



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

MICHELLE NERISSA COELHO DIAS

**FENÓTIPOS MICROGLIAIS E TRATAMENTO COM MINOCICLINA APÓS
ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 NO
CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS**

Belém

2016

MICHELLE NERISSA COELHO DIAS

**FENÓTIPOS MICROGLIAIS E TRATAMENTO COM MINOCICLINA APÓS
ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 NO
CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Belém

2016

Dados Internacionais de Catalogação- na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dias, Michelle Nerissa Coelho

Fenótipos microgliais e tratamento com minociclina após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1 no córtex motor de ratos adultos / Michelle Nerissa Coelho Dias ; Orientador, Wallace Gomes Leal. - 2016.

76 f. : il.

Inclui bibliografia

Área de concentração: Neurociências

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2016.

1. Isquemia cerebral - tratamento. 2. Microglia. 3. Minociclina. I. Leal, Wallace Gomes, orientador. II. Título.

CDD – 22 ed. 573.839

MICHELLE NERISSA COELHO DIAS

**FENÓTIPOS MICROGLIAIS E TRATAMENTO COM MINOCICLINA APÓS
ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 NO
CÓRTEX MOTOR DE RATOS ADULTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Data de aprovação:

Banca Examinadora:

Wallace Gomes Leal
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

- Orientador

Vânia Castro Correa
Professora Doutora
Universidade Federal do Pará

- Membro Titular

Rafael Rodrigues Lima
Professor Doutor
Universidade federal do Pará

- Membro Titular

Belém
2016

À Maria Coelho
Francisco Dias
Savanna Madureira
Ijair Rogerio

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, que viabilizou esse projeto de mestrado e que, ao longo desta pesquisa, sempre esteve à disposição para atender meus pedidos de auxílio, gentilmente cedendo seu tempo.

Agradeço ao MSc. Ijair Rogerio Costa dos Santos, por estar sempre presente nos momentos bons e difíceis e de aprendizado que surgiram durante a produção deste trabalho. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Lima, por ceder um componente necessário para a continuidade do trabalho.

Agradeço as Prof. Dra. Edna Franco do Instituto Evandro Chagas e a Dra. Elizabeth Sumi Yamada do Hospital universitário João de Barros Barreto por abrir as portas dos seus laboratórios para a utilização do equipamento criostato, indispensável para o corte do material coletado.

Agradeço ao coordenador do laboratório multidisciplinar Prof. Dr. Anderson Herculano pela disposição no uso do microscópio de fluorescência pertencente ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.

Agradeço a doutoranda Marta, do laboratório de Neuroendocrinologia, pelos ensinamentos de utilização do microscópio de fluorescência do laboratório multidisciplinar.

Agradeço aos colegas de laboratório pela amizade, aprendizado, e ajuda que tive de cada um deles durante a construção deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas- ICB pelo auxílio e disponibilidade constante aos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	17
1.2. ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE).....	19
1.3. EVENTOS SUBSEQUENTES AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) NO PARÊNQUIMA CEREBRAL.....	21
1.3.1. Efeito da Isquemia ao Nível Celular.....	21
1.3.2. Excitotoxicidade.....	22
1.3.3. Estresse Oxidativo e Nitrosativo.....	23
1.3.4. Ruptura da Barreira Hematoencefálica (BHE).....	24
1.3.5. Apoptose.....	24
1.3.6. Resposta Inflamatória no AVE.....	25
1.4. ASPECTOS MORFOLÓGICOS RELACIONADOS À ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS DESORDENS NEURAIS AGUDAS.....	30
1.4.1. Microglia: Origem e Desenvolvimento.....	30
1.4.2. Resposta Microglial após Acidente Vascular Encefálico (AVE).....	31
1.4.3. Mecanismo de Transição dos Fenótipos Microgliais.....	32
1.5. MINOCICLINA: ESTRUTURA E ASPECTOS CLÍNICOS.....	34
1.6. HIPÓTESE EXPERIMENTAL.....	37
1.7. OBJETIVOS.....	39
1.7.1. Objetivos Gerais.....	39
1.7.2. Objetivos Específicos.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1. Aspectos Éticos.....	40
2.2. Animais e Grupos Experimentais.....	40
2.2.1. Grupo Controle e Tratado Com Tempo de Sobrevida de 07 dias.....	40
2.2.2. Grupo Controle com Tempo de Sobrevida de 14 dias e 30 dias.....	40
2.3. Procedimentos Cirúrgicos e Indução da Isquemia Focal Por Microinjeções de Endotelina-1.....	41
2.4. Tratamento Com Tetraciclina: Minociclina e Solução Estéril (PBS).....	43
2.5. Perfusão e Processamento Histológico.....	44
2.6. Análise Histopatológica, Imuno-histoquímica e Imunofluorescência.....	44
2.6.1. Análise Histopatológica Geral.....	44

2.6.2. Imuno-histoquímica.....	45
2.6.3. Imunofluorescência Dupla.....	46
2.7. Análise Qualitativa e Quantitativa.....	46
2.8. Análise Estatística.....	47
3. RESULTADOS.....	48
3.1. Análise Histopatológica da Lesão Isquêmica no Córtex de Ratos Machos, após Microinjeções de Endotelina- 1.....	48
3.2. A Perda Neuronal Após Microinjeções de Endotelina- 1 no Córtex Motor Concomitante ao Tratamento Com Minociclina.....	49
3.3. Imunofluorescência Dupla de Células Microgliais M1 e M2 no Córtex Motor Após Lesão Isquêmico por Microinjeções de Endotelina- 1.....	52
4. DISCUSSÃO.....	58
4.1. Considerações Gerais.....	58
5. CONCLUSÃO.....	60
6. REFERENCIAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AMPA	α -amino-3- hidroxí-5-metil-4-propionato
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Acidente vascular encefálico
AVEi	Acidente vascular encefálico isquêmico
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose
Arg- 1	Arginase- 1
BHE	Barreira hematoencefálica
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Cito C	Citocromo C
CCL-5	Citocinas quimioatrativas de leucócitos
CCR- 5	Receptor de citocinas quimioatrativas de leucócitos
COX	Ciclooxigenase
COX- 2	Ciclooxigenase- 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DA	Doença de Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DP	Doença de Parkinson
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IRM	Imagens por ressonância magnética
ICAM- 1 e 2	Moléculas de adesão intracelular 1 e 2
IL-1	Interleucina- 1
IL- 1 β	Interleucina-1 beta
IL-1ra	Receptor antagonista da Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina- 2
IL-6	Interleucina- 6

IL-8	Interleucina- 8
IL-10	Interleucina- 10
iNOS	Oxido nítrico sintase induzida
IFN- γ	Interferon gama
5-LOX	Lipooxigenase 5
KDa	Quilodalton
LAME	Lesão aguda da medula espinhal
LPS	Lipopolissacarideo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MHC	Complexo de principal de histocompatibiliade
MMPs	Metaloproteinase da matriz
MAPKs	Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NF- κ B	Fator nuclear- kappa Beta
NMDA	N-methyl-D-aspartato
NeuN	Proteína nuclear especifica de neurônios
NOO ₂	Peroxinitrito
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
NOSn	Oxido nítrico sintase neuronal
OACM	Oclusão da artéria cerebral média
OMS	Organização mundial de saúde
HO-	Hidroxila
O ₂ -	Superóxido
PARP	Enzima poli (ADP-ribose) polimerase
PPAR- γ	Proliferador de peroxissoma-ativado pelo receptor gama
pMols	Picomols
rt-PA	Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
SAMU	Serviço de Atendimento Móvel de Urgência
SNC	Sistema Nervo Central
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de Necrose tumoral alfa
TCE	Trauma crânio encefálico

VCAM- 1
μl

Moléculas de adesão vascular- 1
Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** Progressão do Acidente Vascular Encefálico (AVE). Janela 22
temporal em minutos, horas, dias e semanas. Núcleo isquêmico
(em azul); penumbra isquêmica (em verde). Notar o aumento
da área lesionada durante esse período.
- Figura 02** Esquema demonstrando os eventos químicos e celulares 29
subsequentes de um acidente vascular encefálico que
acometem o parênquima cerebral.
- Figura 03** Diagrama mostrando as vias envolvidas na expressão dos 34
fenótipos microgлияis M1 e M2. À esquerda: NF-κB; NOTCH;
STAT1/ STAT3 vias que modulam a expressão do fenótipo M1;
À direita: CREB (cAMP); TLRs e PI3K/Akt (IRF-3) vias que
modulam a expressão do fenótipo M2; Ao centro: C/EBP e CBP
coativadores às duas vias de expressão microgлияl M1 e M2.
- Figura 04** Estrutura química da tetraciclina e minociclina. 35
- Figura 05** Em “A” local de referência (bregma) para retirada das 42
coordenadas estereotáticas à microinjeção de endotelina-1; em
“B” desenho esquemático da região cortical do hemisfério
esquerdo (área motora M1) de um encéfalo de rato; box: figura
em corte coronal mostrando a extensão lateralmente e em
profundidade da área motora no córtex.
- Figura 06** Cronograma do tratamento com minociclina e PBS. Linha 43
inferior: tempo de tratamento em dias; linhas paralelas: dose
diária intraperitoneal em mg/kg nos animais tratados; linha
pontilhada: solução salina estéril (PBS) volume/massa (V/M)
injetado intraperitoneal (i.p) nos animais controles.

- Figura 07** Análise histopatológica da área da lesão; coloração por Violeta de Cresila. Em **A, B e C**: animal controle (7d após lesão); em **D, E e F**: animal tratado (7d após lesão). **Linha pontilhada em A e D**: Delimita toda extensão da área de lesão. Infiltrado celular (**IFC**); Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala**: 200µm (A e D); 50 µm (B e E) e 30 µm (C e F). 48
- Figura 08** Análise histopatológica da área da lesão; coloração por Violeta de Cresila. Em **A, B e C**: animais controle (7 d após lesão); em **D, E e F**: Animais controle (14d após lesão); em **G, H e I**: animais controle (30d após lesão). **Área pontilhada**: Extensão da área de lesão; infiltrado celular (**IFC**); Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala**: 200 µm (A, D e G); 50 µm (B, E e H); 30 µm (C, F e I). 49
- Figura 09** Analise imuno-histoquímica da área de lesão. Marcação de corpos neuronais no centro e periferia da lesão após 7 dias do evento isquêmico. Imagens A, B e C mostram a área de lesão e células Neu-N+ em animais controle; imagens D, E e F a lesão e células Neu-N+ em animais tratados. **Área pontilhada**: área de lesão; Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala**: 200 µm (A e D); 50 µm (B e E); 30 µm (C e F). 50
- Figura 10** Analise imuno-histoquímica da área de lesão. Marcação de corpos neuronais no centro e periferia da lesão isquêmica. Em A, B e C grupo controle e D, E e F grupo tratado; em C e F destaque para os corpos neuronais (células Neu-N+; setas pretas). **Área pontilhada**: área de lesão; Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala**: 200 µm (A e D); 50 µm (B e E); 30 µm (C e F). 51

- Figura 11** Análise quantitativa de células Neu-N+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico induzido por ET-1. *** comparação entre os grupos. AN 07(animais 7 dias) ($p<0,05$). 51
- Figura 12** Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A e D); células micróglias iNOS+ (B e E) ; células duplamente marcadas Ed1+/ iNOS+ (C e F). **07 DC:** grupo controle (após sete dias de sobrevivência); **07 DT:** grupo tratado (após sete dias de sobrevivência). **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F). 52
- Figura 13** Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A e D); células micróglias Arg1+ (B e E); células duplamente marcadas Ed1+/ Arg1+ (C e F). **07 DC:** grupo controle (sete dias de sobrevivência); **07 DT:** grupo tratado (sete dias de sobrevivência). **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F). 53
- Figura 14** Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A,D,G); células micróglias iNOS+ (B,E,H); dupla marcação Ed1+/ iNOS+ (C,F,I). **07 DC:** grupo controle (7 dias de sobrevivência); **14 DC:** grupo controle (14 Dias de sobrevivência); **30 DC:** grupo controle (30 dias de sobrevivência) . **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F). 54
- Figura 15** Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A,D,G); células micróglias Arg1+ (B,E,H); dupla marcação Ed1+/ Arg1+(C,F,I). **07 DC:** grupo controle (7 Dias de sobrevivência); **14 DC:** grupo controle (14 Dias de sobrevivência); **30 DC:** grupo controle (30 Dias de sobrevivência) . **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F). 55
- Figura 16** Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, Arg-1+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de endotelina-1 (ET-1). Comparação entre os grupos (ANOVA) ($p<0,05$). AN 07(animais controle, 7 dias de sobrevivência). 56

Figura 17 Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, Arg-1+ 56
imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de
endotelina-1 (ET-1). Comparação entre os grupos (ANOVA)
($p < 0,05$). AN 14 (animais controle, 14 dias de sobrevivência).

Figura 18 Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, arg- 1+ 57
imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de
endotelina-1 (ET-1). Comparação entre os grupos (ANOVA)
($p < 0,05$). AN 30 (animais controle 30 dias de sobrevivência).

RESUMO

As células microgлияis são componentes fundamentais do sistema imune inato que fazem, continuamente, uma varredura completa do parênquima neural em busca de alterações teciduais sutis para a preservação da integridade tecidual. Estes macrófagos residentes do sistema nervoso central (SNC), correspondem a cerca de 20% da população celular encefálica. Em distúrbios neurais agudos e crônicos, incluindo lesão cerebral e da medula espinhal, acidente vascular encefálico experimental (AVE), doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, células microgлияis são ativadas, o que é refletido em alterações morfológicas e bioquímicas. Nestas doenças, acredita-se que a ativação microgлияl contribua tanto para neuroproteção como para a exacerbação do processo lesivo. Diversas evidências experimentais sugerem que a ativação microgлияl excessiva pode contribuir para a exacerbação do processo lesivo após AVE experimental. No entanto, nossos estudos prévios sugerem que as células microgлияis podem liberar fatores tróficos após AVE experimental em regiões anatomicamente distintas da população microgлияl com fenótipos prejudiciais. Inexistem estudos que tenham descrito os padrões de reatividade dos diferentes fenótipos microgлияis após isquemia experimental. No presente projeto, investigaremos os padrões de ativação de células microgлияis apresentando fenótipos benéficos e prejudiciais, avaliando que populações microgлияis são inibidas pela tetraciclina minociclina após isquemia cortical focal. Os animais foram submetidos à isquemia focal no córtex motor por microinjeções de 80 pMol de endotelina-1 (ET-1). Os mesmos foram sacrificados 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica. Foi feita a técnica de imuno-histoquímica para a observação da perda neuronal (NeuN+) e imunofluorescência dupla para avaliar a densidade de células microgлияis M1 e M2 na área lesionada. A análise estatística da densidade de células NeuN+ foi feita pelo teste t de Student dos grupos de 07 dias de sobrevivência controle e tratado enquanto que a análise das células microgлияis M1 e M2 foram feitas pela análise de variância dos grupos de 07, 14 e 30 dias sobrevivência controle, adotando em todos os testes o nível de significância $P < 0.05$. Foi comprovada uma preservação no número de neurônios presentes no parênquima lesionado dos animais tratados com minociclina. Foi observada uma diminuição no número de células microgлияis M1 nos animais tratados com minociclina, sugerindo que o fármaco pode apresentar efeitos em vias de expressão dos fenótipos microgлияis M1. Entretanto, quando comparados os animais de 07, 14 e 30 dias controle, há um aumento do número desse fenótipo M1 que se estende do 07 dia até o 30 dia de sobrevivência. Concluímos que há um efeito neuroprotetor do fármaco minociclina relacionada ao acidente vascular encefálico, sugerindo que esse fármaco pode estar envolvido na modulação dos fenótipos microgлияis necessitando de maiores estudos sobre a sua função nas vias de expressão desses fenótipos.

Palavras-Chave: Fenótipos microgлияis, minociclina, isquemia cerebral e inflamação.

ABSTRACT

Microglial cells are fundamental components of the innate immune system that continually make a complete scan of the neural parenchyma in search of subtle tissue changes for the preservation of tissue integrity. These resident macrophages of the central nervous system (CNS) correspond to about 20% of the encephalic cell population. In acute and chronic neural disorders, including brain and spinal cord injury, experimental stroke, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease, microglial cells are activated, which is reflected in morphological and biochemical changes. In these diseases, it is believed that microglial activation contributes to both neuroprotection and exacerbation of the injury process. Several experimental evidences suggest that excessive microglial activation may contribute to the increase of the injury process after experimental stroke. However, our previous studies suggest that microglial cells may release trophic factors after experimental stroke in anatomically distinct regions of the microglial population with deleterious phenotypes. There are no studies that have described the reactivity patterns of the different microglial phenotypes after experimental ischemia. In the present project, we will investigate the patterns of activation of microglial cells presenting beneficial and harmful phenotypes, evaluating which microglial populations are inhibited by tetracycline minocycline after focal cortical ischemia. The animals were submitted to focal ischemia in the motor cortex by microinjections of 80 pMol of endothelin-1 (ET-1). They were sacrificed 7, 14 and 30 days after ischemic induction. The immunohistochemistry technique for the observation of neuronal loss (NeuN +) and double immunofluorescence to evaluate the density of M1 and M2 microglial cells in the lesioned area was used. Statistical analysis of NeuN+ cell density was performed by the Student's t-test from the 7-day of control and treated groups while the analysis of the M1 and M2 microglial cells were done by the analysis of variance in the 07, 14 and 30 control groups, adopting in all tests the level of significance $P < 0.05$. A preservation in the number of neurons in the injured parenchyma of the animals treated with minocycline was confirmed. A decrease in the number of M1 microglial cells in minocycline-treated animals was observed, suggesting that the drug may present effects on expression pathways of M1 microglial phenotypes. However, when the animals of the control group of 07, 14 and 30 are compared, there is an increase in the number of this M1 phenotype that extends from day 7 to day 30. We conclude that there is a neuroprotective effect of the drug minocycline when associated to stroke, suggesting that this drug may be involved in the modulation of microglial phenotypes requiring further studies on its function in the pathways of expression of these phenotypes.

Key words: Microglial phenotypes, minocycline, cerebral ischemia and inflammation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

O acidente vascular encefálico (AVE) é a segunda causa mais comum de morte no mundo e aproximadamente 1/6 de todos os seres humanos podem sofrer pelo menos um evento isquêmico durante a vida, podendo ocasionar incapacidade ao acometido que se torna dependente de familiares ou de profissionais de saúde especializados (MURRAY; LOPEZ, 1997; SESHADRI et al., 2006). O alto custo do tratamento é uma das dificuldades à manutenção da recuperação parcial do paciente, sendo que atualmente alguns programas de saúde se aproximam do índice de 6% de todo o orçamento destinado aos setores implementadores (WANG; TANG; YENARI, 2007).

Tem sido relatado que o acidente vascular cerebral isquêmico (AVEi) responde por aproximadamente 80% dos casos, sendo ocasionado por uma oclusão trombótica ou embólica de uma artéria cerebral, na maioria dos casos a artéria cerebral média ou um dos seus ramos. A variabilidade clínica do AVE, principalmente em termos de causas, duração, localização e gravidade da isquemia tem relação com doenças sistêmicas que reforçam a necessidade de se ampliar a atenção da pesquisa clínica para um grupo maior de pacientes com essa patologia (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

A obstrução do fluxo sanguíneo em um território vascular cerebral provoca eventos moleculares complexos que desencadeiam uma série de alterações fisiopatológicas, sendo a principal abordagem direcionada ao tratamento do AVEi: a recanalização e neuroproteção. Atualmente, o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA) é a única terapia aprovada para o AVE isquêmico agudo (NINDS, 1995). Várias drogas têm sido testadas em modelos experimentais de AVE em roedores e primatas não humanos com excelentes resultados, mas sem muita eficácia em humanos (KASTE, 2005; LEES et al., 2006).

Atualmente, nos Estados Unidos da América, assim como em outros países industrializados, as taxas de AVE registrada por idade diminuíram nos últimos 30 anos. No entanto, o envelhecimento da população implicará em números maiores de casos nas próximas décadas. Essas modificações acarretarão impacto sobre futuros ensaios clínicos a respeito da prevenção do AVE, devido ao maior número de

financiamento, por parte dos órgãos públicos e privados, destinados aos programas de avaliação e tratamento para esses pacientes (HONG et al., 2011; KUNST; AMIRI; JANSSEN, 2011; LLOYD-JONES, D. M. et al., 2010; REDON et al., 2011).

Em aspecto global, esse quadro não difere. A contínua industrialização da Ásia e da África provoca mudanças, não muito saudáveis, no estilo de vida da população levando ao aumento de casos de acidente vascular cerebral e outras doenças cardiovasculares, ocasionando maiores taxas de incapacidade e mortalidade por AVE (KIM, A. S.; JOHNSTON, 2011). Na Rússia e Europa oriental o curso dessa patologia aumenta rapidamente, situação semelhante evidencia-se na China onde há elevada população em envelhecimento, mas, a causa singular de prevalência do AVE nessas áreas ainda são: o tabagismo e a hipertensão (HONG et al., 2011; LLOYD-JONES, D. M. et al., 2010; MORAN et al., 2010; REDON et al., 2011).

Verifica-se uma alteração nos casos de AVE em países em desenvolvimento, com declínio do hemorrágico em relação ao isquêmico. A identificação dos fatores de riscos ao AVE são extremamente importantes à prevenção primária e secundária dessa patologia, sendo o monitoramento da pressão arterial, obesidade, diabetes, dislipidemia, e outros, os principais alvos de programas de prevenção (LLOYD-JONES, D. et al., 2009; ZHAO, D. et al., 2008).

Nesse contexto, nota-se que nos últimos anos as mudanças no modo de vida das pessoas, em países em desenvolvimento, bem como os fatores de risco como a aterosclerose, hipertensão e diabetes contribuem para o aumento do número de casos de acidente vascular encefálico.

No Brasil o AVE é a principal causa de morte em diversas faixas etárias, sendo o quadro de óbitos mais relacionado à origem isquêmica- (20%) dessa patologia- e, em casos de sobrevivência, o paciente fica incapacitado de realizar atividades cotidianas simples (DE CARVALHO et al., 2011; MANIVA; DE FREITAS, 2012). Os fatores de risco dessa desordem neuronal aguda para a população brasileira são as mesmas de outros países em desenvolvimento: idade avançada, hipertensão arterial sistêmica, diabetes, tabagismo, sedentarismo e dislipidemias (CASTRO et al., 2009).

Esse quadro é indicativo da adoção de políticas que visem o atendimento aos indivíduos que sofreram o AVE em todas as regiões do Brasil, com a meta de redução de óbitos e invalidez dos acometidos. Dados do Ministério da Saúde

relataram o número de 99.159 óbitos, em 2010, representando a média de 271 mortes/dia. Por conseguinte, o número de internações também é elevado na rede pública de saúde brasileira, sendo direcionada uma maior atenção aos grupos de riscos com ações preventivas na atenção básica até a ampliação da rede de serviços para tratamento especializado (BRASIL, 2012).

Duas portarias, em 2012, a de nº664/2012 e a nº665/2012, elaborada pelo Ministério da Saúde Brasileiro aprovaram e estabeleceram critérios no protocolo clínico, diretrizes terapêuticas e habilitação dos estabelecimentos hospitalares como centros de atendimento de urgência aos pacientes com AVE, instituindo a ajuda financeira e, ainda, aprovando a linha de cuidados com a doença (BRASUS, 2012; BRASIL, 2012). O cerne está na compreensão que o atendimento às vítimas deve ser prestado em condições adequadas possibilitando uma linha de cuidados compatíveis à situação do paciente com AVE.

Sendo assim, o excelente funcionamento das Redes Básicas de Saúde, do Serviço de Atendimento Móvel de Urgência (SAMU), das Unidades Hospitalares de Emergência, comportando leitos de reabilitação ambulatorial e profissionais de saúde especializados no atendimento a pacientes com AVE, podem minimizar os danos motores e cognitivos nesses pacientes.

1.2. ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

A organização mundial de saúde (OMS) define Acidente Vascular Encefálico (AVE) como “um sinal clínico de rápido desenvolvimento de perturbação focal da função cerebral, de suposta origem vascular e com mais de 24 horas de duração”. (MARKUS, 2008).

Apesar de ser classificado como uma patologia de idade avançada o AVE também ocorre no período neonatal e ocasiona disfunções neurológicas que se estendem por toda vida do acometido. Nessa fase da vida os acidentes vasculares ocorrem em um percentual que varia de 20% a 30% dos nascidos com menos de 35 semanas de gestação, suplantando os casos, em frequência, nos indivíduos com idade superior a 65 anos (DERUGIN et al., 2000). Nesses dois grupos suscetíveis à lesão vascular, observa-se a obstrução parcial ou total do suprimento sanguíneo para regiões do sistema nervoso. Na obstrução parcial, o AVE isquêmico, os dois subtipos: trombolítico e embolítico, são descritos. O trombolítico está diretamente

relacionado ao acúmulo de placas de ateromas na parede do vaso com posterior entupimento (CAPLAN; SEARLS; HON, 2009), enquanto o embólico ocorre com o desprendimento da placa de ateroma e obliteração de um vaso subsequente (CAPLAN et al., 2009; MARKUS, 2008).

Imagens por ressonância magnética (IRM) de pacientes que sofreram acidente vascular encefálico tem demonstrado, em alguns casos, o extravasamento de sangue resultante do rompimento da parede vascular intracerebral e subaracnoide e seu acúmulo no parênquima neural e espaço dural. Geralmente são ocasionados por rompimento de aneurismas caracterizando como AVE hemorrágico, muito frequente em indivíduos com hipertensão, traumas, distúrbios hemorrágicos, angiopatia amiloide, com erro de formação vascular e que fazem uso de drogas ilícitas como a anfetamina ou cocaína (DEB; SHARMA; HASSAN, 2010; SEDER; MAYER, 2009). Entre os fatores de riscos para o AVE, estão: a hipertensão, dislipidemia, obesidade, alcoolismo, tabagismo, diabetes e fatores relacionados a pré-disposição genética (MARKUS, 2008; MOSKOWITZ; LO; IADECOLA, 2010).

Independente da causa que resulta o AVE, o comprometimento vascular atua como fator primário em 85% a 90% da lesão isquêmica (MARKUS, 2008; PETTY et al., 1999), podendo ocorrer pela oclusão de pequenos vasos a grandes infartos cortico-subcorticais, sendo a oclusão da artéria carótida interna ou da artéria cerebral media responsáveis por 10% dos infartos que resultam em edema cerebral e aumento da pressão intracraniana possibilitando a um estado de coma do paciente e, conseqüentemente, a morte (JIEYONG et al., 2006).

Em quadros agudos desta doença a principal meta da terapia é a interrupção da evolução da lesão isquêmica com a transformação da chamada área de penumbra em zona de infarto. Os procedimentos visam reduzir as sequelas do infarto e o restabelecimento da perfusão da área afetada, sendo a recanalização vascular nas primeiras horas do evento a manobra para melhorar os índices de recuperação e redução da lesão (HENNINGER et al., 2006). Nas últimas décadas, o emprego de drogas trombolíticas tem avançado no tratamento do AVE juntamente com outras duas modalidades: a hipotermia e a craniectomia descompressiva (YANAMOTO et al., 2001), mas, alguns obstáculos permanecem devido ao tempo de isquemia cerebral tolerado pelo cérebro ser dependente da intensidade do evento, da concentração de oxigênio no tecido encefálico, da reserva metabólica

primária e secundária, da velocidade de consumo dessa reserva, da temperatura e da presença ou não de drogas anestésicas (HOSSMANN, 1998).

Vários modelos experimentais de isquemia cerebral em roedores e primatas não humanos são utilizados em trabalhos científicos na busca de consistente avaliação e tratamento dessa patologia. Esses modelos procuram uma aproximação do padrão de lesão, após isquemia, semelhante às encontradas em humanos que são imprevisíveis e de estudos clínicos de difícil interferência (ALKAYED et al., 1998; HOSSMANN, 1998; VANNUCCI et al., 2001), sendo o modelo mais utilizado o da oclusão da artéria cerebral média (OACM) (HOSSMANN, 1998).

Após AVE experimental em roedores, primatas não-humanos, bem como em humanos parte do parênquima cerebral lesionado (núcleo isquêmico) sofre morte imediata e outra área (penumbra isquêmica) que circunda aquela pode ser parcialmente lesionada, mantendo o potencial de recuperação após a lesão isquêmica (**figura 1**). Por conseguinte, a duração, intensidade e a localização do evento isquêmico têm relação direta com a extensão da área lesionada (BROUNS; DE DEYN, 2009; KOERNER et al., 2008; VANNUCCI et al., 2001; WISE et al., 2001).

1.3. EVENTOS SUBSEQUENTES AO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE) NO PARENQUIMA CEREBRAL

1.3.1. Efeito da Isquemia ao Nível Celular

Durante a instalação do evento isquêmico o fluxo sanguíneo torna-se deficiente na área lesionada, ocasionando um déficit de oxigenação que resulta em vulnerabilidade do tecido cerebral. Acompanha esse colapso: a queda na concentração de ATP e glicose que faz surgir um desequilíbrio em vias bioquímicas diretamente relacionadas com a sobrevivência das células e tecidos (DEB et al., 2010; DURUKAN; TATLISUMAK, 2007). A diversidade histopatológica da lesão cerebral tem relação com o tempo de redução do fluxo sanguíneo e, em modelos experimentais com roedores e primatas não humanos, a diminuição do fluxo sanguíneo pela introdução do fio oclutor, em OACM, possibilita a visualização de áreas distintas, uma central (núcleo isquêmico) e outra periférica (penumbra isquêmica) (**figura 1**). Entretanto, a evolução da lesão difere nessas duas áreas.

Evidenciamos morte celular por necrose no núcleo isquêmico e um processo de morte celular programada (apoptose) na periferia da lesão (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

Nesse ambiente isquêmico uma série de eventos relacionados ocorre: a excitotoxicidade, o estresse oxidativo e nitrosativo, a ruptura da barreira hematoencefálica, a resposta inflamatória e apoptose que culminam na lesão e morte celular (**figura 2**) (BROUNS; DE DEYN, 2009; DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P., 2008).

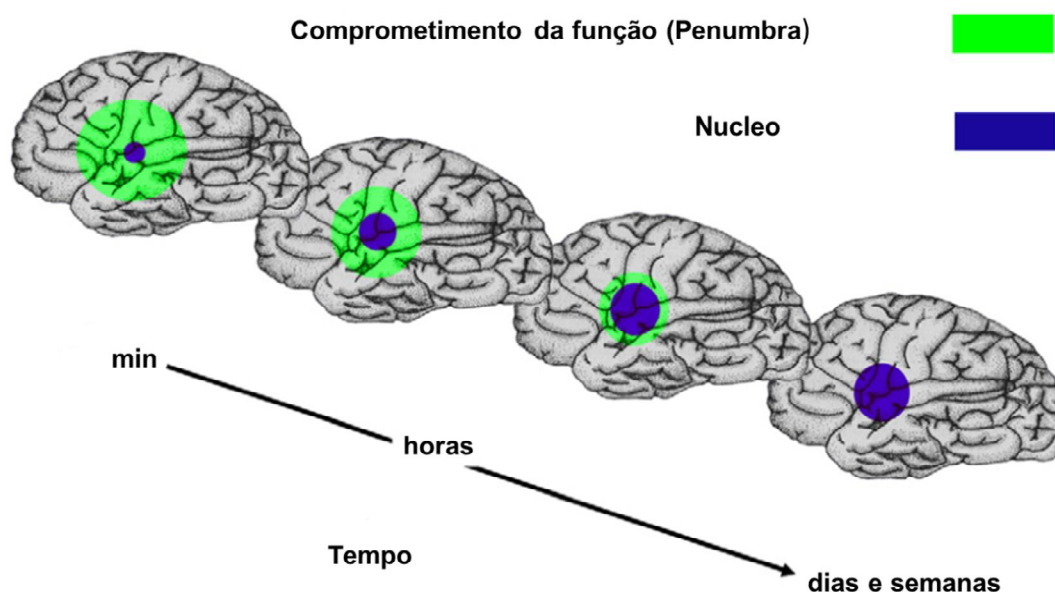


Figura 1: Progressão do Acidente Vascular Encefálico (AVE). Janela temporal em minutos, horas, dias e semanas. Núcleo isquêmico (em azul); penumbra isquêmica (em verde). Notar o aumento da área lesionada durante esse período. Adaptado de KUNZ et al, 2010.

1.3.2. Excitotoxicidade

A progressão do acidente vascular encefálico provoca uma queda bioenergética que compromete a execução das tarefas normais de neurônios e células gliais que são dependentes de glicose e oxigênio para a geração de energia em um ambiente celular normal (CHOI, 1988). Quando essas células entram em colapso, inicia-se o acúmulo do neurotransmissor excitatório, o glutamato, na membrana pré-sináptica proporcionando, em pouco tempo, excesso desse neurotransmissor na fenda sináptica (HAZELL, 2007).

Falhas no mecanismo de recaptação do glutamato ocasiona extravasamento para o meio extracelular e, por conseguinte, um excessivo processo de excitabilidade de neurônios pós-sinápticos. Ademais, durante a instalação desse processo, ocorrem à entrada de íons sódio, cloreto e cálcio que conduzem à formação do edema citotóxico, ativação de endonucleases e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que são eventos relacionados à abertura de receptores glutamatérgicos AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionato), kainato e NMDA (N-methyl-D-aspartato) (DEB et al., 2010; KUNZ; DIRNAGL; MERGENTHALER, 2010).

1.3.3. Extresse Oxidativo e Nitrosativo

Em condições normais da rede neuronal há um mecanismo antioxidante endógeno realizado pelos neurônios na eliminação de radicais livres, mas, que se torna deficiente em condições patológicas. No desencadeamento do AVE um desequilíbrio químico é instalado e radicais livres formados como produtos de reações desencadeiam um ciclo de novas reações que afetam o funcionamento da mitocôndria (KNOTT; BOSSY-WETZEL, 2009), resultando em inibição de mecanismos de transporte de elétrons, queda na produção de ATP, formação de superóxido (O_2^-) com liberação para o citoplasma, bem como síntese de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e acúmulo de radical hidroxila (OH^-). Essas espécies reativas de oxigênio ativam diversas cascatas enzimáticas danificando macromoléculas na célula e induzem a liberação de moléculas pró-apoptóticas causando morte celular (DOYLE, KRISTIAN P.; SIMON, ROGER P.; STENZEL-POORE, MARY P., 2008; KUNZ et al., 2010).

No mesmo ambiente isquêmico contribui ao efeito deletério à célula o óxido nítrico (NO). Este composto apresenta funções deletérias durante AVE, sendo sintetizado a partir da L-arginase por várias isoformas da síntese do NO. Neste ambiente desordenado o óxido nítrico reage com o superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito (NOO^-) altamente reativo e citotóxico, responsável por danificar estruturas celulares (DOYLE, K. P. et al., 2008; KUNZ et al., 2010).

1.3.4. Ruptura da Barreira Hematoencefalica (BHE)

O NO produzido em condições normais pela parede neurovascular tem um efeito vasodilatador e anti-inflamatório, mas, em condições patológicas como no AVE, o aumento na concentração desse composto promove danos à integridade celular, compromete a parede endotelial e a permeabilidade vascular por ativar metaloproteinases da matriz celular (MMPs) (BROUNS; DE DEYN, 2009). As metaloproteinases agem sobre as fibras colágenas da lamina basal, degradando-as e prejudicando a coesão entre as células endoteliais, resultando em um aumento da permeabilidade local que favorece o extravasamento do plasma, a transmigração de leucócitos e a entrada de hemácias para o parênquima cerebral concomitante a entrada de água levando ao edema cerebral (DEL ZOPPO et al., 2000).

1.3.5. Apoptose

As vias moleculares ativadas durante o evento isquêmico e que ocasionam a apoptose não são necessariamente idênticas no cérebro de machos e fêmeas. Recentes estudos sugerem que esses mecanismos de morte celular são mediados pela ativação da oxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e subsequente ativação da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), em machos (MCCULLOUGH et al., 2005). Em fêmeas, essa condição pode ser desencadeada pela enzima citocromo C (Cito C) e a ativação de caspases (LANG; MCCULLOUGH, 2008; MCCULLOUGH et al., 2005).

Potencializa a instalação de morte celular por apoptose: a formação e liberação de radicais livres, as alterações no DNA mitocondrial e o desequilíbrio iônico e processos desencadeados após a excitotoxicidade (DOYLE, K. P. et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004) O acidente vascular encefálico altera vias bioquímicas internamente à mitocôndria, sendo a cadeia transportadora de elétrons uma dessas vias alteradas. Na cadeia respiratória enzimas que atuam no transporte de elétrons como a citocromo C são exportadas ao citoplasma e reagem com moléculas pró-apoptóticas específicas, por exemplo, a Apaf-1 que ativa a caspase-9 que ativa a caspase-3 (DOYLE, K. P. et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004). Caspase-3 ativada no citoplasma atua sobre o citoesqueleto celular e reforça a ação

das endonucleases sobre o DNA nuclear, consolidando a morte celular (DOYLE, K. P. et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004; VILA; PRZEDBORSKI, 2003).

Outro mecanismo ativador do processo de morte celular por apoptose ocorre por vias bioquímicas dependentes de receptores e seus ligantes (via extrínseca), por exemplo, receptores de morte, tipos: Fas/CD-95, TNF-R1 e seus ligantes FAS (FasL). Após a ligação entre receptor e ligante, verifica-se ativação da enzima caspase-8 que pode ativar caspase-3 resultando em mudança na concentração da enzima PARP e alterando a produção de NADP e ATP (DOYLE, K. P. et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004). Durante esses mecanismos bioquímicos de morte celular pode haver a ativação de enzimas desoxirribose nucleases ativadas por caspases (CAD) que causam danos ao material genético celular (DOYLE, K. P. et al., 2008).

Outra via ativada por caspase-8 envolve a proteína bcl, pró-apoptótica, que atuando conjuntamente com proteínas Bax e Bak desencadeiam na membrana mitocondrial o aparecimento de poros e liberação de citocromo C que mediará a morte celular por caspases (DOYLE, K. P. et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004).

Ademais, a apoptose fornece um mecanismo para que as células morram sem afetar adversamente seus vizinhos, diferente da forma não regulada de morte celular chamada de necrose em que organelas celulares incham e suas membranas plasmáticas se tornam permeáveis, resultando na liberação de conteúdos celulares e morte massiva de grupo de células ao longo do tecido (DOYLE, K. P. et al., 2008).

1.3.6. Resposta Inflamatória no AVE

No parênquima cerebral lesionado a inflamação pode permanecer por dias ou semanas após o dano, sendo caracterizada por um acúmulo de células inflamatórias e seus mediadores. Células microgliais, astrócitos, leucócitos (neutrófilos, linfócitos, macrófagos) e endopeptidases (metaloproteinases-MMPs) liberadas por esses leucócitos são evidenciados neste local (NILUPUL PERERA et al., 2006; SINGHAL et al., 2005; WANG et al., 2007).

Ao desencadeamento do processo inflamatório são associados à produção de radicais livres e de óxido nítrico, bem como a excitotoxicidade e o processo de morte celular programada (apoptose) (EMSLEY; TYRRELL, 2002). Estudos recentes demonstraram que hormônios sexuais influenciam esses mecanismos, principalmente, por suprimir a atividade dos mediadores inflamatórios limitando o

dano celular e provocando mudanças temporais na sinalização celular, na transdução de sinal, no metabolismo, na regulação e expressão dos genes (GIBSON et al., 2005; OSPINA et al., 2004; RAZMARA; KRAUSE; DUCKLES, 2005; TANASESCU et al., 2009; WEN et al., 2004).

Genes pró-inflamatórios são expressos após AVE e codificam fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Citocinas são altamente expressas após danos no SNC. Durante o AVE a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) exacerbam a lesão cerebral, mas, interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) tem efeitos neuroprotetores (WANG et al., 2007).

As citocinas sinalizam para inflamação, ativação imunológica, diferenciação e morte celular. Na circulação sistêmica são produzidas por macrófagos ativados, monócitos, linfócitos, células endoteliais e por outros tipos celulares, mas, no sistema nervoso central (SNC) são as micróglias ativadas as responsáveis por essa expressão (ADIBHATLA; HATCHER, 2008; EMSLEY; TYRRELL, 2002; TANASESCU et al., 2009). Em pacientes que sofrem AVE os níveis de IL-1, nos primeiros dias após lesão, são elevados e as expressões desses compostos ocorrem em áreas adjacentes à lesão isquêmica (ADIBHATLA; HATCHER, 2008; ELKIND et al., 2002; WANG et al., 2007).

O fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), interleucina anti-inflamatória, desempenha importante papel no desencadeamento da lesão, neste caso, como substância de potencial efeito neuroprotetor igualmente as interleucinas IL-10 e IL-8, que apresentam níveis elevados no plasma de pacientes com AVE. Estudos sugerem que essas citocinas estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos para área de lesão nos primeiros instantes do AVE (KRUPINSKI et al., 1996; LIMA et al., 2008; LOSY; ZAREMBA, 2001; SKINNER et al., 2009; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Neutrófilos fagocitam e removem corpos estranhos na área de lesão, chegando ao pico máximo de células em torno de 24 horas. Essas células liberam citocinas inflamatórias, enzimas proteolíticas e radicais livres prejudiciais ao ambiente isquêmico no tecido neural e na medula espinhal. Enzimas proteolíticas agem degradando componentes da matriz extracelular e da junção neurovascular aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos no ambiente isquêmico. (GOMES-LEAL; CORKILL; PICANCO-DINIZ, 2005; LIMA et al., 2008). Outra condição ocasionada pelo recrutamento de neutrófilos é a obstrução do fluxo

sanguíneo que juntamente com a ativação plaquetária amplia a extensão da lesão por ocasionar mais hipoxia tecidual concomitante à liberação de radicais livres prejudiciais ao parênquima tecidual (AKOPOV; SIMONIAN; GRIGORIAN, 1996; DOYLE, K. P. et al., 2008; STOWE et al., 2009).

Verifica-se o recrutamento de Monócitos e macrófagos ao ambiente isquêmico, tendo relação direta com o aumento de MCP-1 (Proteína quimioatrativa de monócitos) bem como a CCL-5 (Citosinas quimioatrativa de leucócitos) medeia através de seu receptor CCR5 a ativação e a migração de leucócitos ao tecido lesionado concomitante a expressão normal de células T (CANOUI-POITRINE et al., 2011; KIM, J. Y.; KAWABORI; YENARI, 2014; NILUPUL PERERA et al., 2006; SINGHAL et al., 2005; WANG et al., 2007). Outro tipo de leucócito que atua durante o processo isquêmico são os linfócitos (YILMAZ et al., 2006). Linfócitos entram em atividade e ocasionam uma resposta celular que envolve a produção de citocinas, aumento da expressão de receptores de citocinas e proliferação celular. Em situações patológicas do sistema nervoso central essas células exercem ações na resposta inflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias e promovendo a quimiotaxia a outros leucócitos (MUKHTAR et al., 2005; SCHWAB et al., 2001; YILMAZ et al., 2006). Linferi e colaboradores, em 2009, relataram possíveis efeitos protetores dos linfócitos, sendo dependente do tipo de célula T ativada e da gravidade da lesão. Esses achados foram evidentes em um modelo experimental de esclerose lateral amiotrófica e de encefalite autoimune (CHIU et al, 2008; MOALEM et al, 1999).

Em áreas próximas e distantes do sitio da lesão, células microgliais são ativadas em resposta aos processos inflamatórios instalados. Essa ativação precede e predomina sobre o infiltrado de macrófagos e, em um estudo in vivo, a ativação dessas células pareceu ser influenciada por tratamento com hormônios (WU et al., 2005) (CLARK et al., 1993; VAGNEROVA; KOERNER; HURN, 2008). Microglia em ambientes não patológicos do SNC apresenta morfologia ramificada, mas quando ocorrem mudanças fisiológicas no meio, passam a ter formato diferente que caracteriza um estado ativado. Isso é bem observado em situações de estresse, quando neurônios produzem compostos que disparam mecanismos que irão sinalizar os receptores de membrana destas células e a tornam ativadas (DAVALOS et al., 2005; HAWLISCH; KOHL, 2006; KREUTZBERG, 1996; PERRY, 2007; PERRY; ANDERSSON; GORDON, 1993; RANSOHOFF; PERRY, 2009). Nessa

condição, prolongamentos curtos e grossos que auxiliam na função fagocitária de macrófagos ativados são observados e essas células passam a um formato ameboide. No momento em que estão ativadas, as microglias sintetizam substâncias e aumentam a expressão de moléculas de membrana da família MHC classes I e II, receptores CD₄ e CD₈ e receptores do complemento (PERRY et al., 1993; STOLL; JANDER, 1999; STREIT; GRAEBER, 1993). Em algumas situações de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, essas células desempenham papel neurotóxico que contribui para a morte neuronal, podendo dificultar a neurogênese endógena nas doenças neurodegenerativas (BLOCK; HONG, 2005; EKDAHL; KOKAIA; LINDVALL, 2009; GOMES-LEAL et al., 2004).

Ademais, ativação microglial concentra-se no centro e na área de penumbra da lesão isquêmica, e, dependendo do estímulo, contribui ao aumento ou não da lesão. Em um experimento *in vivo* a função deletéria dessas células foi ativada por LPS e β amiloides que induzem a expressão do fator TNF- α (BUTOVSKY et al., 2005; HAYAKAWA et al., 2008). Uma função benéfica da microglia pode ser atribuída ao secretar GDNF- fator neurotrófico derivado de células gliais que desempenha função benéfica à sobrevivência de neurônios (BATCHELOR et al., 2000).

A resposta astrocitária durante o evento isquêmico funciona como um marcador de resposta celular, sendo a passagem ao estado ativado dessas células associado à forte expressão de GFAP (PEKONY; NILSSON, 2005). Essas células são evidenciadas ao redor da área de lesão e sua condição de reatividade por marcadores difere com o gênero. O pico da resposta astrocitária ocorre no período de 24 a 72 horas após AVE. Alguns estudos sugerem que a ativação astrocitária pode ser intensa em fêmeas, sendo que essas células, quando ativadas, possuem forte correlação com a morte neuronal em machos (HERRMANN; EHRENREICH, 2003; WENG; KRIZ, 2007; ZHU; PFAFF, 1995).

No parênquima cerebral afetado pelo AVE, metabólitos do ácido araquidônico contribuem à instalação do processo inflamatório, sendo que a diminuição do fluxo sanguíneo no local da lesão associado ao decréscimo de energia (ATP) desencadeia o aumento na concentração de cálcio intracelular possibilitando a ativação de fosfolipases e a liberação do ácido araquidônico (AA) por hidrólise de glicerofosfolípidios. O AA ativa vias COX (ciclooxigenase) e 5-LOX (lipooxigenase) que agem na conversão do AA em prostaglandina que participarão da

metabolização de eicosanoides (prostaciclina (PGI₂); tromboxano A₂ (TXA₂); prostaglandina E₂ e D₂) que exercem efeitos na regulação da permeabilidade da BHE e na microvasculatura do parênquima cerebral. Outra via de atuação do AA no decorrer do processo inflamatório é ativação de precursores de leucotrienos, moléculas que potencializam a produção do edema e a permeabilidade no parênquima cerebral (WANG et al., 2007).

Associado aos processos que desencadeiam a resposta inflamatória está a síntese de óxido nítrico (NO), molécula que desempenha função sinalizadora em vários processos fisiológicos além de participar, no encéfalo de mamíferos, como vasodilatador e importante composto na via de comunicação entre neurônios. Durante o acidente vascular encefálico a óxido nítrico sintase (NOS) é relevante na síntese do óxido nítrico (NO) que promove dano celular, danifica a parede endotelial e compromete a permeabilidade vascular por ativar metaloproteínase de matriz extracelular (BROUNS; DE DEYN, 2009). Sendo restritas as células que estão envolvidas na resposta inflamatória no cérebro isquêmico o NO pode causar danos ao DNA através da formação de peroxinitrito (WANG et al., 2007).

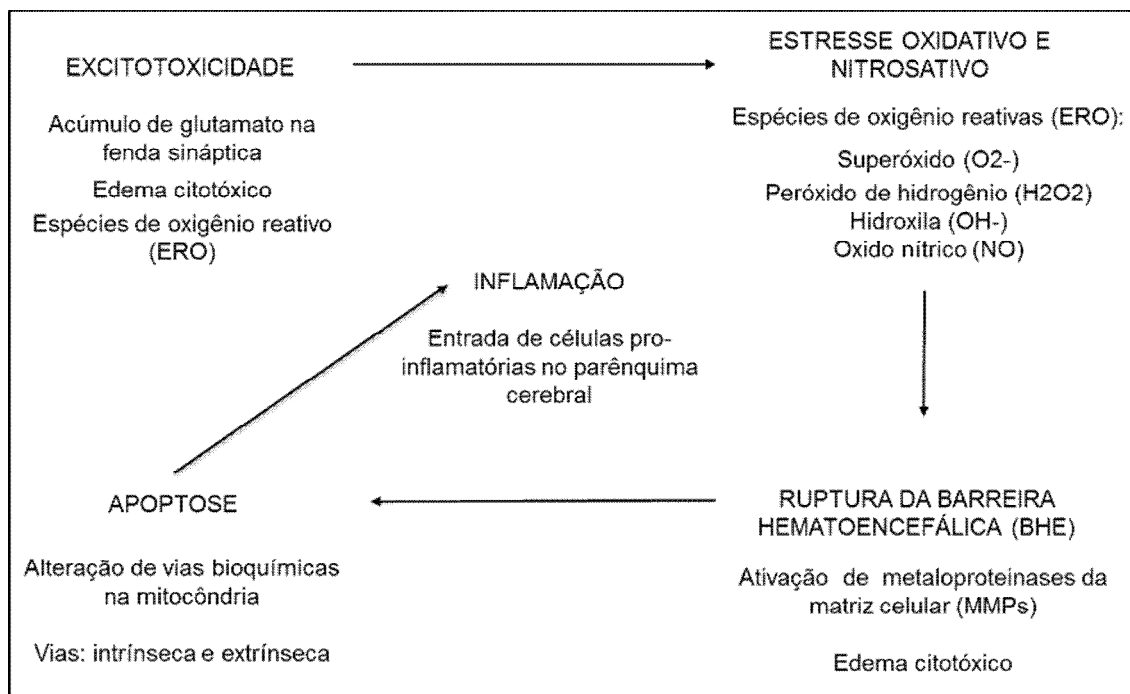


Figura 2: Esquema demonstrando os eventos químicos e celulares subsequentes de um acidente vascular encefálico que acometem o parênquima cerebral.

1.4. ASPECTOS MORFOLÓGICOS RELACIONADOS À ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS DESORDENS NEURAIS AGUDAS

1.4.1. Microglia: Origem e Desenvolvimento

As primeiras pesquisas relevantes sobre as células microgliais começaram com Georg Kreutzberg, em 1841, que identificou células fagocitárias de origem mesodermal de um cérebro lesionado. Nos anos subsequentes, outros pesquisadores sugeriram diversas funções a estas células no SNC. Cajal, em 1913, reconheceu a mesoglia como o "terceiro elemento" do sistema nervoso central, enquanto Alzheimer acreditava que estas células gliais se tornavam amebóides e serviam para combater certas infecções agudas (KETTENMANN et al., 2011; ROCK et al., 2004).

Pío del Río-Hortega, pesquisador espanhol, acrescentou a esse estudo que a mesoglia era um componente da microglia com origem no mesoderma e que elas diferiam de astrócitos e oligodendrócitos (KETTENMANN et al., 2011; KIM, S. U.; DE VELLIS, 2005; ROCK et al., 2004). Em 1932, essas células foram reconhecidas como componentes do Sistema Nervoso Central (KETTENMANN et al., 2011).

As microglias são originárias do mesoderma e se desenvolvem a partir de percursores mielóides primitivos localizados no saco vitelínico embrionário, surgindo antes do oitavo dia embrionário. Essas células se infiltram no cérebro durante a embriogênese e o início do desenvolvimento pós-natal, mantendo-se independentemente de seus progenitores hematopoiético embrionário (EGGEN et al., 2013; GOMES-LEAL, 2012; HARRY; KRAFT, 2012; NEIVA; MALVA; VALERO, 2014).

O termo "microglia" se referi a célula que reside no parênquima cerebral em estado quiescente e não ativado, com morfologia ramificada e que apresenta propriedades semelhantes àsquelas realizadas por macrófagos em outros sistemas. Constituem 15 a 20% do total de células da população cerebral, sendo mais numerosa na substância branca em relação à cinzenta (EGGEN et al., 2013; PATEL et al., 2013).

Morfologicamente, essas células são classificadas em: micróglias ativadas ou não ativadas. No estado não ativo apresentam um soma alongado e muitas ramificações que auxiliam no inspecionamento do microambiente ao redor

(CARTIER et al., 2014), participando do controle de sinapses evitando o acúmulo de detritos no tecido cerebral, bem como remodelando circuitos neurais através da limpeza, por fagocitose, de neurônios apoptóticos recém-nascidos (CATALIN et al., 2013; NEIVA et al., 2014; WAKE; MOORHOUSE; NABEKURA, 2011).

Na condição de ativada a célula microglial executa funções fagocíticas englobando microrganismos e fragmentos celulares após desordens agudas e crônicas no SNC. Nessa condição, expressam um grande número de tipos de receptores que sinalizam cascatas bioquímicas originando substâncias responsáveis pela defesa ou dano ao cérebro lesionado (BARRON, 1995; CATALIN et al., 2013; KIM, S. U.; DE VELLIS, 2005; ROCK et al., 2004).

1.4.2. Resposta Microglial após Acidente Vascular Encefálico (AVE).

Após Acidente Vascular Encefálico (AVE) as células microgliais alteram sua morfologia e expressam fenótipos distintos que ativam vias bioquímicas importantes ao processo de exacerbação ou diminuição da lesão no parênquima cerebral (XIA et al., 2015).

No AVE, a produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de citosinas, aumento da concentração do glutamato, ativação de receptores (CD14, TLR4) e o aumento da expressão de receptores P2 (P2x4; P2x7) sinalizam à ativação microglial, sua migração e atuação para área cerebral afetada (KIM, J. Y. et al., 2014; WAKE et al., 2011; XIA et al., 2015).

No centro e periferia da lesão isquêmica células microglias são evidenciadas em grande número, mas, a ação benéfica ou prejudicial executada no ambiente lesionado depende do fenótipo que essas células irão expressar. Há dois tipos de fenótipos microgliais bastante investigados durante desordens do sistema nervoso central: O fenótipo microglial M1 e M2. A expressão de M1 é identificada por marcadores pró-inflamatórios iNOS, CD 11b, CD 16, CD 32, IL- 1 β que conferem a esse fenótipo uma ação lesiva ao parênquima cerebral (XIA et al., 2015). A expressão a M1 não altera as funções fagocitárias e citotóxicas prejudiciais ao SNC e, estende-se até o 14º dia (KIM, J. Y. et al., 2014; XIA et al., 2015).

Entretanto, a expressão do fenótipo M2 representado pelos marcadores CD 206, Arg-1, Ym1/2, IL-10 e TGF- β confere maior integridade ao tecido lesionado proporcionando uma possível reocupação nessa área. O reparo e a regeneração

parecem ter relação com a elevada expressão de agentes anti-inflamatórios durante a expressão de M2(a) e M2(b/c), possibilitando a recuperação neural após uma lesão isquêmica (FRANCO; FERNANDEZ-SUAREZ, 2015; XIA et al., 2015).

Na área de penumbra isquêmica a expressão de fenótipo microglial M2 tem sido verificada por marcadores de receptores Ym1 presentes nas membranas dessas células. Essa expressão de M2 estende-se por sete 7 dias, diminuindo nos dias subsequentes em decorrência de menor expressão de RNAm de marcadores CD 206, Arg-1, Ym1/2, IL-10 e TGF- β desse fenótipo (HU et al., 2012; KIM, J. Y. et al., 2014; XIA et al., 2015).

1.4.3. Mecanismo de Transição dos Fenótipos Microgliais

Após acidente vascular encefálico (AVE) ocorre mudança no microambiente lesionado e ativação de células microgliais. Alguns estudos relatam que diferentes vias intracelulares regulam e determinam a expressão fenotípica da célula microglial (XIA et al., 2015).

A via NF- κ B (fator nuclear- Kappa Beta) tem importância nesse processo por potencializar a expressão de mediadores pró-inflamatórios IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , iNOS e COX-2 e ativar metaloproteinases de matriz que tornam a barreira hematoencefálica suscetível a lesão, agravando o quadro inflamatório. Este ambiente com elevada concentração de citocinas contribui à expressão de RNAm para marcadores de fenótipo microglial M1, destacam-se: IL- 1 β , TNF- α ; IFN- γ , IL-6. A via NF- κ B por ação de homodímeros NF- κ B p50 potencializa a expressão do fenótipo microglial M2 através de mediadores Arg-1, Ym1 e Fizz 1 suprimindo a atividade de STAT1 e a transcrição do gene M1, indicando que a atividade de transcrição do NF- κ B é essencial para modelar a expressão do fenótipo prejudicial M1(**figura 3**) (PORTA et al., 2009).

Outros fatores de transcrição participam na expressão do fenótipo microglial por influenciar a atividade da via NF- κ B. Em resposta ao LPS, a via NOTCH ativada sinaliza à produção de interferon gama (IFN- γ) através do co-recrutamento de p50 e cREL, bem como prolonga a ativação de NF- κ B mantendo o processo inflamatório e ampliando a neurotoxicidade induzida pela micróglia (ARUMUGAM et al., 2011; SHIN et al., 2006). NOTCH e NF- κ B ocasionam a inibição da expressão do receptor

ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- γ) essencial na indução do fenótipo microglial M2 (**figura 3**) (ZHAO, Y. et al., 2006).

Igualmente, o transdutor de sinal e ativador de transcrição STAT1 e STAT3 estão envolvidos na expressão do fenótipo microglial M1 após AVE por elevar a expressão de NF- κ B/p65 (**figura 3**). A supressão da atividade de STAT1 e STAT3 impossibilita a resposta inflamatória, diminui o volume do infarto e do edema após a isquemia cerebral (LENTSCH et al., 2001; YI et al., 2007).

A expressão do fenótipo microglial M2, no ambiente isquêmico, pode ser regulada pela via CREB através da transdução de sinal dependente da ativação da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), um nucleotídeo que funciona como modulador em vários processos fisiológicos. Associados a essas vias, estão os fatores de transcrição de genes da família C/EBP que irão promover a expressão de moléculas de IL-10 e arg-1 marcadores do fenótipo M2 (84). A C/EBP pode desencadear a expressão de M1, dependendo de qual via se ligue: a CREB ou NF- κ B (**figura 3**) (STEIN; COGSWELL; BALDWIN, 1993).

Após AVE ocorre a ativação das vias sinalizadoras intracelulares TLRs, PI3K/Akt importantes na modulação dos fenótipos microglias por ativarem o fator regulatório de interferon- 3 (IRF-3) que se transloca ao núcleo celular interagindo com o CBP, proteína ligada a CREB, que sinaliza a expressão do fenótipo M2 (80-90). A interação entre IRF-3 e CREB não está bem estabelecida, entretanto, a via CREB compete, por mesmos coativadores C/EBP e CBP, com a via NF- κ B para regular a expressão dos fenótipos microgliais M1 e M2 (**figura 3**) (GUO et al., 2014; RIDDER; SCHWANINGER, 2009).

Pelo exposto, a ação conjunta das vias CREB e NF- κ B são essenciais na modulação da expressão dos fenótipos microglias dentro no ambiente isquêmico instalado após acidente vascular encefálico.

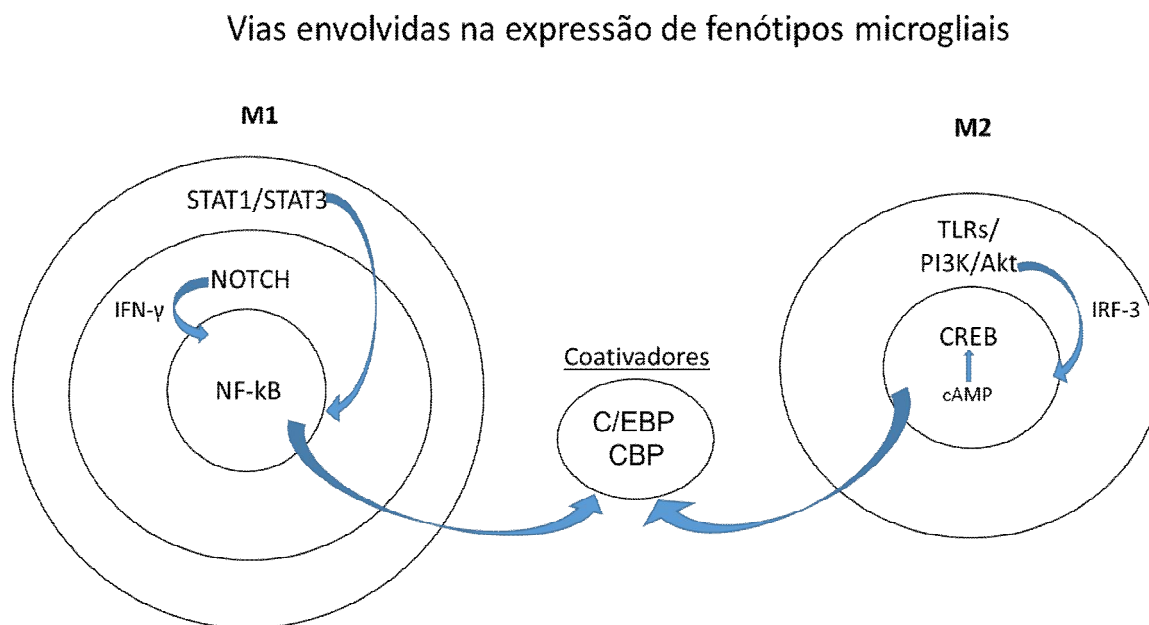


Figura 3: Diagrama mostrando as vias envolvidas na expressão dos fenótipos microgliais M1 e M2. À esquerda: NF-kB; NOTCH; STAT1/ STAT3 vias que modulam a expressão do fenótipo M1; À direita: CREB (cAMP); TLRs e PI3K/Akt (IRF-3) vias que modulam a expressão do fenótipo M2; Ao centro: C/EBP e CBP coativadores às duas vias de expressão microglial M1 e M2.

1.5. MINOCICLINA: ESTRUTURA E ASPECTOS CLÍNICOS

As tetraciclinas foram descobertas em 1948 como produto natural de fermentação da bactéria do solo, a *streptomyces aureofaciens*, com um alto poder antibiótico e bacteriostático (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006). Esses compostos possuem um mecanismo de bloqueio da síntese de proteínas por ligamento do seu sítio de afinidade ao correspondente na bactéria (subunidade 30S ribossomal) inibindo alostericamente a ligação do aminoácido acyl-tRNA neste sítio. Isso conferiu a esta família uma extensa ação contra bactérias aeróbicas e anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas (GARRIDO-MESA; ZARZUELO; GALVEZ, 2013; GRIFFIN et al., 2010; KIM, H. S.; SUH, 2009).

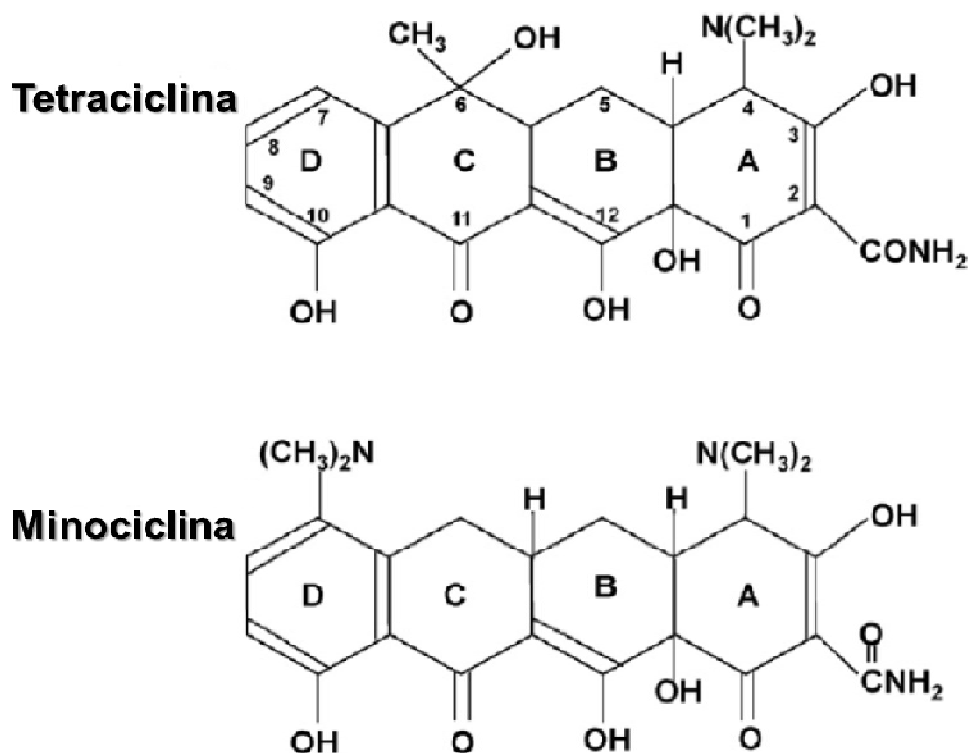


Figura 4: Estrutura química da tetraciclina e minociclina. Adaptado de KIM e SUH, 2009.

Alterações na estrutura química das tetraciclina possibilitou a formulação de novos componentes pertencentes à família das tetraciclina como a doxiciclina e a minociclina (**figura 4**) (GARRIDO-MESA et al., 2013; GRIFFIN et al., 2010).

A minociclina é identificada como uma molécula semissintética, de segunda geração, com peso molecular de 495 KDa e altamente lipofílica. Em sua estrutura química há um grupo di-metil-amino no carbono 7 do anel D, diferenciando-a da molécula de tetraciclina que possui um grupo funcional no carbono seis do anel C (**figura 4**). Essa conformação facilita, em ratos, a passagem pela barreira hematoencefálica (KIM, H. S.; SUH, 2009; YONG et al., 2004).

A ação neuroprotetora desse fármaco foi bem estabelecida em 1998 e 1999 quando Juha Yrjänheikk e colaboradores relataram o efeito neuroprotetor desse fármaco no córtex e hipocampo de ratos lesionados após isquemia global e focal. Nesses estudos foi nítida a preservação de células neuronais e a diminuição de substâncias tóxicas ao parênquima cerebral. Posteriormente, foi verificada a ação

desse composto sobre vias bioquímicas relacionadas a processos que desencadeiam a inflamação e a morte celular programada, conferindo a minociclina efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (KIM, H. S.; SUH, 2009; PLANE et al., 2010).

Essa funcionalidade da minociclina estende-se a outras vias de sinalização envolvidas no processo de inflamação após desordens no SNC. É singular a ação sobre a inibição de iNOS, Prostaglandina, metaloproteinases, modulação de células do sistema imune inato, linfócitos T, inativação de caspases 1 e 2, bem como a inibição da citocromo C e a redução da fosforilação de proteínas P38 (MAPKs) (FAGAN; CRONIC; HESS, 2011; GRIFFIN et al., 2010; PLANE et al., 2010; STIRLING et al., 2005).

A farmacocinética da molécula caracteriza-se por uma rápida absorção, quando administrada oralmente, pelo trato intestinal durante profilaxia de patologias em pacientes de diferentes faixas etárias. Em tratamentos prolongados o espectro de tolerância foi aceitável mesmo em doses acima de 200mg/dia. Entretanto, em pacientes com hipersensibilidade ao fármaco foi relatado: desordens digestivas e vestibulares, mudanças da coloração dentaria, hipertensão, lúpus e hepatite autoimune (BLUM et al., 2004; GARRIDO-MESA et al., 2013).

A Medicines e Health care Products Regulatory Agency e a Food and Drug Administration (FDA) protocolou excelentes resultados com uso da minociclina em tratamentos de condições crônicas, tais como: acne vulgares (100-200mg/dia), rosácea e algumas doenças sexualmente transmissíveis (BLUM et al., 2004; GARRIDO-MESA et al., 2013; GOOD; HUSSEY, 2003). A ação benéfica em periodontites, artrite reumatoide e esclerodermia conduziram à utilização desse fármaco como estratégia terapêutica em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas: acidente vascular encefálico (AVE), lesão da medula espinhal (LAME), trauma crânio encefálico (TCE), esclerose lateral amiotrófica (ELA), esclerose múltipla (EM), Doença de Parkinson (DP), doença de Huntington (DH) e doença de Alzheimer (DA) (KIM, H. S.; SUH, 2009; YONG et al., 2004).

Garrido-Mesa, Zarzuelo e colaboradores relatam à utilização da minociclina em modelos experimentais de doenças inflamatórias e/ou correlacionadas ao sistema imune com objetivo de investigar se a resposta farmacocinética apresenta resultados semelhantes aos encontrados em desordens do sistema nervoso central (GARRIDO-MESA et al., 2013).

1.6. HIPOTESE EXPERIMENTAL

Sabe-se que o AVE é a segunda causa, mais comum, de morte no mundo e que aproximadamente 1/6 de todos os seres humanos podem sofrer pelo menos um evento isquêmico durante a vida, causando incapacidade ao indivíduo que se torna dependente de seus familiares ou até mesmo de profissionais de saúde especializados (MURRAY; LOPEZ, 1997; SESHADRI et al., 2006).

A expectativa de vida no mundo tem aumentado e especialistas e pesquisadores, em saúde pública, estimam mais casos de AVE. A variabilidade clínica do AVE, principalmente em termos de causas, duração, localização e gravidade da isquemia tem relação com doenças sistêmicas que reforçam a necessidade de se ampliar a atenção da pesquisa clínica para um grupo maior de pacientes com essa patologia (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007; WANG et al., 2007).

Nesse contexto, as mudanças no modo de vida das pessoas, em países em desenvolvimento, bem como os fatores de risco como a aterosclerose, hipertensão, diabetes, e outros, contribuem para o aumento do número de casos de acidente vascular cerebral (AVE). No Brasil o AVE é a principal causa de morte em diversas faixas etárias, sendo o quadro de óbitos mais relacionado à origem isquêmica (20%) dessa patologia e, em casos de sobrevivência, o paciente fica incapacitado de realizar atividades cotidianas simples (DE CARVALHO et al., 2011; MANIVA; DE FREITAS, 2012).

Várias drogas têm sido testadas em modelos experimentais de AVE em roedores e primatas não humanos com excelentes resultados, mas sem muita eficácia em humanos (KASTE, 2005; LEES et al., 2006). Atualmente, o (Rt-PA) - ativador do plasminogênio tecidual recombinante – é a única terapia aprovada para AVE isquêmico agudo (NINDS, 1995). Um fármaco derivado da família das tetraciclinas, a minociclina, vem sendo utilizado em ensaios clínicos para o tratamento do AVE e em outras doenças crônicas devido a ação anti-inflamatória e neuroprotetora.

Essa funcionalidade desse fármaco, estende-se a outras vias de sinalização envolvidas no processo de inflamação após desordens no SNC, sendo singular a ação sobre a inibição de compostos diretamente envolvidos em vias bioquímicas que sinalizam para ativação de células gliais no parênquima cerebral lesionado

(FAGAN et al., 2011; GRIFFIN et al., 2010; PLANE et al., 2010; STIRLING et al., 2005). Essas modificações em vias específicas à ativação dos mecanismos que acarretam a modulação microglial no ambiente isquêmico de forma benéfica e/ou prejudicial ratifica o uso de tratamento com fármacos que interfiram nas vias que potencializam a expressão de células prejudiciais ao parênquima lesionado.

Portanto, investigar se a minociclina atua sobre as vias de inibição microglial, configura-se como um estudo direcionado ao papel neuroprotetor desse fármaco após AVE, sendo possível que o efeito benéfico da minociclina ocorra pela modulação dos fenótipos microgliais, ou seja, maximizando os efeitos do fenótipo M2 e minimizando os do fenótipo M1 após isquemia focal do córtex motor de ratos adultos, hipótese a ser investigada nessa dissertação.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivos Gerais

Investigar se o tratamento com minociclina modula os fenótipos microgliais M1 e M2, maximizando os efeitos do fenótipo M2 e minimizando a expressão do fenótipo M1 em diferentes tempos de sobrevida após isquemia focal do córtex motor de ratos.

1.7.2. Objetivos Específicos

- a. Descrever a distribuição do infiltrado celular e a perda tecidual em toda extensão da lesão, bem como a neuroinflamação após isquemia focal induzida no córtex motor por microinjeções de ET-1;
- b. Descrever qualitativamente e quantitativamente a preservação de corpos neuronais ocasionados pelo tratamento com minociclina após lesão isquêmica induzida no modelo experimental proposto.
- c. Descrever qualitativamente e quantitativamente a densidade de células microgliais que expressam os fenótipos M1 e M2 em diferentes tempos de sobrevida após isquemia focal do córtex motor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Aspectos Éticos

Para a realização desse estudo todos os procedimentos experimentais, incluindo a manipulação de animais foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA) -BIO- 0911.

2.2. Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos adultos da raça Wistar do sexo masculino com peso entre 250 à 300g. Os grupos experimentais foram subdivididos em procedimentos experimentais adequados a cada tempo de sobrevivência, conforme descrito abaixo:

2.2.1. Grupo Controle e Tratado Com Tempo de Sobrevivência de 07 dias

Foram selecionados 10 animais (controle, N=05; tratado, N=05) com peso adequado à realização do procedimento cirúrgico ao estabelecimento da lesão isquêmica no córtex motor por microinjeção de endotelina-1. Após a constatação da lesão, os animais destinados ao grupo controle receberam o tratamento por via intraperitoneal com solução salina estéril (PBS) e os do grupo tratado a solução contendo a quantidade em massa (mg/kg) do fármaco minociclina pela mesma via.

2.2.2. . Grupo Controle com Tempo de Sobrevivência de 14 dias e 30 dias

Foram selecionados 10 animais (controle 14 dias, N=05; controle 30 dias, N=05) com peso adequado à realização do procedimento cirúrgico ao estabelecimento da lesão isquêmica no córtex motor por microinjeção de endotelina-1. Após a constatação da lesão, os animais destinados aos grupos de 14 e 30 dias de sobrevivência receberam o tratamento por via intraperitoneal com solução salina estéril (PBS).

2.3. Procedimentos Cirúrgicos e Indução de Isquemia Focal por Microinjeções de Endotelina- 1

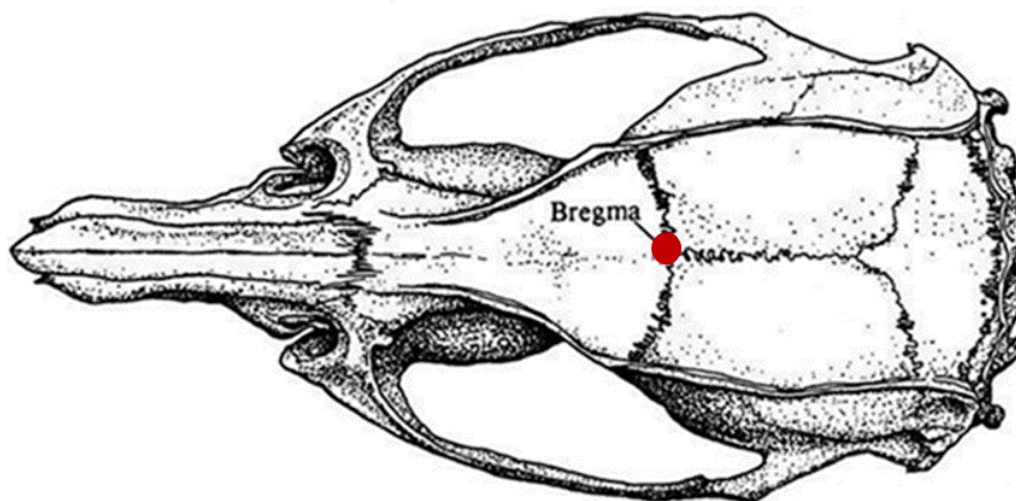
Antes dos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Vetanarcol[®], Köning. 72 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (Kensol[®], Köning. 9 mg/Kg). Verificada a ausência dos reflexos de retirada de pata e corneano, os animais foram colocados sobre um aparelho estereotático (Insight[®] EFF-336), sob a proteção de uma manta térmica.

As coordenadas adotadas a partir do bregma foram: +2,3 mm, anterior; +1,2 mm, médio-lateral; e -0,5 mm, dorso-ventral, a partir da superfície cortical (**figura 5**). Uma incisão longitudinal foi feita com bisturi, para exposição da caixa craniana e no ponto especificado pelas coordenadas estereotáticas, foi realizada craniotomia com auxílio de broca cirúrgica odontológica de baixa rotação para exposição da superfície cortical.

A concentração de endotelina-1 foi injetada com auxílio de uma micropipeta de vidro graduada (Sigma-Aldrich, Hirschmann) na concentração de 80 pMols, diluída em 1 µl de corante azul colanil, de modo a permitir a localização da área de injeção. A micropipeta permanecerá fixa por cinco minutos no parênquima neural visando evitar possíveis refluxos.

Após os procedimentos cirúrgicos os ratos foram observados, em intervalos regulares, visando o monitoramento da recuperação e da evolução dos sintomas causados pelo dano isquêmico e deverão ser mantidos em gaiolas-padrão individuais durante o tempo de sobrevivência de sete, quatorze e trinta dias.

A



B

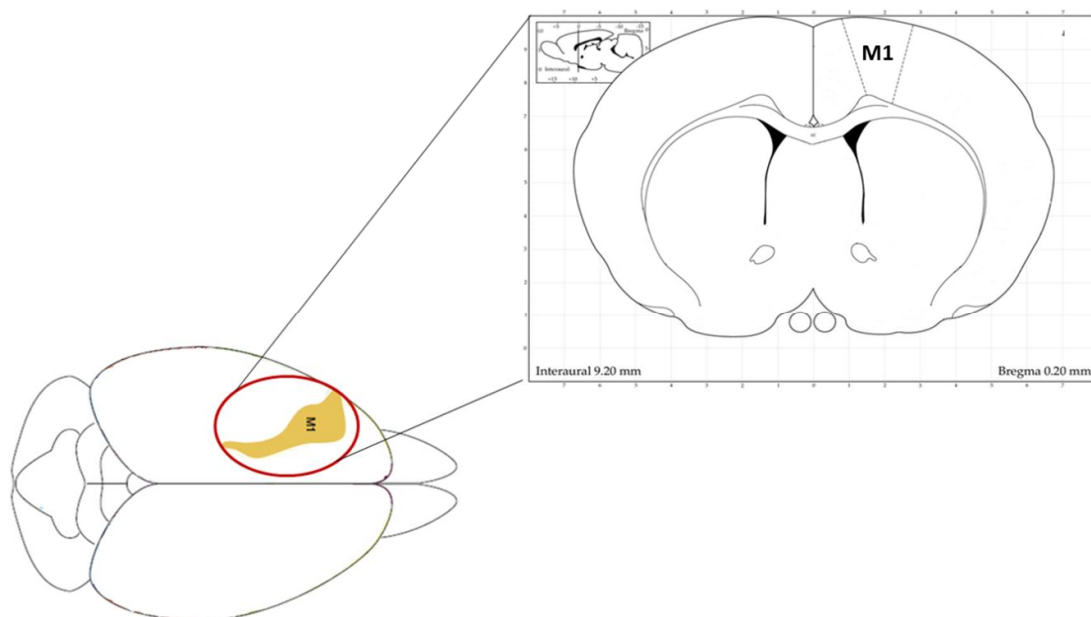


Figura 5: Em “A” local de referência (bregma) para retirada das coordenadas esteriotáticas à microinjeção de endotelina-1; em “B” desenho esquemático da região cortical do hemisfério esquerdo (área motora M1) de um encéfalo de rato; box: figura em corte coronal mostrando a extensão lateralmente e em profundidade da área motora no córtex. Adaptado de (PAXINOS; WATSON; EMSON, 1980).

2.4. Tratamento com Tetraciclina: Minociclina e Solução Estéril (PBS)

Os animais isquêmicos receberam o tratamento por via intraperitoneal com a minociclina após 2 horas do estabelecimento da lesão isquêmica por injeção de endotelina-1 e, em dia subsequente, no intervalo de 12 em 12 horas. Entretanto, a partir do terceiro dia foi injetada somente a metade da dose inicial até o sétimo dia. As concentrações utilizadas durante o tratamento foram 50mg/kg de minociclina (Sigma Aldrich) no estabelecimento da lesão e 25mg/kg, no intervalo de 12 horas, duas vezes ao dia e a partir do terceiro dia de tratamento (YRJÄNHEIKK et al; 1998) (**figura 6**). Os animais isquêmicos controles receberam injeções de solução estéril (PBS) por via intraperitoneal obedecendo ao mesmo cronograma de tratamento para injeção de minociclina.

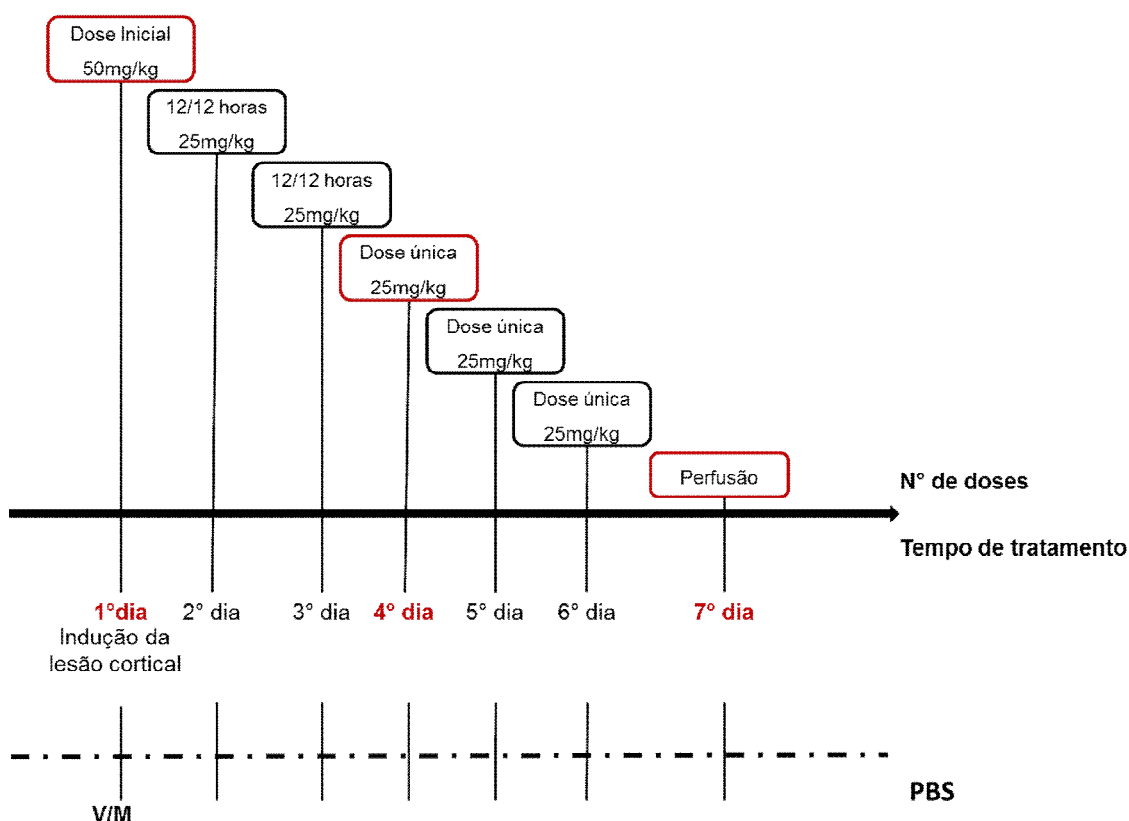


Figura 6: Cronograma do tratamento com minociclina e PBS. Linha horizontal: tempo de tratamento em dias; linhas verticais: dose diária intraperitoneal em mg/kg nos animais tratados; linha pontilhada: solução salina estéril (PBS) volume/massa (V/M) injetado intraperitoneal (i.p) nos animais controles.

2.5. Perfusão e Processamento Histológico

Ao término do período de sobrevida de cada grupo experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetanarcol[®], König 72mg/kg) e cloridrato de xilazina (Kensol[®], König 9mg/kg). Abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os mesmos foram perfundidos na região do ventrículo esquerdo do coração com 300-400 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 300-400 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4).

Os encéfalos foram retirados e pós-fixados por 24 h em paraformaldeído 4% tamponado e crioprotégidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose em 25%, 50%, 100% diluídos em mistura de glicerina com tampão fosfato (0,05 M- pH 7,2 – 7,4). Após a crioproteção foram incluídos em Tissue-Tek[®] (Sakura) para congelamento à -35°C em câmara de criostato (Microm HE 505E) e, posteriormente, seccionados por navalhas INOX fixados em criostato para obtenção de secções a 40µm que foram armazenadas em recipientes contendo solução de etilenoglicol (anti-freezer) e conservadas em um freezer a -20°C para uso posterior em protocolos de histoquímica, imuno-histoquímica e imunofluorescência dupla.

2.6. Análise Histopatológica, Imuno-histoquímica e Imunofluorescência

2.6.1. Análise Histopatológica Geral

A análise histopatológica foi realizada pela coloração de Nissl-Violeta de cresil, que permitirá a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações patológicas (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; GUIMARAES et al., 2009).

Para identificar o local exato da lesão isquêmica foram utilizadas secções coradas em diferentes pontos, anteriores e posteriores a área de injeção de endotelina-1. As secções mais próximas do centro da lesão foram escolhidas para análise histopatológica.

2.6.2. Imuno-histoquímica

Corpos neuronais foram marcados com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon-Millipore), que marcarão um epítipo específico no núcleo de neurônios maduros (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992) obedecendo o seguinte protocolo:

As secções foram retiradas da solução anti-freezer e aderidas às lâminas microscópicas. Em seguida, foram colocadas na estufa (Brasdonto, BrClave) a 40 °C por 20 minutos para depois serem delimitadas com Pap-PEN (Invitrogen), de modo a concentrar por mais tempo as gotas de soluções que por cima delas foram despejadas. Em seguida, foram lavadas em PBS por 5 minutos para remoção do excesso de tissue-tek e imersas em tampão borato (0,2M; ph 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções foram secas por 20 minutos à temperatura ambiente e lavada em PBS por 5 minutos para que fossem submetidas ao tratamento com solução de metanol (QEEL) – peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) (1ml de H₂O₂ para cada 100 ml de metanol absoluto) sob agitação constante. Passada essa fase, elas foram lavadas por 3 vezes (5 minutos cada) em solução PBS/Tween (Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1h em soro normal de cavalo a 10% em câmara úmida. Passada esta hora, o anticorpo primário NeuN é incubado durante 24 horas. Após a incubação em anticorpo primário, as secções foram lavadas por três vezes (5 minutos cada) na solução de PBS/Tween® e incubadas por 2h no anticorpo secundário biotilado anti-camundongo feito em cavalo (1:200, NeuN). Após esse período, três lavagens foram realizadas (5 minutos cada) em PBS/Tween® para que as secções fossem incubadas no complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector®, kit ABC Vectastain®) por 2h. Finalizando, as secções foram lavadas 4 vezes (4 tempos de 5 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). Após lavagem as secções foram incubadas em uma solução contendo 250ml de PB 0,1M (pH 7,2–7,4), juntamente com 125mg de DAB e 130µl de H₂O₂ e, posteriormente, monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação seja adequada. Após o término da revelação as secções foram lavadas em PB 0,1M (pH 7,2–7,4) e desidratadas em gradientes de álcool /xileno para a montagem com lamínulas e Entellan (Merck).

2.6.3. Imunofluorescência Dupla

A identificação dos diferentes fenótipos microgliais foi realizada por imunofluorescência dupla, com o anticorpo ED-1 (1: 500) usado como marcador de micróglia/ macrófagos ativados e os anticorpos Arginase- I (1: 200) como marcador de micróglia do tipo M2 e o anticorpo iNOS (1: 100) como marcador para o fenótipo M1.

A marcação em vermelho pelo cy3 conjugado Donkey anti-rabbit (1: 200) identifica as células microgliais ativadas e a marcação verde obtida pelo Alexa 488 (1:200) marca os fenótipos microgliais M1 e M2.

Inicialmente, as secções de animais isquêmicos foram lavadas em solução salina tamponada (PBS) e, posteriormente, colocadas em álcool metílico a 100% por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas em uma mistura de soro de jumento e cavalo a 5% por 1 hora. Por conseguinte, as secções foram incubadas em anticorpos primários ED-1/ iNOS e ED-1/ ARG- 1 e ficaram em câmara fria até o outro dia. Após o período de incubação no anticorpo primário as secções foram lavadas na mistura de soro de jumento e cavalo a 5% e incubadas com anticorpo secundário fluorescente contendo estreptavidina e o biotinilado não fluorescente por 2 horas e 30 minutos.

Finalizando, as secções foram lavadas em solução salina tamponada (PBS) e incubadas com o componente fluorescente Alexa 488 por um período de tempo de 2 horas e, em seguida, foram lavadas em solução salina tamponada (PBS) e montadas em lâminas gelatinizadas.

2.7. Análise Qualitativa e Quantitativa

As secções de todos os grupos experimentais, marcadas pelos métodos imuno-histoquímicos, histoquímicos e por imunofluorescência foram analisadas em sistemas de microscopia óptica. Para as secções coradas e marcadas por métodos histoquímicos ou imuno-histoquímicos a verificação foi feita em microscópio Binocular (Modelo Eclipse- E200MV R) e as imagens dos campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (Moticam[®]-5500- 5M pixels) acoplada ao microscópio óptico (Nikon[®], ECLIPSE 50i).

As marcações por imunofluorescência foram verificadas por um sistema de microscopia de fluorescência (BioRad Microscience) e as imagens foram capturadas com auxílio de uma câmera fotográfica (Moticam® – 5500 – 5 M Pixels) acoplada ao microscópio.

Para a verificação quantitativa foram feitas contagens das células microgliais no ambiente isquêmico duplamente marcadas, utilizando-se uma gradícula de dimensões (comprimento C= 29,5 cm; largura L= 21,0 cm) com quatro quadrantes de mesma área 133,0 cm² acoplado a tela do computador contendo o software de reprodução de imagens Adobe Photoshop C S6.

2.8. Análise Estatística

As avaliações dos dados numéricos foram feitas por estatística descritiva, em que os valores de média e erro padrão foram obtidos. As comparações entre os diferentes tempos de sobrevida foram feitas por análise de variância, e nível de significância $P < 0.05$. O teste t de Student foi utilizado para os animais controle e tratados para amostras não pareadas (nível de significância $P < 0.05$). A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad (Prism 5.0).

3. RESULTADOS

3.1. Análise Histopatológica da Lesão Isquêmica no Córtex de Ratos Machos, após Microinjeções de endotelina-1

A indução de lesão isquêmica focal na região cortical, área motora (M1), por microinjeções de endotelina-1, em ratos machos Wistar adultos, na concentração de 80 pMols ocasionou perda tecidual e infiltração de células na região isquêmica quando as secções foram coradas por técnica histoquímica - violeta de cresila.

Esse padrão histopatológico foi observado em todos os grupos experimentais tratados e controles. Nos animais com o tempo de sobrevivência de 7d após a lesão, o infiltrado celular apresentou uma distribuição equitativa por toda região próxima ao centro isquêmico (**figura 7**).

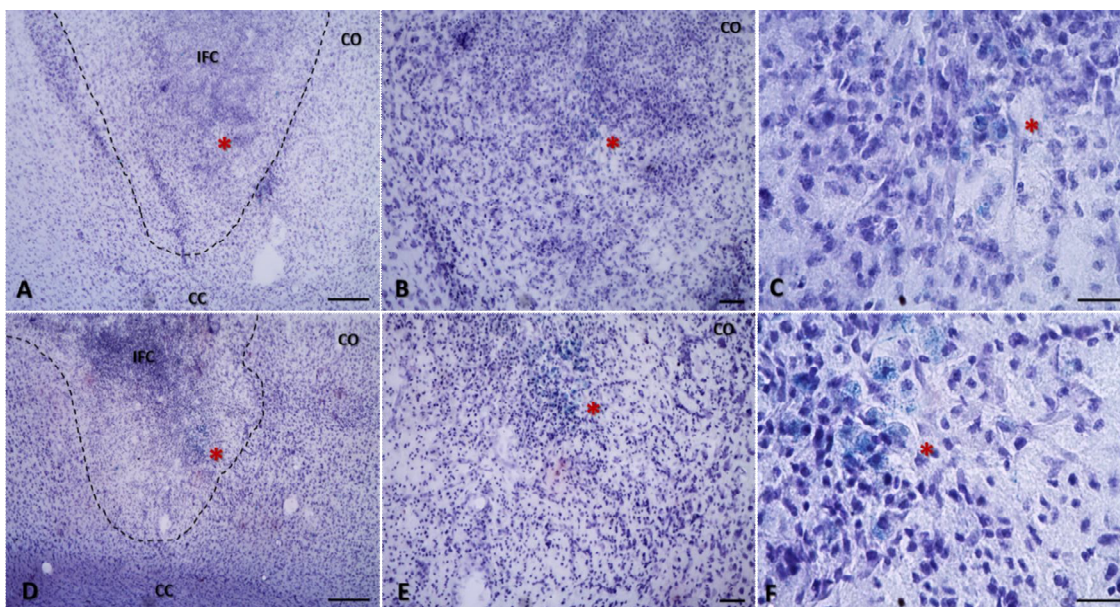


Figura 7: Análise histopatológica da área da lesão; coloração por Violeta de Cresila. Em **A, B e C**: animal controle (7d após lesão); em **D, E e F**: animal tratado (7d após lesão). **Linha pontilhada em A e D**: Delimita toda extensão da área de lesão. Infiltrado celular (**IFC**); Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala:** 200μm (A e D); 50 μm (B e E) e 30 μm (C e F).

Entretanto, nos animais controle com sobrevivência de 14 e 30 dias foi observado uma distribuição de infiltrado celular distinta àquela observada nos animais controles e tratados com sobrevivência 7d. No grupo experimental de 14 dias a distribuição do infiltrado celular parece ser menor em relação ao tempo de 7d, em ambos os grupos

experimentais. Resultado semelhante ao grupo de 30 dias, porém um padrão de distribuição maior no centro de lesão manteve-se idêntico aos outros tempos de sobrevida nos grupos experimentais controle e tratado (**Figura 7 e 8**).

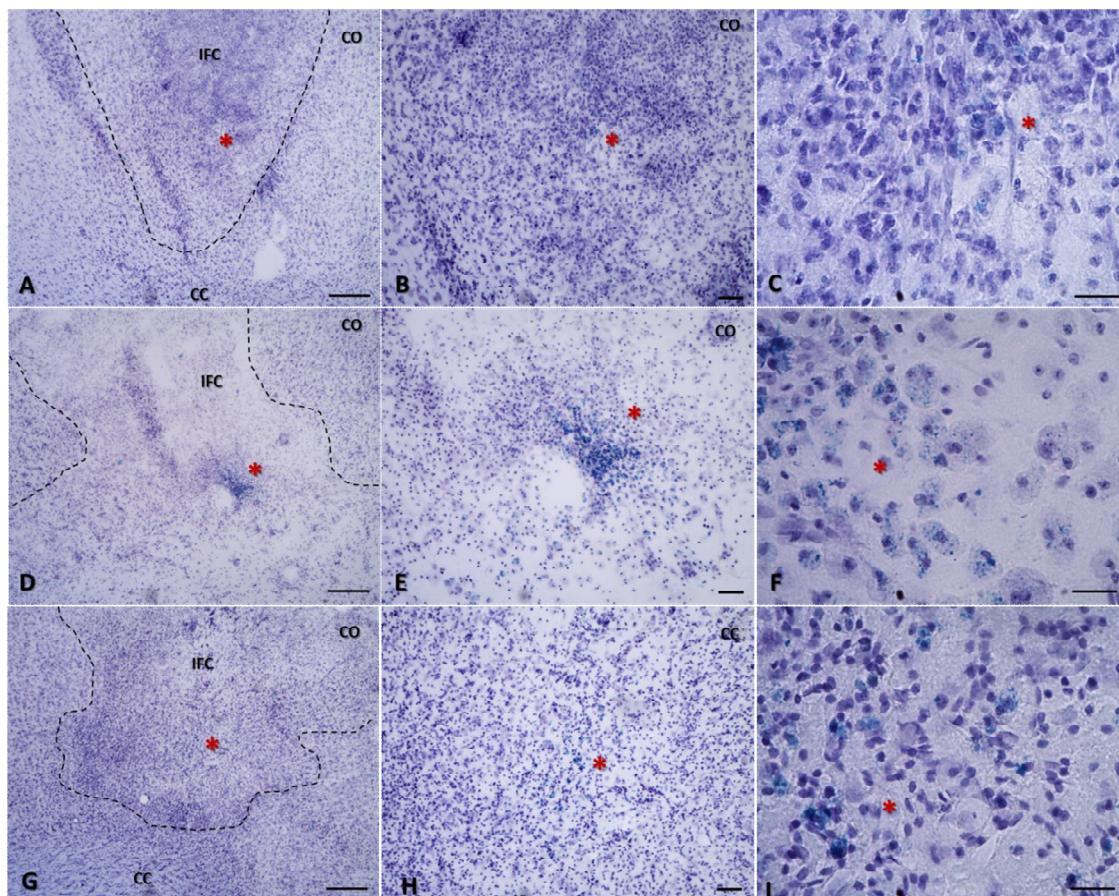


Figura 8: Análise histopatológica da área da lesão; coloração por Violeta de Cresila. Em **A, B e C**: animais controle (7 d após lesão); em **D, E e F**: Animais controle (14d após lesão); em **G, H e I**: animais controle (30d após lesão). **Área pontilhada**: Extensão da área de lesão; infiltrado celular (**IFC**); Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala**: 200 μ m (**A, D e G**); 50 μ m (**B, E e H**); 30 μ m (**C, F e I**)

3.2. A Perda Neuronal Após Microinjeções de Endotelina-1 no Córtex Motor Concomitante ao Tratamento com Minociclina.

Corpos neuronais identificados após marcação por imuno-histoquímica com o anticorpo anti-NeuN revelou que a perda de neurônios foi maior nos animais que sofreram a lesão isquêmica e que foram tratados durante 7 dias após a lesão com a solução salina estéril quando comparados aos animais lesionados e tratados com minociclina em mesma janela temporal.

Essa diferença não foi evidenciada no centro de lesão, em ambos os grupos experimentais. A maior preservação de neurônios na região periférica a lesão no grupo tratado (**figura 10**) foi ratificada após análise quantitativa do número de corpos neuronais nessa região (células Neu-N+). As densidades médias dos corpos neuronais por campo foram claramente maiores no grupo tratado que nos grupos controles. Os grupos tratados apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$, teste t de Student) quando comparados aos grupos controles (**figura 11**). Por conseguinte, percebeu-se menor área de lesão no grupo tratado com minociclina em relação ao grupo tratado com solução salina estéril (**figura 9 A e D**).

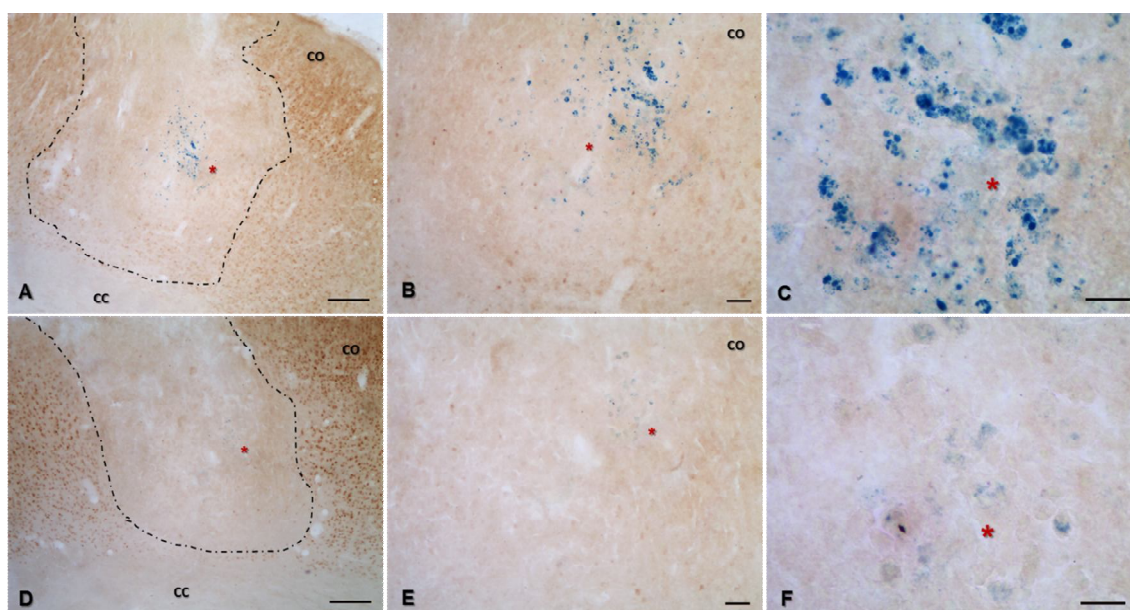


Figura 9: Análise imuno-histoquímica da área de lesão. Marcação de corpos neuronais no centro e periferia da lesão após 7 dias do evento isquêmico. Imagens A, B e C mostram a área de lesão e células Neu-N+ em animais controle; imagens D, E e F a lesão e células Neu-N+ em animais tratados. **Área pontilhada:** área de lesão; **Córtex cerebral (CO);** **Corpo caloso (CC);** asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala:** 200 μm (A e D); 50 μm (B e E); 30 μm (C e F).

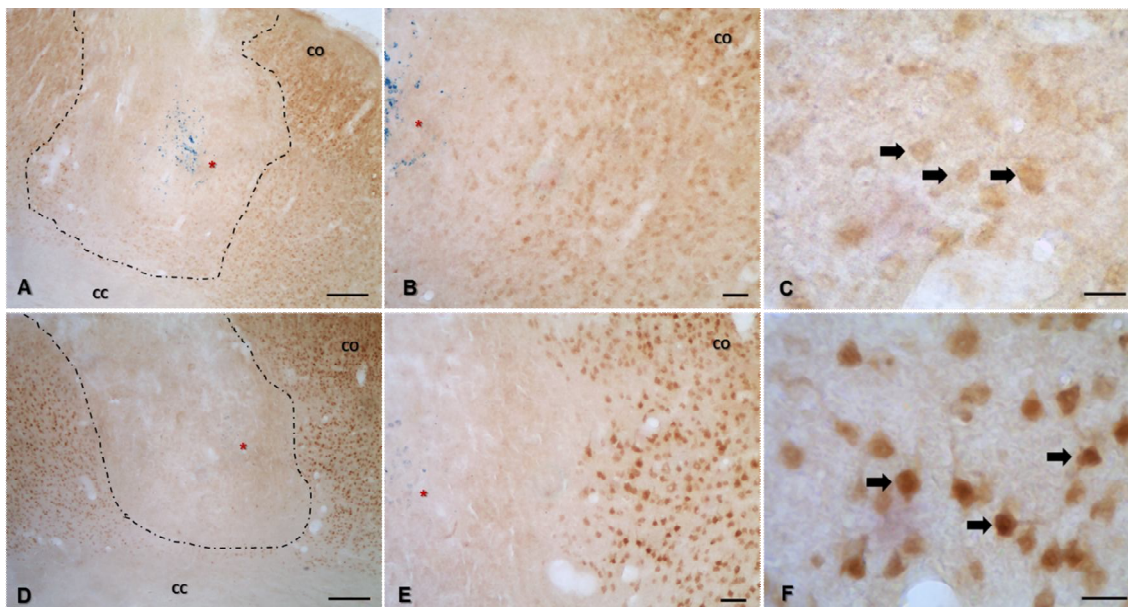


Figura 10: Análise imuno-histoquímica da área de lesão. Marcação de corpos neuronais no centro e periferia da lesão isquêmica. Em A, B e C grupo controle e D, E e F grupo tratado ; em C e F destaque para os corpos neuronais (células Neu-N+; setas pretas). **Área pontilhada:** área de lesão; Córtex cerebral (**CO**); Corpo caloso (**CC**); asterisco (vermelho): local de injeção da endotelina-1 (ET-1). **Barra de escala:** 200 μ m (A e D); 50 μ m (B e E); 30 μ m (C e F).

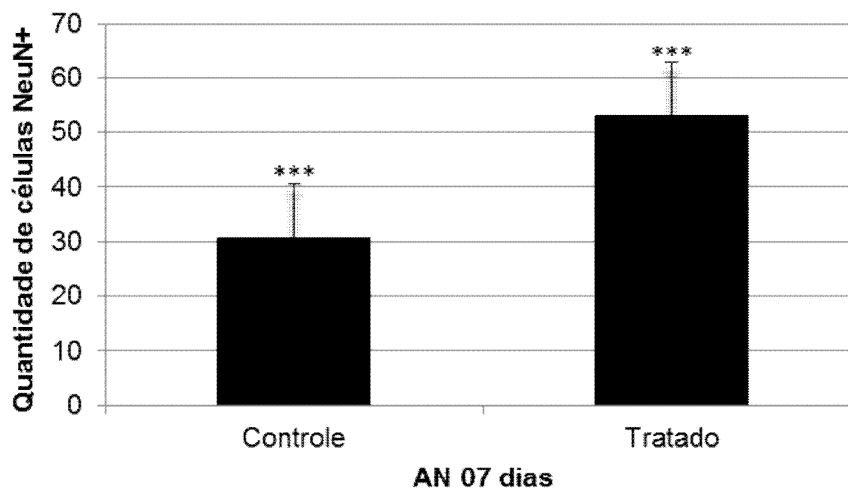


Figura 11: Análise quantitativa de células Neu-N+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico induzido por ET-1. *** comparação entre os grupos. AN 07 (animais 7 dias) ($p < 0,05$).

3.3. Imunofluorescência Dupla de Células Microgliais M1 e M2 no Córtex Motor Após Lesão Isquêmica por Microinjeção de Endotelina-1.

A marcação por imunofluorescência para identificar a presença de células microglias ED1+ na área de lesão mostrou que essas células se distribuem por todo ambiente isquêmico. Evidenciou-se em todos os grupos experimentais uma nítida diferença na densidade dessas células quando se comparou o grupo tratado com minociclina ao grupo controle, animas que receberam salina estéril como tratamento (figura 12, 13, 14 e 15).

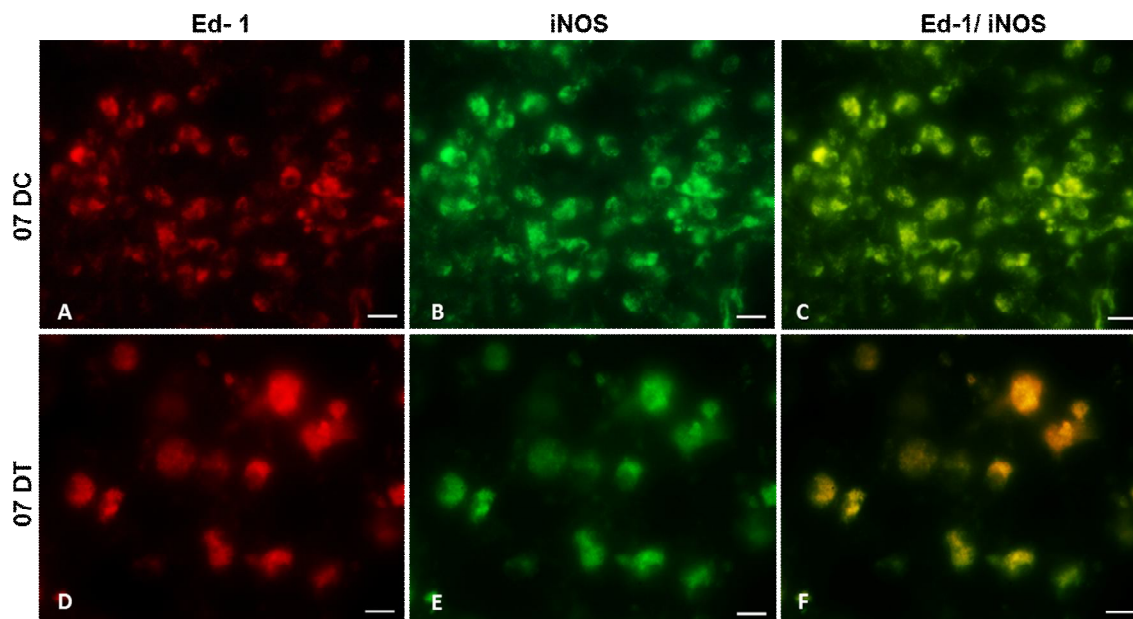


Figura 12: Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A e D); células micróglias iNOS+ (B e E) ; células duplamente marcadas Ed1+/ iNOS+ (C e F). **07 DC:** grupo controle (após sete dias de sobrevivência); **07 DT:** grupo tratado (após sete dias de sobrevivência). **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F).

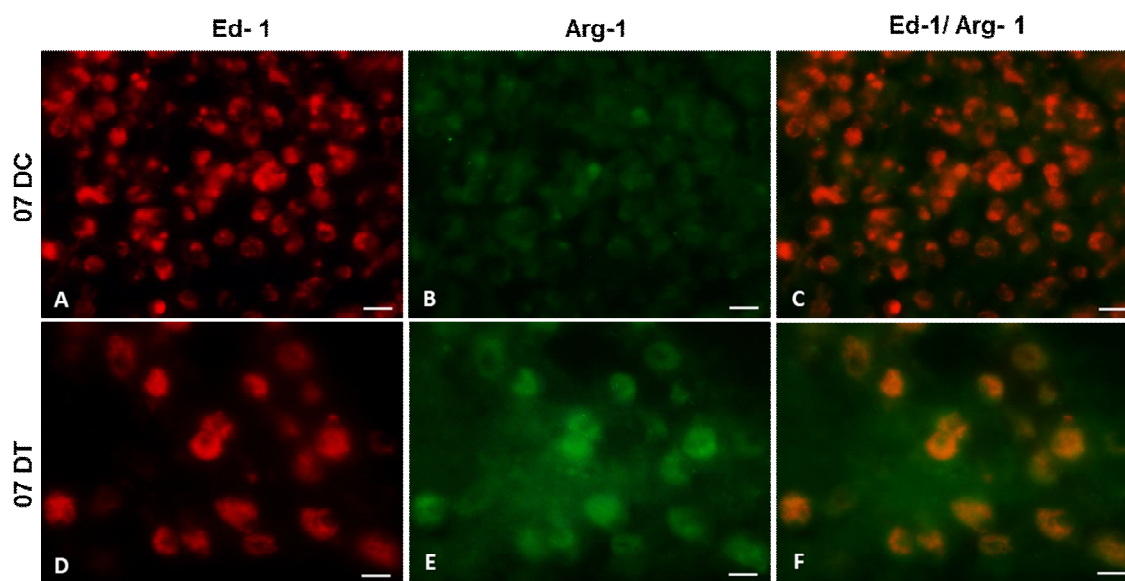


Figura 13: Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A e D); células micróglia Arg1+ (B e E); células duplamente marcadas Ed1+/ Arg1+ (C e F). **07 DC:** grupo controle (sete dias de sobrevivência); **07 DT:** grupo tratado (sete dias de sobrevivência). **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F).

Por conseguinte, as marcações pelos anticorpos INOS e Arg- I revelaram a presença dos fenótipos microgliais M1 e M2 na área de lesão. Observação confirmada após sobreposição das células marcadas (ED1+/ INOS; ED1+/ Arg-I) no meio isquêmico (**figura 12 e 13: C e F; 14 e 15: C, F e I**).

Em relação aos grupos controles de 7, 14 e 30 dias, a presença de células microgliais ED1+ foram evidenciadas, mas a expressão do fenótipo microglial M1(células INOS+) na área de lesão foi maior que a expressão do fenótipo microglial M2(células Arg-I+) em todos os tempos de sobrevivência, observação confirmada pela sobreposição das células marcadas ED1+/INOS+ e ED1+/ Arg-I+ (**figura 14 e 15**). As densidades médias das células microgliais INOS+ (fenótipo M1), por campo, foram maiores em relação às células microgliais Arg-I+ (fenótipo M2) apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$, ANOVA- TUKEY) quando comparados entre si (**figura 16, 17 e 18**).

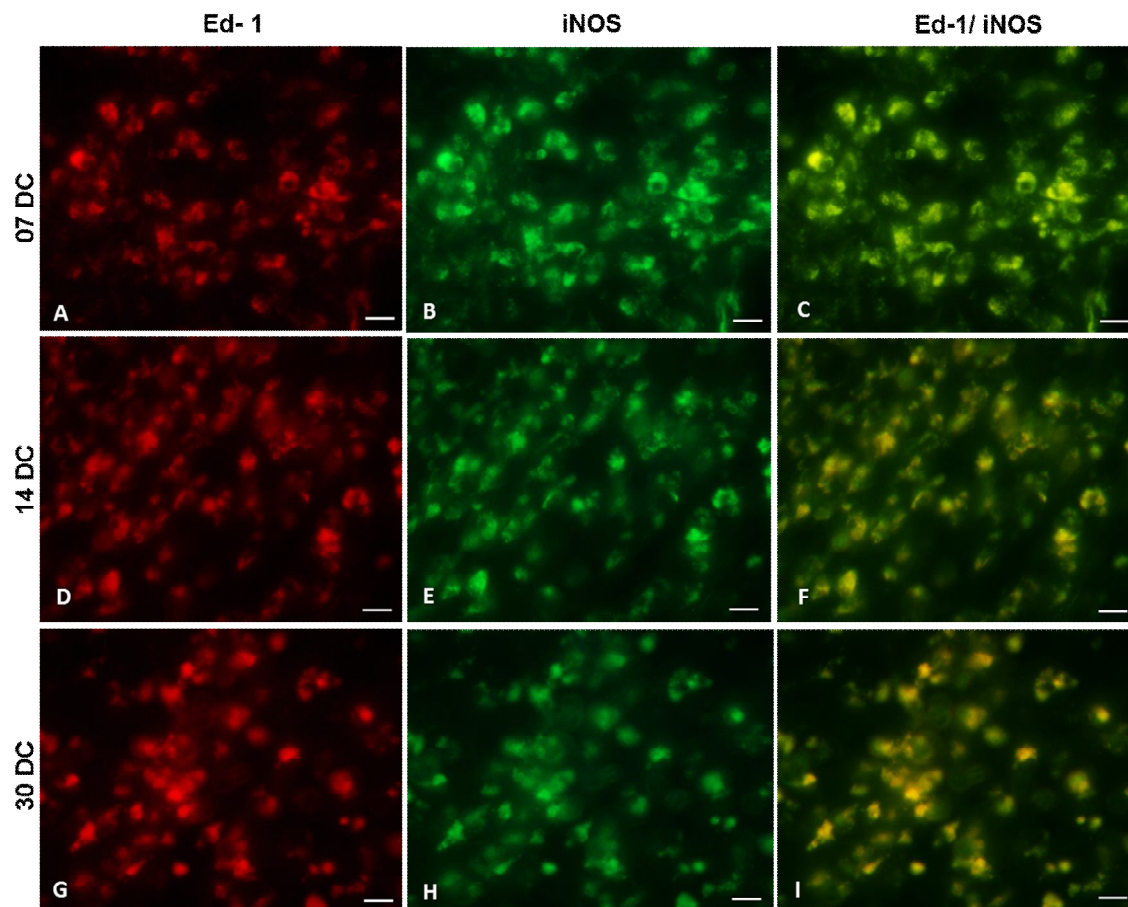


Figura 14: Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A,D,G); células micróglias iNOS+ (B,E,H); dupla marcação Ed1+/ iNOS+ (C,F,I). **07 DC:** grupo controle (7 dias de sobrevida); **14 DC:** grupo controle (14 Dias de sobrevida); **30 DC:** grupo controle (30 dias de sobrevida) . **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F).

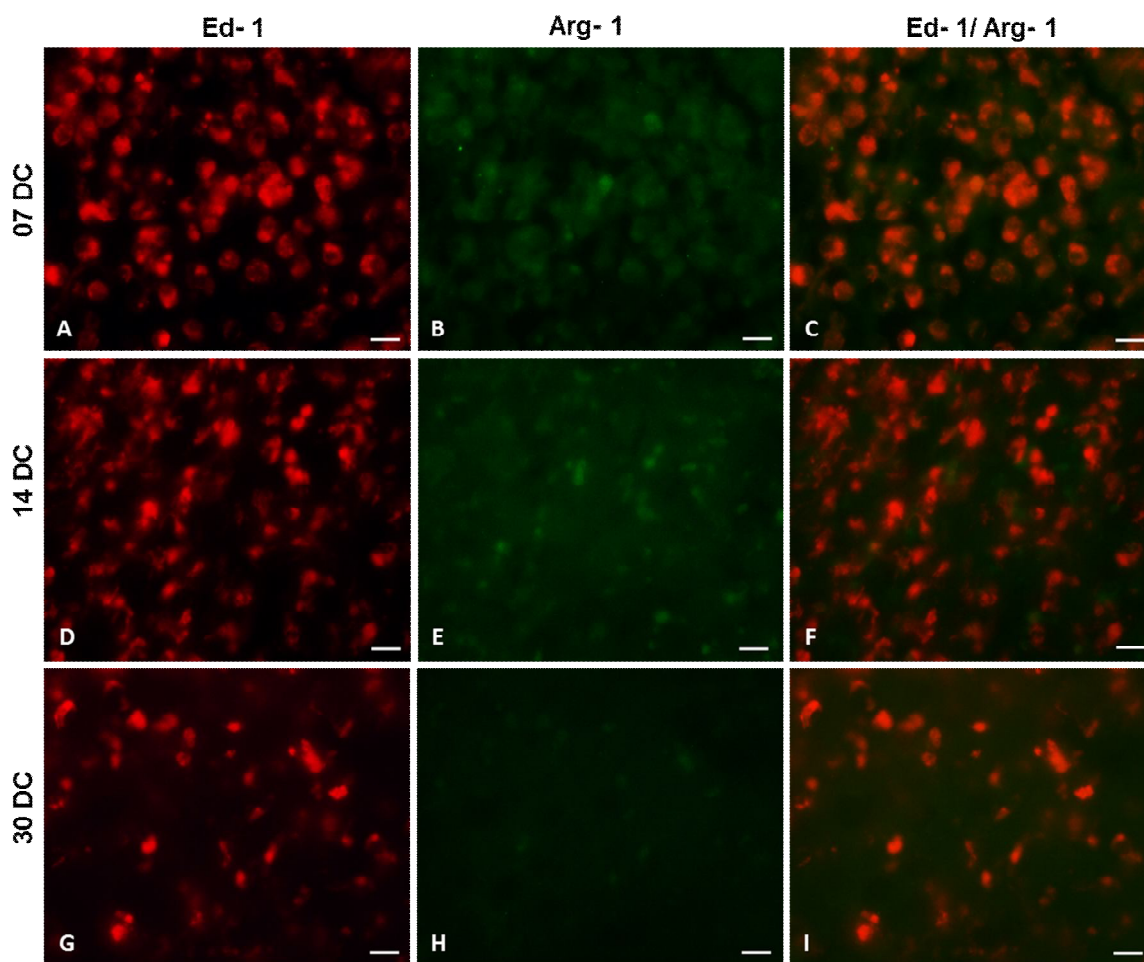


Figura 15: Imunofluorescência dupla na área de lesão isquêmica. Imagens: células microgliais Ed1+ (A,D,G); células micróglia Arg1+ (B,E,H); dupla marcação Ed1+/ Arg1+(C,F,I). **07 DC:** grupo controle (7 Dias de sobrevivência); **14 DC:** grupo controle (14 Dias de sobrevivência); **30 DC:** grupo controle (30 Dias de sobrevivência) . **Barra de escala:** 75 μ m (A, B, C, D, E e F).

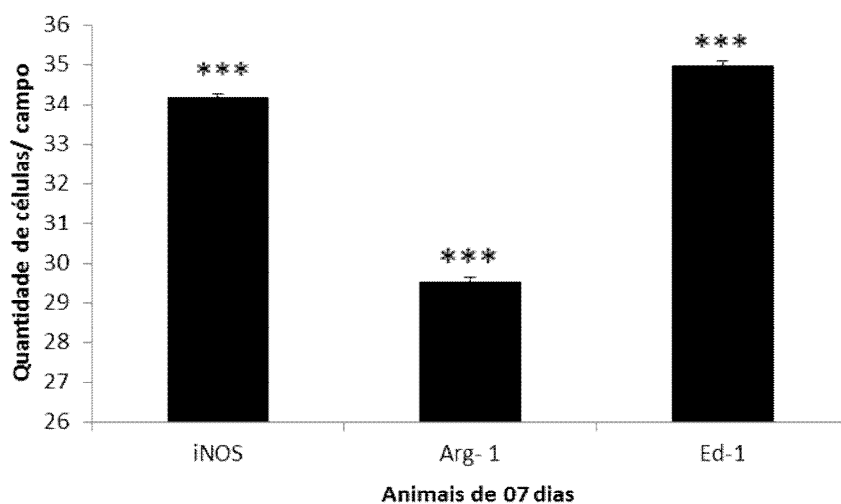


Figura16: Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, Arg-1+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) . Comparação entre os grupos (ANOVA) ($p < 0,05$). AN 07 (animais controle, 7 dias de sobrevida).

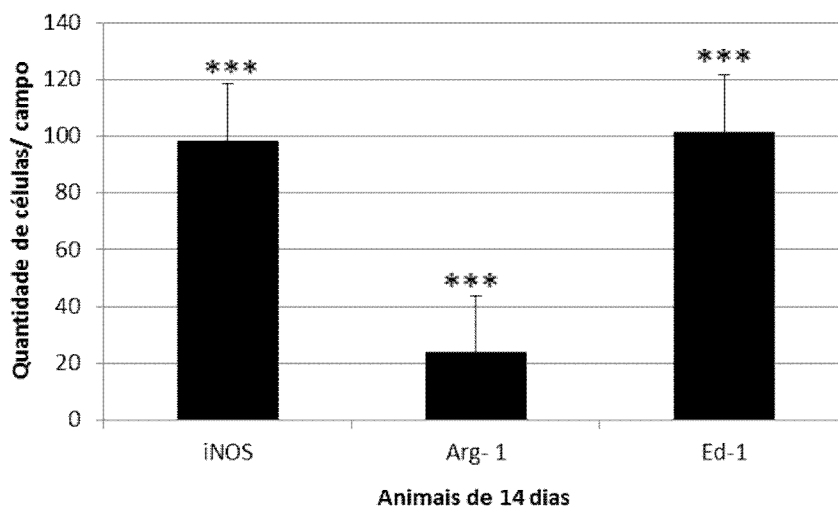


Figura 17: Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, Arg-1+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) . Comparação entre os grupos (ANOVA) ($p < 0,05$). AN 14 (animais controle, 14 dias de sobrevida).

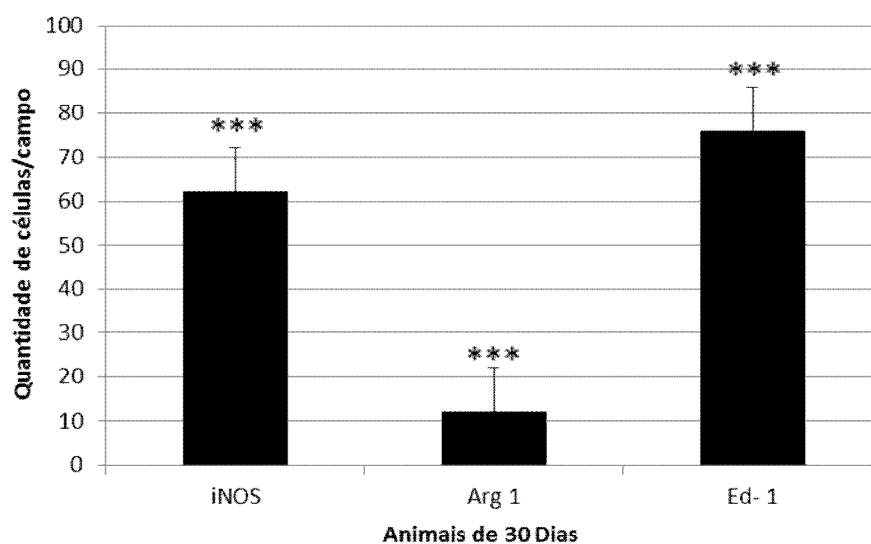


Figura 18: Análise quantitativa de células Ed1+, iNOS+, arg- 1+ imunomarcadas no córtex motor isquêmico por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) . Comparação entre os grupos (ANOVA) ($p < 0,05$). AN 30 (animais controle 30 dias de sobrevivência).

4. DISCUSSÃO

4.1. Considerações Gerais

No presente estudo, induzimos isquemia focal no córtex motor de ratos machos adultos utilizando microinjeções do fármaco vasoconstritor endotelina-1(ET-1). A injeção de 80pmols de ET-1 foi eficaz à indução de isquemia com consequente perda neuronal e migração de células inflamatórias ao centro e periferia de lesão. Esses resultados estão em concordância com estudos de SOUZA-RODRIGUES et al, 2008, que utilizaram o modelo experimental de Acidente Vascular Encefálico com endotelina-1 na obtenção de lesão isquêmica focal em roedores.

O modelo utilizado nesse estudo possibilitou a investigação da modulação microglial, tendo como foco a expressão dos fenótipos microgliais M2, benéfico, e o M1, prejudicial, no ambiente isquêmico (WAKE et al, 2011). Os marcadores utilizados para esses fins foram os anticorpos anti iNOS, Arg-1 e Ed- 1. Diversos estudos mostram que durante o acidente vascular encefálico as células microglias migram a área lesionada, podendo exercer um papel dual, dependendo da sinalização, no local de lesão (HU et al, 2012, KIM et al, 2014 e XIA et al, 2015). Nossos resultados qualitativos mostraram que a expressão do fenótipo M1 nos animais que foram tratados com minociclina foi menor em relação ao grupo que só recebeu solução salina intraperitonealmente, sugerindo que o tratamento com a minociclina pode está modulando essa expressão por supressão de vias moleculares, no ambiente isquêmico, que potencializam a expressão desse fenótipo microglial. Trabalhos de STEIN; COGSWELL, BALDWIN, 1993, PORTA et al; 2009 e ARCMUGAM et al; 2011 sugerem que a via NF-kB em sinergismo com a via NOTCH, STAT 1 e STAT 3 atuam nesse processo. Igualmente, o tratamento pareceu influenciar na expressão do fenótipo microglial M2 (arg-1+) quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com solução salina estéril. Essa modulação pelo tratamento ratifica que a minociclina também pode estar atuando em vias CREB (cAMP) que potencializam a expressão do fenótipo microglial M2. A permanência da resposta microglial nos tempos superiores a 7 dias, após lesão isquêmica, nos grupos controle, bem como a identificação dos fenótipos M1 (iNOS+) e M2 (arg-1+) nessa janela temporal está de acordo com os trabalhos de HU et al, 2012 e XIA et al, 2015 que relatam que a expressão dos fenótipos microglias

estende-se por tempos superiores àquele considerado como pico máximo da expressão dessas células.

Os resultados descritos nesse estudo sugerem que o fármaco minociclina pode modular a expressão microglial na fase aguda (primeira semana)- estágio esse no qual as novas abordagens terapêuticas ao tratamento do AVE são testadas. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos que possam modular a expressão do fenótipo M2 (ação neuroprotetora) no ambiente isquêmico, mas em janela de atuação mais prolongada.

Por conseguinte, foi mostrado – pela coloração por violeta de cresila- que após a indução isquêmica no córtex motor houve intensa migração de células ao local da lesão, em todos os tempos de sobrevida. Essa comprovação está de acordo com trabalhos de (GOMES-LEAL et al; 2008) que demonstram esse recrutamento de células ao local de lesão isquêmica. Ademais, marcação imuno-histoquímica para corpos neuronais revelou menor área de lesão e maior preservação neuronal na periferia da lesão no grupo tratado com minociclina. Essa constatação está de acordo com trabalhos de JUHA YRJÄNHEIKK et al, 1998 e 1999, que mostrou a ação neuroprotetora da minociclina por nítida preservação dessas células neurais através da diminuição de substâncias tóxicas no parênquima cerebral dos animais tratados com esse fármaco. Esses resultados também estão em concordância com trabalhos de KIM; SUH, 2009 e PLANE et al, 2010 que relatam a ação da minociclina em vias bioquímicas relacionadas a processos que desencadeiam a inflamação e a morte celular programada, conferindo a minociclina efeitos anti-inflamatórios e anti-apoptóticos.

O relato acima ratifica a minociclina como um fármaco usado em diversos estudos experimentais devido sua propriedade neuroprotetora e anti-inflamatória por atuar em vias bioquímicas que estão relacionadas com a produção de radicais livres, redução do infiltrado de células inflamatórias e inibição microglial (HAYAKAWA et al., 2008).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, investigamos se o tratamento com minociclina modularia os fenótipos microgliais M1 e M2 no córtex motor isquêmico, após microinjeção de endotelina-1 e se essa modulação tenderia para maximização dos efeitos do fenótipo M2 reconhecidamente neuroprotetor.

De posse dessa informação, concluímos que:

- A minociclina apresenta efeito neuroprotetor por potencializar a preservação de células neuronais na área isquêmica.
- A minociclina modula a expressão de células microgliais (iNOS+) e células microgliais (arg-1+) no cortex motor de ratos machos Wistar isquêmicos após sete dias da lesão.
- A presença de células microglias dentro de uma janela temporal superior a 7 dias após isquemia sugere estudos que objetive um maior conhecimento das vias envolvidas no processo de expressão dos fenótipos microgliais.

6. REFERENCIAS

ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. **Subcell Biochem**, v. 49, p. 241-68, 2008.

AKOPOV, S. E.; SIMONIAN, N. A.; GRIGORIAN, G. S. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. **Stroke**, v. 27, n. 10, p. 1739-43, Oct 1996.

ALKAYED, N. J. et al. Gender-linked brain injury in experimental stroke. **Stroke**, v. 29, n. 1, p. 159-65; discussion 166, Jan 1998.

ARUMUGAM, T. V. et al. Evidence that gamma-secretase-mediated Notch signaling induces neuronal cell death via the nuclear factor-kappaB-Bcl-2-interacting mediator of cell death pathway in ischemic stroke. **Mol Pharmacol**, v. 80, n. 1, p. 23-31, Jul 2011.

BARRON, K. D. The microglial cell. A historical review. **J Neurol Sci**, v. 134 Suppl, p. 57-68, Dec 1995.

BATCHELOR, P. E. et al. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 3462-8, Oct 2000.

BLOCK, M. L.; HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 77-98, Jun 2005.

BLUM, D. et al. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiol Dis**, v. 17, n. 3, p. 359-66, Dec 2004.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 111, n. 6, p. 483-95, Jul 2009.

BUTOVSKY, O. et al. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol Cell Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 381-93, Jul 2005.

CANOUI-POITRINE, F. et al. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events: the PRIME study. **Neurology**, v. 77, n. 12, p. 1165-73, Sep 20 2011.

CAPLAN, L. R.; SEARLS, D. E.; HON, F. K. Cerebrovascular disease. **Med Clin North Am**, v. 93, n. 2, p. 353-69, viii, Mar 2009.

CARTIER, N. et al. The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 3, p. 363-80, Sep 2014.

CATALIN, B. et al. Microglia: first responders in the central nervous system. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 3, p. 467-72, 2013.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v. 1, n. 8, p. 623-34, Oct 1988.

CLARK, R. K. et al. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain Res Bull**, v. 31, n. 5, p. 565-72, 1993.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-8, Jun 2005.

DE CARVALHO, J. J. et al. Stroke epidemiology, patterns of management, and outcomes in Fortaleza, Brazil: a hospital-based multicenter prospective study. **Stroke**, v. 42, n. 12, p. 3341-6, Dec 2011.

DEB, P.; SHARMA, S.; HASSAN, K. M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. **Pathophysiology**, v. 17, n. 3, p. 197-218, Jun 2010.

DEL ZOPPO, G. et al. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathol**, v. 10, n. 1, p. 95-112, Jan 2000.

DERUGIN, N. et al. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. **Stroke**, v. 31, n. 7, p. 1752-61, Jul 2000.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, 9// 2008.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-8, Sep 2008.

DURUKAN, A.; 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. 179-97, May 2007.

EGGEN, B. J. et al. Microglial phenotype and adaptation. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 807-23, Sep 2013.

EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1021-9, Feb 6 2009.

ELKIND, M. S. et al. Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. **Stroke**, v. 33, n. 1, p. 31-7, Jan 2002.

EMSLEY, H. C.; TYRRELL, P. J. Inflammation and infection in clinical stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 22, n. 12, p. 1399-419, Dec 2002.

FAGAN, S. C.; CRONIC, L. E.; HESS, D. C. Minocycline development for acute ischemic stroke. **Transl Stroke Res**, v. 2, n. 2, p. 202-8, Jun 1 2011.

FRANCO, R.; FERNANDEZ-SUAREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 131, p. 65-86, Aug 2015.

GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Minocycline: far beyond an antibiotic. **Br J Pharmacol**, v. 169, n. 2, p. 337-52, May 2013.

GIBSON, C. L. et al. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. **Exp Neurol**, v. 193, n. 2, p. 522-30, Jun 2005.

GOMES-LEAL, W. Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? **Brain Behav**, v. 2, n. 3, p. 345-56, May 2012.

GOMES-LEAL, W. et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-67, Dec 2004.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; PICANCO-DINIZ, C. W. Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 57-70, Dec 20 2005.

GOOD, M. L.; HUSSEY, D. L. Minocycline: stain devil? **Br J Dermatol**, v. 149, n. 2, p. 237-9, Aug 2003.

GRIFFIN, M. O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, n. 3, p. C539-48, Sep 2010.

GUO, X. J. et al. Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina. **Exp Eye Res**, v. 125, p. 156-63, Aug 2014.

HARRY, G. J.; KRAFT, A. D. Microglia in the developing brain: a potential target with lifetime effects. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 191-206, Mar 2012.

HAWLISCH, H.; KOHL, J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. **Mol Immunol**, v. 43, n. 1-2, p. 13-21, Jan 2006.

HAYAKAWA, K. et al. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, v. 39, n. 3, p. 951-8, Mar 2008.

HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 941-53, Jun 2007.

HENNINGER, N. et al. Comparison of ischemic lesion evolution in embolic versus mechanical middle cerebral artery occlusion in Sprague Dawley rats using diffusion and perfusion imaging. **Stroke**, v. 37, n. 5, p. 1283-7, May 2006.

HERRMANN, M.; EHRENREICH, H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. **Restor Neurol Neurosci**, v. 21, n. 3-4, p. 177-90, 2003.

HONG, K. S. et al. Declining stroke and vascular event recurrence rates in secondary prevention trials over the past 50 years and consequences for current trial design. **Circulation**, v. 123, n. 19, p. 2111-9, May 17 2011.

HOSSMANN, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 1, p. 106-20, Jul 1998.

HU, X. et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 43, n. 11, p. 3063-70, Nov 2012.

JIEYONG, B. et al. Decompressive craniectomy and mild hypothermia reduces infarction size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after permanent focal ischemia in rats. **Neurosurg Rev**, v. 29, n. 2, p. 168-72, Apr 2006.

KASTE, M. Use of animal models has not contributed to development of acute stroke therapies: pro. **Stroke**, v. 36, n. 10, p. 2323-4, Oct 2005.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 461-553, Apr 2011.

KIM, A. S.; JOHNSTON, S. C. Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease. **Circulation**, v. 124, n. 3, p. 314-23, Jul 19 2011.

KIM, H. S.; SUH, Y. H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behav Brain Res**, v. 196, n. 2, p. 168-79, Jan 23 2009.

KIM, J. Y.; KAWABORI, M.; YENARI, M. A. Innate inflammatory responses in stroke: mechanisms and potential therapeutic targets. **Curr Med Chem**, v. 21, n. 18, p. 2076-97, 2014.

KIM, S. U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 302-13, Aug 1 2005.

KNOTT, A. B.; BOSSY-WETZEL, E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 3, p. 541-54, Mar 2009.

KOERNER, I. P. et al. Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia. **Front Biosci**, v. 13, p. 2833-41, 2008.

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

KRUPINSKI, J. et al. Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. **Stroke**, v. 27, n. 5, p. 852-7, May 1996.

KUNST, A. E.; AMIRI, M.; JANSSEN, F. The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. **Stroke**, v. 42, n. 8, p. 2126-30, Aug 2011.

KUNZ, A.; DIRNAGL, U.; MERGENTHALER, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 24, n. 4, p. 495-509, Dec 2010.

LANG, J. T.; MCCULLOUGH, L. D. Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? **J Transl Med**, v. 6, p. 33, 2008.

LEES, K. R. et al. NXY-059 for acute ischemic stroke. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 588-600, Feb 9 2006.

LENTSCH, A. B. et al. STAT4 and STAT6 regulate systemic inflammation and protect against lethal endotoxemia. **J Clin Invest**, v. 108, n. 10, p. 1475-82, Nov 2001.

LIMA, R. R. et al. Diffuse axonal damage, myelin impairment, astrogliosis and inflammatory response following microinjections of NMDA into the rat striatum. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 24-35, Feb 2008.

LLOYD-JONES, D. et al. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 119, n. 3, p. 480-6, Jan 27 2009.

LLOYD-JONES, D. M. et al. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. **Circulation**, v. 121, n. 4, p. 586-613, Feb 2 2010.

LOS, J.; ZAREMBA, J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. **Stroke**, v. 32, n. 11, p. 2695-6, Nov 2001.

MANIVA, S. J.; DE FREITAS, C. H. [Use of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke: what nurses know?]. **Rev Bras Enferm**, v. 65, n. 3, p. 474-81, May-Jun 2012.

MARKUS, H. Stroke: causes and clinical features. **Medicine**, v. 36, n. 11, p. 586-591, 11// 2008.

MCCULLOUGH, L. D. et al. Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 25, n. 4, p. 502-12, Apr 2005.

MORAN, A. et al. Future cardiovascular disease in china: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes**, v. 3, n. 3, p. 243-52, May 2010.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H.; IADECOLA, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-98, Jul 29 2010.

MUKHTAR, M. et al. T-Cells and excitotoxicity: HIV-1 and other neurodegenerative disorders. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 3, p. 265-73, 2005.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-11, Sep 1992.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, n. 9061, p. 1269-76, May 3 1997.

NEIVA, I.; MALVA, J. O.; VALERO, J. Can we talk about microglia without neurons? A discussion of microglial cell autonomous properties in culture. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 202, 2014.

NILUPUL PERERA, M. et al. Inflammation following stroke. **J Clin Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 1-8, Jan 2006.

OSPINA, J. A. et al. Estrogen suppresses IL-1 β -mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 5, p. H2010-9, May 2004.

PATEL, A. R. et al. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol**, v. 5, n. 2, p. 73-90, 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. R.; EMSON, P. C. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **J Neurosci Methods**, v. 3, n. 2, p. 129-49, Dec 1980.

PEKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-34, Jun 2005.

PERRY, V. H. Stress primes microglia to the presence of systemic inflammation: implications for environmental influences on the brain. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 1, p. 45-6, Jan 2007.

PERRY, V. H.; ANDERSSON, P. B.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 7, p. 268-73, Jul 1993.

PETTY, G. W. et al. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. **Stroke**, v. 30, n. 12, p. 2513-6, Dec 1999.

PLANE, J. M. et al. Prospects for minocycline neuroprotection. **Arch Neurol**, v. 67, n. 12, p. 1442-8, Dec 2010.

PORTA, C. et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 35, p. 14978-83, Sep 1 2009.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 119-45, 2009.

RAZMARA, A.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Testosterone augments endotoxin-mediated cerebrovascular inflammation in male rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 5, p. H1843-50, Nov 2005.

REDON, J. et al. Stroke mortality and trends from 1990 to 2006 in 39 countries from Europe and Central Asia: implications for control of high blood pressure. **Eur Heart J**, v. 32, n. 11, p. 1424-31, Jun 2011.

RIDDER, D. A.; SCHWANINGER, M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 995-1006, Feb 6 2009.

ROCK, R. B. et al. Role of microglia in central nervous system infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 4, p. 942-64, table of contents, Oct 2004.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **J Am Acad Dermatol**, v. 54, n. 2, p. 258-65, Feb 2006.

SCHWAB, J. M. et al. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. **J Neuroimmunol**, v. 114, n. 1-2, p. 232-41, Mar 1 2001.

SEDER, D. B.; MAYER, S. A. Critical care management of subarachnoid hemorrhage and ischemic stroke. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 1, p. 103-22, viii-ix, Mar 2009.

SESHADRI, S. et al. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 345-50, Feb 2006.

SHIN, H. M. et al. Notch1 augments NF-kappaB activity by facilitating its nuclear retention. **Embo j**, v. 25, n. 1, p. 129-38, Jan 11 2006.

SINGHAL, A. B. et al. Advances in stroke neuroprotection: hyperoxia and beyond. **Neuroimaging Clin N Am**, v. 15, n. 3, p. 697-720, xii-xiii, Aug 2005.

SKINNER, R. et al. Psychoneuroimmunology of stroke. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 29, n. 2, p. 359-79, May 2009.

SOUZA-RODRIGUES, R. D. et al. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Res**, v. 1200, p. 78-88, Mar 20 2008.

STEIN, B.; COGSWELL, P. C.; BALDWIN, A. S., JR. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 3964-74, Jul 1993.

STIRLING, D. P. et al. Minocycline as a neuroprotective agent. **Neuroscientist**, v. 11, n. 4, p. 308-22, Aug 2005.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 3, p. 233-47, Jun 1999.

STOWE, A. M. et al. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion. **Neurobiol Dis**, v. 35, n. 1, p. 82-90, Jul 2009.

STREIT, W. J.; GRAEBER, M. B. Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 68-74, Jan 1993.

SUGAWARA, T. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 17-25, Jan 2004.

TANASESCU, C. et al. Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk. **Eur J Intern Med**, v. 20, n. 4, p. 348-54, Jul 2009.

VAGNEROVA, K.; KOERNER, I. P.; HURN, P. D. Gender and the injured brain. **Anesth Analg**, v. 107, n. 1, p. 201-14, Jul 2008.

VANNUCCI, S. J. et al. Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, n. 1, p. 52-60, Jan 2001.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 365-75, May 2003.

WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. **Neuron Glia Biol**, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011.

WANG, Q.; TANG, X. N.; YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **Journal of Neuroimmunology**, v. 184, n. 1-2, p. 53-68, 3// 2007.

WEN, Y. et al. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa B activation induced by transient cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 1008, n. 2, p. 147-54, May 22 2004.

WENG, Y. C.; KRIZ, J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. **Exp Neurol**, v. 204, n. 1, p. 433-42, Mar 2007.

WISE, P. M. et al. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 37, n. 1-3, p. 313-9, Nov 2001.

XIA, C. Y. et al. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. **Int Immunopharmacol**, v. 25, n. 2, p. 377-82, Apr 2015.

YANAMOTO, H. et al. Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. **Stroke**, v. 32, n. 1, p. 232-9, Jan 2001.

YI, J. H. et al. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. **Neurochem Int**, v. 50, n. 7-8, p. 1014-27, Jun 2007.

YILMAZ, G. et al. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, v. 113, n. 17, p. 2105-12, May 2 2006.

YONG, V. W. et al. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurol**, v. 3, n. 12, p. 744-51, Dec 2004.

ZHAO, D. et al. Epidemiological transition of stroke in China: twenty-one-year observational study from the Sino-MONICA-Beijing Project. **Stroke**, v. 39, n. 6, p. 1668-74, Jun 2008.

ZHAO, Y. et al. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. **Faseb j**, v. 20, n. 8, p. 1162-75, Jun 2006.

ZHU, Y. S.; PFAFF, D. W. DNA binding of hypothalamic nuclear proteins on estrogen response element and preproenkephalin promoter: modification by estrogen. **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 5, p. 454-66, Nov 1995.