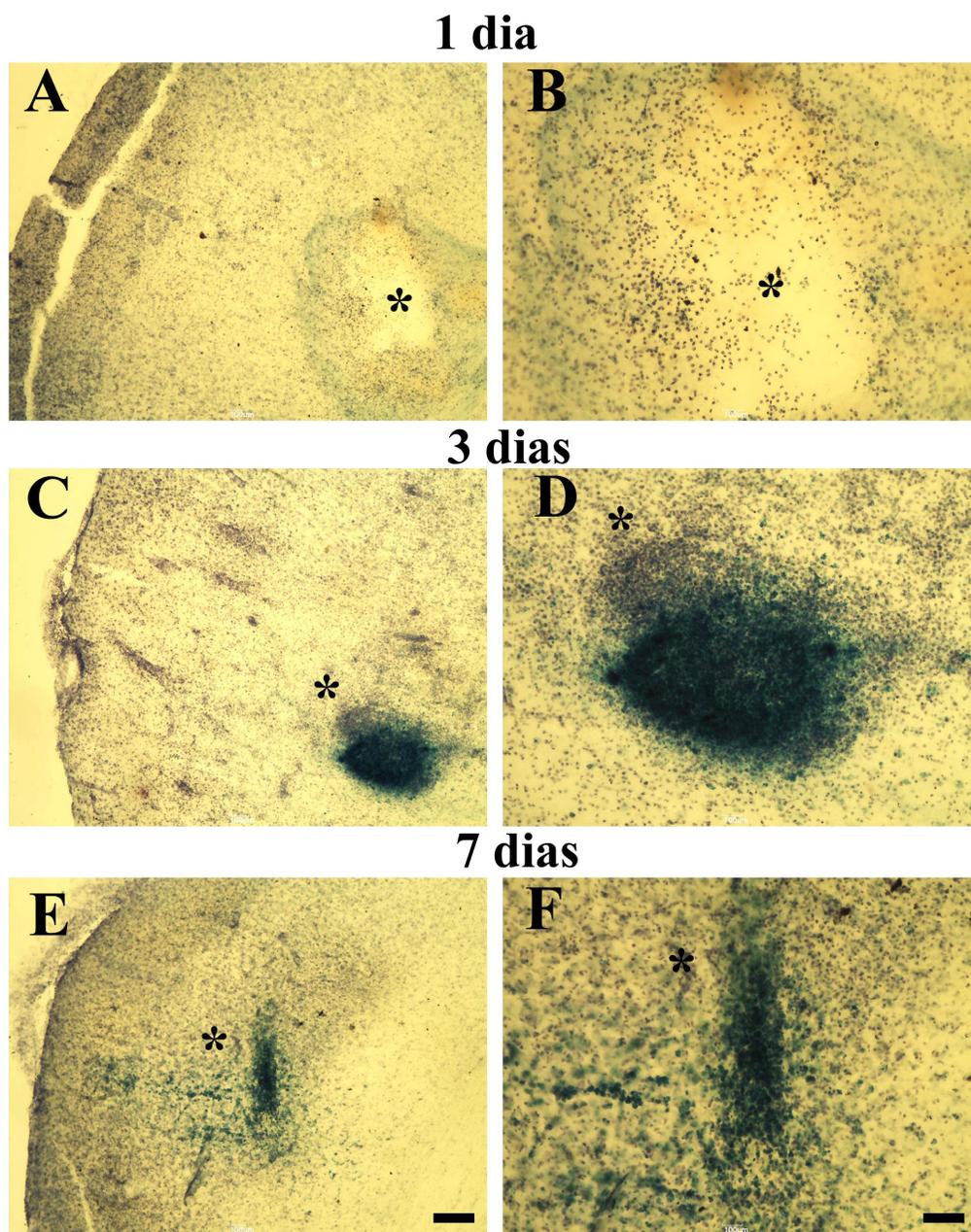


Figura 12. Análise histopatológica de seções coronais do córtex somestésico de ratos, coradas pela violeta de cresila. Animais injetados com endotelina -1 e perfundidos 1 (A-B), 3 (C-D) e 7 (E-F) dias após a indução isquêmica. Asteriscos marcam a área de lesão. B, D e F são ampliações de A, C e E. Escalas: A, C, E (300 μm); B, D, F (120 μm).

3.3 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZIRAM PERDA NEURONAL NA ÁREA SOMESTÉSICA

A presença de corpos neuronais foi evidenciada com o anticorpo anti-NeuN. Um dia após a lesão isquêmica, houve baixa perda neuronal no centro da lesão isquêmica, as células apresentaram uma morfologia aparentemente preservada (Figura 13D). Entre 3 e 7 dias, houve intensa perda de corpos celulares, com formação de uma região clara de rarefação no centro da lesão (Figura 13F-H). Em ambos os tempos de sobrevivência, as células apresentaram características patológicas (Figura 13E-H).

Os resultados da análise quantitativa (Figura 14) mostram que a densidade média de células NeuN+/campo foi maior no grupo de 1 dia ($28,28 \pm 0,45$), quando comparada à do grupo de 3 dias ($14,8 \pm 0,49$) e 7 dias ($12,62 \pm 0,42$). Todos os grupos apresentaram diferenças significativas, entre os lados contralaterais e ipsilaterais à lesão ($p < 0,05$ ANOVA - Tukey).

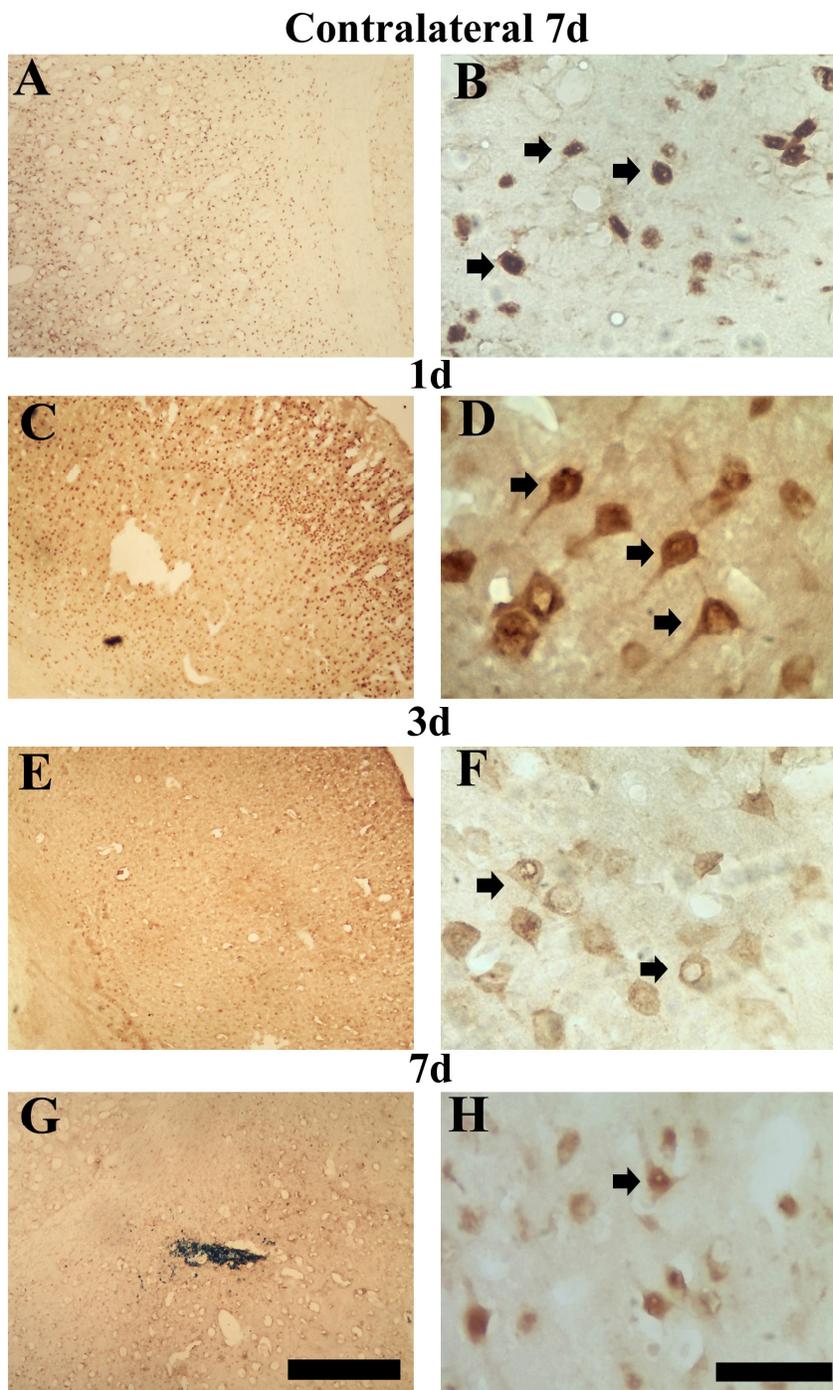


Figura 13. Perda neuronal após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, demonstrada pela imunohistoquímica para NeuN. Lado contralateral a lesão (A-B) e animais injetados com ET-1 nos tempos de 1, (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução isquêmica. As setas apontam para células NeuN+. B, D, F e H são ampliações de A, C, E e G. Escalas: A, C, E e G (50 μ m); B, D, F e H: (500 μ m).

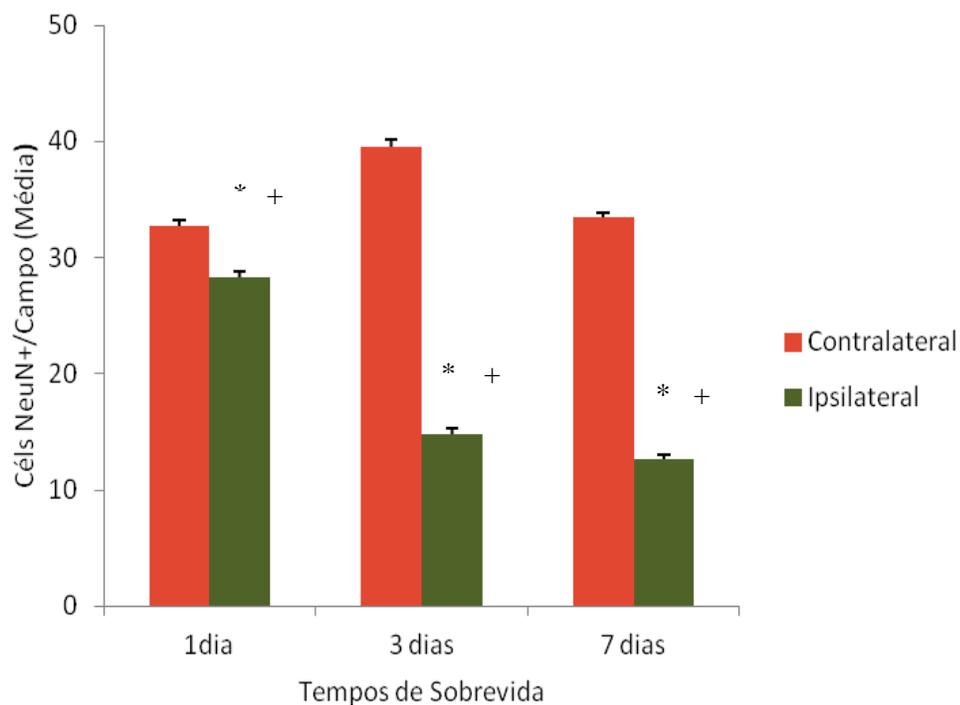


Figura 14. Análise quantitativa da perda neuronal na área somestésica primária após isquemia focal. Média das contagens/campo em função do tempo de sobrevida. Houve diminuição progressiva do número de neurônios (*+ $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Todos os grupos apresentaram diferença significativa entre os lados contralateral e ipsilateral á lesão isquêmica (* $p < 0,05$ -ANOVA/tukey).*Comparações entre os lados ipsi e contralateral; + comparações com tempo de sobrevida anterior.

3.4. A ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 RESULTA EM ATIVAÇÃO MICROGLIAL PROGRESSIVA NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA

A população microglial em geral foi marcada pelo anticorpo anti-Iba1 (ITO et al., 1998). No lado contralateral à lesão isquêmica, as células microgliais apresentaram aspecto ramificado, com pequenos corpos celulares, caracterizando o estado morfológico não ativado (Figura 15A-B). A lesão isquêmica focal mudou este perfil morfológico (Figura 15C-H). Houve ativação microglial progressiva na área somestésica primária entre 1 e 7 dias (Figura 15C-H).

No primeiro dia após a lesão, a ativação foi insipiente, onde apenas uma pequena fração microglial apresentou diminuição de processos e aumento da intensidade da marcação (Figura 15C-D). Ao terceiro dia, as células microgliais adquiriram uma morfologia ameboide e arredondada, caracterizando a transformação em fagócitos (Figura 15E-F). Ao sétimo dia, a ativação microglial foi bem intensa e a maior parte das células tornou-se ameboide ou arredondada, formando agregados microgliais (Figura 15G-H).

As observações qualitativas, anteriormente descritas, foram confirmadas pela análise quantitativa (Figura 16). As densidades médias de células Iba1+ foram maiores nos grupos de 3 ($42,66 \pm 0,90$) e 7 ($52,44 \pm 1,84$) dias, comparadas à do grupo de 1 dia ($15,64 \pm 0,60$). Estas diferenças foram estatisticamente significativas (Figura 16, $p < 0,05$ ANOVA- Tukey), com exceção às comparações realizadas entre os lados contralaterais ($p > 0,05$ ANOVA- Tukey).

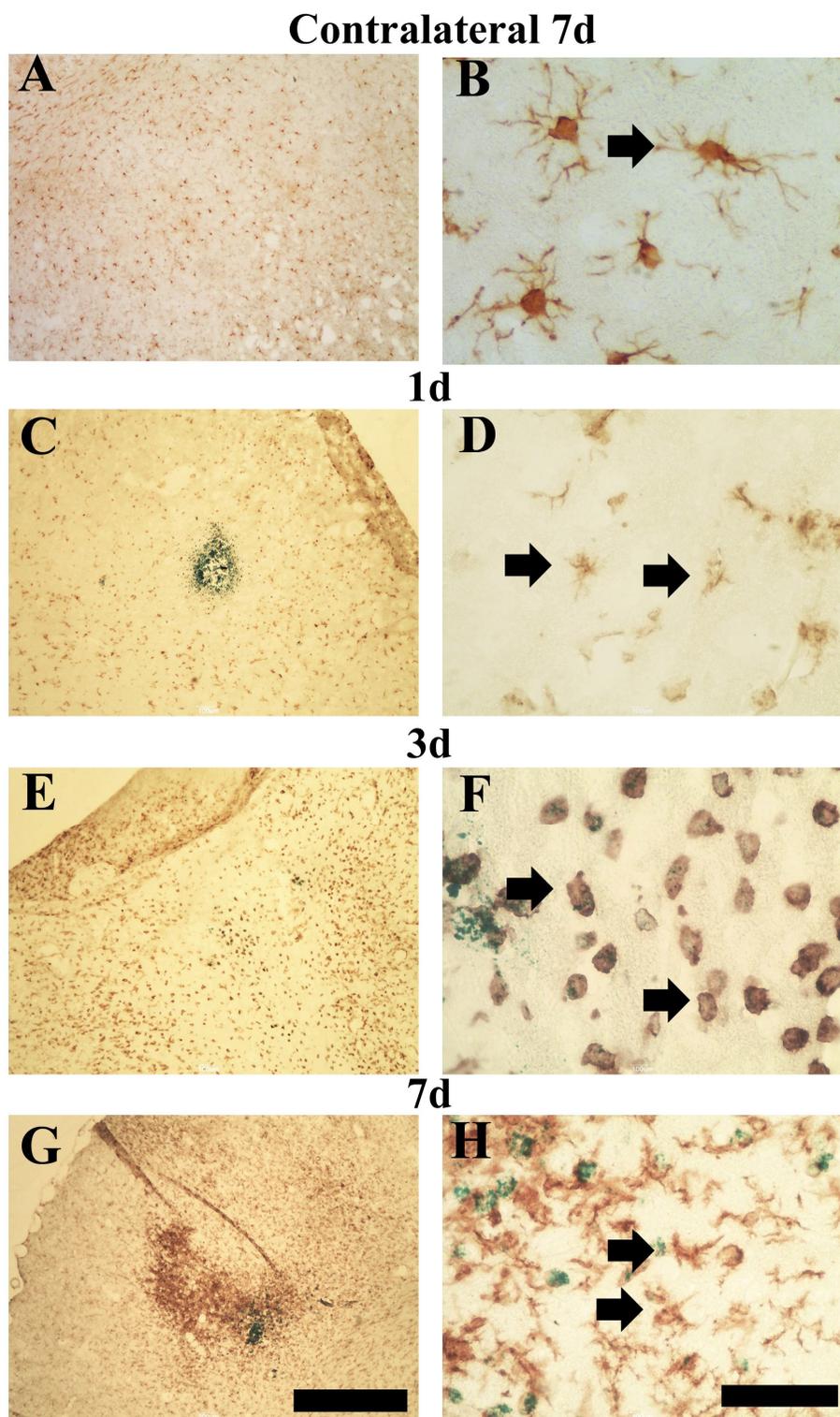


Figura 15. Ativação microglial progressiva após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, marcada pela imunistoquímica para Iba1. Lado contralateral a lesão (A-B) e animais injetados com ET-1 nos tempos de 1, (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução isquêmica. As setas apontam para células Iba1+. B, D, F e H são ampliações de A, C, E, e G. Escalas A, C, E e G (50µm); B, D, F e H: (500µm).

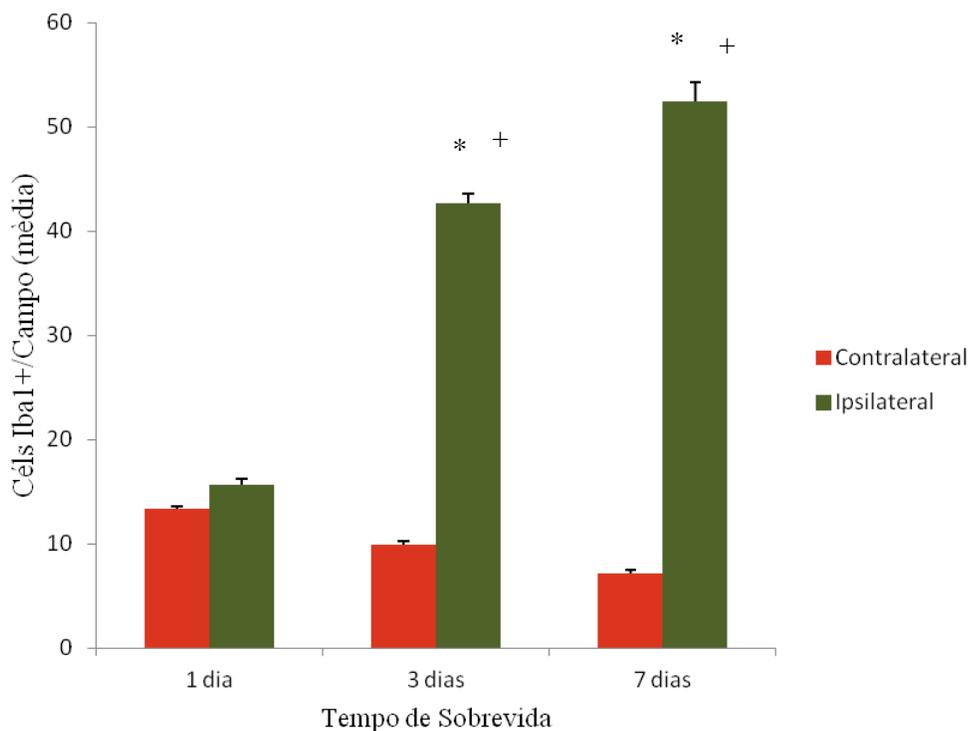


Figura 16. Análise quantitativa de células Iba1+ na área somestésica primária após isquemia focal. Média das contagens/campo em função do tempo de sobrevida nos lados ipsi e contralateral. A densidade média de células Iba1+ foi maior nos grupos de 3 e 7 dias (* $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Não houve diferença estatística entre os lados ipsilateral e contralateral á lesão isquêmica em 1dia ($p > 0,05$ -ANOVA/tukey). Não houve aumento do número de células microgliais no lado contralateral em todos os tempos ($p > 0,05$ -ANOVA/tukey).*Comparações entre os lados ipsilateral e contralateral; + comparações com tempo de sobrevida anterior.

A avaliação da ativação microglial também foi realizada pela imunohistoquímica para o anticorpo ED1, que é específico para a marcação de microglia/macrófagos ativados (ROBINSON et al., 1986).

Confirmando os achados com Iba1, observou-se ativação microglial progressiva entre 1 e 7 dias após a indução isquêmica (Figura 17). No lado contralateral, houve predomínio de microglia ramificada, com poucas células redondas (Figura 17A-B). No primeiro dia observou-se um número reduzido de células ED1+ no parênquima isquêmico (Figura 17C-D). Ao terceiro dia, houve um aumento do número destas células na região isquêmica (figura 17E-F). Ao sétimo dia, houve aumento significativo da presença de células ED1+ no parênquima isquêmico, com predominância de fagócitos no centro da lesão (Figura 17H).

As observações anteriormente descritas foram confirmadas pela análise quantitativa (Figura 18). As densidades médias de células ED1+ foram maiores nos grupos de 3 ($16,44 \pm 0,71$), 7 ($29,83 \pm 0,96$) dias comparados ao grupo de 1 dia ($11,94 \pm 0,53$) (Figura 18). Todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas, entre lados contralateral e ipsilateral à lesão isquêmica ($p < 0,05$ -ANOVA/Tukey) (Figura 18). Não houve diferença significativa entre os lados contralaterais à lesão, em todos os tempos ($p < 0,05$ -ANOVA/Tukey).

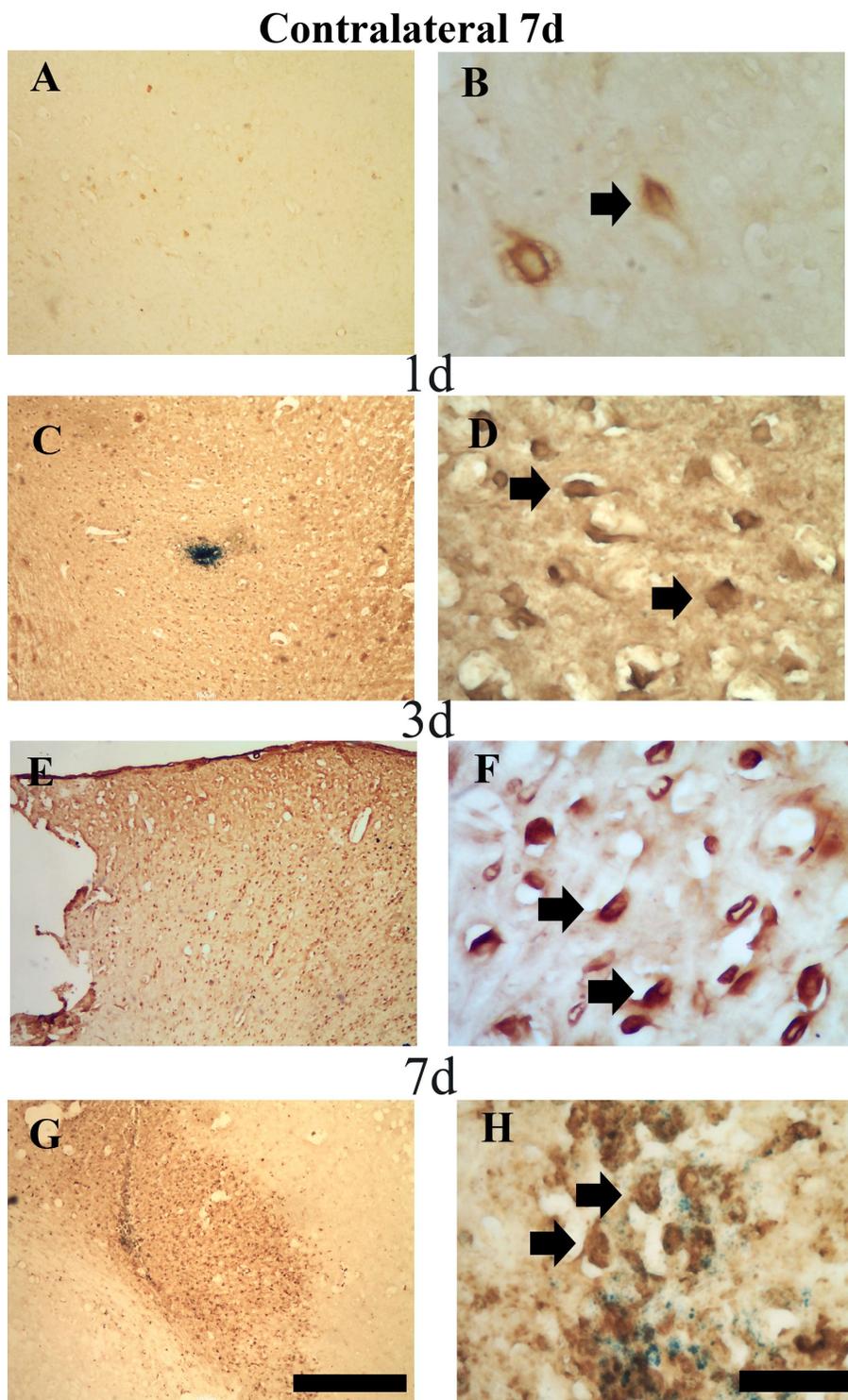


Figura 17. Ativação microglial progressiva após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, revelada pela imunohistoquímica para ED1. Lado contralateral a lesão (A-B) e animais injetados com ET-1 nos tempos de 1, (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução isquêmica. As setas apontam para células ED1+. B, D, F e H são ampliações de A, C, E, e G. Escalas A, C, E e G (50 μ m); B, D, F e H: (500 μ m).

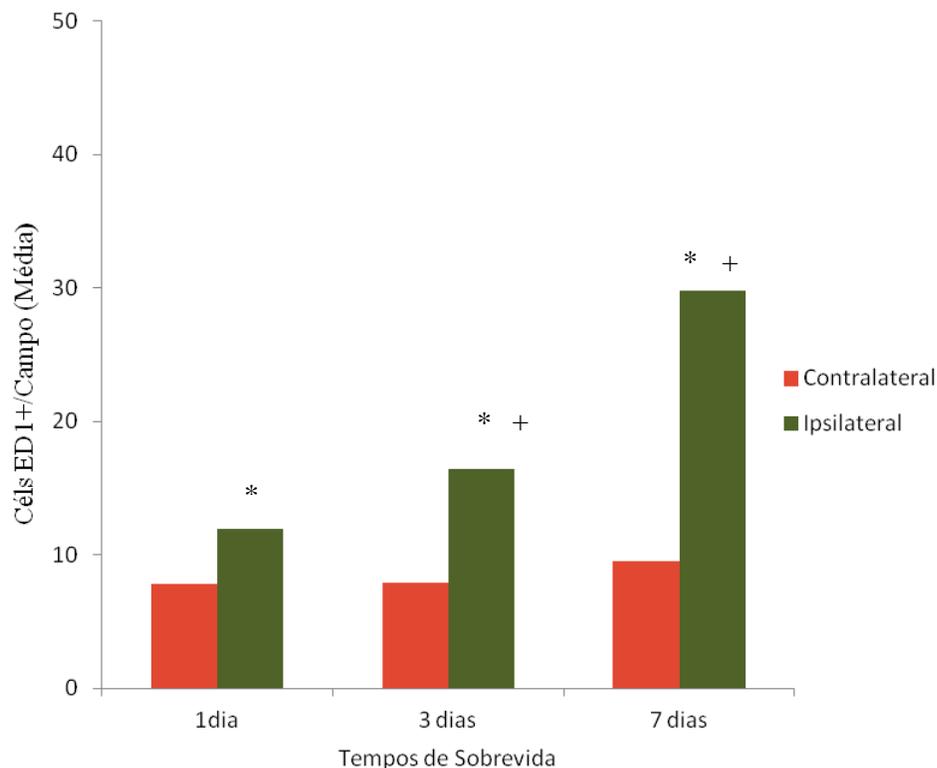


Figura 18. Análise quantitativa de células ED1+ na área somestésica primária após isquemia focal. Média das contagens/campo em função do tempo de sobrevida nos lados ipsilateral e contralateral. A densidade média de células ED1+ foi maior nos grupos de 3 e 7 dias (* $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Foi menor no grupo de 1 dia. Todos os grupos apresentaram diferença estatística entre os lados ipsilateral e contralateral a lesão isquêmica (* $p < 0,05$ -ANOVA/tukey). *Comparações entre os lados ipsi e contralateral; + comparações com tempo de sobrevida anterior.

3.5 A LESÃO ISQUÊMICA INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZIU ATIVAÇÃO PROGRESSIVA DE ASTRÓCITOS NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA

Neste estudo, utilizamos um anticorpo anti-proteína básica de mielina para imunomarcação de astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004). Houve ativação progressiva de astrócitos na área somestésica primária entre 1 e 7 dias após a indução isquêmica, (Figura 19).

No primeiro dia, houve baixa reatividade dos astrócitos tanto no centro como na borda da lesão (Figura 19C-D). Ao terceiro pôde-se visualizar células GFAP+ fortemente marcadas, com aumento do tamanho do corpo celular, redução de comprimento e aumento da espessura de processos astrocíticos, principalmente na borda da lesão (Figura 19E-F). Neste tempo de sobrevivência, houve considerável perda de imunoreatividade para GFAP no centro da lesão, que apresentou quase que total ausência de imunomarcação para astrócitos (Figura 19E). Ao sétimo dia, observou-se intensa perda de imunoreatividade para GFAP no centro da lesão (Figura 19G), enquanto que a astrocitose aumentou na periferia da mesma (Figura 19H).

As densidades médias de células GFAP+ foram maiores nos grupos de 3 ($31,51 \pm 0,61$) e 7 ($58,11 \pm 11,24$) dias, comparadas às do grupo de 1 dia ($21,77 \pm 0,43$), (Figura 20). Em todos os grupos houve diferença significativa entre os lados contralateral e ipsilateral à lesão isquêmica (* $p < 0,05$ - ANOVA- Tukey). Não houve diferença significativa entre os lados contralateral e ipsilateral em todos os tempos investigados, ($p > 0,05$ ANOVA- Tukey).

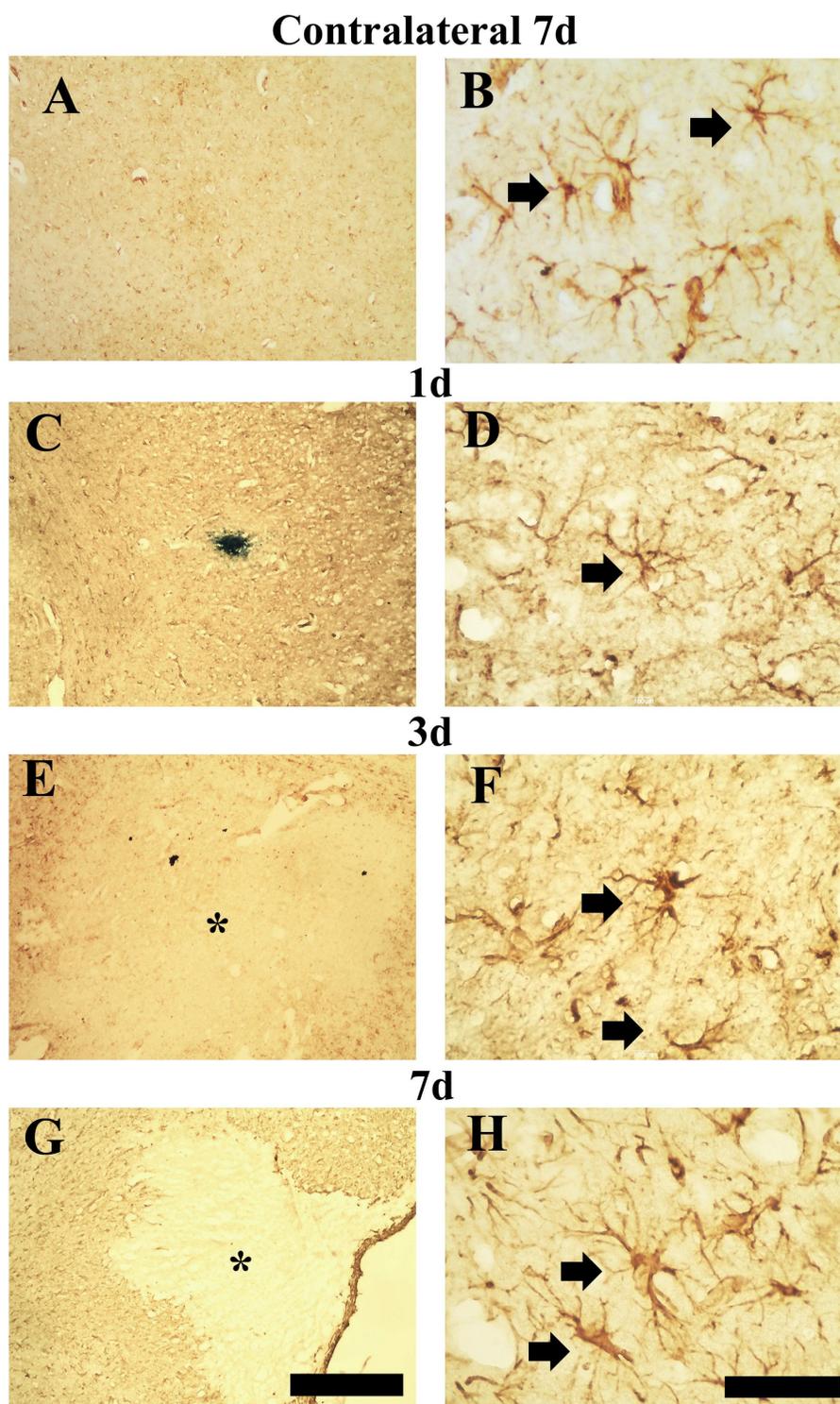


Figura 19. Ativação progressiva de astrócitos após lesão isquêmica focal no córtex somestésico, revelada pela imunistoquímica para GFAP. Lado contralateral a lesão (A-B) e animais injetados com ET-1 nos tempos de 1, (C-D), 3 (E-F) e 7 dias (G-H) após a indução isquêmica. As setas apontam para células GFAP+. B, D, F e H são ampliações de A, C, E, e G. Escalas A, C, E e G (50 μ m); B, D, F e H: (500 μ m).

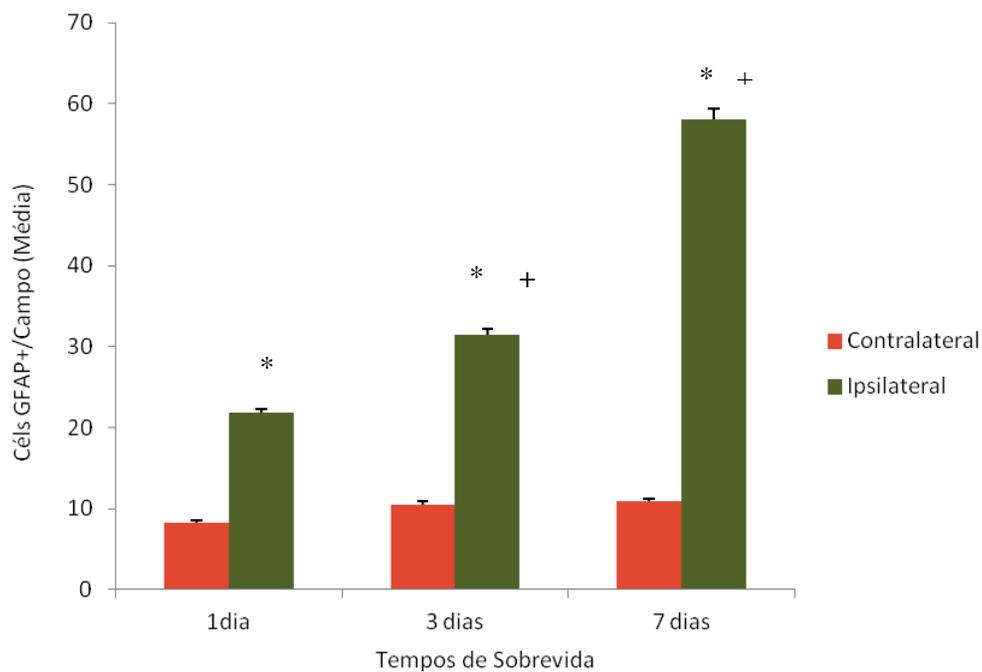


Figura 20. Análise quantitativa de células GFAP+ na área somestésica primária após isquemia focal. Média das contagens/campo em função do tempo de sobrevida nos lados ipsilateral e contralateral. A densidade média de células GFAP+ foi maior nos grupos de 3 e 7 dias (* $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Foi menor no grupo de 1 dia. Todos os grupos apresentaram diferença estatística entre os lados ipsilateral e contralateral a lesão isquêmica (* $p < 0,05$ -ANOVA/tukey).*Comparações entre os lados ipsi e contralateral; + comparações com tempo de sobrevida anterior.

3.6 ISQUEMIAS FOCAIS NO CÓRTEX SOMESTÉSICO E NEUROGÊNESE ENDÓGENA

3.6.1 A Isquemia Focal no Córtex Somestésico Influencia o Número de Neuroblastos na Zona Subventricular

A presença de neuroblastos (neurônios imaturos) foi identificada com o anticorpo anti-DCX, uma proteína associada a microtúbulos, expressa em neurônios imaturos migratórios (GLEESON et al ., 1999). Houve um aumento progressivo de imunomarcção de neuroblastos na SVZ ipsilateral nos tempos de sobrevida investigados (Figura 21). A marcação foi mais intensa na parte dorsal da SVZ (Figura 21).

A análise quantitativa do número de células (DCX+) foi maior no grupo de 7 ($90,5 \pm 1,88$) dias em comparação a 3 ($62,5 \pm 3,17$) e 1 dia ($61,58 \pm 3,25$) ($p < 0,05$ ANOVA-Tukey). Não houve diferença na densidade de neuroblastos entre 1 e 3 dias (Figura 22, ($p > 0,05$ ANOVA- Tukey), mas o aumento foi significativo entre 3 e 7 dias ($p < 0,05$ ANOVA-Tukey). Houve diferença entre os lados ipsi e contralateral em todos os tempos de sobrevida investigados (Figura 22).

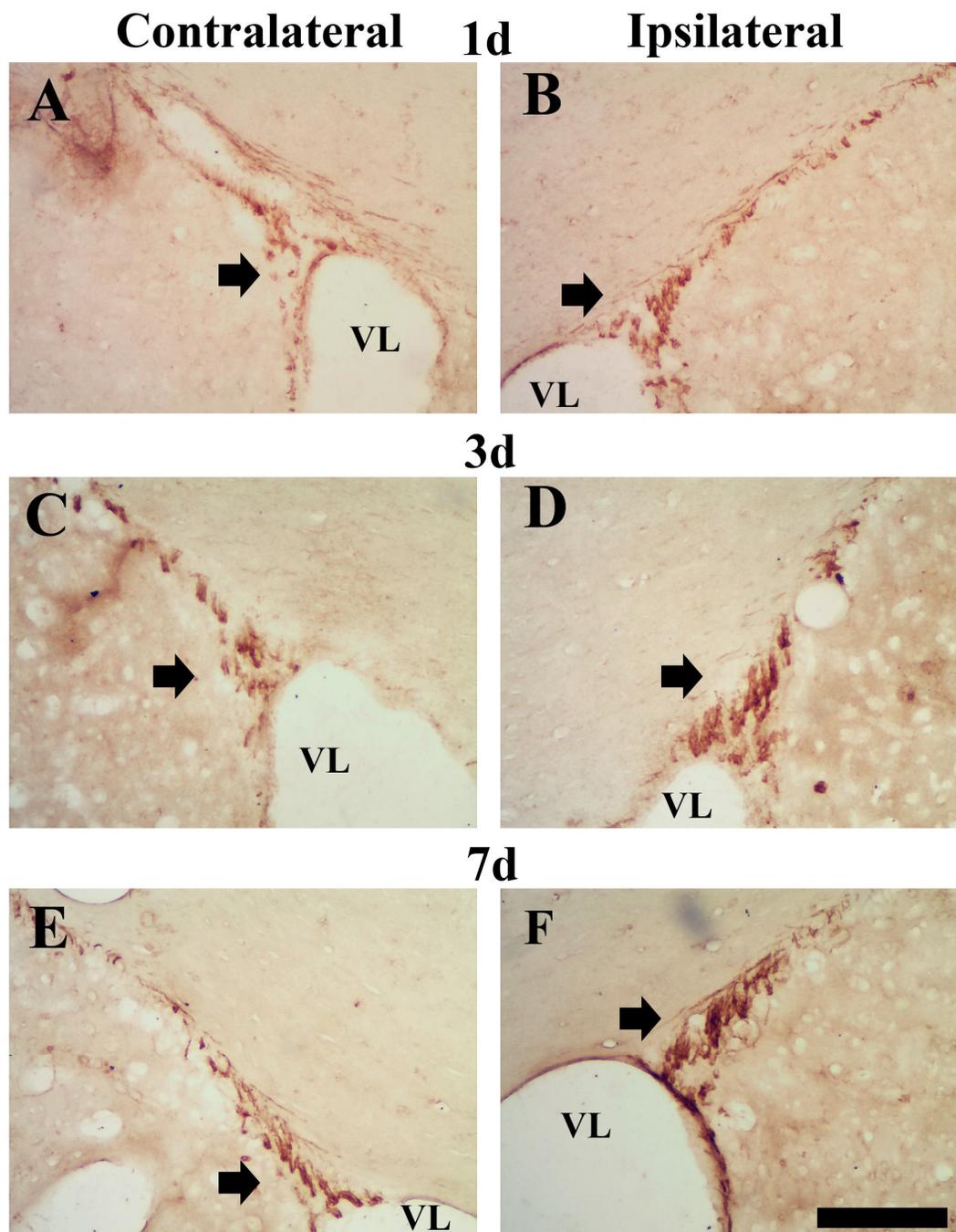


Figura 21. A isquemia focal no córtex somestésico influencia o número de neuroblastos na zona subventricular, revelada pela imunohistoquímica para DCX. Animais injetados com ET-1 e perfundidos 1 (A-B), 3 (C-D) e 7 dias (E-F), lados contralateral (A, C, D) e ipsilaterais (B, D, F) a lesão isquêmica respectivamente. As setas apontam para a parte dorsal dos ventrículos laterais (VL). Escala (500 μ m).

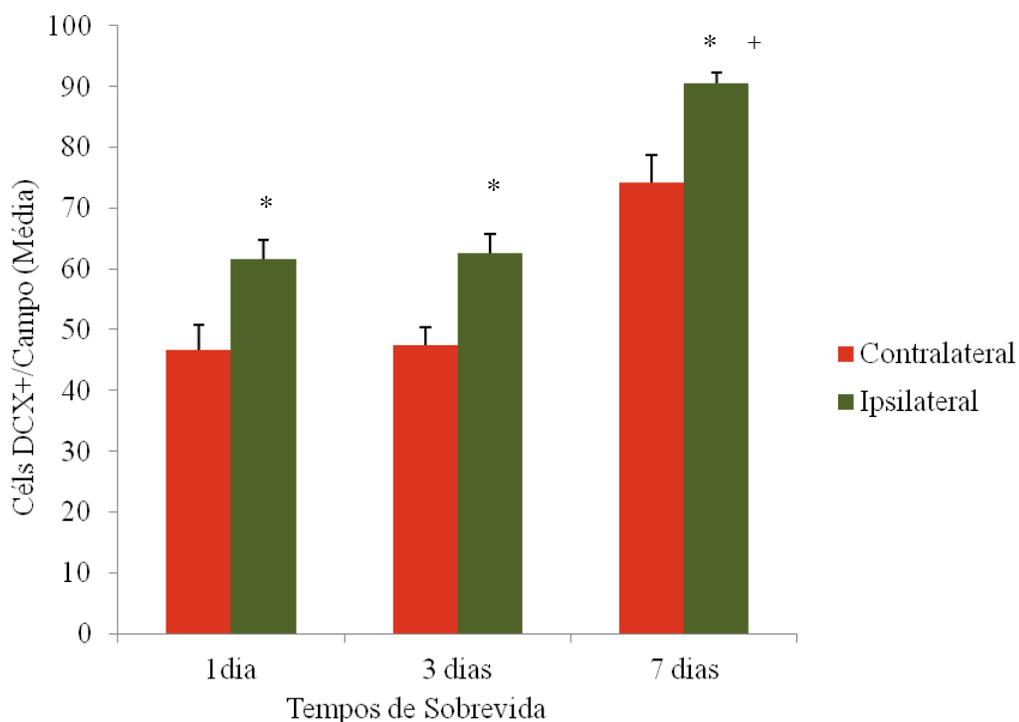


Figura 22. Análise quantitativa do número de células DCX+ na zona subventricular após isquemia focal. Média das contagens/campo em função do tempo de sobrevivência nos lados ipsilateral e contralateral. A densidade média de células DCX+ foi maior no grupo de 7 dias (* $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Foi menor nos grupos de 3 e 1 dia. Não houve diferença estatística entre 3 e 1 dia (* $p > 0,05$ -ANOVA/Tukey). Mas, houve aumento significativo entre 3 e 7 dias (* $p < 0,05$ -ANOVA/Tukey). Todos os grupos apresentaram diferença estatística entre os lados ipsi e contralateral a lesão isquêmica (* $p < 0,05$ -ANOVA/tukey). *Comparações entre os lados ipsi e contralateral; + comparações com tempo de sobrevivência anterior.

3.6.2 A Isquemia focal Induzida por Microinjeções de Endotelina-1 Não Induz Migração Significativa de Neuroblastos Para O Córtex Somestésico Primário.

Não houve marcação significativa de células (DCX+) no córtex somestésico após isquemia focal (não ilustrado). No entanto células DCX+ foram observadas fora da SVZ, na substância branca cortical e/ou no corpo caloso (Figura 23).

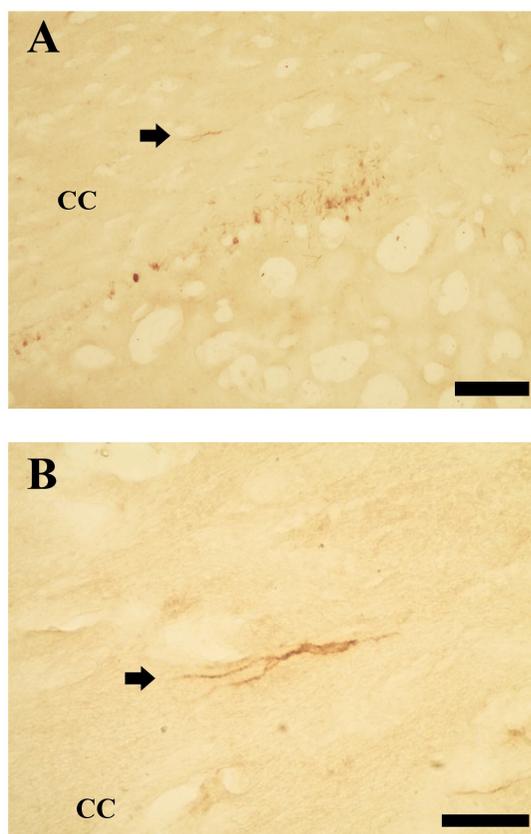


Figura 23. A isquemia focal induzida por microinjeções de ET-1 não induz migração significativa de neuroblastos para o córtex somestésico. Animal injetado com ET-1 e perfundido com 7 dias. As setas em (A e B) apontam para um neuroblasto na substância branca cortical próxima ao corpo caloso (CC). B, é a ampliação de A. Escala em A (50 μ m) e em B (500 μ m).

4. DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Na presente tese, utilizou-se o modelo experimental de isquemia focal, induzida por microinjeções de ET-1, no córtex somestésico primário de ratos adultos com a finalidade de estudar os padrões de perda neuronal, ativação microglial, astrocitose e neurogênese na primeira semana após a indução isquêmica. Também objetivou-se avaliar os déficits neurológicos com o uso de testes comportamentais específicos para averiguação das perdas sensório-motoras.

Animais submetidos à lesão isquêmica focal unilateral, no córtex somestésico primário, desenvolveram déficits neurocomportamentais significativos de assimetria das patas anteriores, o que foi bem correlacionado com o comprometimento histológico, incluindo necrose tecidual, perda de corpos neuronais, microgliose e astrocitose progressivas, além de alterações neurogênicas na SVZ do lado ipsilateral. Os padrões comportamentais e neurogênicos observados são corroborados por estudos anteriores, utilizando diferentes modelos de isquemia focal no córtex somestésico (ADKINS et al., 2003; GILMOUR et al., 2004; LI et al., 2008; SOLEMAN et al., 2010). No entanto, nestes estudos não se realizou uma análise sistemática da correlação neurocomportamental e histológica, como na presente investigação.

O modelo aqui utilizado é um método alternativo a outros mais invasivos e de grande complexidade cirúrgica para a indução de isquemia experimental (MORIOKA et al., 1993; ZHAO et al., 1994). O modelo ET- foi primeiramente utilizado para a indução de lesão isquêmica focal no estriado de ratos adultos (HUGHES et al., 2003). Nosso grupo, o implementou em vários estudos posteriores, no tronco encefálico (DOS SANTOS et al.,

2007), estriado (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; CARDOSO et al., 2012) e córtex cerebral (FRANCO et al., 2012). No córtex somestésico, alguns estudos mostraram que o modelo experimental aqui utilizado induz conspícuo déficit sensório-motor (ADKINS et al., 2004; GILMOUR et al., 2004; LI et al., 2008; SOLEMAN et al., 2010), o que foi confirmado na presente investigação.

4.2 MICROINJEÇÕES DE ET-1 SÃO EFICAZES PARA INDUZIR DÉFICITS FUNCIONAIS MENSURÁVEIS: SIGNIFICADO PARA ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Mostramos que microinjeções de ET-1 no córtex somestésico induzem alterações comportamentais mensuráveis, o que está de acordo com o previamente publicado (ADKINS et al., 2003; GILMOUR et al., 2004; WINDLE et al., 2006; LI et al., 2008; SCHAAR et al., 2010; SOLEMAN et al., 2010). No presente estudo, todos os animais submetidos à isquemia, sete dias depois apresentaram sinais clínicos de lesão, quando comparados aos animais do grupo controles, como avaliado pela escala neurológica de Bederson (BEDERSON et al., 1986; SCHAAR et al., 2010) e teste do canto (SCHARLLET et al., 2000).

A escala neurológica utilizada foi proposta por BEDERSON et al. (1986) para averiguação dos déficits neurológicos após isquemia. Quando o animal é suspenso pela cauda até a altura de um metro do solo, sua reação normal seria a de estender ambas as patas anteriores em direção a um solo. Os animais que se comportaram desta maneira são classificados como normais. Já os animais isquêmicos, fletem suas patas anteriores em direção contralateral à lesão, o que ilustra o déficit neurológico. Os animais injetados com ET-1 apresentam esta alteração neurológica, o que confirma a eficácia do método.

O outro teste utilizado (teste de colocação da pata) utiliza uma reação reflexa de mover a pata anterior por estimulação das vibrissas (SCHARLLET et al 2002). Os animais isquêmicos têm dificuldades de executar este reflexo devido ao comprometimento da área cortical envolvida. Microinjeções de ET-1 induzem este déficit neurológico, o que legitima a eficácia do método isquêmico empregado. Este resultado é apoiado por estudos recentes (WEI et al., 2012).

Finalmente, no teste do canto desenvolvido por Scharllet et al., (2002), observou-se que os animais isquêmicos retornaram mais pelo lado ipsilateral à lesão, o que sugere déficit neurosensorial manifesto pelo comportamento assimétrico dos retornos. Resultados similares foram obtidos utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média (ZANG et al., 2002).

Fica claro que implementamos, no Instituto de Ciências Biológicas de nossa instituição, um modelo de isquemia focal com alterações histopatológicas e comportamentais mensuráveis. Este fato preenche uma lacuna importante de estudos anteriores de nosso grupo e de outros autores, onde apenas alterações histológicas foram observadas sem a evidência comportamental concomitante (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA- RODRIGUES et al., 2008). Nosso estudo também propicia uma base importante para investigações futuras que visem testar agentes neuroprotetores e/ou anti-inflamatórios em potencial, uma linha de pesquisa muito utilizada em nosso laboratório.

4.3 PERDA NEURONAL PROGRESSIVA APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL DO CÓRTEX SOMESTÉSICO PRIMÁRIO

Neste estudo, relatou-se perda neuronal progressiva, principalmente entre 3 e 7 dias após o evento isquêmico inicial. Este evento patológico é bem descrito na literatura em diversos modelos experimentais de isquemia, incluindo o da oclusão da artéria cerebral média (CLARK et., 1993; MORIOKA et al., 2003; THORED et al.,2009) e o da ET-1(HUGHES et al., 2003; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al.,2012; CARDOSO et al., 2012).

A perda neuronal é consequência de uma série de alterações patológicas que começa com a redução fluxo sanguíneo para uma determinada área, com a falta de oxigênio, glicose e outros nutrientes que levam a um inexorável distúrbio da homeostase celular, culminando na morte de neurônios (CHEN et al., 2011; IADECOLA & ANRATHER, 2012; COOK et al., 2012). As mortes neuronais são causadas por alterações em bombas metabólicas que induzem desarranjo iônico, com acúmulo patológico de aminoácidos excitatórios, ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, com influxo excessivo de Na⁺ e Ca⁺⁺, culminando em excitotoxicidade, estresse oxidativo e morte celular CHEN et al., 2011; IADECOLA & ANRATHER, 2012; COOK et al., 2012). Esta lesão afeta a organização modular do córtex somestésico, o que certamente contribui para as alterações sensório-motoras observadas (FREGNI et al., 2006; LEASURE et al., 2010).

A isquemia desencadeia padrões neuropatológicos irreversíveis de lesão neuronal no centro da lesão. Entretanto, um volume grande de tecido encefálico circunvizinho a este centro conhecido como penumbra isquêmica, pode ser salvo por irrigação sanguínea colateral (LAKHAM et al., 2009). Neurônios são mais vulneráveis a insultos isquêmicos do que células vasculares e gliais (IADECOLA & ANRATHER, 2012).

A perda neuronal leva a sinalização que induz a ativação de astrócitos e microglia (GOMES LEAL, 2012). A resposta inflamatória é um importante componente da fisiopatologia do AVE (CEULEMANS et al., 2010; NIESWANDT et al., 2011) e será discutida a seguir.

Estudos futuros devem testar substâncias neuroprotetoras para minimizar a perda neuronal mencionada. Um agente neuroprotetor em potencial é a minociclina, uma tetraciclina semi-sintética que induz neuroproteção em diversos modelos experimentais de AVE, incluindo a oclusão da artéria cerebral média (YRJANHEIKKI et al., 1999) e por microinjeções de ET-1 (FRANCO et al., 2012; CARDOSO et al., 2012).

4.4 O PAPEL DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS LESÃO ISQUÊMICA DO CORTEX SOMESTÉSICO

Neste estudo, houve intensa ativação microglial, entre 3 e 7 dias após a indução da lesão isquêmica. A descrição de eventos inflamatórios não tem sido bem descrito após lesão do córtex somestésico. Muitos dos estudos publicados avaliam somente a área de infarto e as alterações comportamentais, negligenciando a participação de astrócitos e microglia (ADKINS et al., 2003; GILMOUR et al., 2004; WINDLE et al., 2006; LI et al., 2008; SCHAAR et al., 2010; SOLEMAN et al., 2010). Em nosso estudo, preenchemos esta lacuna, fazendo uma descrição completa da microgliose e da astrocitose na primeira semana após AVE experimental. Estudos futuros devem descrever as alterações gliais em tempos mais crônicos. Em humanos, sugeriu-se recentemente que a ativação microglial afeta os tratos de substância branca distantes do sítio de lesão primária (THIEL e HEISS, 2010; THIEL et al., 2010).

A microgliose observada no córtex somestésico é uma resposta à lesão neural (GOMES- LEAL, 2012). Microglia/macrófagos são considerados os sensores mais sensíveis de alterações patológicas (KREUTZBERG, 1996; KETTENMAN et al., 2011). A resposta microglial é dúbia, podendo contribuir para reparo tecidual (LALANCETTE-HERBERT et al., 2007; NEUMANN et al., 2006, 2008) e neurodegeneração (YRJANHEIKKI et al., 1999; FRANCO et al., 2012; CARDOSO et al., 2012). Após oclusão da artéria cerebral média, as células microgliais podem contribuir para reparo tecidual liberando fatores tróficos como o fator de crescimento similar à insulina (IGF-1, do inglês, insulin like growth factor) (LALANCETTE-HERBERT et al., 2007; TORED et al., 2009) ou mesmo através da fagocitose de neutrófilos (NEUMANN et al., 2008). No campo da neurogênese endógena, um estudo recente sugere que as células microgliais permanecem ativadas durante várias semanas na SVZ após oclusão da artéria cerebral média e que são próneurogênicas, liberando IGF-1

(TORED et al., 2009). Um estudo recente confirmou que estas células gliais podem apresentar diferentes fenótipos denominados M1 (pró-inflamatório, lesivo) e M2 (anti-inflamatório, neuroprotetor) após isquemia experimental (HU et al., 2012).

A pesar do papel benéfico da microglia, existem várias evidências que estas células podem ser prejudiciais após doenças agudas e crônicas do SNC (revisto em BLOK et al., 2007; JIN et al., 2010; GOMES-LEAL, 2012). O bloqueio da ativação microglial com minociclina induz neuroproteção após isquemia (YRJANHEIKKI et al., 1999; FRANCO et al., 2012; CARDOSO et al., 2012). Relatou-se que a diminuição experimental da ativação destas células gliais diminuiu em até 65% a área de infarto cortical após oclusão experimental da artéria cerebral média (YRJANHEIKKI et al., 1999). Em estudos recentes do nosso grupo, mostramos que o tratamento com a minociclina diminui a ativação microglial após isquemia no córtex motor (FRANCO et al., 2012) ou no núcleo estriado (CARDOSO et al., 2012), com considerável redução da área de infarto, aumento da densidade de neurônios e diminuição da perda de neurônios por morte celular programada (FRANCO et al., 2012). Nestas circunstâncias, as células microgliais podem liberar proteases, radicais livres e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , induzindo lesão neural (KAUSHAL & SCHLICHTER, 2008). Estes mecanismos podem envolver a produção do fator de transcrição pró-inflamatório fator nuclear (NK-KappaB).

A intensa ativação microglial, mostrada no presente estudo, sugere que estas células podem contribuir para a fisiopatologia da lesão no córtex somestésico. Neste sentido, observamos inúmeras células positivas para CO, com morfologia de macrófagos, na área de lesão isquêmica. É possível que macrófagos aumentem os níveis de CO como uma resposta ao processo isquêmico. Considerando que a mitocôndria é uma das principais fontes de radicais livres em condições patológicas, o aumento dos níveis de CO no modelo experimental investigado pode estar associado a aumento na formação de radicais livres por

macrófagos e dano tecidual. Em estudos futuros, investigaremos a hipótese de que a CO é um marcador seletivo de macrófagos ativados após isquemia e que estas células podem contribuir para a lesão tecidual observada. Outros estudos relataram aumento dos níveis de CO após epilepsia (OTAHAL et al., 2005), mas inexistem estudos que tenham investigado a expressão de CO após isquemia experimental.

4.5 LESÃO ISQUÊMICA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 ESTIMULA UMA ATIVAÇÃO PROGRESSIVA DE ASTRÓCITOS NA ÁREA SOMESTÉSICA PRIMÁRIA

Após a indução da lesão isquêmica por ET-1, observamos uma intensa ativação astrocitária na área somestésica primária, principalmente 3 e 7 dias após a indução isquêmica. Como para microgliose, a astrocitose é uma resposta geral do SNC à condições patológicas (RANSON et al., 2003; GOMES-LEAL et al., 2004; BUFFO et al., 2010; BARRETO et al., 2012). Estas células gliais são importantes para a manutenção da homeostase e a modulação da resposta imune no SNC (ASCHNER, 1998). São divididos em radicais (próximos aos ventrículos), fibrosos (substância branca) e protoplasmáticos (substância cinzenta). Os processos protoplasmáticos destas células fazem contato com os vasos sanguíneos, por meio dos “pés terminais”, contribuindo para a formação da BHE (RANSON et al., 2003; BUFFO et al., 2010). De acordo com as funções que exercem, os astrócitos podem ser divididos em três grupos: aqueles que fornecem funções de manutenção necessária para manter a função neuronal, aqueles que ativamente moldam a função sináptica e aqueles que atuam como precursores neurais adultos em regiões neurogênicas (WANG et al 2008).

Dentre as funções dos astrócitos destacam-se: a manutenção da homeostase no microambiente neural, através da desintoxificação de substâncias tóxicas criadas no SNC, captação de neurotransmissores, regulação do pH, osmolaridade e concentração iônica do tecido nervoso (RANSON et al., 2003; BUFFO et al., 2010).

Devido à presença de junções comunicantes, os astrócitos formam um sincício funcional, no qual mudanças na concentração de íons e moléculas solúveis são rapidamente equilibradas. Essas exigências são muito maiores na substância cinzenta do que na branca, sendo os astrócitos diferentes em sua habilidade para regular o microambiente. A detoxificação de amônia e de radicais livres encefálicos é também realizadas por eles (RANSOM et al., 2003).

Os astrócitos participam da formação e manutenção da glia limitante e prolongamentos perivasculares dando suporte estrutural, imunomodulação, indução e manutenção da BHE, produção e secreção de proteínas da matriz extracelular, síntese de moléculas de adesão, fagocitose e funções como expressão de moléculas, codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II. Estas células são envolvidas em reparo após danos neurais, orientação da migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC, isolamento das superfícies neuronais, modulação a transmissão de impulsos nervosos, regulação da sinaptogênese, modulação de sinapses excitatórias e inibitórias (RANSON et al., 2003).

Apesar das funções mencionadas, não se sabe a participação específica da reação astrocítica após lesão isquêmica do córtex somestésico primário. Parte da população de astrócitos prolifera após lesão isquêmica do córtex somestésico (BARRETO et al., 2012). Alguns autores sugerem que a ativação de astrócitos pode ser importante para o acoplamento de fluxo sanguíneo que ocorre a estimulação das vibrissas (LECRUX et al., 2011). Considerando que houve diminuição da imuneratividade para GFAP e, possivelmente, morte

de astrócitos na primeira semana após a lesão isquêmica, o acoplamento do fluxo sanguíneo pode estar alterada, o que pode contribuir para as perdas teciduais e funcionais observadas. Por outro lado, o aumento da ativação de astrócitos na periferia da lesão isquêmica pode prejudicar, através da formação da cicatriz glial, mecanismos de neuroplasticidade que ocorrem após lesão do córtex somestésico. Estas hipóteses devem ser investigadas em futuros estudos, onde a astrocitose pode ser inibida, por exemplo, com florocitrato – um inibidor metabólico de astrócitos.

4.6 NEUROGÊNESE APÓS ISQUEMIA FOCAL NO CÓRTEX SOMESTÉSICO PRIMÁRIO

Após a indução da lesão isquêmica por ET-1, houve aumento progressivo de neuroblastos células (DCX+) na SVZ ipsilateral, principalmente, nos tempos de 3 e 7 dias após a lesão. Não houve migração significativa de neuroblastos para o córtex somestésico. Apenas poucas células com características de neuroblastos foram vistas próximas ao corpo caloso. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que relatam que os neuroblastos podem sair da SVZ após lesão do córtex somestésico, mas são encontrados preferencialmente na substância branca cortical ou corpo caloso, mesmo em 14 dias após a indução isquêmica (LI et al., 2008). Estes autores também relatam que a estimulação das vibrissas mistanciais aumenta a intensidade da migração de neuroblastos, os quais neste caso podem chegar na substância cinzenta cortical. Estes achados mostram que, após lesão isquêmica do córtex somestésico, uma série de eventos neuroplásticos ocorre, incluindo o aumento neurogênese endógena. O significado deste tipo de plasticidade não é conhecido, mas pode servir para a manutenção ou refinamento dos circuitos neurais alterados após a isquemia (TAVARES e

GOMES-LEAL, 2011). Existe grande polêmica sobre neurogênese cortical após isquemia, com alguns autores relatando o fenômeno (GU et al., 2000; OHIRA et al., 2009) e outros não (ARVIDSSON et al., 2002).

Inúmeras evidências sugerem que diversos tipos de neuroplasticidade ocorrem após AVE experimental (MURPHY & CORBETT, 2011; UENO et al., 2012) e em humanos (ROTHWELL, 2010; CRAMMER et al., 2011). Estas alterações envolvem neurogênese e diversos tipos de plasticidade axonal, entre os quais mobilização de axônios de outras vias (MURPHY & CORBETT, 2011; UENO et al., 2012). Existem evidências que o córtex somestésico primário é uma região com considerável potencial para neuroplasticidade (BAHIA et al., 2008). Deaferentação experimental de roedores, ao nascimento, induz um padrão diferencial de expressão da isolecitina Vicia Villosa entre 3 e 60 dias após o nascimento (BAHIA et al., 2008). Como esta isolecitina marca componentes das redes perineuronais, as quais são envolvidas em eventos de estabilização e manutenção dos circuitos talâmicos no córtex somestésico primário, ela foi utilizada para mostrar a evolução do padrão de estabilização dos aferentes talâmicos para o campo de barris. Neste estudo, os autores sugerem que proteoglicanas contribuem para a estabilização sináptica.

Estudos futuros devem investigar os eventos neuroplásticos no córtex somestésico e como a degradação de proteoglicanas, por exemplo com condroitinase, ou a manipulação da neurogênese endógena, influenciam eventos neuroplásticos nesta área sensorial primária após processos isquêmicos. Nosso laboratório no Instituto de Ciências Biológicas está realizando alguns destes estudos. A lesão isquêmica focal desencadeia mecanismos de reparo molecular e celular, que contribuem para a recuperação e podem incluir ativação de neurogênese no encéfalo adulto (CRAMER & CHOPP, 2000).

Em mamíferos existem duas regiões que abrigam essas células proliferativas, a zona subventricular (SVZ) e a zona granular do hipocampo (SGR) (MALBERG et al., 2000; GARCIA-VERDUGO et al., 2002). As células formadas na região subventricular migram através da via de migração rostral (*rostral migratory stream* ou RMS), até o bulbo olfatório onde são incorporadas (RAMIREZ-AMAYA et al., 2006). Já as células geradas na região subgranular do hipocampo têm sua posição final na camada granular do giro dentado (MALBERG et al 2000; GARCIA-VERDUGO et al., 2002).

Cai e colaboradores (2009), descreveram a distribuição de células imunorreativas à DCX em gatos (*Felis catus*), macacos rhesus (*Macaca mulatta*) e humanos e (*homo sapiens*). Puderam verificar que em sua maioria, neurônios imaturos DCX+ posteriormente desenvolviam-se em neurônios GABAérgicos nestas 3 espécies. Também verificaram que a expressão de DCX estava presente nas zonas proliferativas da SVZ e SGZ.

Em roedores também foram encontradas evidências de que a expressão da dupla cortina reflete a neurogênese, estando presente nas regiões proliferativas e na via de migração rostral (NACHER et al., 2001). Outros estudos observaram aumento na população de células (BrdU+) na zona subventricular do giro dentado, com o pico máximo em torno de 7 - 14 dias (JIN et al ., 2001; ARVIDSSON et al., 2002; PARENT et al., 2002). Encontramos, em nossos resultados, o pico máximo de recrutamento de neuroblastos células (DCX+) em torno de 7 dias.

5. CONCLUSÕES

- O modelo de isquemia focal por microinjeções de ET-1 é adequado por apresentar praticidade e baixo custo operacional;
- Microinjeções de ET-1 induzem perda neuronal e alterações gliais progressivas, com déficits sensório-motores claramente observados;
- No modelo em questão, ocorrem alterações neurogênicas na SVZ, com migração de neuroblastos para substância branca subcortical, mas sem considerável migração para o foco de lesão isquêmica do córtex somestésico;
- Este modelo experimental pode ser útil para os estudos que visem investigar a eficácia de drogas neuroprotetoras.

6. REFERÊNCIAS

ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS.

Neurotoxicology 19, 269-281. 1998.

ADRINKS-MUIR, D.L. and JONES, T.A. Cortical electrical stimulation combined with rehabilitative training: enhanced functional recovery and dendritic plasticity following focal cortical ischemia in rats. **Neurological Res.** v. 25, p. 780-788, 2003.

AIKAWA, V.N.; BAMBIRRA, A.P.; SEOANE, L. A.; BENSENHOR, I.M.; LOTUFO, P.A. An autopsy-based study in São Paulo, Brazil. **Neuroepidemiology**. v. 24, p. 209-13, 2005

ALLAN, S.M. and ROTHWELL, N.J. Inflammation in central nervous system injury. Philosophical transactions of the royal society of london. Series B: **Biological Sciences**. v. 358, p. 1669-1677, 2003.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradrographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J. Comp. Neurol.** v. 124, p. 391-35, 1965.

ALVAREZ-BUYLLA, A. and GARCIA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **J. Neurosci.** v. 22(3), p. 629-34, 2002.

ALVAREZ-BUYLLA, A. and LIM, D. A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. **Neuron**. v. 41(5), p. 683-686, 2001.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; SERI, A. B.; DOETSCH, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain Res Bull.** v. 57(6), p. 751-758, 2002.

ARONOFF, R.; MATYAS, F.; MATEO, C.; CIRON, C.; SCHNEIDER B.; PETERSEN, C.C.H. Long-range connectivity of mouse primary somatosensory barrel cortex. **European journal of neuroscience.** v. 31 p. 2221-2233, 2010.

ARSENE, D., F.; VASILESCU, C.; TOADER, A.; BALAN, C.; POPA and ARDELEANU, C. Clinico-pathological correlations in fatal ischemic stroke. An immunohistochemical study of human brain penumbra. **Rom J Morphol Embryol.** v. 52, p. 29-38, 2011.

ARVIDSSON, A.; COLLIN, T.; KIRIK, D.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med.** v. 8, p.963-970, 2002.

ATLANTE, A. and CALLISSANO, P. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and Mitochondria. **FEBS.** v. 497(1), p. 1-5, 2001.

BAHIA, C. P.; HOUZEL, J. C.; PICANÇO-DINIZ, C. W and PEREIRA-JR, A. Spatiotemporal distribution of proteoglycans in the developing rat's barrel field and the effects of early deafferentation. **The Journal of comparative neurology.** v. 510, p.145-157, 2008.

BARRETO, G. E., X. SUN, L. XU, AND R. G. GIFFARD, 2011. Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct. *PloS one* 6, e 27881.

BARONE, F.C.; ARVIN, B.; BRANCO, R.F.; MILLER, A.; WEBB, C.L.; LYSKO, P.G
FEUERSTEIN, G.Z. Fator de necrose tumoral- α : um mediador da lesão cerebral focal
isquêmica. **Stroke**. v. 28, p. 1233-1244, 1997.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Introdução a neurociência. In:
Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BEDERSON, J.B.; PITTS, L.H.; TSUJI, M.; NISHIMURA, M.C.; DAVIS, R.L.;
BARTOWSKI, H. Rat middle cerebral artery occlusion evaluation of the model and
development of a neurological examination. **Stroke**. v. 17, p.472-476, 1986.

BLEAKMAN, D. and LODGE, D. Neuropharmacology of AMPA and Kainati receptors.
Neuropharmacol. v. 37, p. 1187-1204, 1998.

BIERNASKIE, J., CORBETT, D., PEELING, J., WELLS, J., LEI, H. A serial MR study of
cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1 induced ischemia
in rats. **Magn. Reson. Med.** v.46, p. 827-830, 2001.

BIGNAMI, A. and DAHL, D. Glial cells in the central nervous system and their reaction to
injury. **Autin:Landes**. P. 109, 1994.

BONDAN, E. F. Estudo da imunoreatividade astrocitária para GFAP e Vimentina no tronco
encefálico de ratos wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. **Arquivos
de Neuropsiquiatria**, v.61(3), p. 642, 2003.

BLOCK, M. L., L. ZECCA, AND J. S. HONG, 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci** 8, 57-69.

BLOMSTRAND, F.; VENANCEL, L.; SIREN, A.L.; ELZAN, P.; HANSE, E.; GLOWINSKI, J.; EHRENREICH, H.; GIAUME, C. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. **Eur. J. Neurosci.** V. 19, p. 1005-1015, 2004.

BOLTON, S. J. and PERRY, V. H. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. **Exp. Neurol.** v. 154(1), p. 231-40. 1998.

BROUGHTON, B.R.S.; REUTENS, D.C.; SOBEY, C.G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. **Stroke.** v. 40, p. E 331-E 339, 2009.

BUFFO, A., C. ROLANDO, AND S. CERUTI. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol** 79, 77-89. 2010

BRUNO, V.; BATTAGLIA, G.; COPANI, A.; D. ONOFRIO, M.; DI IORIO, P.; DE BLASI, A.; MELCHIORRI, D.; FLOR, P. J.; NICOLETTI, F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs . **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.** v. 21, p. 1013-1033, 2001.

C.D.C.GOV/STROKE/STROKE FACTS.HTM Center for disease control and prevention. stroke facts and statistics. (on line) 2009 Feb 12 (cited 2009 March 28); Available from: URL: <http://www.cdc.gov/stroke/stroke facts.htm>.

CABRAL, N.L.; LONGO, A.L.; MORO, C.H.; AMARAL, C.H.; KISS, H.C. Epidemiology of cerebrovascular disease in Joinville, Brazil. An Institutional Study. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.55, p. 357-363, 1997.

CAI, Y.; XIONG, K.; CHU, Y.; LUO, D.; LUO, X.; YUAN, X.; STRUBLE, R.G.; CLOUGH, R.W.; SPENCER, D.D.; WILLIAMSON, A.; KORDOWER, J.H.; PATRYLO, P.R.; YAN, X. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. **Experimental Neurology**, n. 216, p.342-356, 2009.

CARDOSO, M. M., FRANCO, E.C.S, SOUZA, C.C., DA SILVA, M.C, GOUVÊIA, A., GOMES-LEAL, W., Minocycline treatment and bone marrow mononuclear cell transplantation after endothelin-1 induced striatal ischemia (In Press). **Inflammation**. 2012

CARDOSO, L.; COSTA, M.; CARVALHO, J.; FERREIRA, H.; LOPES, M. L.; PENNA, L.; ARAÚJO, K.; PALADINO, L.; SANCOVSKI, R.; MOUTA, R.; BRANDÃO, G.; ARRAIS, A.; RIBEIRO, I. Apresentação de resultados preliminares da utilização de protocolo informatizado de reabilitação cognitiva. Laboratório de Neuropsicologia e Cognição - FM/UFRJ, 2004.

CHAPIN, J. K.; SADEQ, M., GUISE J. L. V. Cortico-cortical connections within the primary somatosensory cortex of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 263, p. 326-346, 1987.

CRAMER, S. C. and CHOPP, M. Recovery recapitulates ontogeny. **Trends Neurosci.** v. 23, p. 265-271, 2000.

CLARK, R. K., E. V. LEE, C. J. FISH, R. F. WHITE, W. J. PRICE, Z. L. JONAK, G. Z. Feuerstein, and F. C. Barone, 1993. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain Res Bull** 31, 565-572.

CEULEMANS, G.A; IGAVC, T.; KOOJMAN, R.; IDRUSI, H.; SARRE, S.; MICHOLOTTE, Y. The Dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation.** v. 7, p. 74, 2010.

CHEN, J.; ZHANG, C.; JIANG, H.; LI, Y.; ZHANG, L.; ROBIN, A.; KATAKOWSKI, A.; LU, M.; CHOPP, M. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.** v. 25, p.281-290, 2005.

CHEN, D-S; YANG, I-D; UN, K-T; SHAW, J-F; LION, W-C CHUANEZ, C-Y. Roles of Oxidative Stress Apoptosis, P6C - 1 α and Mitochondrial Bio-genesis in Cerebral Ischemia. **Int. J. Mol. Sei.** v. 12, p. 7199-7215, 2011.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**. v. 1, p.623-34, 1988.

CHOI, D.W. Excitotoxic cell death. **Journal of Neurobiology**. v. 23, p. 1261-1276, 1992.

CONN, P.J. and PIN, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.37, p.205-237, 1997.

COOK D. J.; TEVES, L. and TYMIANSKI, M. Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. **Nature**. v. 483, p. 213-217, 2012.

CORAY, T. W. and MICKE, L. Inflammation in neurodegenerative disease adouble edged sword. **Neuron**. v. 35, p. 419-432, 2002.

DANBOLT, N. C. "Glutamate Uptake" **Progress in Neurobiology**. v. 65(1), p. 1-105, 2001

DAVID, J.C.; YAMADA, K.A.; BAWGE, M.R.; GOLDBERG, M.P.; AMPA Receptor Activation is rapidly toxic to cortical astrocytes when desensitization is blocked. **J. Neurosci**. v.16, p. 2009, 1996.

DENES, A.R; VIDYASAGAR, FENG. J.J; NARVAINEN. MCCOLL, B.W; KAUPPINEN, R.A.; ALLAN, S.M. Proliferação microglia residente após a isquemia cerebral focal em ratos. **J. Cereb. Metab. Fluxo Sanguineo**. v. 27, p. 1941-1953, 2007.

DEWAR, D.; YAM, P.; MCCULLOCH, J. Drug development for Stroke: Importance of protecting cerebral white matter. **European Journal of Pharmacology**. v. 375, p. 41-50, 1999.

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

DOETSCH, F.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the Adult mammalian brain. **J Neurosci**. v. 17, p. 5046-61,1997.

DOS SANTOS, C. D. P.-D., C.W.;GOMES-LEAL, W., 2007. 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** 1172, 130-144.

DOYLE, P.K.; SIMON, P.R.; POORE, P.M. Neuropharmacology-Special Issue on Cerebral Ischemia Brain Damage- Review Article. **Neuropharmacology**. v.55 (3), p. 310-318, 2008.

DUNCAN, C. C.; SUMMERS, A. C.; PERLA, E. J.; COBURN, K.L. and MIRSKY, A. F. Evaluation of traumatic brain injury: brain potentials in diagnosis, function, and prognosis. **Int J Psychophysiol**. v. 82, p. 24-40, 2011.

FABRI, M. and BURTON, H. Ipsilateral cortical connections of primary somatic sensory cortex in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 311, p. 405-424, 1991.

FRANCO, E. C.; CARDOSO, M. M.; GOUVEIA, A.; PEREIRA-JR, A. and GOMES-LEAL, W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neuroscience research**. v. 73, p. 122-132, 2012.

FREGNI, F., AND A. PASCUAL-LEONE, 2006. Hand motor recovery after stroke: tuning the orchestra to improve hand motor function. *Cognitive and behavioral neurology: official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 19, 21-33.

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

FRIEDLANDER, R.M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **N. Engl. J. Med.** v. 348, p. 1365-1375, 2003.

FISHER, M.; FEUERSTEIN, G.; HOWELLS, D. W.; HURN, P.D.; KENT, T. A.; SAVITZ, S. I.; LO, E. H. Update of the stroke therapy academic industry round table preclinical recommendations. **Stroke**. v. 40, p. 2244-2250, 2009.

FUJITA, T.; YOSHIMINE, T.; MARUNO, M.; HAYAKAWA, T. Cellular dynamics of macrophages and microglial cells in reaction to stab wounds in rat cerebral cortex. **Acta Neurochir**. v. 140, p. 275-279, 1998.

FUXE, K.; BJELKE, B.; ANDBJER, B.; GRAHN, H.; RIMONDINI, R.; AGNATI, L.F. Endothelin-1 induced lesion of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**. v. 8, p. 2623-2629, 1997.

GARCIA-VERDUGO, J.M.; FERRÓN, S.; FLAMES, N.; COLLADO, L.; DESFILIS, E.; FONT, E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 6, p.765-775, 2002.

GAGLIARDI, J.R. Neuroprotection, excitotoxicity and antagonists. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 58, p. 583-588, 2000.

GINSBERG, M. P. and BUSTO, R. Rodent models of cerebral ischemia. **Stroke**. v. 20, p. 1627-1642, 1989.

GILMOUR, G.; IVERSEN, S.D.; O'NEIL, M.F.; BANNERMAN, D.M. The effects of intracortical endothelin-1 injections on skilled forelimb use: implications for modelling recovery of function after stroke. **Behav. Brain Res.** v. 150, p. 171-183, 2004.

GOMES-LEAL, W. Inflamação aguda, resposta glial e degeneração axonal em um Modelo de excitotoxicidade na medula espinhal. Departamento de Morfologia, CCB. Belém, Universidade Federal do Pará: 197p. 2002.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M.A.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PERRY, V.H. Astrocytosis, Microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, p.456-67, 2004.

GOMES-LEAL, W., CORKILL, D. J.; PIKANÇO-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, p. 57-70, 2005.

GOMES-LEAL, W., CORKILL, D.J., PIKANÇO-DINIZ, C.W.P., PERRY, V.H. Acute inflammation, glial activation and axonal damage in an excitotoxic model of acute spinal cord Injury. **International Spinal Cord Annual Meeting abstracts**. 2002b.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain and behavior**. 2012

GOULD, E., REEVES, A.J.; GRAZIANO, M.S.; GROSS, C.G. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science**, v. 286, p.548-52. 1999.

HIRSCH, S. and BAHR, M. Growth promoting and inhibitory effects of glial cells in the mammalian nervous system. **Adv Exp Med Biol**. v. 468, p. 199-205, 1999.

HIRSCHEBERG, D. L. and SCHWARTZ M. Macrophage recruitment to acutely injured central nervous system is inhibited by a resident factor: a basis for an immune-brain barrier. **J Neuroimmunol**. v. 61(1), p. 89-96,1995.

HU, X., P. LI, Y. GUO, H. WANG, R. K. LEAK, S. CHEN, Y. GAO, AND J. CHEN. Microglia/Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. **Stroke; a journal of cerebral circulation**. 2012.

HUA, Y.; SCHALLERT, T.; KEEP, R.K.; WU, J.; HOFF, J. T.; XI, G. Behavioral test after intracerebral hemorrhage in rat. **Stroke**. v. 33, p. 2478-2484, 2002.

HUGHES, P.M.; ANTHONY, D.C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M.S.; RANKINE, E.L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A.K.; PERRY, V.H. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**. v. 62, p.1276-1286, 2003.

HUGON, J. and VALLAT, J.M. Role of glutamate and excitotoxicity in neurologic diseases. v. 152, p. 239-48, 1996.

HYNYNEN, M.M. and KHALIL, R.A: The vascular endothelin system in hypertension recent patents and discoveries, recent pat cardiovasc drug disco. v .1, p. 95-108, 2006.

IADECOLA, C. and ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**. v. 17, p. 796-808, 2012.

ITO, D.; IMAI, Y.; OHSAWA, K; NAKAJIM, K.; FUKUUCHI, Y. and KOHSAKA, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 57, p. 1-9, 1998.

JIN, K.; MINAMI, M.; LAN, J. Q.; MAO, X. O.; BATTEUR, S.; SIMON, R. P. GREENBERG, D. A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, p.4710-5, 2001.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G.; Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J. Leukoc Biol.** v. 87, p. 779-789, 2010.

KATO, H.; TANAKA, S.; OIKAWA, T.; KOIKE, T.; TAKAHASHI, A.; ITOYAMA, Y. Expression de resposta microglial factor-1 na microglia e macrófagos após isquemia cerebral no rato. **Brain res.** v. 882, p. 206-211, 2008.

KAUSHAL, V., AND L. C. SCHLICHTER. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci* 28, 2221-2230. 2008.

KEER, J.F, WYHE, A.H. and CURRIE, A.R Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br.5.Cancer.** v. 26, p.239-257, 1972.

KEMPERMANN, G. and GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Novartis Found Symp.** v. 231, p. 220-35; discussion 235-41, 302-6, 2000.

KETTENMANN, H. & RANSON, B.R. **Neuroglia.** New York: Oxford, 1079p., 1995.

KETTENMANN, H. Physiology of Microglia. **Physiology rev.** v. 91, p. 461-553, 2011.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci** 19, 312-318. 1996.

KOKAIA, Z.; THORED, P.; ARVIDSSON, A.; LINDVALL, O. Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain recent scientific progress. **Cereb Cortex** **16 Suppl.** v, 1, p.162-7, 2006.

KORNACK, D. R. and RAKIC, P. Cell Proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. **Science.** v. 294, p. 2127-30, 2001b.

KORALECK K. A., JENSEN, K. F., KILLACKEY, H. P. Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. **Brain Research.** V. 463, p. 346-351, 1988.

KORALEK, C. A.; OLAVARRIA, J. & KILLACKEY, H. P. Areal and laminar organization of cortical projections in the rat somatosensory cortex. **Journal of Comparative Neurology,** v. 299, p. 133-150, 1990.

KRIZ, J. Inflamação em lesão isquêmica cerebral: O tempo é importante. **Crit ver Neurobiol.** v. 18, p.145-157, 2006.

LALANCETTE-HEBERT, M., G. GOWING, A. SIMARD, Y. C. WENG, AND J. KRIZ. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **J Neurosci** **27,** 2596-2605. 2007.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine.** v.7, p. 97, 2009.

LAZAROV-SPIEGLER, O. and RAPALINO, O. Restricted inflammatory reaction in the CNS: a key impediment to axonal regeneration? **Mol Med Today**. v. 4(8), p. 337-42,1998.

LEASURE, J.L. and SCHALLERT, T: Consequences of forced disuse of the impaired forelimb after unilateral cortical injury. **Behavioural Brain Research**. v.150, p. 83-91, 2004.

LEASURE, J. L., AND M. GRIDER. The effect of mild post-stroke exercise on reactive neurogenesis and recovery of somatosensation in aged rats. **Experimental neurology** 226, 58-67, 2010.

LECRUX, C., X. TOUSSAY, A. KOCHARYAN, P. FERNANDES, S. NEUPANE, M. LEVESQUE, F. PLAISIER, A. SHMUEL, B. CAULI, AND E. HAMEL. Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience** 31, 9836-9847. 2011

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios conceitos fundamentais de neurociências**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

LEWEN, A., P. MATZ, et al. Free radical pathways in CNS Injury. **J Neurotrauma**, v. 17, p. 871-90, 2000.

LI, Y.; CHEN, J.; WANG, I.; LU, M.; CHOPP: Treatment of stroke with intracarotid administration of marrow stromal cells. **Neurology**. v.56, p. 1666-1672, 2001.

LI, G.; SUN, S., CAS, X., ZHONG, J., TONG, E. LPS-induced degeneration of dopaminergic neurons of substantia nigra in rats. **J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.** v. 24, p. 83-86, 2004.

LICHTENWALNER, R. J. and PARENT, J. M. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 26, p. 1-20, 2006.

LIPTON, S. A. and CHOI, Y. B. et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature.** v. 364, p.626-32, 1993.

LIPTON, S.A. and STAMLER, J.S. Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the Nmda Receptor. **Neuropharmacology.** v. 33, p.1229-1233, 1994.

LIPTON, S.A. and ROSENBERG, P.A. Mechanisms of disease. Excitatory aminoacids as a Final Common Pathway Neurological Disorders. **The new Eng. J. Med.** v.330, p. 613-622, 1994.

LIPTON, S. A. and CHOI, Y. B. Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related Species. **Biofactors.** v. 8, p. 33-40, 1998.

LIPTON, P. Ischemia cell death in brain neurons. **Physiol rev.** v. 79, p. 1431-1568, 1999.

LIU, J.S.H, AMARAL, T. D.; BROSNAM, C. F. & LEE, S. C. IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. **J. Immunol.** v.161, p. 1989-1996. 1998.

LIU, Y.; WONG, T. P.; AARTS, M.; ROOYAKKERS, A.; LIU, L.; LAI, T.W.; WU, D. C.; LU, J.; TYMIANSKI, M.; GRAIG, A. M.; WANG, Y. T. NMDA Receptor Subunits Have Differential Roles in Mediating Excitotoxic Neuronal Death Both In Vitro and in Vivo. **Journal of Neuroscience.** v. 27, p. 2846-2857, 2007.

LLOYD-JONES, D.; ADAMS, R.; CARNETHON, M.; SIMONE, G.; FERGUSON, T.B.; GLENN, K. Heart disease and stroke statistics 2009 update: A report from American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation.** v. 119, p. 21-181, 2009.

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

LOKENS GAR, J.R., CHEERAN, M.C-J., HU, S., GEKKER, G., PETERSON, P.K. Microglia: Defenders of the brain against viral infection. In: PETERSON, P.K., REMINGTON, J.S. New concepts in the immunopathogenesis of CNS infections. Blackwell Science: Massachusetts. Cap.3, p.39-50, 2000.

LOTAN, M. and SCHAWARTZ, M. Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. **Fasab journal,** v.8, p.1026-1033., 1994.

LOTUFO P.A.; GOULART, A. C.; BENSENHOR, I.M.; Race, Gender and Stroke Subtypes Mortality in São Paulo, Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.** v. 65, p. 752-757, 2007.

LOTUFO P.A. and BENSENHOR, I.M., Stroke Mortality in São Paulo (1977-2003): A description using the tenth revision of the international classification of diseases **Arquivos. Neuropsiquiatr.** v. 62(4), p. 1008-11, 2004

LOVE, S. Apoptosis and brain is ischemia. Prog. Neuropsychopharmacol. **Biol. Psychiatry.** v. 27, p. 267-282, 2003.

MACREZ, R.; TOUTIRAIS, O.; MAUFF, L.B; DEFER, G; DERMAGL, V.; VITRIEN, D. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. **Neurology.** v. 10, 2011.

MALBERG, J.E.; EISCH, A. J.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience,** n. 26, p. 9104-9110, 2000.

MAGAVI, S. S., B. R. LEAVITT, et al. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult Mice. **Nature.** v. 405 (6789), p.951-5, 2000.

MASAKI, T. and YANAGISAWA, M. Endothelins. **Essays in Biochemistry.** v. 27, p. 79-89, 1992.

MATUTE, C.; ALBERDI, E.; IBARRETXE, G.; SANCHEZ-GOMEZ, M. V. Excitotoxicity in glial cells. **Eur. J. Pharmacol.** v. 447, p. 239-246, 2002.

MELDRUM, B. and GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends in Pharmacological Sciences.** v. 11(9), p. 379-87,1990.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Journal of Nutrition.** v.130, p.1007S-1015S, 2000b.

MELDRUM, B. S. The glutamate synapse as a Therapeutical target: perspectives for the future. **Progress in Brain Research.** v. 116, p. 441-58, 1998.

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology.** v. 44, p. 514-23, 1994.

MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. and MEISEL, A. Pathophysiology of stroke. lessons from animal models. **Metabolic Brain Disease.** v. 19, p. 3-4, 2003.

MERGENTHALER, P., DIRNAGL, U. and MEISEL, A. Pathophysiology of stroke. lessons from Animal models. **Metabolic Brain Disease.** v. 19, p.151-157, 2004.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: Form, functions and roles in diseases. **Veterinary Pathology.** v. 31, p. 145-167, 1994.

MOSKOWITZ, A.M.; LO, H.E.; IADECOLA, C. The science of stroke: Mechanisms in search of Treatments. **Neuro**. v. 67, p.181-198, 2010.

MOTTE, S.; MCENTEE, K.; NAEUE, R. Endothelin receptor antagonists. **Pharmacology & Therapeutics**, v.3, 2005.

MULLEN, R. J.; BUCK, C.R.; SMITH, H. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**. v. 116, p. 201-211, 1992.

NACHER, J.; CRESPO, C.; MCEWEN, B.S. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. **European Journal of Neuroscience**. n. 14, p. 629–644, 2001.

NAKAJIMA, K. and KOHSAKA, S. Microglia: ativação e sua Importância no Sistema Nervoso Central. **J. Biochem**. v. 130, p. 169-175, 2004.

NEUMANN, J.; GUNZER, M.; GUTZEIT, H. O.; ULLRICH, O.; REYMANN, K. G.; DINKEL, K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **Faseb. J**. v. 20, p. 714-771, 2006.

NEUMANN, J., S. SAUERZWEIG, R. RONICKE, F. GUNZER, K. DINKEL, O. ULLRICH, M. GUNZER, AND K. G. REYMANN. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophilgranulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci** 28,5965-5975. 2008.

OBRENOVITCH, T. P. and URENJAK, J. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders. from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. **Prog. Neurobiol.** v. 51, p. 37-39, 1997.

OLNEY, J. W.; RHEE, V.; HO, O.L. Kainic Acid: A Powerful neurotoxic analogue of glutamate. **Brain Research.** v. 77, p. 507-512, 1974.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKII, K. Glutamate Receptors in The Mammalian Central Nervous System. **Progr. Neurobiol.** v. 55, p. 581-618, 1998.

PARK, L. and THORNHILL, J. Hypoxic modulation of striatal lesions induced by administration of Endothelin-1. **Brain Research.** v. 883, p. 51-59, 2000.

PARENT, J. M.; VEXLER, Z. S.; CONG, C.; DERUGIN, N.; FERRIERO, D. M.; Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. **Ann Neurol.** v.52, p. 802-813, 2002.

PAXINOS, G., WATSON, C., The Rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd Ed. Academic Press. 2007.

PETROV, T.; STEINER, J.; BRAUN, B.; RAFOLS, J.A: sources of endothelin-1 in hippocampus and cortex following traumatic brain injury. **Neuroscience.** v. 115, p. 275-283, 2002.

PETTY, M.A. and LO, E. H. Junctional complexes of the blood brain barriers, Permeability changes in neuroinflammation. *Prog. Neurobiology*. v. 60, p.311-323, 2002.

PETERSEN, C. C. H. The functional organization of the barrel cortex. *Neuron Review*. v. 56, p. 339-355, 2007.

PIN, J. P. and DUVOISIN, R. Neurotransmitter receptors I the metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacol*. v. 34, p. 1-26, 1995.

RAMIREZ-AMAYA, V.; MARRONE, D.F.; GAGE, F.H. WORLEY, P.F.; BARNES, C.A. Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of Neuroscience*. v.. 26, p.12237–12241, 2006.

RANSOM, B. R., AND C. B. RANSOM. Astrocytes: multitalented stars of the central nervous system. *Methods in molecular biology*. 814, 3-7. 2012

RAKIC, P. Adult neurogenesis in mammal: an Identity Crisis. *J Neurisci*. v. 22(3), p.614-618, 20021a.

ROBINSON, A.P.; WHITE, T. M.; MADSON, D. W. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies Mrc OX-41 and Mrc OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology*. v. 57, p. 239-247, 1986.

ROGER, S.D.; PETERS, C. M.; POMONIS, J.D.; HAGWARA, H.; GHILAR, J.R.; MANTY, P.W. Endothelin-B receptores are expressed by astrocytes and regulate astrocytes hypertrophy In the normal and injured CNS. *Glia*. v.41, p. 180-190, 2003.

ROTHWELL, N.; ALLAN, S.; TOUMOND, S.; O Papel da interleucina-11 em neurodegeneração aguda e acidente vascular cerebral: implicações fisiopatológicas e terapêuticas. **J Clin Invest.** v.100, p. 2648-2652, 1997.

ROZYEZKA, J.; FIGIE, L M.; ENGELE, J. Endothelins negatively regulate glial glutamate transporter xpression. **Brain Pathol.** v. 14, p. 406-414, 2004.

SAKURAI, T.; YANAGISAWA, M.; TAKUWA, Y.; MIYAZAKI, KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, Y. Cloning of a CDNA encoding a non-isopetide-selective subtype of the endothelin Receptor. **Nature.** v. 348, p.732-735, 1990.

SANCHEZ-ALVARES, R., TABERNERO, A., MEDINA, J.M. Endothelin-1 stimulates the translocation and upregulation of both glucose transporter and hexokinase in astrocytes: relationship with gap junctional communication. **J. Neurochem.** v. 89, p.703-714, 2004.

SEGOVIA, G.; PORRAS; ARCO, D.A.; MORA, F. Glutamatergic neurotransmission in aging. A critical perspective. **Mech. Ageing Develop.** v. 122, p. 1-29, 2001.

SOLEMAN, S.; YIP, P.; LEASURE, L.; MOON, L. Sustained sensorimotor impairment after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. **Exp. Neurol.** v. 222 (1), p. 13-24, 2010.

SOUZA-RODRIGUES, R. D., R. R. LIMA, J. GUIMARAES-SILVA, A. M. COSTA, C. D. DOS SANTOS, C. W. PIKANÇO-DINIZ, AND W. GOMES-LEAL. Inflammatory response

and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum *Brain Research* 1200C, 78-88. 2008.

SCHAAR, L.K; BRENNEMAM, M.M.; SAVETZ, I.S. Funcional assesments in the rodent stroke model. **Experimental & Translational Sroke Medicine**. P. 2-13, 2010.

SCHALLERT, T.; WOODLEE, M. T.; FLEMING, S. M. Disentangling multiple types de recovery from brain injury. In: *Pharmacology of cerebral ischemia* (Krieglstein J. and Klumpp, S. eds). P. 201-216. **Suttgart Medpham Scientific**.2002

SCHALLERT, T. and WOODLEE M.T: Orienting and placing. In the behavior of the laboratory rat: A handbook with test oxford University Press Whishaw L, Kolb B. p. 129-140, 2005.

SCHALLERT, T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. **The Americam Society for Experimental Neurotherapeutics. INC**. v. 3, p. 497-504, 2006.

SCHAWARTZ, M. and KIPNIS, J. Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. **Trends Mol Med**. v. 7(6), p.252-8, 2001a.

SCHAWARTZ, M. and MOALEM, G. Beneficial immune activity after CNS Injury: prospects for vaccination. **J Neuroimmunol**. v. 113(2), p. 185-92, 2001b

SCHNELL, L., S.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E.; PERRY, V.H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**. v. 11(10), p.3648-58.1999.

SHARKEY J., RITCHIE, I.M., KELLY, P.A., Perivascular Microapplication of Endothelin-1
A new Model of Focal Cerebral ischaemia in the Rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v.13,
p.865-871, 1993.

SHARKEY, J.; BUTCHER, S.P., KELLY, J.S. Endothelin-1 induced middle cerebral artery
occlusion: pathological consequences and neuroprotective effects of MK801. **J Auton. Nerv.
Syst.** v. 49, p. S177-S185, 1994.

SHIRAISHI, K. and SIMON, R. P. A model of proximal middle cerebral artery occlusion
in rat. **Journal of Neuroscience Methods.** v. 30, p. 169-174, 1989.

STREIT, W. J. Microglia como neuroprotetores, células imunocompetentes do SNC. **Glia.** v.
40, p.133-139, 2002.

STONE, T., W. and ADDAE, J.I. The pharmacological manipulation of glutamate receptors
and neuroprotection. **European J. Pharmacol.** v. 447, p. 285-296, 2002.

SYNTICHANKI, P. and TAVERNARAKIST, N .The biochemistry of neuronal necrosis:
rogue biology? **Nature Reviews Neuroscience.** v. 4, p. 672-684, 2003.

SUMMERS, B. A.; CUMMINGS, J. F.; LAHUNTA, A. Principles of neuropathology. In:
veterinary neuropathology. **Battimore: Mosby.** v. 527, p. 10-30, 1995.

SUGAWARA, T., FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G.W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P.H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **Neuro Rx**. v.1, p.17-25, 2004b.

TAVARES, P., GOMES-LEAL, W. Neurogênese no sistema nervoso central adulto: função e participação na manutenção e reparo dos circuitos neurais. *Neurociências* 7, 49-57. 2011.

THIEL, A., AND W. D. HEISS. Imaging of microglia activation in stroke. **Journal of Cerebral Circulation**. 42, 507-512. 2011.

THIEL, A., B. A. RADLINSKA, C. PAQUETTE, M. SIDEL, J. P. SOUCY, R. SCHIRRMACHER, AND J. MINUK, The temporal dynamics of poststroke neuroinflammation: a longitudinal diffusion tensor imaging-guided PET study with ¹¹C-PK11195 in acute subcortical stroke. **J Nucl Med**. 51, 1404-1412. 2010.

THORED, P., A.; ARVIDSSON, A.; CACCI, E.; AHLENIUS, H. KALLUR, T.; DARSALIA, V.; EKDAHL, C. T.; KOKAIALI, O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells**. v. 24, p.739-47, 2006.

THORED, P.; HELDMANN, U. ; GOMES-LEAL, W.; GISLER, R.; DARSALIA, V.; TANEERA, J.; NYGREN, M.; JACOBSEN, S. E. ; EKDAHL, C. T. KOKAIA, Z. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**. v. 57 p. 835–849, 2009.

TORRIANI, C.; MOTA, O.P.E; SALES, M.L.A.; RICCI, M.; NISHIDA, P.; MARQUES, L.; LIMA, F.L; NOGUEIRA, M.; SOUZA, L.M.V.; LIMA, Z.R. Efeitos da estimulação motora

e sensorial no pé de Pacientes Hemiparéticos após acidente vascular encefálico. **Ver. Neurociencia**. v.16/1: p. 25-29, 2008

VENANCE, L.; STELLA, N.; GLOWINSKI, J.; GIAUME, C. Mechanism involved in initiation and propagation of receptor induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. **J Neurosci** .v.17, p. 1981-1992, 1997.

VILLARREAL, G.; ZAGORSKI, J.; WAHL, S.M.T., F. Inflammation: acute. Encyclopedia of Life. **Sciences**. v., p. 1-8, 2001.

WAKEFIELD, D. and KUMAR, R.K. Inflammation: Chronic. **Encyclopedia of life Sciences**, 2001.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M.A. The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology**. v. 184, p. 53-68, 2007.

WANG, D.D. and BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Prog neurobiol**. v. 86, p. 342-367, 2008.

WARD, N.M.; SHARKEY, J.; MARSTON, H.M.; BROW, V.J. Simple and choice reaction-time performance following occlusion of the anterior cerebral arteries in the rat. **Exp Brain rev**. 123, p.-269-281, 1998.

WEI, D.; REN, C.; CHEN, X.; ZHAO, H. The chronic protective effects of remote preconditioning and the underlying mechanisms involved in inflammatory factors in rat stroke. Limb preconditioning protects against stroke. 2012

WESTON, R.M.; JONES, N.M.; JARROT, B.; CALLAWAY, J.K. Infiltração de células Inflamatórias após isquemia cerebral induzida por endotelina-1: Correlação histoquímica e mioloperoxidase com variações temporais de lesão cerebral. **J Cereb Metad Fluxo Sanguíneo**. v. 27, p. 100-114, 2007.

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

WOOLSEY, T. A. & VAN DER LOOS, H. The structural organization of layer IV in the somatosensory regions (SI) of mouse cerebral cortex: The description of a cortical fields composed of discrete cytoarchitectonic units. **Brain Research**, v. 17, p. 205-242, 1970.

WOODRUFF, T.; THUNDYLA, J.; TANG, C.S.; SOBEY, G.C.; TAYLOR, M.S.; Pathophysiology, treatment and Animal and cellular models of human ischemic stroke, **molecular Neurodegeneration**. v.6, p.11, 2011.

YAMAMOTO, S., M. NAGAP, et al. Transcription factor expression and notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. **J Neurosci**. v. 21(24), p. 9814-23, 2001.

YAMASHITA, T., M. NINOMIYA, et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. **J Neurosci**, v. 26, p. 6627-36, 2006.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; MASAKI, T.A. Novel peptide vasoconstrictor, endothelin, Is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca^{++} channels. **Journal of Hypertension Supplement**. v. 6, p. 188-191, 1988a.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; TOMB, Y.; KOBASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A Novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**. v.332, p. 411-415, 1988b.

YANG, C.; WANG, H.; ZHANG, S.; CHENG, Y.; SUN, J.; Neuroprotective effects of NKN on focal cerebral ischemia in rats. **Turkish Neurosurgery**. v. 22, p.1-6, 2011.

YENANI, M. A.; XU, L.; TANG, X. N.; QIAO, Y.; GIFFARD, R. G. Microglia potencializa danos aos componentes da barreira hemato-encefálica: melhoria de minociclina in vivo. **Curso**. v. 37, p.1087-1093, 2006.

YILMAZ G, D. and GRANGER N. Moléculas de adesão e Acidente vascular cerebral isquêmico. **Res Neurol**. v.30, p.783-793, 2008.

YRJANHEIKKI, J., T. TIKKA, R. KEINANEN, G. GOLDSTEINS, P. H. CHAN, AND J. KOISTINAHO, 1999. 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**. 96, 13496-13500.

ZHANG L, SCHALLERT T, ZHANG ZG, LIANG Q, ARNIEGO P, LI Q, LU M, CHOPP M: A Test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 117, p. 207-214, 2002.