

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

SANDERSON CORRÊA ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E NEUROPROTETORA DA EDARAVONA
NO CÓRTEX SENSÓRIOMOTOR PRIMÁRIO DE RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL EXPERIMENTAL.

BELÉM-PA

2014

SANDERSON CORRÊA ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E NEUROPROTETORA DA EDARAVONA
NO CÓRTEX SENSÓRIOMOTOR PRIMÁRIO DE RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL EXPERIMENTAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob a orientação do professor Dr. Wallace Gomes Leal.

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Co-Orientador: Prof. Dr. Rosivaldo Santos Borges

BELÉM

2014

SANDERSON CORRÊA ARAÚJO

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E NEUROPROTETORA DA EDARAVONA
NO CÓRTEX SENSÓRIOMOTOR PRIMÁRIO DE RATOS ADULTOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA FOCAL EXPERIMENTAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob a orientação do professor Dr. Wallace Gomes Leal.

APROVADO EM: 12/02/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal – Orientador
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof. Dr. Enio Mauricio Nery dos Santos – Avaliador
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco - Avaliadora
Instituto Evandro Chagas – Ministério da Saúde

Dedico este trabalho à:

Meus pais Sandoval Santos Araújo e Raimunda Vera Corrêa Araújo;

Minha filha Ana Cristina da Rosa Araújo;

Minha avó Edith dos Santos Araújo;

Minha tia Dulcirene dos Santos Araújo;

Meus irmãos Ana Keuria, Sanclayver e Sandy Araújo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais Sandoval e Vera por acreditarem em meu potencial desde a época em que morávamos em Alenquer.

Ao Orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal.

Ao Co-Orientador, Prof. Dr. Rosivaldo Santos Borges.

A minha filha Ana Cristina, por ter sido a grande fonte de inspiração e motivação para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas, nas pessoas do Prof. Dr. José Antônio Picanço Diniz Júnior e da Dr^a. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias pelo suporte material dispensado.

Aos colegas de laboratório pela ajuda nos diferentes momentos da execução do presente.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

“Veni, vidi, vici”

Júlio César

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVENC) é uma desordem neural iniciada a partir da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo, tornando inadequada a demanda energética para a região, promovendo assim um dano tecidual. O AVENC é classificado em hemorrágico ou isquêmico. O AVENC isquêmico tem maior prevalência e pode ocorrer por trombose ou embolismo. A patologia isquêmica tem múltiplos eventos interrelacionados como excitotoxicidade, despolarização periinfarto, estresse oxidativo e nitrosativo, inflamação e apoptose. Um elemento de fundamental importância na patologia isquêmica é a célula microglial, cuja atividade está intimamente ligada à progressão do ambiente lesivo. Uma alternativa terapêutica no tratamento do AVENC é um pirazolona denominada Edaravona. O presente trabalho avaliou o efeito neuroprotetor da Edaravona na dose de 3mg/kg no córtex sensório-motor primário após lesão isquêmica focal. A indução isquêmica foi induzida através da administração de 40pM do peptídeo vasoconstritor endotelina 1 diretamente sobre o córtex sensório-motor primário. Foram avaliados animais tratados com Edaravona (N=10) e animais tratados com Água Destilada (N=10) nos tempos de sobrevivência 1 e 7 dias após o evento isquêmico. O tratamento com edaravona evidenciou através da análise histopatológica com violeta de cresila uma redução de 49% e 66% na área de infarto nos animais nos tempos de sobrevivência 1 e 7 dias respectivamente. Os estudos imunohistoquímicos para micróglia/macrófagos ativos (ED1⁺) demonstraram uma redução na presença de células ED1⁺ em 35% e 41% para os tempos de sobrevivência 1 e 7 dias respectivamente. A redução na presença de neutrófilos (MBS-1⁺) foi significativa apenas nos animais com tempo de sobrevivência de 24h onde se observou a redução em 56% na presença dessas células. A análise estatística foi feita por análise de variância com correção a *posteriori* de Tukey com $p < 0,05$.

Palavras-chave: Acidente vascular encefálico, isquemia, micróglia, edaravona.

ABSTRACT

Stroke is a neural disorder originated from blood flow decreasing or interruption, making inadequate energy supply in the region, thus promoting tissue damage. The stroke can be divided in hemorrhagic or ischemic. The ischemic stroke is more prevalent and can occur through thrombosis or embolism. The ischemic pathology has multiple interrelated events like excitotoxicity, peri-infarct depolarization, oxidative and nitrosative stress, inflammation and apoptosis. An element of fundamental importance in ischemic pathology is the microglial cell, whose activity is closely linked to the progression of environment harm. A therapeutic alternative in the treatment of stroke is a pyrazolone called Edaravone. This study evaluated the neuroprotective effect of Edaravone dose of 3mg/kg in primary sensorymotor cortex after focal ischemic lesion. Edaravone treated animals (N = 10) and animals treated with saline solution (N = 10) in the survival time of 1 and 7 days after the ischemic event was evaluated. Treatment with edaravone showed by histopathological analysis with cresyl violet a reduction of 49% and 66% in infarct size in animals in survival time 1 and 7 days respectively. Immunohistochemistry studies for microglia/macrophages assets (ED1⁺) demonstrated a reduction in the presence of ED1⁺ cells in 35% and 41% survival times for 1 and 7 days, respectively. Neutrophils (MBS-1⁺) were reduced to 64% only in animals with survival times a day. Harmful patterns were assessed qualitatively and quantitatively. Data was tested by ANOVA with Tukey post hoc test. Differences were considered significant at $p < 0,05$.

Keywords: Stroke, ischemia, microglia, edaravone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	
Oclusão da artéria cerebral média provocando isquemia cerebral.....	18
FIGURA 2	
Cascata de eventos de eventos na isquemia cerebral.....	19
FIGURA 3	
Resposta inflamatória no ambiente isquêmico.....	23
FIGURA 4	
Modelo esquemático da origem microglia.....	25
FIGURA 5	
Ativação microglial.....	26
FIGURA 6	
Modulação da micróglia por astrócitos em ambiente inflamatório.....	30
FIGURA 7	
Ativação das vias de morte celular programada.....	31
FIGURA 8	
Mecanismo hipotético de reação da Edaravona.....	35
FIGURA 9	
Figura esquemática da lesão do córtex sensório motor primário.....	38
FIGURA 10	
Modelo esquemático do delineamento terapêutico.....	39
FIGURA 11	
Prancha com fotomicrografias de violeta de cresila de cresila.....	43
FIGURA 12	
Gráfico da quantificação da área de lesão.....	44
FIGURA 13	
Prancha com fotomicrografias de imunomarcação para MBS-1.....	45
FIGURA 14	
Gráfico da contagem de células MBS-1 ⁺	46
FIGURA 15	
Prancha com fotomicrografias de imunomarcação para ED1.....	47
FIGURA 16	
Gráfico da contagem de células ED1 ⁺	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	
Descrição dos grupos experimentais.....	37
TABELA 2	
Anticorpos utilizados nos estudos imunohistoquímicos.....	41

Lista de Abreviaturas

AA	Ácido Araquidônico
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AVENC	Acidente Vascular Encefálico
CINC	Citocina Indutora Quimioatraente de Neutrófilos
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERK	Cinase Regulada por Sinal Extracelular
ET-1	Endotelina 1
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
HIF-1 α	Fator 1 α Induzido por Hipóxia
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à insulina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MAP	Proteína Ativada por Mitógeno
MCAO	Oclusão da Artéria Cerebral Média
MCP-1	Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
MDA	Dialdeído Malônico
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9

NMDA	N metil D Aspartato
NA	Nicotinamida
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase do Óxido Nítrico
iNOS	Sintase do Óxido Nítrico Induzida
ONOO ⁻	Peroxinitrito
M1	Córtex Sensório motor Primário
p38 MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno p38
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
rt-PA	Ativador Plasminogênio Tecidual Recombinante
TGF-β	Fator de Crescimento Transformante Beta
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VCAM	Molécula de Adesão Vascular Celular
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	16
1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	17
1.2.1 Excitotoxicidade	19
1.2.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	20
1.2.3 Despolarização Periinfarto	20
1.2.4 Inflamação Aguda	21
1.2.4.1 CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	24
<i>Neutrófilos</i>	24
<i>Micróglia</i>	24
<i>Astrócitos</i>	28
1.2.5 Morte Celular Programada	30
1.3 TERAPIAS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	32
1.4 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL	35
1.5 OBJETIVOS	36
1.5.1 Objetivo Geral	36
1.5.2 Objetivos Específicos	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	37
2.2 MODELO DE ISQUEMIA FOCAL	37
2.3 ADMINISTRAÇÃO DO FÁRMACO	38
2.4 PERFUSÃO E MICROTOMIA.....	39
2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA.....	40
2.5.1 Visualização da Área de Lesão	40
2.5.2 Estudos Imunohistoquímicos.....	40
2.6 ANÁLISE QUALITATIVA.....	41
2.7 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	41
2.7.1 Análise da área de lesão	41
2.7.2 Análise dos Padrões Histopatológicos	41
2.7.3 Análise Estatística	41
3.1 ÁREA DE LESÃO.....	42

3.3 ATIVAÇÃO MICROGLIAL	46
4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS	49
4.2 O TRATAMENTO COM EDARAVONA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO DO CÓRTEX SENSÓRIOMOTOR PRIMÁRIO	49
4.3 A EDARAVONA REDUZ A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA ÁREA DE LESÃO	50
5. CONCLUSÃO.....	52
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O acidente vascular encefálico (AVENC) é uma desordem neural com grande taxa de mortalidade mundialmente, cuja a incidência é maior em homens em relação às mulheres, sendo que o primeiro evento ocorre em média entre 60,8–63,5 anos para os homens e 65,3–80,4 anos para as mulheres (APPELROS et al., 2009). Dentre os fatores de risco que aumentam a probabilidade de incidência do AVENC está a ingestão de sal, gordura saturada, consumo de álcool, tabagismo, sedentarismo, histórico familiar de hipertensão e diabetes mellitus (CAPPUCCIO e JI, 2012; O'DONNELL et al., 2012). Somado aos fatores de risco, verificou-se que populações residentes em áreas de menor poder socioeconômico estão sujeitas a uma maior incidência quando comparadas a populações residentes em áreas de maior poder aquisitivo (ENGSTROM et al., 2001).

Na atualidade, o AVENC representa uma das maiores causas de incapacidade funcional por provocar consideráveis sequelas neurológicas (DOBKIN, 2005; TAYLOR et al., 1996). Globalmente, a prevalência em países com grande extensão territorial é cerca de cinco a dez vezes maior, quando comparada a países de pequena extensão (BONITA e BEAGLEHOLE, 2007).

Estima-se que nos Estados Unidos (EUA) cerca de 7 milhões de pessoas maiores de 20 anos foram acometidas pelo AVENC entre os anos de 2005 e 2008, dentre os quais houve prevalência entre índios americanos, negros, hispânicos, outras raças e brancos. Em 2009, a taxa de ocorrência em adultos maiores de 18 anos foi maior em negros comparados a brancos e asiáticos. Dentre os indivíduos acometidos, foi apontado um maior grau de severidade nos indivíduos negros. Somando-se a isto, constatou-se um aumento na taxa de infarto cerebral sem sintomas clínicos em indivíduos mais velhos (ROGER et al., 2011; STANSBURY et al., 2005).

Na América Latina, o AVENC é um dos líderes de mortalidade com incidência e prevalência através do continente. Na década dos anos 2000, foi

uma das maiores causas de mortalidade dentre os países da região (PONTES-NETO et al., 2008). No Brasil o AVENC ocupa posição de liderança nos casos de mortalidade (PONTES-NETO et al., 2008). Na cidade de São Paulo-SP, em meados da década de 1990, constatou-se uma maior taxa de incidência em homens em relação a mulheres, bem como uma maior taxa entre negros em relação a brancos (LOTUFO et al., 2007). Na cidade de Fortaleza, entre os anos de 2009 e 2010, verificou-se que a população acometida tinha média de idade de 67,7 anos; sendo as mulheres as maiores vítimas e que a média de tempo desde o surgimento dos sintomas até a entrada no hospital foi de 14,2 horas (DE CARVALHO et al., 2011).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O AVENC é uma desordem neural iniciada a partir da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo por oclusão da artéria cerebral média (MCAO, do inglês *middle cerebral artery occlusion*), levando a uma privação de oxigênio e nutrientes para o encéfalo, resultando em um dano tecidual (Figura 1). O AVENC pode ser classificado em hemorrágico e isquêmico, este último podendo ocorrer por trombose ou embolia (AHMAD e GRAHAM, 2010; DOYLE et al., 2008).

Na patologia isquêmica são visualizadas duas áreas distintas: centro da lesão denominado centro isquêmico e uma região mais periférica denominada penumbra isquêmica (LO et al., 2003).

O centro isquêmico é caracterizado por rápida despolarização anóxica com concomitante aumento extracelular da concentração de K^+ . Ocorre intenso influxo de Ca^{+2} nas células do tecido com consequente diminuição da concentração extracelular de Ca^{+2} . Durante o período de reperfusão após isquemia focal, a concentração extracelular de K^+ aproxima-se do seu nível fisiológico. Apesar do retorno se aproximar do nível fisiológico, o dano causado é severo o suficiente para resultar infarto tecidual no centro da lesão (LIPTON, 1999).

A região de penumbra isquêmica localiza-se ao redor do centro isquêmico, sofrendo eventos deletérios menos pronunciados devido ao

suprimento residual de vasos sanguíneos colaterais. No estágio inicial, a penumbra pode ocupar até a metade do volume de lesão, além de metabolizar glicose ativamente. A quebra da homeostase celular promove crescimento da área de lesão por apoptose somado ao processo inflamatório (LO, 2008; MERGENTHALER et al., 2004).

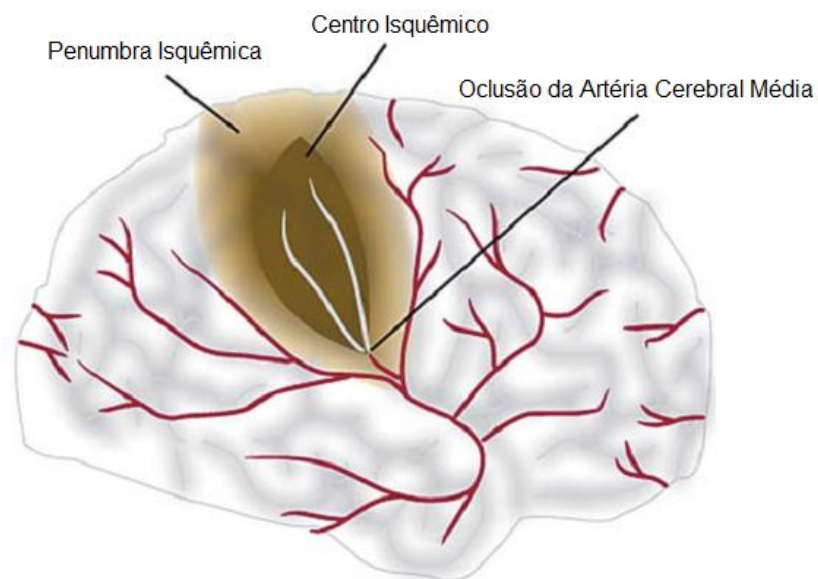


Figura 1: Oclusão da artéria cerebral média provocando isquemia cerebral. Desenvolvimento do centro isquêmico e da região de penumbra. Adaptado (MITSIOS et al., 2006).

A lesão isquêmica é marcada por eventos complexos e interrelacionados que incluem: excitotoxicidade, despolarização periinfarto, inflamação e apoptose entre outros (Figura 2) (DIRNAGL et al., 1999; DOYLE et al., 2008).

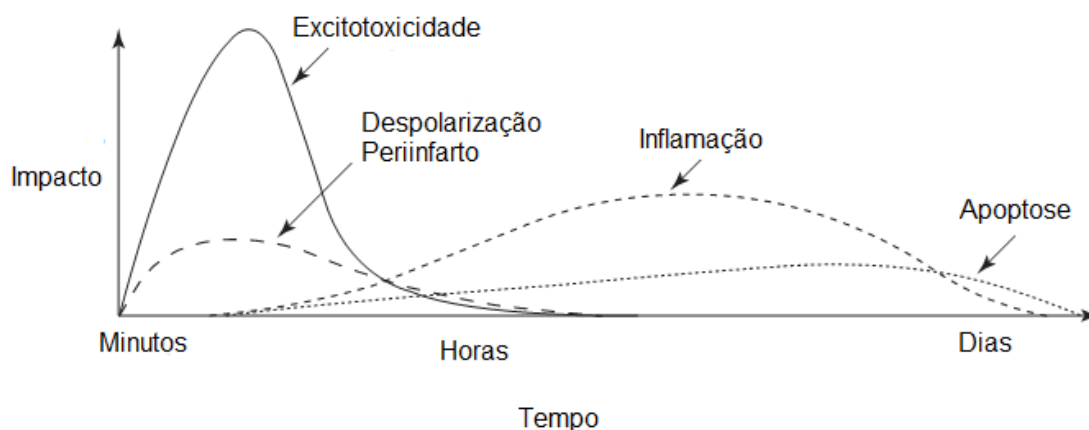


Figura 2: Cascata de eventos que ocorrem durante a isquemia cerebral. Adaptado (DIRNAGL et al., 1999).

1.2.1 Excitotoxicidade

O encéfalo é um dos órgãos mais ativos metabolicamente demandando uma grande quantidade de oxigênio para manter a fosforilação oxidativa e assim gerar ATP o suficiente para manter os gradientes iônicos intra e extracelular. A bomba iônica Na^+/K^+ ATPase encontrada na membrana plasmática neuronal é a principal responsável por manter a alta concentração extracelular de Na^+ e a alta concentração intracelular de K^+ necessária para a realização do potencial de ação. Após o início da isquemia, ocorre falência mitocondrial e a síntese de ATP cessa. O ATP restante é rapidamente consumido. A membrana do neurônio pré-sináptico sofre despolarização, liberando de forma exacerbada neurotransmissores na fenda sináptica, principalmente o neurotransmissor excitatório glutamato que tem um importante papel na fisiopatologia do AVENC (OLNEY, 1990; OLNEY et al., 1974).

A presença do glutamato na fenda sináptica ativa diversos receptores dos neurônios pós-sinápticos. Alguns desses, os receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), Cainato e N-Metil-D-Aspartato (NMDA) desempenham importante papel no desenvolvimento da patologia. O receptor NMDA é permeável ao Ca^{+2} . A presença excessiva do Ca^{+2} intracelular ativa algumas enzimas como a proteína cinase C, fosfolipase A_2 (PLA_2), ciclooxigenase (COX), sintase do óxido nítrico (NOS, do inglês *nitric oxide*

synthase) dependente de cálcio, calpaína e algumas endonucleases (DOYLE et al., 2008; DURUKAN e TATLISUMAK, 2007; LO et al., 2003; MITSIOS et al., 2006).

Os receptores AMPA também contribuem com massivo influxo de Na⁺ e Cl⁻ que juntos perturbam a homeostase celular, além de contribuir com entrada de água resultando em edema celular (MERGENTHALER et al., 2004).

1.2.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Como resultante da isquemia e reperfusão tecidual, o acúmulo de Ca⁺² na região lesionada desregula a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a qual produz níveis deletérios de radicais livres. Os radicais livres iniciam um ciclo vicioso, desregulando ainda mais a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, produzindo ainda mais radicais livres. (DOYLE et al., 2008; ENDRES et al., 2009)

Essa condição patológica favorece uma maior ativação da enzima NOS que por sua vez gera quantidade significativa de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*). A reação de NO com íons superóxidos forma peroxinitrito (ONOO⁻), um potente radical livre. O excesso de ROS e ONOO⁻ destroem várias macromoléculas além de participar em mecanismos de sinalização que resulta em morte celular (DOYLE et al., 2008).

O NO e o estresse oxidativo estão relacionados com a ativação excessiva da enzima de reparo de DNA, Poli(ADP-Ribose) Polimerase 1 (PARP-1). A enzima PARP-1 atua reparando a quebra de uma das fitas de DNA, catalisando a transformação de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺) em Nicotinamida (NA). A ativação excessiva de PARP-1 depleta o NAD⁺ das células, prejudicando todos os processos NAD⁺-dependente, tais como a glicólise e a respiração mitocondrial, exacerbando ainda mais o processo patológico (DOYLE et al., 2008; ENDRES et al., 2009).

1.2.3 Despolarização Periinfarto

A despolarização periinfarto são ondas espontâneas de despolarização com todas as características de depressão alastrante cortical que se propaga através da penumbra isquêmica. Depressão cortical alastrante é uma onda

autopropagadora de atividade eletroquímica que progride através do tecido cortical cerebral normal (DOYLE et al., 2008). Na região do centro isquêmico, as células sofrem despolarização anóxica e não repolarizam mais. Na região de penumbra as células ainda podem repolarizar a custo de mais gasto energético (DIRNAGL et al., 1999).

A anóxia e a despolarização excitotóxica de neurônios e glia aumenta a concentração extracelular de K^+ e glutamato no centro isquêmico. O glutamato e o K^+ difundem-se do centro para a penumbra isquêmica levando a um ciclo vicioso de despolarização a mais de neurônio e glia. Como a condição intrínseca da repolarização é dependente de energia e as células da região de penumbra estão comprometidas metabolicamente, a despolarização periinfarto pode contribuir para um aumento gradativo do centro de lesão em direção à penumbra (MERGENTHALER et al., 2004).

1.2.4 Inflamação Aguda

A inflamação pode ser entendida como um mecanismo de defesa iniciado após estímulos nódicos (agentes físicos ou químicos) ou não-nódicos (agentes microbianos, reações imunológicas, necrose tecidual). A resposta inflamatória aguda é considerada transitória e controlada sendo coordenada por uma série de eventos sobrepostos e interrelacionados com finalidade de eliminar o agente lesivo e restaurar a homeostase tecidual. Caso o agente lesivo não seja eliminado, o processo inflamatório torna-se crônico (VILLAREAL et al., 2001).

A inflamação aguda é iniciada a partir de uma lesão tecidual desencadeando uma série de eventos bioquímicos. Lesões em vasos sanguíneos são as primeiras consequências desses eventos. As lesões produzidas induzem uma maior produção na quantidade de fibrinogênio para a formação de uma rede de fibrina, sendo esta responsável pela restauração dos vasos lesionados, além de servir como suporte para a agregação plaquetária e a infiltração leucocitária (VILLAREAL et al., 2001).

As células endoteliais vasculares secretam mediadores inflamatórios que promovem aumento na permeabilidade vascular. Como consequência há um extravasamento do plasma para o sítio inflamatório, ocorrendo diluição dos

fatores tóxicos, influxo de proteínas com função imune, fragmentos do sistema complemento (C3), além de uma intensa infiltração leucocitária. A síntese e liberação de mediadores inflamatórios torna-se um processo autorregulado que promove a exacerbação do processo inflamatório (VILLAREAL et al., 2001).

No decorrer da inflamação as células envolvidas no processo respondem às citocinas alterando a expressão genica e induzindo a atividade de enzimas importantes como fosfolipase A2 (PLA₂), que dá origem ao ácido araquidônico (AA), que por sua vez sofre a ação das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipooxigenase produzindo prostanóides e leucotrienos respectivamente (VILLAREAL et al., 2001).

Em resposta ao ambiente inflamatório, as células do endotélio expressam moléculas de superfície para permitir a adesão, rolamento, fixação, espalhamento e transmigração das células com funções imunes para o sítio lesionado (Figura 3) (LEY et al., 2007; MCDONALD e KUBES, 2011; ROCK e KONO, 2008; VILLAREAL et al., 2001).

As principais moléculas de ancoramento de leucócitos circulantes são: Integrinas; molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule*); molécula de adesão vascular celular (VCAM, do inglês *vascular cell adhesion molecule*) selectinas L, P e E; ligantes de selectina semelhantes à mucina (LEY et al., 2007; MCDONALD e KUBES, 2011; ROCK e KONO, 2008; VILLAREAL et al., 2001).

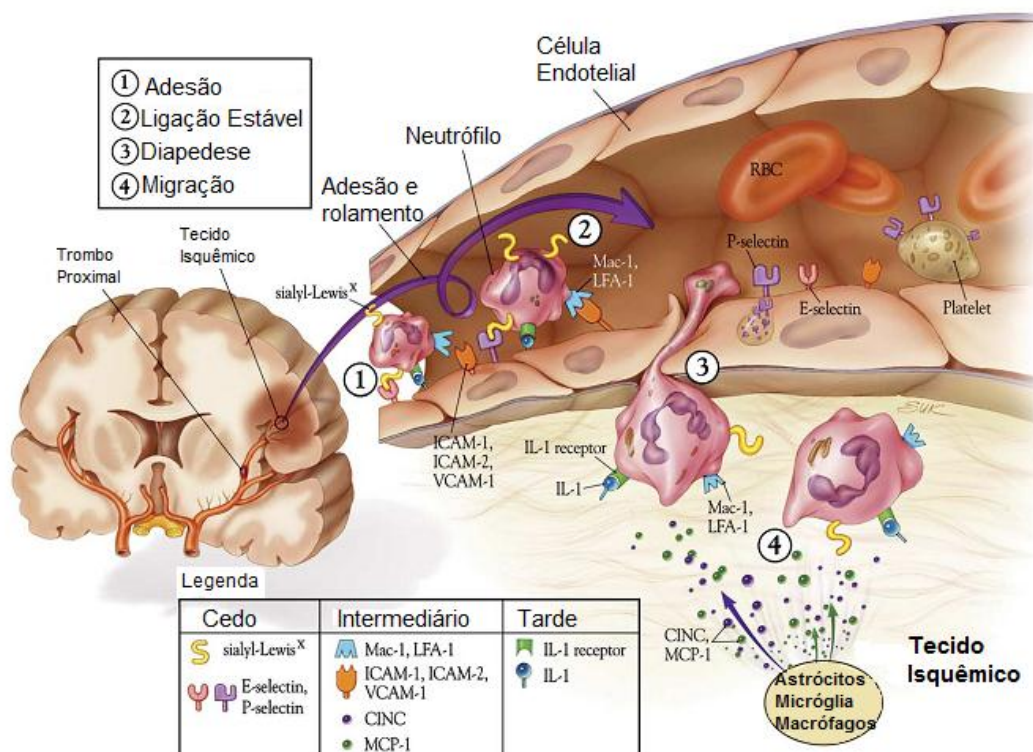


Figura 3: Resposta inflamatória no ambiente isquêmico: Moléculas de Selectina P e E são expressas e fazem ligação através de Sialil-LewisX favorecendo a adesão e rolamento de neutrófilos(1). A isquemia promove a expressão de IL-1 nas células endoteliais que induzem a expressão de ICAM-1 em sua própria superfície. As Integrinas MAC-1 e LFA-1 presentes na superfície de neutrófilos ligam-se à ICAM-1, ICAM-2 e VCAM-1 promovendo forte ligação dos neutrófilos com o endotélio vascular (2). Astrócitos, Micróglia/Macrófagos da área isquêmica liberam CINC e MCP-1 em resposta a liberação de citocinas oriundas da própria área lesionada. O conjunto dessas citocinas direciona a diapedese e migração dos neutrófilos para o parênquima cerebral lesionado (3 e 4). Adaptado (HUANG et al., 2006).

Durante o recrutamento, as moléculas de adesão e quimiocinas direcionam a rápida infiltração de leucócitos, que são as primeiras células infiltrantes, direcionando-as para o foco inflamatório. As células que alcançam o sítio da lesão produzem espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) que são letais e inespecíficas. Os monócitos infiltram tardiamente e diferenciam-se em macrófagos que reconhecem células opsonizadas pelo sistema complemento e as fagocitam (VILLAREAL et al., 2001).

A fase final da inflamação aguda compreende a eliminação dos patógenos e detritos celulares, restauração dos vasos sanguíneos, reposição

do tecido lesionado e término da infiltração leucocitária (VILLAREAL et al., 2001).

1.2.4.1 CÉLULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Neutrófilos

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imune inato a infiltrarem-se no parênquima cerebral após desordens neurais agudas, atingindo um pico máximo de acúmulo em 24h pós-lesão decaindo poucos dias após até desaparecerem completamente. Demonstrou-se experimentalmente que esses polimorfonucleares participam na fisiopatologia do processo isquêmico em uma janela temporal definida (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Investigações *in vitro* evidenciaram que os neutrófilos apresentam um papel altamente deletério no microambiente isquêmico, onde estas células infiltram-se rapidamente no sítio de lesão, contribuindo com a exacerbação da morte celular neuronal (NEUMANN, J. et al., 2008). Em modelo experimental de lesão excitotóxica na medula espinhal, observou-se que os neutrófilos infiltravam-se sobre o parênquima acumulando-se adjacente a parte mais ventral da substância cinzenta (GOMES-LEAL et al., 2005).

Uma vez no parênquima lesionado, os neutrófilos podem fagocitar e eliminar elementos invasores, detritos teciduais e células morrendo, mas também pode provocar lesões teciduais por sintetizar e secretar ROS, NOS e enzimas proteolíticas como, mieloperoxidase e elastase (DOYLE et al., 2008; IADECOLA e ANRATHER, 2012; VILLAREAL et al., 2001).

Micróglia

A micróglia tem sua origem a partir de células de linhagem eritromielóide que penetram no SNC através de um padrão complexo de infiltração e ocupação durante o desenvolvimento embrionário (Figura 4). Nesse contexto, o córtex cerebral e a zona subventricular são primeiramente ocupados, para em

seguida o parênquima neural também ser ocupado (NEUMANN, H. e WEKERLE, 2013; SWINNEN et al., 2013).

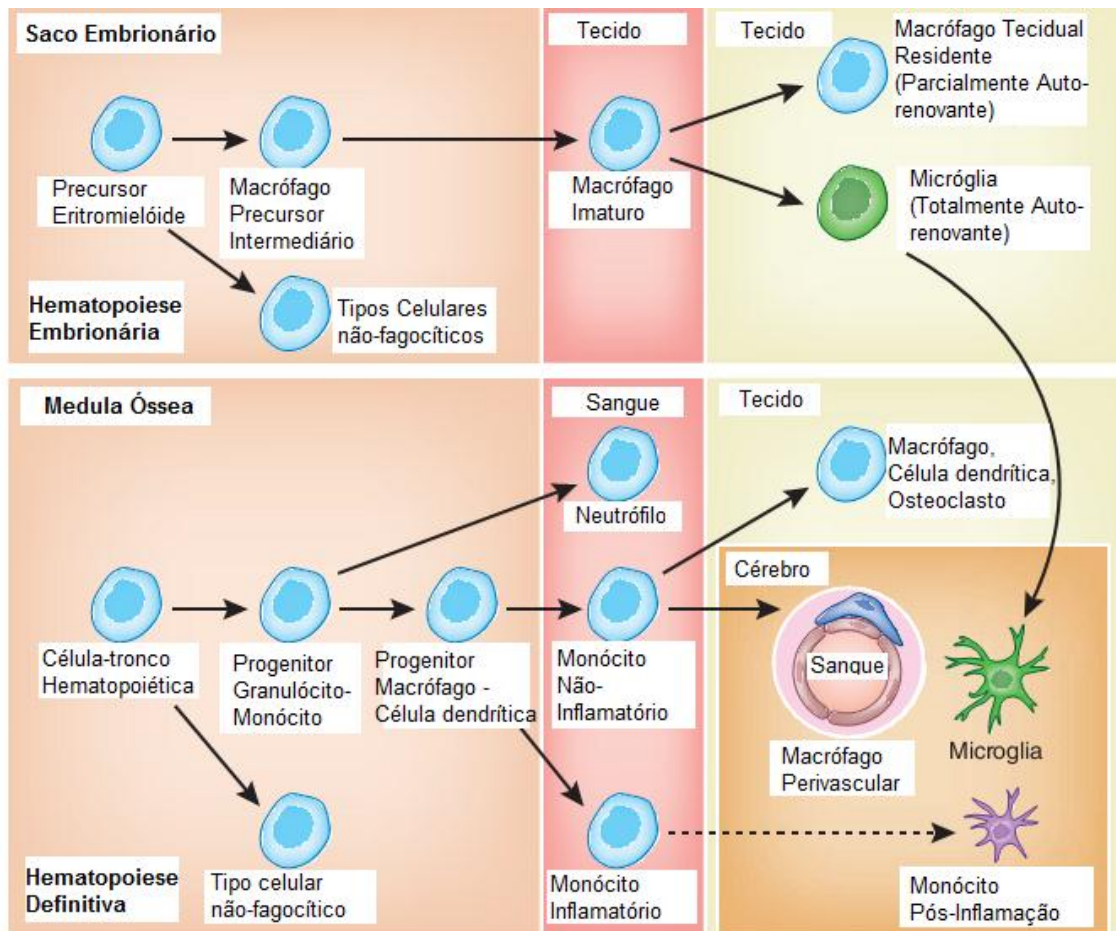


Figura 4: Modelo esquemático da origem microglial e outras células hematopoiéticas. Adaptado (NEUMANN, H. e WEKERLE, 2013; SWINNEN et al., 2013).

Apontou-se para a microglia um papel importante na regulação de progenitores embrionários na região da placa cortical, favorecendo de uma forma ainda não completamente compreendida a astrogênese (ANTONY et al., 2013). Originalmente descrita por Del Rio-Hortega, a célula microglial foi caracterizada por um núcleo denso e escuro com formato triangular, redondo ou alongado, escassa quantidade de citoplasma de onde se originam dois ou mais processos que se tornam mais finos quanto mais ramificações apresentarem. Em seu estado de aparente quiescência, a microglia apresenta escassa quantidade de citoplasma, corpo celular alongado sustentando processos finos e ramificados dispostos nos pólos da célula, atividade migratória e macrofágica. Já no estado ativado a célula retrai os seus

processos, tem seu volume do citoplasma aumentado, sofre arredondamento do núcleo passando a exibir uma morfologia amebóide (Figura 5) (DEL RIO-ORTEGA, 1939; KREUTZBERG, 1996; STOLL e JANDER, 1999).

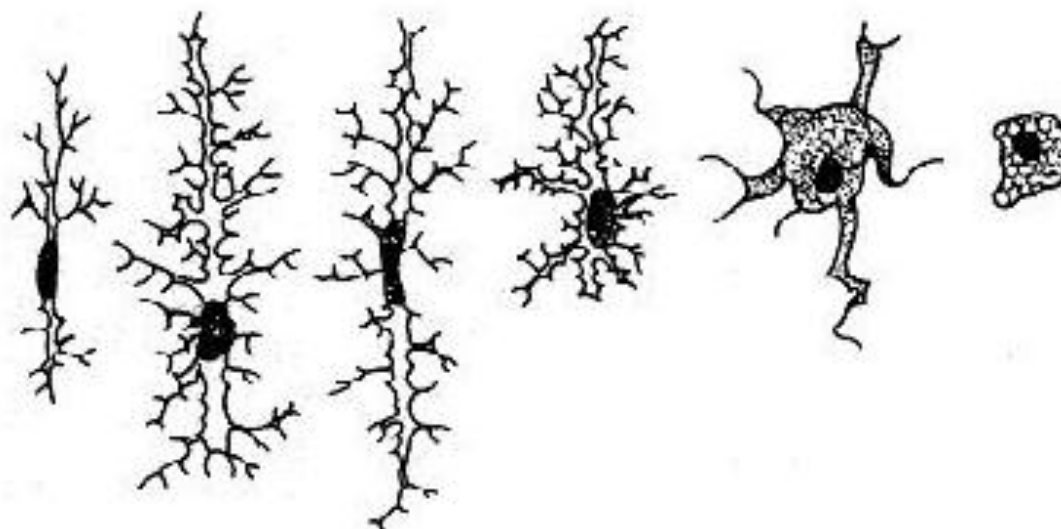


Figura 5: Ativação microglial. Mudança da morfologia ramificada para uma morfologia amebóide (KREUTZBERG, 1996).

Algumas evidências apontam para um papel dual da micróglia, ora apresentando um fenótipo benéfico, ora apresentando um fenótipo deletério (LALANCETTE-HEBERT et al., 2007; LAMBERTSEN et al., 2009; NEUMANN, J. et al., 2006; NEUMANN, J. et al., 2008; YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999).

Esta aparente dualidade que a célula microglial apresenta, está intimamente associada aos diversos fatores aos quais ela é exposta (RANSOHOFF e PERRY, 2009; SCHWARTZ et al., 2006).

A inibição microglial em modelo experimental de isquemia demonstrou caráter neuroprotetor, verificado por uma redução nos volumes de infarto cortical e estriatal além de uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios (YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999).

Em modelo com camundongos, demonstrou-se que semelhante a macrófagos do sangue periférico, as células microgliais apresentam subpopulações com fenótipos classicamente polarizados em M1(fenótipo

deletério) e M2 (fenótipo benéfico), entretanto, estas subpopulações desempenham diferentes papéis em janelas temporais distintas (GIRARD et al., 2013; HU et al., 2012).

Após um dano tecidual, alguns neurotransmissores não clássicos como o ATP são liberados no meio extracelular sinalizando para uma rápida resposta proliferativa e migratória em direção à lesão (DAVALOS et al., 2005; ZOU et al., 2012).

Verificou-se que em ambientes patológicos a ativação dos receptores de superfície do tipo TLR-2, TLR-4 e alguns receptores da família P2Y e P2X estão envolvidos na ativação microglial (FRANKE et al., 2004; LEHNARDT et al., 2008; LV et al., 2011; ZHAO et al., 2012; ZOU et al., 2012).

Recentemente, foi demonstrado que a ativação das enzimas caspases em micróglia não necessariamente induz morte celular, ao invés disso, ativa vias bioquímicas que convergem para que a célula apresente um fenótipo prejudicial (BURGUILLOS et al., 2011). Ao expressar o fenótipo deletério, a micróglia é caracterizada por sintetizar grande quantidade de fatores como PGE₂, IL-1 β , NO, NOO⁻, O₂^{*-} e H₂O₂ (BLOCK et al., 2007).

Gomes-Leal sugeriu a hipótese de que durante desordens neurais diversos fatores nócicos e tróficos são liberados concomitantemente no espaço extracelular e a célula microglial faria o reconhecimento através de seus receptores de membrana. Tais fatores seriam liberados ao longo de nichos anatômicos discretos. Dependendo da área e etiologia da patologia, fenótipos deletérios e benéficos poderiam coexistir no microambiente patológico (GOMES-LEAL, 2012).

Estudos demonstraram a influência de células progenitoras neurais através de fatores tróficos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *factor growth endotelial vascular*) na proliferação microglial além de modular a capacidade de migração, fagocitose e ativação destas células. Em condições patológicas, as células micróglia próximas à zona subventricular parecem estar sob modulação de células progenitoras neurais. Neste ambiente aparentemente deletério, as células microgliais próximas a

regiões neurogênicas expressam receptores para fatores tróficos como o IGF-1, além de apresentar uma morfologia ramificada ou intermediária com característica pró-neurogênica. Em regiões distantes anatomicamente da zona subventricular, a exemplo do estriado, elas parecem apresentar uma morfologia deletéria, expressando moléculas como o MCH II, funcionando como verdadeiras células apresentadoras de antígenos (MOSHER et al., 2012; THORED et al., 2009).

Em condições fisiológicas as células microgliais são altamente dinâmicas. Em um período de poucas horas elas monitoram o estado funcional de todo o do parênquima neural, realizando movimentos estocásticos com seus processos diretamente o estado funcional das sinapses, removendo-as caso apresentem algum indício de degeneração (NIMMERJAHN et al., 2005; TRAPP et al., 2007; WAKE et al., 2009). Utilizando um paradigma experimental em cultura organotípica, a célula microglial apresentou papel neuroprotetor ao englobar neutrófilos além de proteger neurônios quando submetidos à privação de glicose e oxigênio (NEUMANN, J. et al., 2006; NEUMANN, J. et al., 2008).

Reportou-se que camundongos quiméricos com deleção para o gene TNF- α , submetidos à isquemia focal apresentaram uma maior área de volume de infarto, onde o TNF- α apresentou um papel neuroprotetor possivelmente atuando através do receptor p55, além de regular de forma ainda não compreendida um aumento na expressão de receptores TLR-2 (LAMBERTSEN et al., 2009). Fazendo a ablação experimental da micróglia, verificou-se que animais submetidos à MCAO média tiveram uma exacerbação da lesão isquêmica (FAUSTINO et al., 2011; LALANCETTE-HEBERT et al., 2007).

Astrócitos

Os astrócitos em conjunto com oligodendrócitos são considerados a macróglia do SNC. Em condições fisiológicas os astrócitos têm funções proliferativas e estruturais. Quando apresentam um fenótipo de glia radial, participam diretamente da neurogênese, com um fenótipo mais maduro têm função estrutural, servindo como arcabouço de sustentação e proteção para a

migração dos neuroblastos na via migratória rostral. (IHRIE e ALVAREZ-BUYLLA, 2011; ZHANG, R. L. et al., 2008).

Os astrócitos também desempenham função neuroprotetora em condições fisiológicas. Podem estar presentes em íntimo contato com o endotélio vascular, associados a uma rica rede de matriz extracelular juntamente com neurônios na constituição da barreira hematoencefálica (LO et al., 2003).

Em ambientes lesivos, os astrócitos têm sua fisiologia alterada aumentando a síntese de mediadores para sinalização parácrina e autócrina, adquirem uma morfologia hipertrófica, aumentam a síntese de filamentos intermediários, proliferação e migração para o sítio lesionado além da formação de uma barreira física - conhecida como cicatriz glial – para evitar o aumento da área de lesão (BUFFO et al., 2010). Demonstrou-se experimentalmente que em um ambiente hipóxico, a proliferação de astrócitos, ocorre com maior intensidade próxima à unidade neurovascular (BARDEHLE et al., 2013), sendo que o ambiente lesivo pode modular o fenótipo astrocitário, levando a célula a readquirir propriedades de células-tronco neurais (BUFFO et al., 2008).

Verificou-se recentemente que em um ambiente inflamatório os astrócitos têm a capacidade de modular a dinâmica intracelular de Ca^{+2} da micróglia ativada, fazendo com que um complexo sistema de sinalização envolvendo NO, PGE_2 e ATP modulando a mesma, onde a partir de então a célula glial passaria a apresentar um perfil antiinflamatório (Figura 6) (ORELLANA et al., 2013).

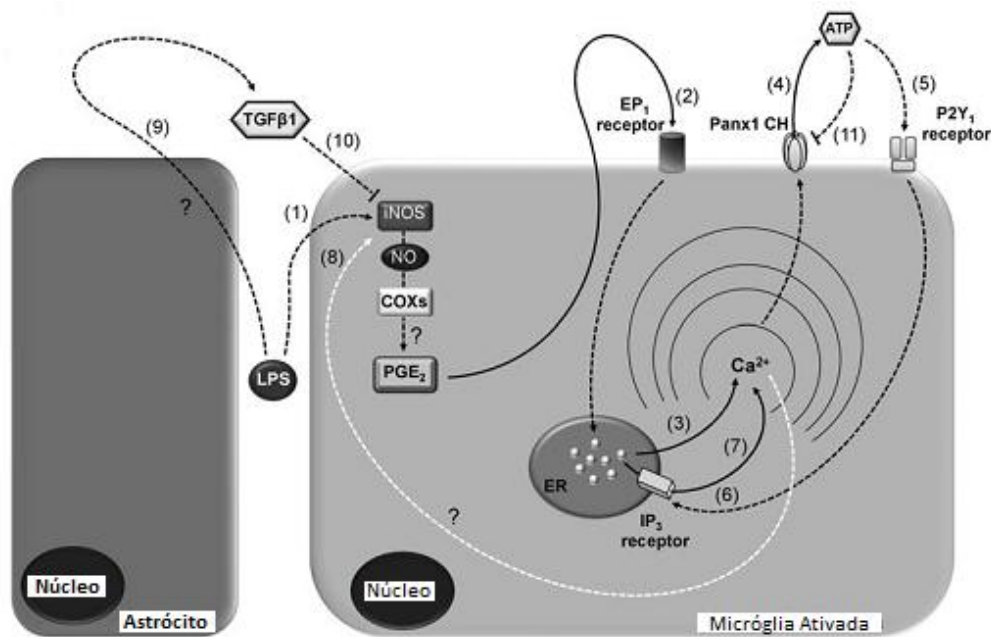


Figura 6: Modulação da micróglia por astrócitos em ambiente inflamatório. Adaptado (ORELLANA et al., 2013).

1.2.5 Morte Celular Programada

A morte celular programada (apoptose) é tradicionalmente considerada um processo pelo qual as células morrem em resposta a condições fisiológicas (LIPTON, 1999). A apoptose é um processo evolutivamente, conservado no qual as células morrem como resultado de uma série de eventos internamente programados, mediados por uma série de produtos gênicos dedicados que estão associados a condensação do núcleo e citoplasma, condensação do agregado de cromatina nuclear e encolhimento celular dando origem a corpos apoptóticos (MITSIOS et al., 2006).

A lesão isquêmica moderada induz preferencialmente morte celular pelo mecanismo do tipo apoptótico. A apoptose é iniciada a partir do surgimento de ROS, ligação ao receptor de morte, lesão no DNA, ativação de proteases e desequilíbrio iônico (DOYLE et al., 2008).

O extravasamento de Citocromo C do interior mitocondrial tem um importante papel em resposta à isquemia. O Citocromo C é liberado como resultado de uma série de eventos bioquímicos que levam a formação de um poro na membrana mitocondrial. O complexo proteico da família Bcl-2 é responsável por formar (Bax, Bad, Bak, Bim, Bid) ou impedir (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) a formação de poros na mitocôndria.

Há duas vias que podem iniciar a morte celular programada: via intrínseca e via extrínseca (HENGARTNER, 2000). A via intrínseca é iniciada a partir do extravasamento de Citocromo C para o citoplasma, unindo-se a pró-enzima Pró-Caspase 9 juntamente com a enzima Apaf-1 originando um complexo enzimático denominado Apoptossoma. Este complexo converterá a enzima Pró-Caspase 3 para a sua forma ativa, chamada Caspase efetora ou Caspase 3. A enzima Caspase 3 alveja substratos que alteram o equilíbrio da célula, clivando citoesqueleto, proteínas de reparo, proteínas sinalizadoras, além de atuar como endonuclease de restrição fragmentando o DNA (DOYLE et al., 2008).

A via extrínseca é iniciada quando ligantes como TNF- α , FASL, RANKL, CD95L, TRAIL acoplam-se a receptores de morte localizados na membrana celular, que sinalizam para a ativação de Caspases do tipo 8 e 10, que por sua vez ativarão vias que convergem na ativação da Caspase 3 (Figura 7) (DOYLE et al., 2008; HENGARTNER, 2000).

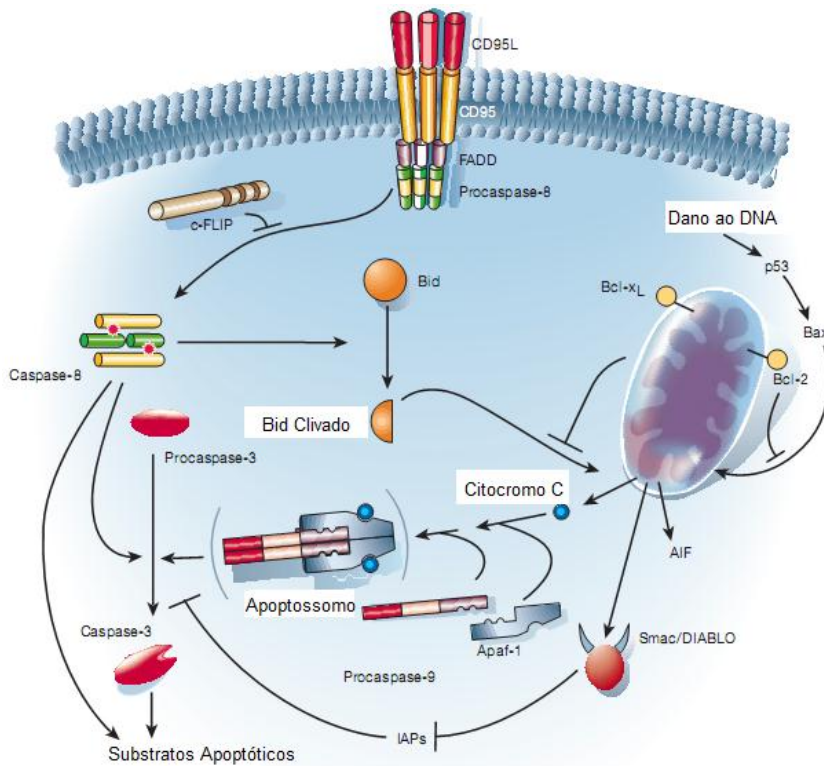


Figura 7: Ativação das vias de morte celular programada. Adaptado (HENGARTNER, 2000).

1.3 TERAPIAS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Para o tratamento em humanos há poucas alternativas farmacológicas utilizadas clinicamente. Uma das opções terapêuticas é um trombolítico denominado ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), entretanto, a janela terapêutica para o uso em pacientes acometidos com AVENC está restrito a aproximadamente 3 horas após o início da patologia (GREEN, 2008). Uma outra alternativa com efeito neuroprotetor demonstrado por inúmeras evidências e que encontra-se em estudo clínico avançado é a Minociclina (FAGAN et al., 2011; FAGAN et al., 2010; LAMPL et al., 2007; YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999). Atualmente existem diversas terapias experimentais para o tratamento de isquemia que apesar de serem promissoras, são pouco eficazes em sanar tal patologia (GINSBERG, 2008). Nesse contexto, uma classe de fármacos antioxidantes denominada pirazolonas apresenta-se como um grupo de potencial importância para o desenvolvimento de novas terapias (MARGAILL et al., 2005).

As pirazolonas são um grande grupo de agentes analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. Apesar dos seus mecanismos de ação não serem totalmente compreendidos, acredita-se que as pirazolonas obedeçam à farmacocinética de antiinflamatórios não esteroidais. (BENTUR e COHEN, 2004). Dentre as Pirazolonas, a edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona ou MCI-186; Radicut ®), apresenta efeito neuroprotetor na patologia isquêmica diminuindo o volume da área de infarto além de promover melhoras em testes comportamentais (KAWAI et al., 1997). Após administração endovenosa de uma única dose de 1,5mg/kg, a edaravona alcança um pico de concentração plasmática de 176µmol/L, decorridos 40 minutos após sua administração. Encontra-se cerca de 65% ligada a proteínas plasmáticas. A análise com radiotraçadores mostrou uma rápida e extensa metabolização de primeira passagem, onde os metabólitos são conjugados a intermediários glicuronídeos ou sulfatados. A excreção é realizada principalmente por secreção tubular renal em 24h (MIZUNO et al., 2007; SANO et al., 2010).

Preferencialmente a edaravona é administrada por via endovenosa, podendo ser administrada também por via oral ou retal (SATO et al., 2010). Demonstrou-se experimentalmente em diferentes modelos de AVENC a

capacidade neuroprotetora da edaravona, apresentando ação pleiotrópica, a se considerar: Preservação das substância branca e cinzenta, redução na taxa de morte celular programada, diminuição na peroxidação lipídica, preservação dos níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), diminuição da expressão TNF- α e IL-1 β , redução na ativação de astrócitos no sítio de lesão, redução na expressão de proteínas de membrana do tipo Aquaporina-4, redução de singleto de oxigênio (1O_2), redução de radicais hidroxila (OH $^\bullet$) além da diminuição da enzima metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9, do inglês *matrix metalloproteinase 9*) (GAO et al., 2010; JIAO et al., 2011; KIKUCHI et al., 2009; KUBO et al., 2009; NAKANO-OKUDA et al., 2006; NISHINAKA et al., 2010; SHICHINOHE et al., 2004; YAGI et al., 2008; YAMAMOTO, T. et al., 1997; YAMAMOTO, Y. et al., 2009).

Em modelos de lesão crânioencefálico, a edaravona apresentou um interessante papel neuroprotetor, reduzindo a expressão da enzima caspase-3, diminuição nos níveis de sintase do óxido nítrico induzida (iNOS, do inglês *induced nitric oxide sintase*), dialdeído malônico (MDA, do inglês *malondialdehyde*), NO, proteína precursora amiloide (APP, do inglês *amyloid protein precursor*) além de diminuir a expressão das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Interessantemente, o tratamento com edaravona proporcionou uma maior preservação nos níveis de SOD, bem como uma maior expressão nos níveis do fator trófico IL-10 (OHTA et al., 2013; WANG, G. H. et al., 2011).

Observou-se em estudo *in vitro* que a micróglia ativada apresentava papel deletério, sintetizando considerável quantidade de NO e ONOO $^-$, modulando desfavoravelmente o seu microambiente e que o tratamento agudo com edaravona diminuiu os efeitos do estresse oxidativo, reduzindo o aparecimento de varicosidades de dendritos e favorecendo a sobrevivência neuronal no microambiente sugerindo assim uma evidente neuroproteção (BANNO et al., 2005). Já a investigação *in vitro* em astrócitos submetidos a quantidades exacerbadas de NO, sugere que a edaravona pode estar envolvida na redução da produção de ROS, através do bloqueio na via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAP, do inglês *mitogen activated protein*), inibindo a via das proteínas: proteína cinase c-jun N-terminal (JNK, do

inglês *c-jun N-terminal protein kinase*), proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK, do inglês *p38 mitogen-activated protein kinase*) e proteína regulada por sinal extracelular (ERK, do inglês *extracellular signal-regulating kinase*)(KAWASAKI et al., 2007). Estudos feitos em cultura de astrócitos humanos submetidos à hipóxia, sugere que a edaravona promove uma infraregulação na expressão VEGF e do fator 1 α induzido por hipóxia (HIF-1 α , do inglês *hypoxia-inducible factor-1 α*) (ISHIKAWA et al., 2007).

Apesar do considerável efeito neuroprotetor, um efeito adverso apontado foi que o tratamento com a edaravona após AVENC experimental pode estar envolvido na diminuição da neurogênese na zona subventricular (SVZ, do inglês *subventricular zone*), onde também demonstrou-se uma diminuição nos níveis da produção de ROS e na expressão de HIF-1 α e VEGF (ZHANG, P. et al., 2012).

Watanabe e colaboradores investigando a capacidade antioxidante da edaravona propuseram um mecanismo químico pelo qual provavelmente a edaravona reagiria com diversas espécies de ROS envolvidas na fisiopatologia do AVENC (Figura 8) (WATANABE et al., 2004).

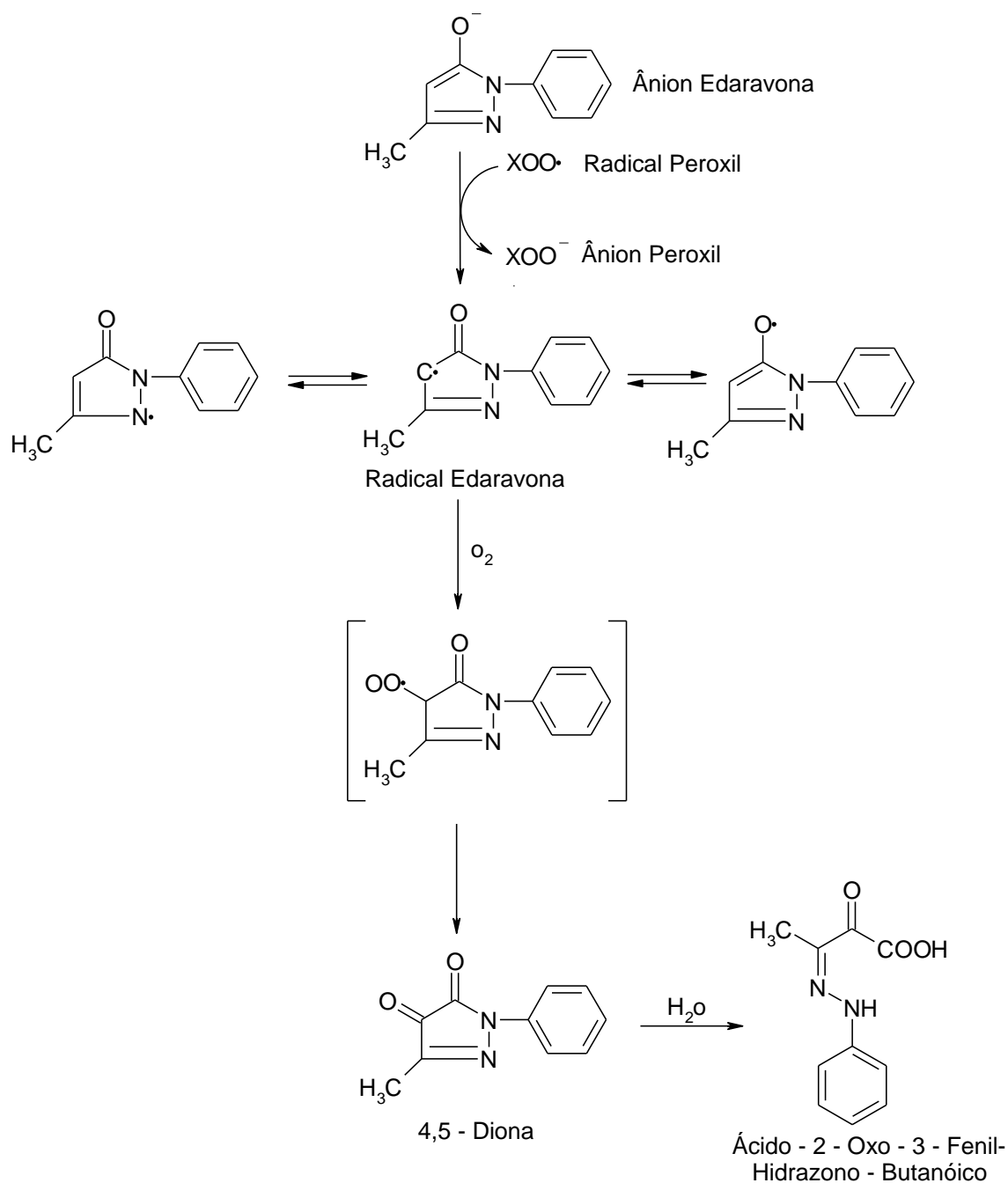


Figura 8: Mecanismo hipotético de reação da Edaravona. Adaptado (WATANABE et al., 2004).

1.4 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

Como visto anteriormente, o AVENC é uma patologia complexa que envolve múltiplos processos que estão interrelacionados entre si (DOYLE et al., 2008). Nesse contexto a resposta inflamatória aguda é um componente da fisiopatologia do AVENC de fundamental importância. Dentre os componentes

da resposta inflamatória aguda no SNC a célula microglial desempenha um papel de destaque na inflamação exercendo um papel deletério com consequente exacerbação da lesão isquêmica (BLOCK et al., 2007; YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999).

Inúmeras evidências têm relatado a ação neuroprotetora da Eदारavona em desordens neurais agudas (JIAO et al., 2011; KIKUCHI et al., 2009; KUBO et al., 2009), entretanto, ainda não foi investigado o papel da edaravona correlacionando o seu efeito neuroprotetor córtex sensório-motor primário acometido por isquemia focal experimental.

No presente estudo, investigou-se a hipótese de que a modulação do ambiente inflamatório com edaravona induz proteção tecidual, com a redução da ativação microglial e a preservação neuronal.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Estabelecer os padrões temporais de resposta inflamatória aguda em M1 de ratos wistar machos adultos submetidos à isquemia focal provocada por microinjeções do peptídeo vasoconstritor Endotelina-1 (ET-1), avaliando o efeito neuroprotetor do tratamento com edaravona.

1.5.2 Objetivos Específicos

- a. Qualificar e quantificar a evolução da área de lesão primária no centro isquêmico com os tempos de sobrevivência de 1 dia e 7 dias pós-lesão;
- b. Quantificar a taxa de neutrófilos para os tempos de sobrevivência de 1 dia e 7 dias pós-lesão;
- c. Quantificar a taxa de células microgliais/macrófagos ativos para os tempos de sobrevivência de 1 dia e 7 dias pós-lesão;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 20 ratos Wistar machos com 6-8 semanas, pesando 250-300 gramas. Estes animais foram obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas em temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}$ C) com acesso a água e comida a vontade.

Para investigação da hipótese experimental, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais de acordo com a tabela abaixo.

Grupos Experimentais	Grupo Controle (Água Destilada)	Grupo Tratamento (Edaravona 3mg/kg)	Total
Sobrevida 1 dia	5 Animais	5 Animais	10 Animais
Sobrevida 7 dias	5 Animais	5 Animais	10 Animais
Total			20 Animais

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais.

2.2 MODELO DE ISQUEMIA FOCAL

A isquemia focal foi induzida através da administração do peptídeo vasoconstritor ET-1 (Sigma Brasil) na região do córtex sensório-motor. O modelo experimental utilizando ET-1 foi demonstrado por Fuxe e colaboradores (FUXE et al., 1989; FUXE et al., 1997) e aplicado com sucesso em 2003 por Hughes e colaboradores (HUGHES et al., 2003). O referido método possui vantagens técnicas em relação aos métodos tradicionais que utilizam aparato cirúrgico complexo (HOSSMANN, 2008).

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato e Xilazina (9mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (72mg/kg). A indução isquêmica experimental por ET-1 tem menor complexidade e consiste em fazer uma pequena abertura no crânio do animal utilizando uma broca de alta rotação. A dura-máter é então removida do campo cirúrgico para visualização da área correspondente ao córtex sensório-motor. Segue-se a isso o posicionamento de uma micropipeta de vidro com ponta de 10-20 μ m e graduação de 1 μ L (Sigma, Brasil) de acordo com as estereotaxias de Castro-Alamancos (CASTRO-ALAMANCOS e BORREL, 1995) e Fonoff (FONOFF et al., 2009), para o córtex sensório-motor primário (-3,0 médio-lateral; +0,5; +0,5; +1,0 ântero-posterior e -

0,3 dorso-ventral). No presente trabalho foi injetado 1 μ L de ET-1 a 40pM. A área de lesão foi visualizada macroscopicamente pela impregnação com o corante azul de colanil, coinjectado com o peptídeo ET-1. Após administração, a micropipeta foi mantida no local por cinco minutos para evitar o refluxo da solução injetada. Após a cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida *ad libitum*. Todas as manipulações com os animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA), sob o parecer nº190-14 (ANEXO I).

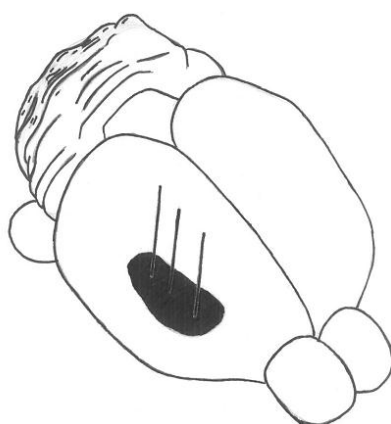


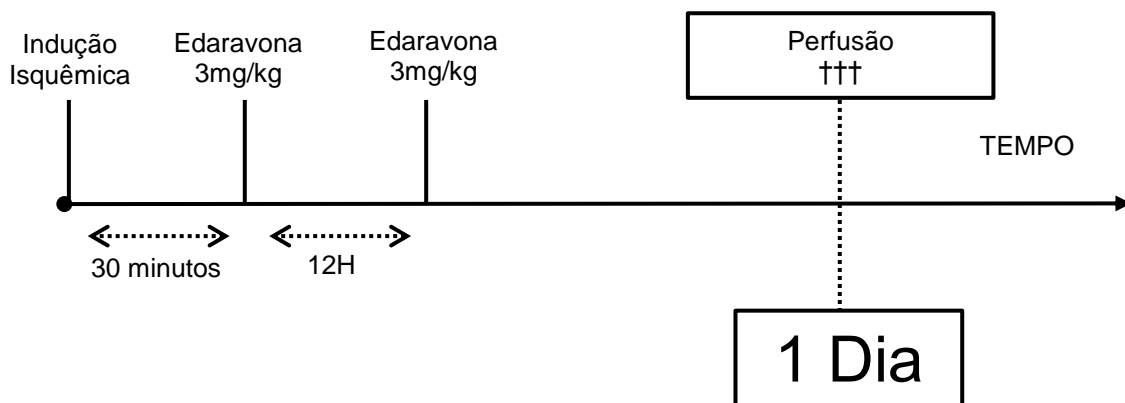
Figura 9: Representação esquemática da lesão experimental no córtex sensório-motor primário.

2.3 ADMINISTRAÇÃO DO FÁRMACO

A Edaravona (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona) é uma pirazolona cujo mecanismo de ação compreende o sequestro de radicais livres, sejam estes derivados do oxigênio bem como derivados do nitrogênio (WANG, L. F. e ZHANG, 2003).

O efeito neuroprotetor da Edaravona será investigado na dose de 3mg/kg de acordo com o esquema abaixo, adaptado de trabalhos previamente publicados (KUBO et al., 2009; YAMAMOTO, Y. et al., 2009).

Animais com sobrevida de 1 dia



Animais com sobrevida de 7 dias

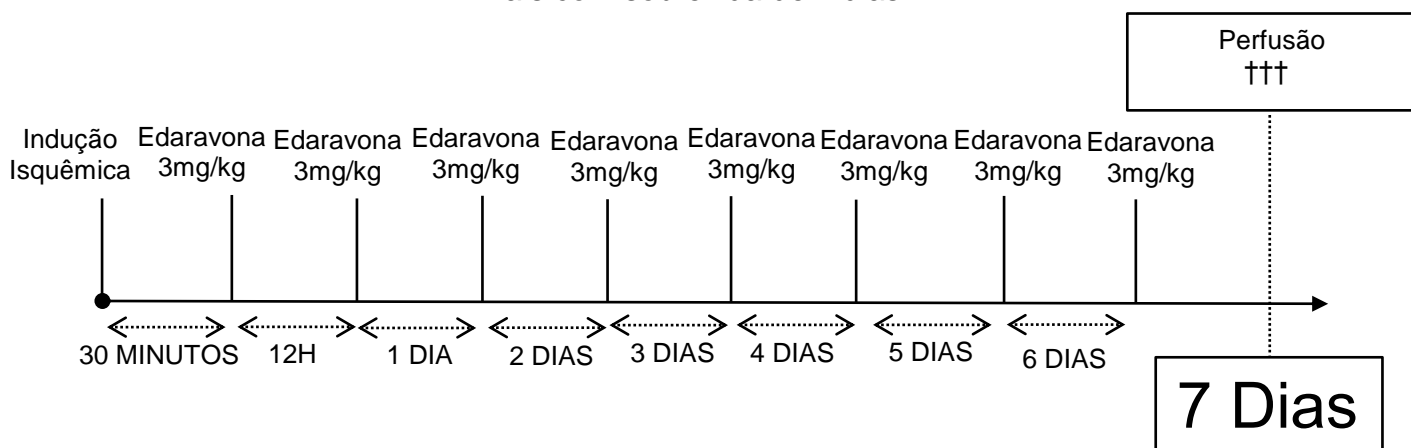


Figura 10: Diagrama esquemático do delineamento terapêutico com Eदारavona para os tempos de sobrevida 1 e 7 dias respectivamente. Os animais do Grupo Controle adotaram o mesmo delineamento terapêutico, entretanto foi utilizada água destilada ao invés de Eदारavona.

2.4 PERFUSÃO E MICROTOMIA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato e Xilazina (9mg/kg) e Cloridrato de Cetamina (72mg/kg). Após a total abolição dos reflexos corneanos e de retirada de pata, foi realizada toracotomia para a visualização do coração. A artéria aorta descendente foi obliterada e uma cânula inserida no ventrículo esquerdo. Uma incisão foi feita no átrio direito para a eliminação completa do sangue do animal. Os animais foram perfundidos com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida por paraformaldeído a 4%. Os encéfalos foram dissecados e pós-fixados por 24 horas em paraformaldeído a 4%. Após a fixação os encéfalos foram

crioprotectados em concentrações crescentes em sacarose com glicerina. Os encéfalos foram cortados em vibrátomo (Microm®, modelo HM 650V) em secções coronais com espessura de 30µm. Posteriormente as secções foram congeladas para processamento histológico adequado.

2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

2.5.1 Visualização da Área de Lesão

Para a visualização da área de lesão, foi utilizada a técnica da coloração de violeta de cresila. A zona de injeção de ET-1 foi visualizada pela presença do corante azul de colanil ou pela presença de palor tecidual característico do processo isquêmico.

2.5.2 Estudos Imunohistoquímicos

Os estudos imunohistoquímicos, foram realizados utilizando os seguintes anticorpos:

Anti-MBS-1 (1:1000). Este anticorpo reconhece epítomos presentes em populações de neutrófilos. Este anticorpo foi desenvolvido por *Martine Bernardes Silva* do *CNS inflammation Group* da Universidade de Southampton.

Anti-ED1 (1:500, Serotec®). Este anticorpo reconhece um epítomo na membrana lisossomal da micróglia/macrófagos ativadas (DIJKSTRA et al., 1985).

A tabela 2 resume os anticorpos utilizados neste estudo:

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Finalidade
Anti-MBS-1	CSN Inflammation Group – Universidade de Southampton	1:1000	Marcação de neutrófilos
Anti-ED-1	Serotec	1:500	Marcação de macrófagos/micróglia ativadas

Tabela 2: Anticorpos utilizados nos estudos imunohistoquímicos.

2.6 ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções produzidas pelos diferentes métodos histológicos foram analisadas em microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E 200). Imagens com campos representativos, obtidas de secções dos animais submetidos à indução isquêmica com ET-1, tanto de animais tratados como animais controle foram obtidas com o uso de uma câmera digital acoplada (MOTICAN 2500) ao fotomicroscópio (NIKON 50i).

2.7 ANÁLISE QUANTITATIVA

2.7.1 Análise da área de lesão

O cálculo da área de lesão primária foi feito a partir de fotomicrografias de secções coradas pela coloração de violeta de cresila, dos diferentes grupos experimentais. Os valores foram calculados em milímetros quadrados (mm^2) a partir de imagens feitas de diferentes secções utilizando o programa Image J (NIH), (N= 3 secções/animal/tempo de sobrevivência/5animais).

2.7.2 Análise dos Padrões Histopatológicos

O número de neutrófilos (células MBS-1⁺) e de micróglia/macrófagos ativados (células ED1⁺), foram contados com o uso de uma gradícula de contagem de $0,0625 \text{ mm}^2$ acoplada à ocular de um microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E200) em objetiva de 40X. As contagens foram realizadas em três campos: um campo no epicentro da lesão, um campo à esquerda do epicentro e outro localizado à direita do epicentro de lesão.

2.7.3 Análise Estatística

As contagens foram obtidas e plotadas como média, em função do tempo em coordenadas cartesianas (\pm erro padrão). Para avaliar as diferenças entre os grupos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para um critério com correção a *posteriori* de Tukey. O nível de significância foi de $p < 0,05$ ou $p < 0,01$. Utilizou-se os softwares BioEstat 5.0[®] e Microsoft Excel 2010[®].

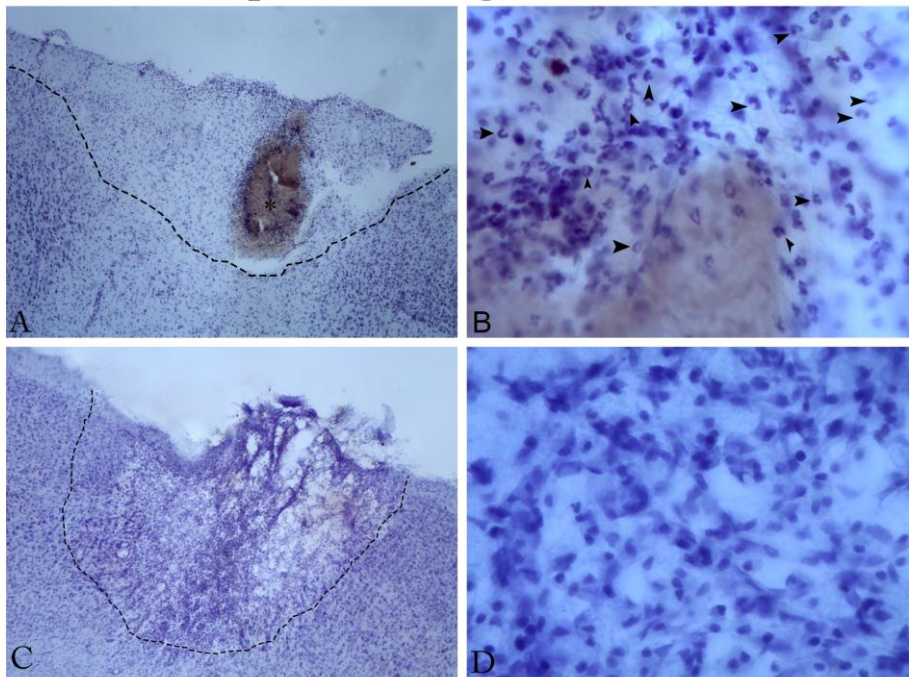
3. RESULTADOS

3.1 ÁREA DE LESÃO

A administração de 40pM de ET-1 no córtex sensório-motor primário de ratos Wistar adultos machos foi visualizada em secções coronais de 30µm de espessura, evidenciada pela coloração com violeta de cresila nos grupos experimentais com tempos de sobrevivência 1 e 7 dias. A área de lesão foi caracterizada pelo palor tecidual, morte celular no centro de lesão e penumbra isquêmica, além da presença de infiltrado inflamatório (Figura 11).

Foi evidenciada uma maior área de lesão nos animais do grupo controle tratados com água destilada (Figura 11A e 11C) em comparação aos animais submetidos ao tratamento com 3mg/kg de Edaravona (Figura 11E e 11H). A média das áreas de lesão dos animais do grupo controle nos tempos de sobrevivência 1 e 7 dias foram 264,5mm² e 230,3mm² respectivamente. Animais tratados com edaravona nos tempos de sobrevivência 1 e 7 dias obtiveram uma redução na área de lesão para os valores 136,2mm² e 78,6mm² respectivamente, isso representou uma redução na área de infarto de 49% em 24h e de 66% sete dias após a lesão, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 12).

Isquemia + Água Destilada



Isquemia + Eदारavona

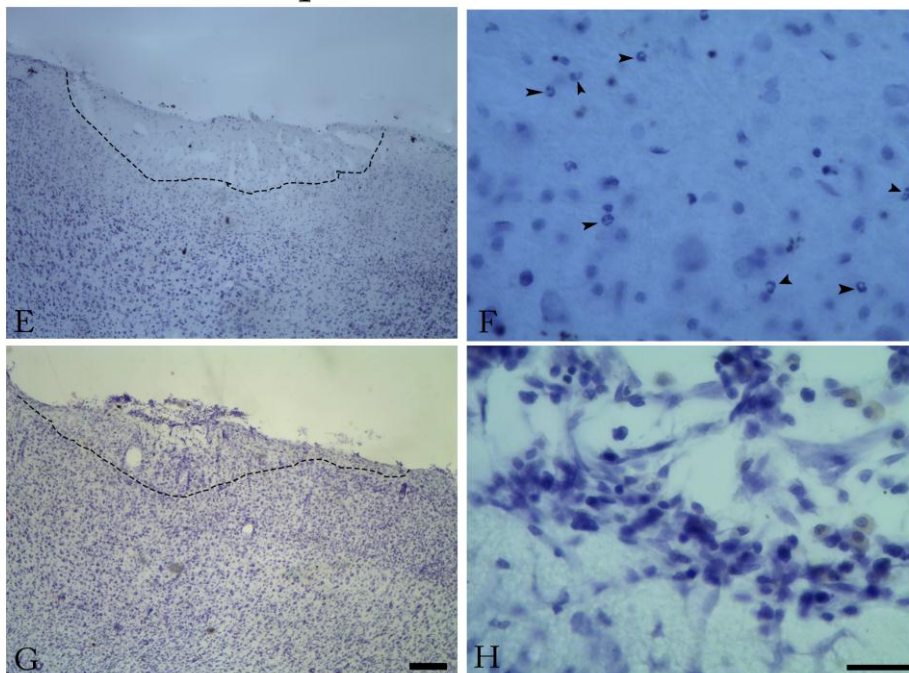


Figura 11: Animais submetidos à isquemia focal e tratados apenas com água destilada, após 24h já apresentam lesão tecidual característica com área de lesão de $\pm 264,5 \text{ mm}^2$ (A) além de sofrer vigorosa infiltração de células com características morfológicas de neutrófilos (B). Os animais do grupo controle de 7 dias de sobrevivência apresentaram uma área de lesão com $\pm 230 \text{ mm}^2$ (C) acompanhada de uma infiltração massiva de células com morfologia de macrófagos mononucleares (D). Animais tratados com edaravona, já em 24 horas tiveram diminuição na área de infarto para $\pm 136,2 \text{ mm}^2$ (E) e redução na infiltração de células com morfologia de neutrófilos (F). Os animais tratados com tempo de sobrevivência de 7 dias apresentam considerável neuroproteção, apresentando uma área de lesão de $\pm 78,6 \text{ mm}^2$ (G) além de ter uma redução na presença de células com morfologia de macrófagos mononucleares (H). *: Centro de lesão. ►: Neutrófilos. A, C, E e G escala de $150 \mu\text{m}$. B, D, F e H: escala de $50 \mu\text{m}$.

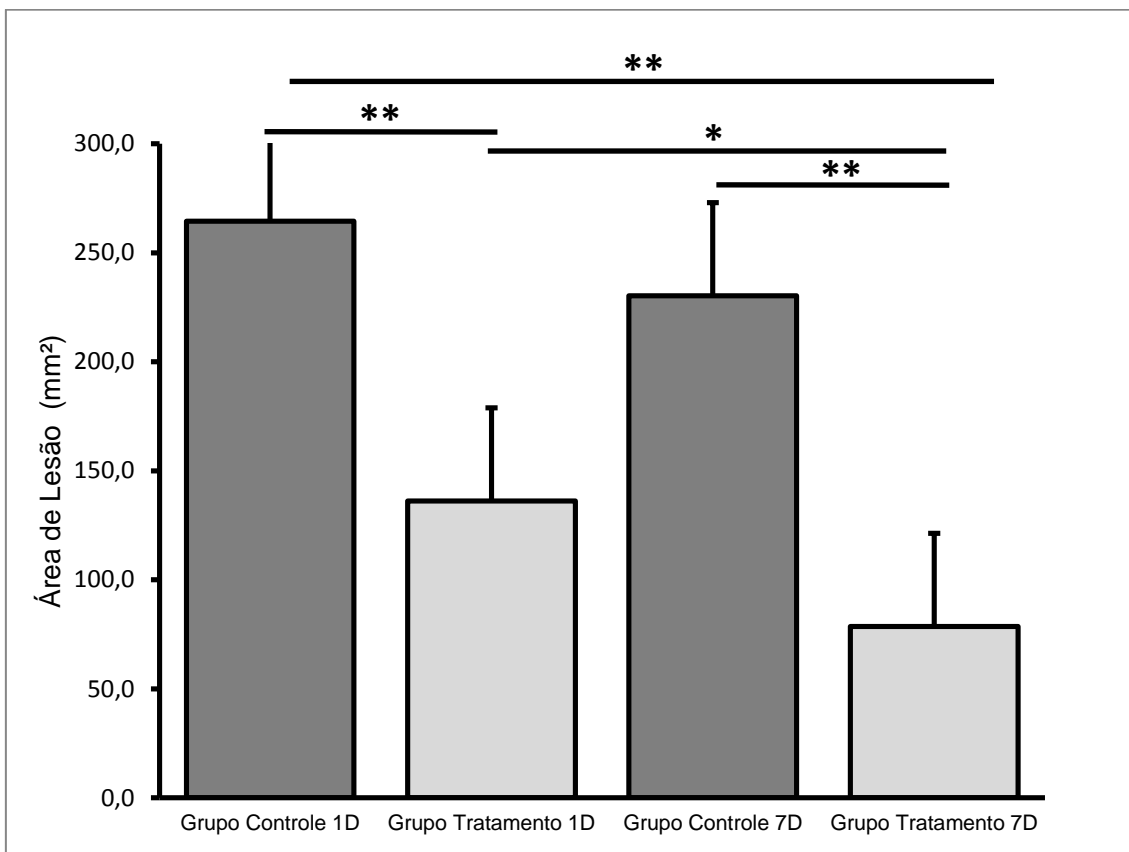


Figura 12: O tratamento com Edaravona reduz a área de lesão de animais submetidos à isquemia focal experimental no córtex sensório motor primário tanto 24h quanto sete dias pós-lesão. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – ANOVA - Tukey).

3.2 INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Verificou-se a maciça presença de neutrófilos no córtex sensório motor primário já em 24h após o início da lesão isquêmica em animais do grupo controle (Figura 13A e 13B), já em animais em animais do grupo tratamento para o mesmo tempo de sobrevivência (Figura 13E e 13F), houve uma redução significativa na presença de neutrófilos infiltrantes. A média de células MBS-1⁺ em animais do grupo controle em 24h foi $\pm 68,60$ células/campo, já a média do grupo tratamento para o mesmo tempo de sobrevivência foi ± 30 células/campo (Figura 14). Os animais com tempo de sobrevivência de sete dias apresentaram poucos neutrófilos, seja no grupo controle (Figura 13C e 13D) com média de $\pm 9,26$ células/campo (Figura 14) quanto no grupo tratamento Figura (13G e 13H) cuja média foi $\pm 9,78$ células/campo (Figura 14).

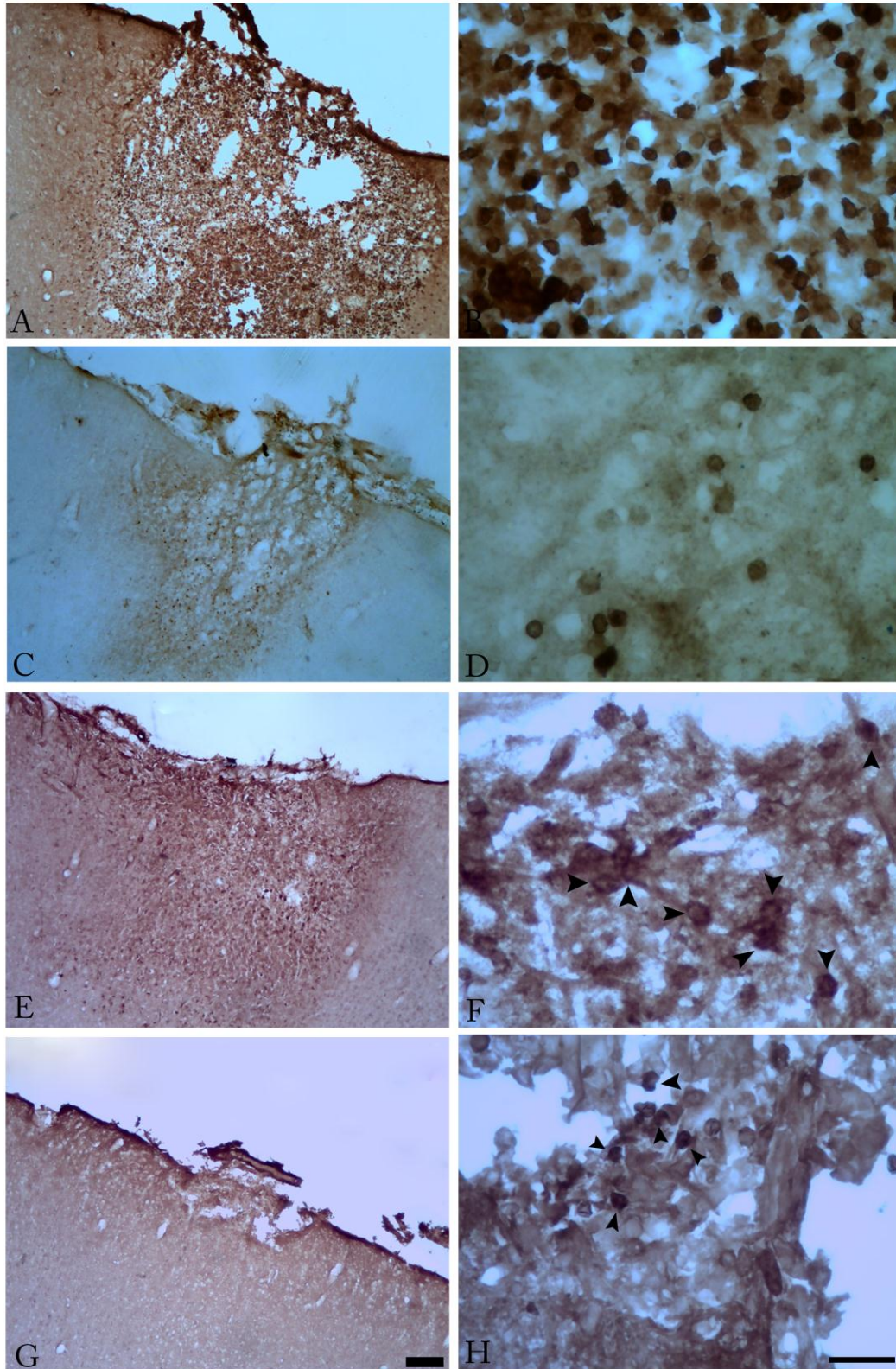


Figura 13: Animais do grupo controle submetidos à isquemia focal apresentam vigorosa infiltração de neutrófilos 24h após o início da lesão isquêmica (A e B). Após 7 dias, os animais do grupo controle apresentam uma menor quantidade de neutrófilos (C e D). O tratamento agudo com edaravona reduziu a presença das células MBS-1⁺ em 24h (E e F). Os animais tratados durante seis dias consecutivos também apresentaram redução na presença dessas células.

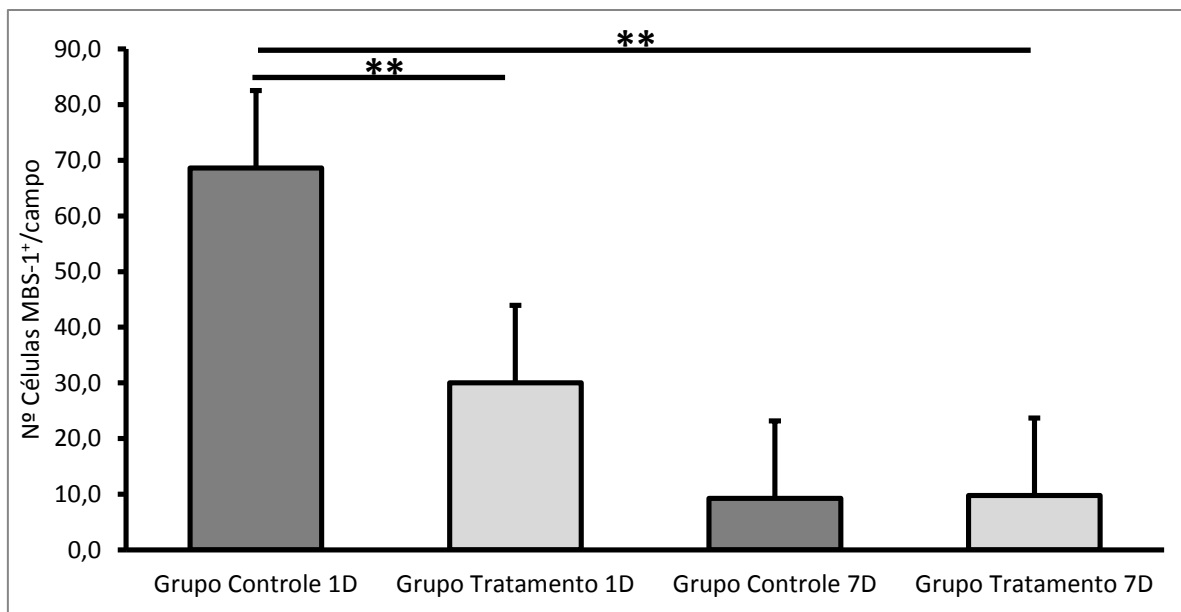


Figura 14: O tratamento com edaravona foi eficaz em reduzir a presença de neutrófilos 24h após o início da lesão isquêmica nos animais do grupo tratamento, entretanto, foi ineficaz em reduzir a infiltração dessas células nos animais do grupo tratamento sete dias após o início da lesão.

3.3 ATIVAÇÃO MICROGLIAL

A avaliação da célula microglial na fisiopatologia isquêmica foi realizada com o uso do marcador denominado ED1, o qual reconhece um epítipo específico na membrana do lisossomo de macrófagos/micróglia ativadas. Os animais do grupo controle tiveram uma maior presença de macrófagos/micróglia ativados no sítio de lesão (Figura 15A, 15B, 15C e 15D) em comparação aos animais do grupo tratamento (Figura 15E, 15F, 15G e 15H). A média das contagens do grupo controle para os tempos de sobrevivência 1e 7 dias foram $\pm 12,69$ células/campo e $\pm 46,19$ células/campo respectivamente (Figura 16). Os animais do grupo tratamento obtiveram médias de $\pm 8,22$ células/campo e $\pm 26,86$ células/campo para os tempos de sobrevivência 1e 7 dias respectivamente (Figura 16).

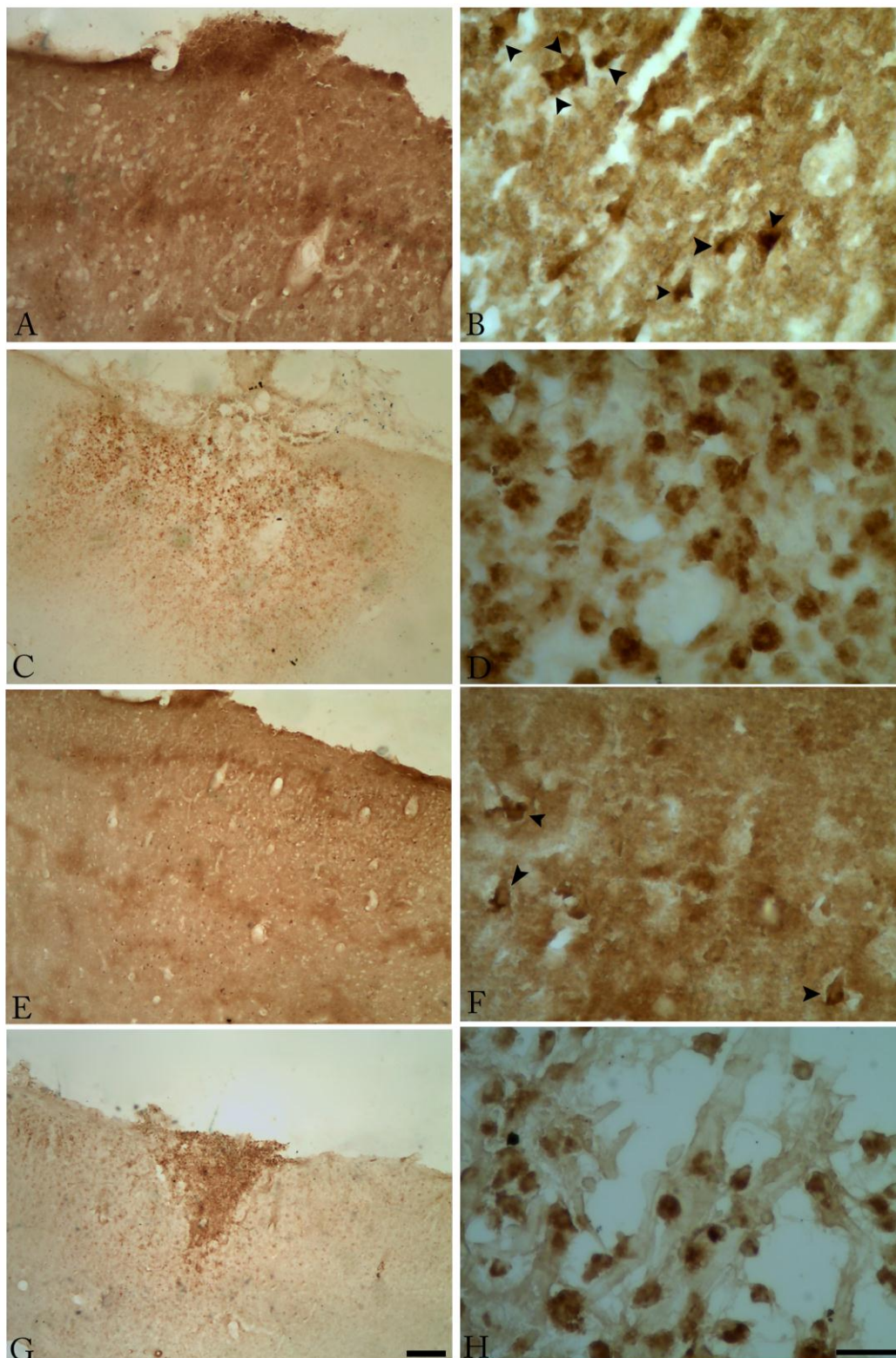


Figura 15: A edaravona diminui a presença de células ED1⁺ em animais submetidos à isquemia focal no córtex sensório-motor primário. Animais do grupo controle 24h após o início da isquemia já apresentam células microglicais ativadas (A e B). Animais do grupo controle sete dias após o início da lesão apresentam uma quantidade ainda maior células ED1⁺ (C e D). Animais tratados com edaravona têm uma redução na presença dessas células ativas no sítio de lesão, tanto em 24h (E e F) como em 7 dias (G e H) após o início da lesão. ►: Microglia ativada. A,C,E e G escala de 150 μm. B,D,F e H: escala de 50μm.

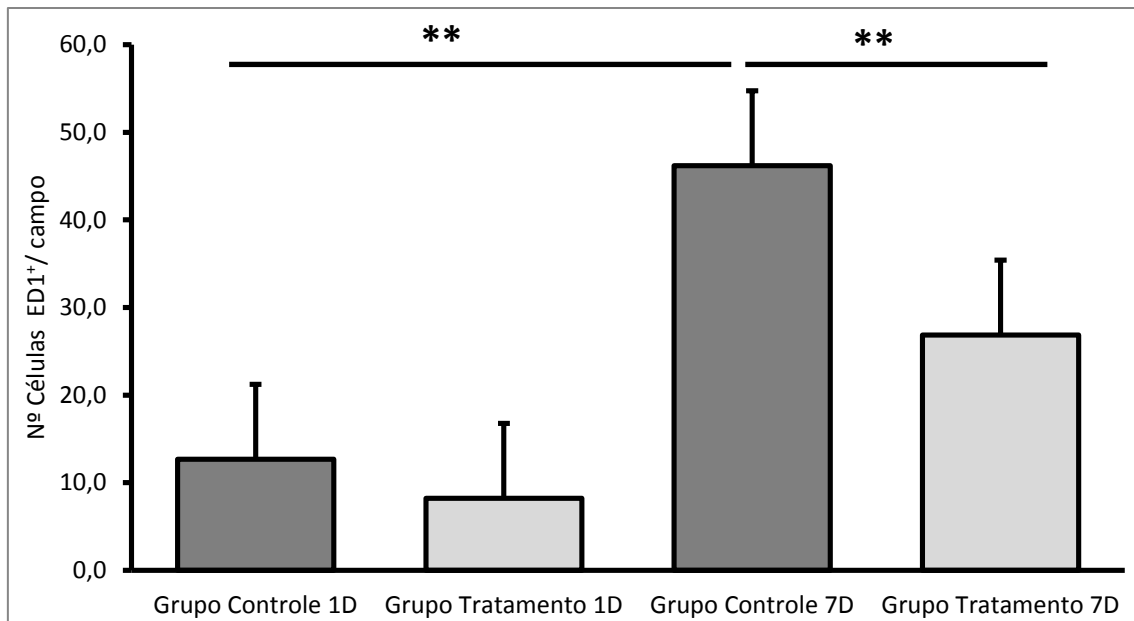


Figura 16: O tratamento com edaravona foi eficaz em reduzir a quantidade de células ED1⁺ no córtex sensorio motor primário no grupo tratamento 7 dias após o início da lesão. (** $p < 0,01$ – ANOVA - Tukey).

4. DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

No presente estudo induzimos isquemia no córtex sensório-motor primário com microinjeções de ET-1. O presente modelo utilizou 1µL de ET-1 a 40pM, sendo eficaz em induzir uma lesão caracterizada por inflamação aguda, perda de pericários neuronais e morte celular. Estes achados estão de acordo com estudos previamente publicados (DOS SANTOS et al., 2007; HUGHES et al., 2003). Os estudos utilizando ET-1 no SNC foram pioneiramente descritos por Fuxe e colaboradores (FUXE et al., 1989), onde foi evidenciado produção de lesão bem como os sítios de ligação da ET-1 no parênquima neural. A administração central desse peptídeo vasoconstritor reduz o fluxo sanguíneo local em torno de 60% (HUGHES et al., 2003).

O modelo experimental utilizando uma micropipeta de vidro foi descrito com sucesso por Hughes e colaboradores (HUGHES et al., 2003) e reproduzido em trabalhos do nosso grupo (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008).

4.2 O TRATAMENTO COM EDARAVONA PROMOVE NEUROPROTEÇÃO DO CÓRTEX SENSÓRIOMOTOR PRIMÁRIO

O presente estudo avaliou o possível efeito neuroprotetor da edaravona em modelo experimental de isquemia focal. Os resultados sugerem que a edaravona apresenta um efeito neuroprotetor do córtex sensório-motor a partir de 24h, estendendo-se até sete dias após o início do processo isquêmico pelo modelo proposto. Os resultados apresentados estão de acordo com trabalhos previamente publicados, onde se demonstrou que o tratamento agudo com 3mg/kg de edaravona confere conspícua neuroproteção (AMEMIYA et al., 2005; KAWAI et al., 1997; XIAO et al., 2007; ZHANG, P. et al., 2012), entretanto, poucos trabalhos investigaram a capacidade neuroprotetora do fármaco em um tratamento subagudo (YAMAMOTO, Y. et al., 2009).

Na presente investigação, os resultados sugerem que o tratamento sistemático durante seis dias consecutivos com edaravona, confere uma maior proteção tecidual em relação ao esquema de tratamento frequentemente

empregado, onde se utiliza apenas duas administrações do fármaco (AMEMIYA et al., 2005; NOOR et al., 2005).

4.3 A EDARAVONA REDUZ A INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS NA ÁREA DE LESÃO

De acordo com o presente paradigma experimental, foi evidenciada a presença vigorosa de neutrófilos na área de lesão nos animais de experimentação do grupo controle 24 horas após o início da lesão. Os animais submetidos ao tratamento com 3mg/kg de edaravona, tiveram uma menor presença desses neutrófilos auxiliando na redução da área de lesão. Estes achados histopatológicos estão de acordo com trabalhos prévios que fizeram o relato da infiltração dessas células no parênquima isquêmico na mesma janela temporal (DEL ZOPPO et al., 1991; GARCIA et al., 1994; HALLENBECK et al., 1986). Sabe-se ainda que o processo isquêmico modula o microambiente acometido, favorecendo a expressão de moléculas de adesão em vasos endoteliais no encéfalo (HESS et al., 1994), onde estas células acumulam-se na luz do endotélio, dificultando a reperfusão local e contribuindo com a exacerbação da isquemia (MORI et al., 1992), propondo uma importante participação das células endoteliais na infiltração de neutrófilos no parênquima lesionado. Somando-se a essas evidências, foi observado que inibição da aderência de neutrófilos no endotélio do vaso sanguíneo bem como a depleção experimental de neutrófilos apresenta um papel neuroprotetor em animais submetidos à MCAO (MATSUO, 1994; MORI et al., 1992).

Wen e colaboradores demonstraram experimentalmente que a edaravona está envolvida na infraregulação da via envolvida no processo inflamatório JNK-c-Jun (WEN et al., 2006). Os resultados sugerem que a edaravona possa estar atuando na regulação de vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório culminando com a redução na infiltração de neutrófilos.

4.4 A ATIVAÇÃO MICROGLIAL É REDUZIDA COM O TRATAMENTO COM EDARAVONA

O tratamento consecutivo por seis dias com 3mg/kg de edaravona propiciou conspícua neuroproteção acompanhado de redução na ativação de células microgliais no sítio de lesão.

Nesse contexto, há de se considerar a chamada Face de Janus microglial, onde esta célula glial apresenta um comportamento fisiopatológico aparentemente dual. Nesse sentido, importantes estudos apontam a importância da célula microglial na exacerbação do processo isquêmico (YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999), entretanto, outros estudos apresentam resultados diametralmente opostos, sugerindo para um papel benéfico da micróglia (LALANCETTE-HEBERT et al., 2007; NEUMANN, J. et al., 2006; NEUMANN, J. et al., 2008).

Recentemente, um número crescente de evidências experimentais leva a ser considerada a coexistência de subpopulações microgliais do tipo M1 e M2 em nichos anatômicos discretos, onde essas subpopulações responderiam de maneira diferenciada aos fatores liberados nesses nichos anatômicos (GOMES-LEAL, 2012). Estudos experimentais sugerem que essas diferentes subpopulações são ativadas em diferentes momentos no progresso da fisiopatologia do processo isquêmico, onde a micróglia atingiria um platô máximo de ativação em torno de sete dias, sendo o fenótipo M2 primeiramente ativado, exibindo um perfil antiinflamatório, e posteriormente, em um tempo mais tardio o fenótipo M1 com um perfil próinflamatório também seria ativado (GIRARD et al., 2013; HU et al., 2012).

De acordo com nossos resultados, é possível sugerir que a edaravona poderia estar modulando de forma diferenciada a ativação dos fenótipos M1 e M2 das células microgliais nas diferentes janelas temporais.

5. CONCLUSÃO

- A Endotelina-1 na concentração de 40pM é capaz de promover isquemia focal do córtex sensório motor primário em ratos adultos.
- A infiltração de neutrófilos na área de lesão e ativação microglial exacerbam o processo isquêmico.
- O tratamento com 3mg/kg de edaravona durante seis dias consecutivos foi eficaz produzir neuroproteção.
- São necessários mais estudos para elucidar de que maneira a edaravona age na diminuição da infiltração de neutrófilos e redução da ativação microglial.
- O esquema de tratamento proposto na presente investigação configura-se como uma alternativa terapêutica promissora para o futuro uso clínico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M. e GRAHAM, S. H. Inflammation After Stroke: Mechanisms and Therapeutic Approaches. **Transl Stroke Res**, v. 1, n. 2, p. 74-84, 2010.
- AMEMIYA, S.; KAMIYA, T.; NITO, C.; INABA, T.; KATO, K.; UEDA, M.; SHIMAZAKI, K. e KATAYAMA, Y. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of edaravone following transient focal ischemia in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 516, n. 2, p. 125-130, 2005.
- ANTONY, J. M.; PAQUIN, A.; NUTT, S. L.; KAPLAN, D. R. e MILLER, F. D. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 3, p. 286-298, 2013.
- APPELROS, P.; STEGMAYR, B. e TERENT, A. Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. **Stroke**, v. 40, n. 4, p. 1082-1090, 2009.
- BANNO, M.; MIZUNO, T.; KATO, H.; ZHANG, G.; KAWANOKUCHI, J.; WANG, J.; KUNO, R.; JIN, S.; TAKEUCHI, H. e SUZUMURA, A. The radical scavenger edaravone prevents oxidative neurotoxicity induced by peroxynitrite and activated microglia. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 2, p. 283-290, 2005.
- BARDEHLE, S.; KRUGER, M.; BUGGENTHIN, F.; SCHWAUSCH, J.; NINKOVIC, J.; CLEVERS, H.; SNIPPERT, H. J.; THEIS, F. J.; MEYER-LUEHMANN, M.; BECHMANN, I.; DIMOU, L. e GOTZ, M. Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. **Nat Neurosci**, v. n. p. 2013.
- BENTUR, Y. e COHEN, O. Dipyrrone overdose. **J Toxicol Clin Toxicol**, v. 42, n. 3, p. 261-265, 2004.
- BLOCK, M. L.; ZECCA, L. e HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.
- BONITA, R. e BEAGLEHOLE, R. Stroke prevention in poor countries: time for action. **Stroke**, v. 38, n. 11, p. 2871-2872, 2007.
- BUFFO, A.; ROLANDO, C. e CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 77-89, 2010.
- BUFFO, A.; RITE, I.; TRIPATHI, P.; LEPIER, A.; COLAK, D.; HORN, A. P.; MORI, T. e GOTZ, M. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 9, p. 3581-3586, 2008.

BURGUILLOS, M. A.; DEIERBORG, T.; KAVANAGH, E.; PERSSON, A.; HAJJI, N.; GARCIA-QUINTANILLA, A.; CANO, J.; BRUNDIN, P.; ENGLUND, E.; VENERO, J. L. e JOSEPH, B. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. **Nature**, v. 472, n. 7343, p. 319-324, 2011.

CAPPUCCIO, F. P. e JI, C. Less salt and less risk of stroke: further support to action. **Stroke**, v. 43, n. 5, p. 1195-1196, 2012.

CASTRO-ALAMANCOS, M. A. e BORREL, J. Functional recovery of forelimb response capacity after forelimb primary motor cortex damage in the rat is due to the reorganization of adjacent areas of cortex. **Neuroscience**, v. 68, n. 3, p. 793-805, 1995.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L. e GAN, W. B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-758, 2005.

DE CARVALHO, J. J.; ALVES, M. B.; VIANA, G. A.; MACHADO, C. B.; DOS SANTOS, B. F.; KANAMURA, A. H.; LOTTENBERG, C. L.; NETO, M. C. e SILVA, G. S. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. **Stroke**, v. 42, n. 12, p. 3341-3346, 2011.

DEL RIO-ORTEGA, P. The microglia. **The Lancet**, v. 233, n. 6036, p. 1023-1026, 1939.

DEL ZOPPO, G. J.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W.; MORI, E.; COPELAND, B. R. e CHANG, C. M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. **Stroke**, v. 22, n. 10, p. 1276-1283, 1991.

DIJKSTRA, C. D.; VAN VLIET, E.; DOPP, E. A.; VAN DER LELIJ, A. A. e KRAAL, G. Marginal zone macrophages identified by a monoclonal antibody: characterization of immuno- and enzyme-histochemical properties and functional capacities. **Immunology**, v. 55, n. 1, p. 23-30, 1985.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C. e MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 9, p. 391-397, 1999.

DOBKIN, B. H. Clinical practice. Rehabilitation after stroke. **N Engl J Med**, v. 352, n. 16, p. 1677-1684, 2005.

DOS SANTOS, C. D.; PICANCO-DINIZ, C. W. e GOMES-LEAL, W. Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain Res**, v. 1172, n. p. 130-144, 2007.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P. e STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, 2008.

DURUKAN, A. e TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 87, n. 1, p. 179-197, 2007.

ENDRES, M.; DIRNAGL, U. e MOSKOWITZ, M. A. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury. **Handb Clin Neurol**, v. 92, n. p. 31-41, 2009.

ENGSTROM, G.; JERNTORP, I.; PESSAH-RASMUSSEN, H.; HEDBLAD, B.; BERGLUND, G. e JANZON, L. Geographic distribution of stroke incidence within an urban population: relations to socioeconomic circumstances and prevalence of cardiovascular risk factors. **Stroke**, v. 32, n. 5, p. 1098-1103, 2001.

FAGAN, S. C.; CRONIC, L. E. e HESS, D. C. Minocycline Development for Acute Ischemic Stroke. **Transl Stroke Res**, v. 2, n. 2, p. 202-208, 2011.

FAGAN, S. C.; WALLER, J. L.; NICHOLS, F. T.; EDWARDS, D. J.; PETTIGREW, L. C.; CLARK, W. M.; HALL, C. E.; SWITZER, J. A.; ERGUL, A. e HESS, D. C. Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. **Stroke**, v. 41, n. 10, p. 2283-2287, 2010.

FAUSTINO, J. V.; WANG, X.; JOHNSON, C. E.; KLIBANOV, A.; DERUGIN, N.; WENDLAND, M. F. e VEXLER, Z. S. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. **J Neurosci**, v. 31, n. 36, p. 12992-13001, 2011.

FONOFF, E. T.; PEREIRA, J. F., JR.; CAMARGO, L. V.; DALE, C. S.; PAGANO, R. L.; BALLESTER, G. e TEIXEIRA, M. J. Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. **Behav Brain Res**, v. 202, n. 1, p. 138-141, 2009.

FRANKE, H.; GUNTHER, A.; GROSCHE, J.; SCHMIDT, R.; ROSSNER, S.; REINHARDT, R.; FABER-ZUSCHRATTER, H.; SCHNEIDER, D. e ILLES, P. P2X7 receptor expression after ischemia in the cerebral cortex of rats. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 63, n. 7, p. 686-699, 2004.

FUXE, K.; CINTRA, A.; ANDBJER, B.; ANGGARD, E.; GOLDSTEIN, M. e AGNATI, L. F. Centrally administered endothelin-1 produces lesions in the brain of the male rat. **Acta Physiol Scand**, v. 137, n. 1, p. 155-156, 1989.

FUXE, K.; BJELKE, B.; ANDBJER, B.; GRAHN, H.; RIMONDINI, R. e AGNATI, L. F. Endothelin-1 induced lesions of the frontoparietal cortex of the rat. A possible model of focal cortical ischemia. **Neuroreport**, v. 8, n. 11, p. 2623-2629, 1997.

GAO, C.; LI, X.; LI, Y.; WANG, L. e XUE, M. Pharmacokinetic interaction between puerarin and edaravone, and effect of borneol on the brain distribution kinetics of puerarin in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 3, p. 360-367, 2010.

GARCIA, J. H.; LIU, K. F.; YOSHIDA, Y.; LIAN, J.; CHEN, S. e DEL ZOPPO, G. J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). **Am J Pathol**, v. 144, n. 1, p. 188-199, 1994.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, 2008.

GIRARD, S.; BROUGH, D.; LOPEZ-CASTEJON, G.; GILES, J.; ROTHWELL, N. J. e ALLAN, S. M. Microglia and macrophages differentially modulate cell death after brain injury caused by oxygen-glucose deprivation in organotypic brain slices. **Glia**, v. n. p. 2013.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-356, 2012.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J. e PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, 2005.

GREEN, A. R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. **Br J Pharmacol**, v. 153 Suppl 1, n. p. S325-338, 2008.

HALLENBECK, J. M.; DUTKA, A. J.; TANISHIMA, T.; KOCHANNEK, P. M.; KUMAROO, K. K.; THOMPSON, C. B.; OBRENOVITCH, T. P. e CONTRERAS, T. J. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. **Stroke**, v. 17, n. 2, p. 246-253, 1986.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HESS, D. C.; ZHAO, W.; CARROLL, J.; MCEACHIN, M. e BUCHANAN, K. Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. **Stroke**, v. 25, n. 7, p. 1463-1467; discussion 1468, 1994.

HOSSMANN, K. A. Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 257-270, 2008.

HU, X.; LI, P.; GUO, Y.; WANG, H.; LEAK, R. K.; CHEN, S.; GAO, Y. e CHEN, J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063-3070, 2012.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M. e TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surg Neurol**, v. 66, n. 3, p. 232-245, 2006.

HUGHES, P. M.; ANTHONY, D. C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M. S.; RANKINE, E. L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A. K. e PERRY, V. H. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 12, p. 1276-1286, 2003.

IADECOLA, C. e ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 796-808, 2012.

IHRIE, R. A. e ALVAREZ-BUYLLA, A. Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 674-686, 2011.

ISHIKAWA, A.; YOSHIDA, H.; METOKI, N.; TOKI, T.; IMAIZUMI, T.; MATSUMIYA, T.; YAMASHITA, K.; TAIMA, K. e SATOH, K. Edaravone inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in human astrocytes exposed to hypoxia. **Neurosci Res**, v. 59, n. 4, p. 406-412, 2007.

JIAO, L.; ZHANG, J.; LI, Z.; LIU, H.; CHEN, Y. e XU, S. Edaravone alleviates delayed neuronal death and long-dated cognitive dysfunction of hippocampus after transient focal ischemia in Wistar rat brains. **Neuroscience**, v. 182, n. p. 177-183, 2011.

KAWAI, H.; NAKAI, H.; SUGA, M.; YUKI, S.; WATANABE, T. e SAITO, K. I. Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 281, n. 2, p. 921-927, 1997.

KAWASAKI, T.; KITAO, T.; NAKAGAWA, K.; FUJISAKI, H.; TAKEGAWA, Y.; KODA, K.; AGO, Y.; BABA, A. e MATSUDA, T. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. **Glia**, v. 55, n. 13, p. 1325-1333, 2007.

KIKUCHI, K.; TANCHAROEN, S.; MATSUDA, F.; BISWAS, K. K.; ITO, T.; MORIMOTO, Y.; OYAMA, Y.; TAKENOUCI, K.; MIURA, N.; ARIMURA, N.; NAWA, Y.; MENG, X.; SHRESTHA, B.; ARIMURA, S.; IWATA, M.; MERA, K.; SAMESHIMA, H.; OHNO, Y.; MAENOSONO, R.; TAJIMA, Y.; UCHIKADO, H.; KURAMOTO, T.; NAKAYAMA, K.; SHIGEMORI, M.; YOSHIDA, Y.; HASHIGUCHI, T.; MARUYAMA, I. e KAWAHARA, K. Edaravone attenuates cerebral ischemic injury by suppressing aquaporin-4. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 4, p. 1121-1125, 2009.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci**, v. 19, n. 8, p. 312-318, 1996.

KUBO, K.; NAKAO, S.; JOMURA, S.; SAKAMOTO, S.; MIYAMOTO, E.; XU, Y.; TOMIMOTO, H.; INADA, T. e SHINGU, K. Edaravone, a free radical scavenger, mitigates both gray and white matter damages after global cerebral ischemia in rats. **Brain Res**, v. 1279, n. p. 139-146, 2009.

LALANCETTE-HEBERT, M.; GOWING, G.; SIMARD, A.; WENG, Y. C. e KRIZ, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **J Neurosci**, v. 27, n. 10, p. 2596-2605, 2007.

LAMBERTSEN, K. L.; CLAUSEN, B. H.; BABCOCK, A. A.; GREGERSEN, R.; FENGER, C.; NIELSEN, H. H.; HAUGAARD, L. S.; WIRENFELDT, M.; NIELSEN, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; BLUETHMANN, H.; FAERGEMAN, N. J.; MELDGAARD, M.; DEIERBORG, T. e FINSEN, B. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. **J Neurosci**, v. 29, n. 5, p. 1319-1330, 2009.

LAMPL, Y.; BOAZ, M.; GILAD, R.; LORBERBOYM, M.; DABBY, R.; RAPOPORT, A.; ANCA-HERSHKOWITZ, M. e SADEH, M. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. **Neurology**, v. 69, n. 14, p. 1404-1410, 2007.

LEHNARDT, S.; SCHOTT, E.; TRIMBUCH, T.; LAUBISCH, D.; KRUEGER, C.; WULCZYN, G.; NITSCH, R. e WEBER, J. R. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. **J Neurosci**, v. 28, n. 10, p. 2320-2331, 2008.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I. e NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol**, v. 7, n. 9, p. 678-689, 2007.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1431-1568, 1999.

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

LO, E. H.; DALKARA, T. e MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 399-415, 2003.

LOTUFO, P. A.; GOULART, A. C. e BENSENOR, I. M. Race, gender and stroke subtypes mortality in Sao Paulo, Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 3B, p. 752-757, 2007.

LV, M.; LIU, Y.; ZHANG, J.; SUN, L.; LIU, Z.; ZHANG, S.; WANG, B.; SU, D. e SU, Z. Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury. **Neuroscience**, v. 176, n. p. 162-172, 2011.

MARGAILL, I.; PLOTKINE, M. e LEROUET, D. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. **Free Radic Biol Med**, v. 39, n. 4, p. 429-443, 2005.

MATSUO, Y. O., H.; SHIGA, Y.; NAKAMURA, M.; NINOMIYA, M.; KIHARA, T.; KOGURE, K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophils accumulation and ischemic brain injury in the rat. **Stroke**, v. 25, n. p. 1469-1475, 1994.

MCDONALD, B. e KUBES, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. **J Mol Med (Berl)**, v. 89, n. 11, p. 1079-1088, 2011.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U. e MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, 2004.

MITSIOS, N.; GAFFNEY, J.; KUMAR, P.; KRUPINSKI, J.; KUMAR, S. e SLEVIN, M. Pathophysiology of acute ischaemic stroke: an analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets. **Pathobiology**, v. 73, n. 4, p. 159-175, 2006.

MIZUNO, N.; TAKAHASHI, T.; KUSUHARA, H.; SCHUETZ, J. D.; NIWA, T. e SUGIYAMA, Y. Evaluation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) and Multidrug Resistance-Associated Protein 4 (MRP4/ABCC4) in The Urinary Excretion of Sulfate and Glucuronide Metabolites of Edaravone (MCI-186; 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 11, p. 2045-2053, 2007.

MORI, E.; DEL ZOPPO, G. J.; CHAMBERS, J. D.; COPELAND, B. R. e ARFORS, K. E. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. **Stroke**, v. 23, n. 5, p. 712-718, 1992.

MOSHER, K. I.; ANDRES, R. H.; FUKUHARA, T.; BIERI, G.; HASEGAWA-MORIYAMA, M.; HE, Y.; GUZMAN, R. e WYSS-CORAY, T. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. **Nat Neurosci**, v. 15, n. 11, p. 1485-1487, 2012.

NAKANO-OKUDA, Y.; HASEGAWA, K.; HIRAI, K.; KANAI-OCHIAI, R.; MORIMOTO, M. e SUGIMOTO, T. Effects of edaravone on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated cytochrome c release and apoptosis in neonatal rat cerebrocortical slices. **Int J Dev Neurosci**, v. 24, n. 6, p. 349-356, 2006.

NEUMANN, H. e WEKERLE, H. Brain microglia: watchdogs with pedigree. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 253-255, 2013.

NEUMANN, J.; GUNZER, M.; GUTZEIT, H. O.; ULLRICH, O.; REYMANN, K. G. e DINKEL, K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. **Faseb J**, v. 20, n. 6, p. 714-716, 2006.

NEUMANN, J.; SAUERZWEIG, S.; RONICKE, R.; GUNZER, F.; DINKEL, K.; ULLRICH, O.; GUNZER, M. e REYMANN, K. G. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci**, v. 28, n. 23, p. 5965-5975, 2008.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F. e HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-1318, 2005.

NISHINAKA, Y.; MORI, H.; ENDO, N.; MIYOSHI, T.; YAMASHITA, K.; ADACHI, S. e ARAI, T. Edaravone directly reacts with singlet oxygen and protects cells from attack. **Life Sci**, v. 86, n. 21-22, p. 808-813, 2010.

NOOR, J. I.; IKEDA, T.; MISHIMA, K.; AOO, N.; OHTA, S.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. e IKENOUE, T. Short-term administration of a new free radical scavenger, edaravone, is more effective than its long-term administration for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Stroke**, v. 36, n. 11, p. 2468-2474, 2005.

O'DONNELL, M. J.; XAVIER, D.; LIU, L.; ZHANG, H.; CHIN, S. L.; RAO-MELACINI, P.; RANGARAJAN, S.; ISLAM, S.; PAIS, P.; MCQUEEN, M. J.; MONDO, C.;

DAMASCENO, A.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; HANKEY, G. J.; DANS, A. L.; YUSOFF, K.; TRUELSEN, T.; DIENER, H. C.; SACCO, R. L.; RYGLEWICZ, D.; CZLONKOWSKA, A.; WEIMAR, C.; WANG, X. e YUSUF, S. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. **Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 112-123, 2012.

OHTA, M.; HIGASHI, Y.; YAWATA, T.; KITAHARA, M.; NOBUMOTO, A.; ISHIDA, E.; TSUDA, M.; FUJIMOTO, Y. e SHIMIZU, K. Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 1490, n. p. 184-192, 2013.

OLNEY, J. W. Excitotoxicity: an overview. **Can Dis Wkly Rep**, v. 16 Suppl 1E, n. p. 47-57; discussion 57-48, 1990.

OLNEY, J. W.; RHEE, V. e HO, O. L. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. **Brain Res**, v. 77, n. 3, p. 507-512, 1974.

ORELLANA, J. A.; MONTERO, T. D. e VON BERNHARDI, R. Astrocytes inhibit nitric oxide-dependent Ca(2+) dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. **Glia**, v. 61, n. 12, p. 2023-2037, 2013.

PONTES-NETO, O. M.; SILVA, G. S.; FEITOSA, M. R.; DE FIGUEIREDO, N. L.; FIOROT, J. A., JR.; ROCHA, T. N.; MASSARO, A. R. e LEITE, J. P. Stroke awareness in Brazil: alarming results in a community-based study. **Stroke**, v. 39, n. 2, p. 292-296, 2008.

RANSOHOFF, R. M. e PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n. p. 119-145, 2009.

ROCK, K. L. e KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annu Rev Pathol**, v. 3, n. p. 99-126, 2008.

ROGER, V. L.; GO, A. S.; LLOYD-JONES, D. M.; ADAMS, R. J.; BERRY, J. D.; BROWN, T. M.; CARNETHON, M. R.; DAI, S.; DE SIMONE, G.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; GREENLUND, K. J.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. A.; HO, P. M.; HOWARD, V. J.; KISSELA, B. M.; KITTNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MAKUC, D. M.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.; MATCHAR, D. B.; MCDERMOTT, M. M.; MEIGS, J. B.; MOY, C. S.; MOZAFFARIAN, D.; MUSSOLINO, M. E.; NICHOL, G.; PAYNTER, N. P.; ROSAMOND, W. D.; SORLIE, P. D.; STAFFORD, R. S.; TURAN, T. N.; TURNER, M. B.; WONG, N. D. e WYLIE-ROSETT, J. Heart disease and stroke statistics--2011

update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 4, p. e18-e209, 2011.

SANO, Y.; MOTOMURA, T.; YAMAMOTO, F.; FUKUDA, M.; MUKAI, T. e MAEDA, M. 1-(3'-[125I]iodophenyl)-3-methyl-2-pyrazolin-5-one: preparation, solution stability, and biodistribution in normal mice. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 58, n. 8, p. 1020-1025, 2010.

SATO, T.; MIZUNO, K. e ISHII, F. A novel administration route of edaravone--II: mucosal absorption of edaravone from edaravone/hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex solution including L-cysteine and sodium hydrogen sulfite. **Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 88-94, 2010.

SCHWARTZ, M.; BUTOVSKY, O.; BRUCK, W. e HANISCH, U. K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends Neurosci**, v. 29, n. 2, p. 68-74, 2006.

SHICHINOHE, H.; KURODA, S.; YASUDA, H.; ISHIKAWA, T.; IWAI, M.; HORIUCHI, M. e IWASAKI, Y. Neuroprotective effects of the free radical scavenger Edaravone (MCI-186) in mice permanent focal brain ischemia. **Brain Res**, v. 1029, n. 2, p. 200-206, 2004.

SOUZA-RODRIGUES, R. D.; COSTA, A. M.; LIMA, R. R.; DOS SANTOS, C. D.; PICANCO-DINIZ, C. W. e GOMES-LEAL, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Res**, v. 1200, n. p. 78-88, 2008.

STANSBURY, J. P.; JIA, H.; WILLIAMS, L. S.; VOGEL, W. B. e DUNCAN, P. W. Ethnic disparities in stroke: epidemiology, acute care, and postacute outcomes. **Stroke**, v. 36, n. 2, p. 374-386, 2005.

STOLL, G. e JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 3, p. 233-247, 1999.

SWINNEN, N.; SMOLDERS, S.; AVILA, A.; NOTELAERS, K.; PAESEN, R.; AMELOOT, M.; BRONE, B.; LEGENDRE, P. e RIGO, J. M. Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. **Glia**, v. 61, n. 2, p. 150-163, 2013.

TAYLOR, T. N.; DAVIS, P. H.; TORNER, J. C.; HOLMES, J.; MEYER, J. W. e JACOBSON, M. F. Lifetime cost of stroke in the United States. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1459-1466, 1996.

THORED, P.; HELDMANN, U.; GOMES-LEAL, W.; GISLER, R.; DARSALIA, V.; TANEERA, J.; NYGREN, J. M.; JACOBSEN, S. E.; EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z. e LINDVALL, O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, v. 57, n. 8, p. 835-849, 2009.

TRAPP, B. D.; WUJEK, J. R.; CRISTE, G. A.; JALABI, W.; YIN, X.; KIDD, G. J.; STOHLMAN, S. e RANSOHOFF, R. Evidence for synaptic stripping by cortical microglia. **Glia**, v. 55, n. 4, p. 360-368, 2007.

VILLAREAL, G.; ZAGORSKI, J. e WAHL, S. Inflammation: Acute. **Encyclopedia of Life Sciences** v. n. p. 1-8, 2001.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; JINNO, S.; KOHSAKA, S. e NABEKURA, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. **J Neurosci**, v. 29, n. 13, p. 3974-3980, 2009.

WANG, G. H.; JIANG, Z. L.; LI, Y. C.; LI, X.; SHI, H.; GAO, Y. Q.; VOSLER, P. S. e CHEN, J. Free-radical scavenger edaravone treatment confers neuroprotection against traumatic brain injury in rats. **J Neurotrauma**, v. 28, n. 10, p. 2123-2134, 2011.

WANG, L. F. e ZHANG, H. Y. A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 21, p. 3789-3792, 2003.

WATANABE, T.; TANAKA, M.; WATANABE, K.; TAKAMATSU, Y. e TOBE, A. [Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant]. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 3, p. 99-111, 2004.

WEN, J.; WATANABE, K.; MA, M.; YAMAGUCHI, K.; TACHIKAWA, H.; KODAMA, M. e AIZAWA, Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia-reperfusion injury in aged rats. **Biol Pharm Bull**, v. 29, n. 4, p. 713-718, 2006.

XIAO, B.; BI, F. F.; HU, Y. Q.; TIAN, F. F.; WU, Z. G.; MUJLLI, H. M.; DING, L. e ZHOU, X. F. Edaravone neuroprotection effected by suppressing the gene expression of the Fas signal pathway following transient focal ischemia in rats. **Neurotox Res**, v. 12, n. 3, p. 155-162, 2007.

YAGI, K.; KITAZATO, K. T.; UNO, M.; TADA, Y.; KINOUCI, T.; SHIMADA, K. e NAGAHIRO, S. Edaravone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9-related brain

hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator. **Stroke**, v. 40, n. 2, p. 626-631, 2008.

YAMAMOTO, T.; YUKI, S.; WATANABE, T.; MITSUKA, M.; SAITO, K. I. e KOGURE, K. Delayed neuronal death prevented by inhibition of increased hydroxyl radical formation in a transient cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 762, n. 1-2, p. 240-242, 1997.

YAMAMOTO, Y.; YANAGISAWA, M.; TAK, N. W.; WATANABE, K.; TAKAHASHI, C.; FUJISAWA, A.; KASHIBA, M. e TANAKA, M. Repeated edaravone treatment reduces oxidative cell damage in rat brain induced by middle cerebral artery occlusion. **Redox Rep**, v. 14, n. 6, p. 251-258, 2009.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T. e KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 26, p. 15769-15774, 1998.

YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P. H. e KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13496-13500, 1999.

ZHANG, P.; LI, W.; LI, L.; WANG, N.; LI, X.; GAO, M.; ZHENG, J.; LEI, S.; CHEN, X.; LU, H. e LIU, Y. Treatment with edaravone attenuates ischemic brain injury and inhibits neurogenesis in the subventricular zone of adult rats after focal cerebral ischemia and reperfusion injury. **Neuroscience**, v. 201, n. p. 297-306, 2012.

ZHANG, R. L.; ZHANG, Z. G. e CHOPP, M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 345-352, 2008.

ZHAO, B.; ZHAO, C. Z.; ZHANG, X. Y.; HUANG, X. Q.; SHI, W. Z.; FANG, S. H.; LU, Y. B.; ZHANG, W. P.; XIA, Q. e WEI, E. Q. The new P2Y-like receptor G protein-coupled receptor 17 mediates acute neuronal injury and late microgliosis after focal cerebral ischemia in rats. **Neuroscience**, v. 202, n. p. 42-57, 2012.

ZOU, J.; VETRENO, R. P. e CREWS, F. T. ATP-P2X7 receptor signaling controls basal and TNFalpha-stimulated glial cell proliferation. **Glia**, v. 60, n. 4, p. 661-673, 2012.