



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR  
MICHELLE CASTRO DA SILVA

TRATAMENTO COM MINOCICLINA E TRANSPLANTE  
INTRAESTRIATAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA  
ÓSSEA APÓS ACIDENTE VASCULAR EXPERIMENTAL ENCEFÁLICO

BELÉM – PARÁ

2011

MICHELLE CASTRO DA SILVA

TRATAMENTO COM MINOCICLINA E TRANSPLANTE  
INTRAESTRIATAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA  
ÓSSEA APÓS ACIDENTE VASCULAR EXPERIMENTAL ENCEFÁLICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Cristina Santos Franco.

BELÉM – PARÁ

2011

MICHELLE CASTRO DA SILVA

TRATAMENTO COM MINOCICLINA E TRANSPLANTE  
INTRAESTRIATAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA  
ÓSSEA APÓS ACIDENTE VASCULAR EXPERIMENTAL ENCEFÁLICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Cristina Santos Franco.

Aprovação em: 27 de abril de 2011.

BANCA DE DEFESA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal (ICB/ UFPA) – Orientador e Presidente da Banca

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Cristina Santos Franco (ICB/UFPA) – Co-orientadora

---

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano – Membro Titular

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth Sumi Yamada – Membro Titular

---

Aos meus Pais, Roberto e Edna – verdadeiros Mestres, com amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua imensurável misericórdia.

Ao Prof. Dr. Wallace Gomes Leal por me conceder orientação nesse mestrado, e à co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edna Cristina Santos Franco pela cooperação adicional.

Ao Laboratório de Biofísica, chefiado pelo Prof. Dr. Manoel Filho pela colaboração material.

Ao Laboratório de Fertilização Animal, chefiado pelo Prof. Dr. Otávio Ohashi, pela generosidade em ceder alguns materiais e equipamento necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

À responsável técnica do Laboratório de Neuroquímica, Neidiane Ramos, e ao Jorge Rissino do Laboratório de Citogenética pela ajuda e orientação no preparo dos reagentes necessários à extração das células mononucleares utilizadas neste estudo.

Ao apoio financeiro da CAPES e do CNPq pelo fomento para o avanço da ciência no Brasil, e em especial, para a realização desta dissertação.

Aos membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) pela participação direta ou indireta na realização desta investigação. Em destaque, aos “amigos-irmãos” que viveram junto comigo esses 24 meses de aflição – Marcelo, Celice, Rosana e Elane. Pessoas mais do que fundamentais para a efetivação desta conquista.

Aos estudantes de Iniciação científica, por quem tenho muito carinho e respeito, agradeço por serem solícitos apesar da insolência “esporádica”. Em especial, ao meu querido IC Mário, por quem nutro um afeto maternal, agradeço sua bondade extrema, e vibrante disposição para me ajudar nos experimentos.

À minha amada família, a quem dedico esta obra, pelo amor reconfortante.

Ao meu Lucas, meu amado. Responsável pelos meus sorrisos mais largos, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço o incentivo, apoio, companheirismo, amor, e principalmente, a paciência e o altruísmo, a mim dispensados.

## RESUMO

Diversos estudos sugerem que a tetraciclina semi-sintética minociclina e o transplante de células mononucleares da medula óssea (CMMOs) induzem neuroproteção em modelos experimentais de acidente vascular encefálico (AVENC). No entanto, poucos investigaram, comparativamente, os efeitos destas duas abordagens terapêuticas após AVENC induzido por microinjeções de endotelina – 1 (ET -1). Nesta dissertação, objetivou-se comparar os efeitos do bloqueio microglial com minociclina com os obtidos pelo transplante intraestriatal de CMMOs na fase aguda após acidente vascular encefálico experimental, sobre a área de lesão, neuroproteção, apoptose e recuperação funcional. Ratos machos adultos, da raça *Wistar*, pesando entre 250 e 350g, foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle (chamado de Salina) - isquêmico tratado com salina (N=4), isquêmico tratado com minociclina (N=4), isquêmico tratado com CMMOs (N=3) e doador de CMMOs (N=2). Testes comportamentais foram realizados em 1, 3 e 7 dias pós-isquemia para avaliar a recuperação funcional entre os grupos. Animais tratados com minociclina receberam 2 doses diárias de 50mg/kg nos 2 primeiros dias, e 5 aplicações únicas de 25mg/kg (i.p) nos dias subsequentes até o sexto dia após a indução isquêmica.  $1 \times 10^6$  de CMMOs foram obtidas de ratos da mesma linhagem e transplantadas diretamente no estriato, 24h após a lesão isquêmica. Todos os animais foram perfundidos 7 dias após a indução isquêmica. Secções coronais foram coradas por violeta de cresila para análise histopatológica geral, e por imunohistoquímica para a identificação de corpos neuronais (neuN), microglia/macrófagos ativados (ED1) e células apoptóticas (Caspase-3). A análise histopatológica geral mostrou grande palor, perda tecidual e intensa ativação microglial/ macrofágica no estriato de animais tratados com solução

salina estéril. O tratamento com CMMO foi mais eficaz do que a minociclina ( $P < 0,05$ , ANOVA-Tukey) na redução do número de microglia/macrófagos ativados (salina  $276,3 \pm 9,3$ ; CMMOs  $133,8 \pm 6,8$ ) e minociclina  $244,6 \pm 7,1$ ). CMMOs e minociclina reduziram a área de lesão, em 67,75% e 69,1%, respectivamente. Os dois tratamentos promoveram o mesmo nível de preservação neuronal ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle,  $61,3 \pm 1,5$ ;  $86,8 \pm 3,4$ ) e  $81 \pm 3,4$ ). As CMMOs reduziram de forma mais eficaz ( $p < 0,01$ ) o número de células apoptóticas em relação à minociclina e grupo controle ( $26,5 \pm 1,6$ );  $13,1 \pm 0,7$ ) e  $19,7 \pm 1,1$ ). Ambas as abordagens terapêuticas promoveram recuperação funcional dos animais isquêmicos. Os resultados sugerem que o tratamento com CMMOs é mais eficaz na modulação da resposta microglial e na diminuição da apoptose do que o tratamento com minociclina, apesar de ambos serem igualmente eficazes para indução da neuroproteção. Estudos futuros devem investigar se o tratamento com minociclina associado ao transplante de CMMOs produzem efeitos sinérgicos, o que poderia amplificar os níveis de neuroproteção observados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estriato; Acidente Vascular Encefálico; Inflamação; Microglia; Minociclina, Células Mononucleares da Medula Óssea.

**Apoio Financeiro:** CAPES/ CNPq.

## ABSTRACT

Several studies suggest that both the semi-synthetic tetracycline minocycline and mononuclear bone marrow cell (BMMCs) transplantation induce neuroprotection in experimental models of stroke. However, a few studies comparatively investigated the effects of these therapeutic approaches following endothelin-1 (ET-1)-induced stroke. In this dissertation, we aimed at investigating the comparative effects of microglial inhibition with minocycline and BMMC transplantation in the acute phase of experimental stroke. Male adult Wistar rats were divided in four experimental groups: saline-treated (N=4), minocycline-treated (N=4), BMMC-treated (N=4). Behavioral tests were performed at 1, 3 and 7 days post-ischemia to evaluate functional recovery between groups. Animals treated with minocycline received two 50mg/kg (*i.p.*) doses in the first two days plus five single 25mg/kg (*i.p.*) daily doses up to sixth days post-ischemia.  $1 \times 10^6$  BMMCs were obtained from Wistar rats and directly transplanted into the striatum at 24h post-ischemia. Animals were perfused at 7 days after ischemia onset. Coronal sections were stained with cresyl violet for gross histopathological analysis and immunolabeled for identification of neuronal bodies (NeuN), activated microglia/macrophages (ED1) and apoptotic cells (active caspase-3). Gross histopathological analysis revealed pallor, tissue loss and intense microglial/macrophage activation in ischemic animals treated with sterile saline. BMMC transplantation induced a higher reduction ( $p < 0.05$ , ANOVA-Tukey) in the number of ED1+ cells than (saline,  $276, 3 \pm 9,3$ ; BMMCs,  $133,8 \pm 6,8$ ; minocycline,  $244,6 \pm 7,1$ ). BMMC transplantation and minocycline reduced the infarct area, compared to control, in about 67,75% and 69,1%, respectively, with no statistical differences between treatments ( $p > 0.05$ ). Both treatments afforded comparable levels ( $p > 0.05$ ) of neuronal preservation compared to control ( $61,3 \pm 1,5$ ;  $86,8 \pm 3,4$ ;  $81 \pm 3,4$ ). BMMC treatment induce a higher decrease in the number of apoptotic cells compared to

control and minocycline treatment ( $26,5 \pm 1,6$ ;  $13,1 \pm 0,7$ ;  $19,7 \pm 1,1$ ). Both therapeutic approaches improved functional recovery in the ischemic animals. The results suggest that BMNC transplantation is more effective in modulating microglial activation and reducing apoptotic cell death than minocycline, although both treatments are equally efficacious on improving neuronal preservation. Future studies should investigate whether minocycline treatment concomitant with BMNC transplantation produces synergistic effects, which might improve neuroprotection.

**KEY-WORDS:** Striatum; Stroke; Inflammation; Microglia; Minocycline; Bone Marrow Mononuclear Cells; Stem cells.

**Financial Support:** CAPES/ CNPq.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| FIGURA 1.  | Representação esquemática da cascata isquêmica que provoca o dano encefálico.....  | 22 |
| FIGURA 2.  | Estereotáxico (Insight®, EFF-336).....   | 47 |
| FIGURA 3.  | Animal posicionado no estereotáxico.....   | 48 |
| FIGURA 4.  | Localização da injeção de ET – 1 no estriato dos animais.....  | 49 |
| FIGURA 5.  | Momento da injeção de ET – 1 com micropipeta de vidro.....   | 51 |
| FIGURA 6.  | Extração, obtenção e administração de células tronco extraídas a partir da medula óssea vermelha em gradiente de Ficoll.....               | 54 |
| FIGURA 7.  | Animal posicionado na caixa após o teste de Campo aberto.....  | 55 |
| FIGURA 8.  | Animal sendo submetido ao teste de remoção do adesivo adaptado de Sughrue et al., 2006.....  | 58 |
| FIGURA 9.  | Região de contagem na área de lesão, com 16 campos de contagem.....  | 58 |
| FIGURA 10. | Análise histopatológica das lesões isquêmicas coradas com violeta de cresila.....  | 60 |
| FIGURA 11. | Análises da lesão isquêmica estriatal, de acordo com a imunomarcagem com NeuN, ED1 e Caspase-3 em animais tratados com salina estéril..... | 62 |
| FIGURA 12. | Inibição da ativação microglial/ macrofágica por CMMOs e minociclina após isquemia estriatal.....  | 63 |
| FIGURA 13. | Neuroproteção por CMMOs e minociclina após isquemia estriatal.....   | 67 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| FIGURA 14. | Efeito anti-apoptótico por ação de CMMOs e minociclina após isquemia estriatal.....   | 70 |
| FIGURA 15. | Comparação do comportamento sensoriomotor da pata D 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico.....  | 72 |
| FIGURA 16. | Comparação do comportamento sensoriomotor da pata esquerda inter e intragrupos 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico.....   | 78 |
| FIGURA 17  | Análise da latência no teste to campo aberto. Os animais tratados com salina apresentaram diferenças em relação à linha de base em todos os tempos de sobrevivência investigados..... | 79 |
| FIGURA 18. | Análise da distância percorrida no teste do campo aberto.....   | 80 |
| FIGURA 19. | Análise do tempo empregado à deambulação no teste to campo aberto.....  | 81 |
| FIGURA 20. | Análise do comportamento de levantar-se no teste to campo aberto.....   | 83 |
| FIGURA 21. | Análise do comportamento de autolimpeza no teste to campo aberto.....   | 84 |
| TABELA 1.  | Delineamento dos grupos experimentais da presente pesquisa.....   | 46 |
| TABELA 2.  | Valores de área de lesão isquêmica calculados pelo software <i>ImageJ</i> .....   | 66 |

## LISTA DE ABREVIACOES

AIF - fator de indução à apoptose (do inglês *apoptosis-inducing factor*);

AMPA - Amino-3-hidroxi-5-metil-4-propionato;

ADP - Adenosina difosfato;

ATP - Adenosina trifosfato;

AVENC - Acidente Vascular Encefálico;

BDNF- do inglês *brain derived neurotrophic factor*;

BHE - Barreira Hemato-Encefálica;

Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio;

CMMOs - Células Mononucleares da Medula ssea;

CDK – 5 - Ciclina dependente de quinase 5;

CRP - Proteína C reativa;

DAC - Doença arteriocoronariana;

DNA - cido desoxirriboleico;

ET – 1 – Endotelina 1;

FGFb - do ingls *fibroblastic growth factor basic*;

GDNF - do ingls *glial derived neurotrophic factor*;

GFAP - proteína cida fibrilar glial (do ingls *glial fibrillary acidic protein*);

GluR2 - Receptores 2 de glutamato;

HMGB1 - do inglês, *high-mobility group box 1*;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio;

IL-1 - Interleucina 1;

IL – 6 - Interleucina 6;

IL-10 - Interleucina 10;

iNOS - do inglês *nitric oxide synthase*;

i.p - intraperitoneal;

K<sup>+</sup> - Íon potássio;

MCAO – (do inglês *middle cerebral artery occlusion*);

MGlu - Receptores metabotrópicos de glutamato;

MMP - Matriz metaloproteinases;

Na<sup>+</sup> - Íon sódio;

NA – Nicotinamida;

NADp - do inglês *b-nicotinamide adenine dinucleotide*;

NGF - do inglês *nerve growth factor*;

NMDA - N-Metil-d-Aspartato;

NO - Óxido Nítrico;

NOS - Sintase do Óxido Nítrico;

O<sub>2</sub><sup>-</sup> Superóxido;

OH - Radical Hidroxila;

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde;

PARP – 1 - Poli(ADP-ribose)polimerase 1;

rt-PA - Ativador Plasminogênico Tecido Recombinate;

SDF1 - do inglês *stroma derived factor 1*;

SNC - Sistema Nervoso Central;

TGF- $\beta$  - Fator- $\beta$  de Crescimento Transformador;

TNF- $\alpha$  - Fator- $\alpha$  de Necrose Tumoral;

VEGF - do inglês *vascular endothelial growth factor*;

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>20</b> |
| 1.1 CONCEITUAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....      | 20        |
| 1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVENC ISQUÊMICO.....                                 | 21        |
| <b>1.2.1 Alterações no Metabolismo Celular.....</b>                        | <b>23</b> |
| <b>1.2.2 Excitotoxicidade.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>1.2.3 Estresse oxidativo.....</b>                                       | <b>25</b> |
| <b>1.2.4 Despolarizações peri-infarto/ despolarizações alastradas.....</b> | <b>26</b> |
| <b>1.2.5 Inflamação.....</b>   | <b>27</b> |
| 1.2.5.1 Leucócitos.....  | 28        |
| 1.2.5.2 Neutrófilos.....   | 29        |
| 1.2.5.3 Linfócitos. ....   | 30        |
| 1.2.5.4 Monócitos.....   | 31        |
| 1.2.5.5 Macrófagos.....  | 31        |
| 1.2.5.6 Microglia.....   | 32        |
| 1.2.5.7 Astrócitos.....  | 34        |
| <b>1.2.6 Apoptose.....</b>   | <b>34</b> |
| 1.3. TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....       | 36        |
| <b>1.4 Minociclina.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>1.5 Terapia celular.....</b>  | <b>40</b> |
| 1.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....   | 41        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>45</b> |
| 2.1 GERAL.....  | 45        |
| 2.2 ESPECÍFICOS.....  | 45        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                     | <b>46</b> |
| 3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....                               | 46        |
| 3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E MODELO DE ISQUEMIA FOCAL.....          | 47        |
| 3.3 TRATAMENTO COM MINOCICLINA.....                                   | 49        |
| 3.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA..... | 50        |
| 3.5 EXTRAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA.....    | 50        |
| 3.6TESTES COMPORTAMENTAIS.....  | 52        |
| <b>3.6.1 Teste do Campo Aberto.....</b>                               | <b>52</b> |
| <b>3.6.2 Teste de Remoção do Adesivo Modificado.....</b>              | <b>54</b> |
| 3.7PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....                          | 55        |
| 3.8HISTOPATOLOGIA DE ROTINA.....                                      | 56        |
| 3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA.....  | 56        |
| <b>3.9.1. Neurônios.....</b>  | <b>57</b> |
| <b>3.9.2. Marcadores Inflamatórios.....</b>                           | <b>57</b> |
| <b>3.9.3. Marcação de Células Apoptóticas.....</b>                    | <b>57</b> |
| 3.10 ANÁLISE QUANTITATIVA.....  | 57        |
| <b>3.10.1 Métodos de contagem.....</b>                                | <b>57</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 58        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>  | <b>59</b> |
| 4.1 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES TÍPICOS DE LESÃO ISQUÊMICA.....  | 59        |
| 4.2. ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS APÓS MICROINJEÇÕES DE ET-1 NO ESTRIATO DE RATOS ADULTOS.....   | 59        |
| 4.3. O TRATAMENTO COM CMMOs DIMINUI DE FORMA MAIS SIGNIFICATIVA A ATIVAÇÃO MICROGLIAL DO QUE A MINOCICLINA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....                                | 63        |
| 4.4.OS TRATAMENTOS COM CMMOs E MINOCICLINA DIMINUEM A ÁREA DE LESÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....   | 65        |
| 4.5 O TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E O TRATAMENTO COM MINOCICLINA INDUZEM NEUROPROTEÇÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....  | 66        |
| 4.6 EFEITO ANTI-APOPTÓTICO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DA INIBIÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....  | 68        |
| 4.7 EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DO TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE O PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DE RATOS ISQUÊMICOS (TESTE DE REMOÇÃO DO ADESIVO)..... | 71        |
| <b>4.7.1 Análise da evolução da pata direita 1, 3 e 7 dias após a isquemia.....</b>  | <b>71</b> |
| <b>4.7.2 Desempenho Sensoriomotor da pata esquerda 1, 3 e 7 após o evento isquêmico.....</b>   | <b>72</b> |
| 4.8 EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE A ATIVIDADE MOTORA EXPLORATÓRIA DE RATOS ISQUÊMICOS (TESTE DO CAMPO ABERTO).....  | 73        |
| <b>4.8.1 Latência.....</b>   | <b>74</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 4.8.2. Distância percorrida.....   | 75         |
| 4.8.3. Tempo empregado na deambulação.....   | 76         |
| 4.8.4. Comportamento de levantar-se.....   | 77         |
| 4.8.5. Autolimpeza.....  | 78         |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>80</b>  |
| 5.1.O MODELO EXPERIMENTAL E A INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL EM RATOS ADULTOS.....  | 80         |
| 5.2.O TRATAMENTO COM CMMOs DIMINUI DE FORMA MAIS SIGNIFICATIVA A ATIVAÇÃO MICROGLIAL DO QUE A MINOCICLINA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....                                     | 81         |
| 5.3 OS TRATAMENTOS COM CMMOs E MINOCICLINA DIMINUEM A ÁREA DE LESÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....   | 85         |
| 5.4 OTRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E O TRATAMENTO COM MINOCICLINA INDUZEM NEUROPROTEÇÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....   | 85         |
| 5.5.EFEITO ANTI-APOPTÓTICO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DA INIBIÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....  | 88         |
| 5.6 EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DO TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE O PADRÃO SENSORIO-MOTOR E A ATIVIDADE MOTORA EXPLORATÓRIA DE RATOS ISQUÊMICOS..... | 90         |
| 5.7 O PAPEL NEUROPROTETOR DA MICROGLIA.....  | 92         |
| <b>6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>   | <b>94</b>  |
| <b>7 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>95</b>  |
| <br>   |            |
| <b>ANEXO I (PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA).....</b>   | <b>114</b> |

**ANEXO II (APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DE  
EXPERIMENTAÇÃO) .....116**

## INTRODUÇÃO

### 1.1 CONCEITUAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O acidente vascular encefálico (AVENC) isquêmico é provocado pela redução do fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, levando a uma depleção energética, e conseqüentemente, à morte de células no território isquêmico. A isquemia encefálica contabiliza, aproximadamente, 80% de todos os acidentes cerebrovasculares, e se constitui na segunda causa mais comum de morte posteriormente à doença isquêmica cardíaca (MASSARO, 2006; ZHOU *et al.*, 2010).

No que tange à etiologia da doença, a hipertensão arterial sistêmica não-controlada se constitui em uma das maiores causas de isquemia, bem como outros fatores de risco modificáveis, como o elevado consumo de álcool, o tabagismo, e ainda, além das enfermidades tropicais endêmicas como a Doença de Chagas e a Malária (CAMARGO *et al.*, 2005).

Os déficits posteriores ao evento isquêmico podem incluir paralisia, parestia, dificuldades com a memória, com aprendizagem e linguagem. Desta forma, vê-se que o AVENC constitui-se em uma das maiores causas de incapacidades e óbitos em muitos países em todo o mundo. (CAPLAN, 2003; CAMARGO *et al.*, 2005).

Na América Latina, o AVENC é considerado uma doença epidêmica pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), apresentando incidência e prevalência variáveis ao longo de todo o continente, o que reflete as diferenças geográficas, étnicas, culturais e socioeconômicas regionais, além da diferença de acesso aos serviços de saúde entre as populações rural e urbana (MANSUR *et al.*, 2003; SAPOSNIK & DEL BRUTTO, 2003).

No Brasil, a transição epidemiológica, caracterizada pela redução na prevalência de doenças infecciosas e a elevação na taxa de ocorrência das doenças crônicas não-transmissíveis, ocorreu em vários lugares, mas não em todo país. Em 2005, o AVENC foi considerado a principal causa de mortalidade com 90.006 óbitos, sendo mais prevalente entre as mulheres do que nos homens, e a Doença Arterio coronariana (DAC) ocupou o posto de segundo lugar. Portanto, no tocante à magnitude da mortalidade, o AVENC deve ser considerado como um crítico problema de saúde pública (CONNOR *et al.*, 2007; LOTUFO & BENSEÑOR, 2009; LOTUFO, 2005; PONTES-NETO *et al.*, 2008).

Considerando sua alta prevalência, letalidade e morbidade, além dos custos econômicos, a relação com fatores de risco modificáveis e com os mecanismos de profilaxia eficazes, o AVENC é altamente elegível para a prevenção. Contudo, ações desfavoráveis sobre os fatores de risco, a deficiência no conhecimento sobre a doença entre a população e até entre a comunidade médica, a má aplicação ou subutilização dos programas preventivos e a falta de ênfase em treinamentos profiláticos, tem contribuído para as elevadas taxas de incidência do AVENC (DEB *et al.*, 2010; MASSARO, 2006; PONTES-NETO *et al.*, 2008).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVENC ISQUÊMICO

O AVENC possui causas diversas, como a trombose, o embolismo e a hipoperfusão relativa. Nestas circunstâncias, a cascata isquêmica é rapidamente iniciada, segundos a minutos após a perda do fluxo sanguíneo para a região encefálica, e, considerando a baixa reserva respiratória e a completa dependência do metabolismo aeróbico do tecido encefálico, evidencia-se a vulnerabilidade aos efeitos da isquemia (LAKHAN *et al.*, 2009; DEB *et al.*, 2010).

Pode ser considerado um evento patológico, caracterizado por colapso metabólico devido à hipoperfusão, seguido de excitotoxicidade, estresse oxidativo, disfunção na barreira hemato-encefálica, lesão microvascular, inflamação pós-isquêmica, e finalmente, morte de células neuronais, gliais e endoteliais. Deste modo, observa-se que a cascata isquêmica é um conjunto complexo de acontecimentos cujas delimitações temporais se misturam, podendo ter duração de horas ou até dias, mesmo depois de restaurada a circulação sanguínea (BROUNS & DEYN, 2009; VIEIRA *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2003; CRACK & TAYLOR, 2005; CUI *et al.*, 2009; SAS *et al.*, 2010). Estes eventos estão resumidos na Figura 1. Dos eventos patológicos mostrados nesta figura, é digna de nota a resposta inflamatória.



Figura 1: Cascata isquêmica que provoca o dano encefálico (Adaptado de LAKHAN *et al.*, 2009).

A extensão da lesão geralmente depende da duração, da gravidade e da localização da isquemia. Sua gravidade está relacionada à região encefálica afetada e à presença de

circulação colateral, sendo que, evidenciam-se duas regiões no território acometido, uma parte do parênquima encefálico que evolui imediatamente à morte – denominada de “centro isquêmico”, e outra, onde se desenvolve uma lesão parcial localizada na área peri-infarto com potencial para se recuperar – chamada de “penumbra isquêmica (MATTSON, 2007; DHAWAN *et al.*, 2010).

### **1.2.1 Alterações no Metabolismo Celular**

O alto consumo de oxigênio e glicose pelo tecido encefálico e sua dependência da fosforilação oxidativa para a produção de energia torna-o extremamente vulnerável à redução da perfusão, em função de haver restrição ao fornecimento de substratos essenciais, resultando na falha nos processos normais de produção de energia pela geração de adenosina trifosfato (ATP). Isto causa diminuição adicional de energia, propiciando a ativação de uma cascata que leva à morte celular devido apoptose. Apesar da isquemia não provocar a morte celular imediatamente, cinco a dez minutos de oclusão da circulação sanguínea podem gerar danos cerebrais irreversíveis (DHAWAN *et al.*, 2010; LOANE & BYRNES, 2010).

Assim, pode-se dizer que a área de infarto - consequência rápida de AVENC isquêmico e hemorrágico - dá-se pelo colapso metabólico inicial, gerando alterações em ATPases e canais iônicos, com acúmulo patológico de aminoácidos excitatórios, influxo excessivo de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), ativação de proteases, formação excessiva de radicais livres e exacerbação da inflamação levando à morte neuronal, glial e perda tecidual (MOSKOWITZ *et al.*, 2010)

### **1.2.2 Excitotoxicidade**

Após a isquemia cerebral, ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios no cérebro, tais como o glutamato e o aspartato. O glutamato é vital para a plasticidade neuronal, porém sua liberação descontrolada nas áreas isquêmicas medeia a transmissão sináptica excitotóxica por meio da ativação dos receptores N-Metil-d-Aspartato (NMDA), Amino-3-hidroxi-5-metil-4-propionato (AMPA) ou kainato, os quais permitem o influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  para a célula, e a indução de múltiplas cascatas de morte celular (BIEGON *et al.*, 2004; LO, 2008).

Os receptores NMDA são permeáveis ao cálcio, portanto sua abertura desencadeia na despolarização adicional da membrana e no maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , exacerbando a quantidade intracelular, caracterizando a excitotoxicidade. Já os receptores AMPA não são normalmente permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  em virtude de suas subunidades GluR2, contudo esta subunidade é reduzida após a isquemia, elevando a permeabilidade destes receptores ao  $\text{Ca}^{2+}$ , fazendo com que os receptores AMPA contribuam com a morte celular cálcio-dependente (DEB *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2006).

Além disso, um gradiente de concentração de glutamato extenso é mantido ao longo da membrana plasmática, através dos transportadores de glutamato sódio-dependentes, localizados nas membranas pré e pós-sináptica. A despolarização da membrana e o acúmulo de  $\text{Na}^+$  dentro das células durante a isquemia provoca um caminho reverso dos transportadores de glutamato, favorecendo sua saída das células, ao longo do gradiente de concentração (DOYLE *et al.*, 2008; BIEGON *et al.*, 2004).

Adicionalmente, o influxo iônico é passivamente seguido de líquido, resultando na formação de edema citotóxico e na elevação intracelular do segundo mensageiro de  $\text{Ca}^{+2}$ , iniciando-se eventos citoplasmáticos e nucleares, dentre os quais, a geração de radicais livres e a ativação de enzimas dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ , incluindo enzimas proteolíticas que

degradam proteínas do citoesqueleto e da matriz extra-celular, tais como a fosfolipase A2, a calpaína, as endonucleases, a adenosina trifosfatase, a cicloxagenase e a óxido nítrico sintase tipo I, provocando um extenso dano celular que leva à morte celular aguda por meio de necrose, e ainda, podem iniciar eventos moleculares que resultam na apoptose, favorecendo a expansão da lesão isquêmica (FURUKAWA *et al.*, 1997; BROUNS & DEYN, 2009).

### **1.2.3 Estresse oxidativo**

Muitas evidências indicam que a disfunção mitocondrial exerce um papel crítico na fisiopatologia da lesão cerebral isquêmica, e suas consequências são numerosas, abrangendo o estresse oxidativo, o acometimento da homeostase celular de cálcio, a promoção de apoptose e a falha metabólica (ROBERTSON *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres ultrapassa a capacidade endógena das defesas anti-oxidantes celulares. Altos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  e adenosina difosfato (ADP) induzem as mitocôndrias a produzirem níveis deletérios de espécies reativas de oxigênio, às quais o SNC é especialmente vulnerável, pois os neurônios apresentam baixos níveis de antioxidantes endógenos. Portanto, a elevada produção de radicais de oxigênio provoca a destruição de macromoléculas celulares e participa da sinalização de mecanismos que geram a morte celular por apoptose (BLOMGREN & HAGBERG, 2006; DEB *et al.*, 2010).

Dentre o espectro de efeitos celulares, encontra-se a inativação de enzimas, a liberação de íons de cálcio dos estoques intra-celulares, a desnaturação protéica, a peroxidação lipídica, o dano ao citoesqueleto e ao DNA, e a quimiotaxia. Por conseguinte, um grave estresse oxidativo se constitui em etiologia para a morte celular por necrose, enquanto que

uma moderada oxidação pode acarretar em apoptose (CRACK & TAYLOR, 2005; EVAN & COOKE, 2004).

#### **1.2.4 Despolarizações peri-infarto/ despolarizações alastradas**

Ondas de despolarizações alastradas são caracterizadas pela redistribuição maciça do transporte de íons pelas membranas celulares, elevando a despolarização neuronal por segundos, e, continuada por um processo de recuperação mais lento, que se prolonga por minutos, durante os quais, os gradientes iônicos são reestabelecidos aos seus valores fisiológicos. Esta perturbação iônica máxima difere das despolarizações alastradas dos outros estados cerebrais, tais como a convulsão epilética, a ativação funcional ou o estado fisiológico de repouso. No AVENC, as despolarizações alastradas são chamadas de despolarizações peri-infarto, que ocorrem e se distribuem nas zonas ao redor da área de infarto (DODICK & GARGUS, 2008).

Despolarizações peri-infarto são ondas de despolarização, causadas pela liberação de potássio ( $K^+$ ) e de aminoácidos excitatórios das áreas circunvizinhas. Estas induzem a despolarização celular, num intervalo de tempo de 1 a 5 minutos, a depressão da atividade neuro-elétrica, o aumento da liberação de glutamato e a perda dos gradientes iônicos de membrana. A principal diferença, entre as duas ondas, consiste no fato de que a depressão alastrada geralmente não causa nenhum tipo de morte celular no cérebro normalmente perfundido, ao passo que as despolarizações peri-infarto, após isquemia, estão associadas com o incremento do dano isquêmico (SASAKI *et al.*, 2009; SAS *et al.*, 2010).

#### **1.2.5 Inflamação**

Dentro do centro isquêmico, a excitotoxicidade e a morte celular por necrose ocorrem em virtude de lipólise, proteólise, desagregação dos microtúbulos e falha bioenergética total, culminando na quebra da homeostase, enquanto na periferia da área isquêmica, a abrangência da isquemia e o intervalo de tempo para a reperfusão determinam o prognóstico para as células. Nesta área de penumbra, a morte celular ocorre em função de mecanismos como apoptose e a inflamação – eventos que acontecem com uma velocidade mais lenta que no centro isquêmico (SAS *et al.*, 2010; HOSSMANN, 2006; MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

No processo inflamatório, há o envolvimento de muitos tipos celulares e mediadores, como as quimiocinas e as citocinas, que serão descritos abaixo. As quimiocinas, participantes no mecanismo de quimioatração das células, correspondem a um dos mais importantes fatores inflamatórios, e no SNC, elas estão relacionadas ao recrutamento das principais células do sistema imune residentes no encéfalo - astrócitos e micróglia, e no sangue periférico, dos monócitos. Apesar de também serem produzidas por neurônios, podem expressar receptores, conhecidos por modularem a atividade neuronal, com potencial neurotóxico. Desta forma, as quimiocinas podem exercer um papel ambíguo, seja por atuarem na atração ou na ativação das células imunes, seja por agirem sobre a modulação da atividade ou da sobrevivência dos neurônios (MADRI, 2009; BAJETTO *et al.*, 2001; CONDUCTIER *et al.*, 2010).

As citocinas são polipeptídeos relacionados à inflamação, ativação imunológica, diferenciação celular ou morte. Numa reação sistêmica, são produzidas por macrófagos ativados, monócitos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas e muitos outros tipos celulares, sendo que no SNC sua origem são as microglias ativadas. Citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumoral necrosis factor* – TNF  $\alpha$ ) e a interleucina 1 (IL – 1) desencadeiam dano parenquimatoso encefálico,

enquanto que a IL – 10 e o receptor antagonista de IL – 1 possuem uma função anti-inflamatória e neuroprotetora (DEB *et al.*, 2010).

No estresse isquêmico, as células inflamatórias podem liberar outras citocinas, como a IL – 6, que tem sido associada com a ativação de células endoteliais, estimulação da Proteína C reativa (CRP), e com a síntese de fibrinogênio. Sendo que elevadas concentrações de CRP e fibrinogênio produzem efeitos deletérios na ocorrência da inflamação e na reologia sanguínea (SHENHAR-TSARFATY *et al.*, 2008). Altos níveis séricos de IL – 6, pós-AVENC, estão associados à gravidade dos acometimentos neurológicos na admissão e no prognóstico, pois tem sido relacionados com o tamanho da área de infarto (LOANE & BYRNES, 2010).

#### 1.2.5.2 Leucócitos

Os leucócitos representam a primeira linha da defesa imunológica. Na ocorrência de um dano tecidual, estas células rapidamente migram para os sítios de lesão a fim de iniciar uma resposta inflamatória. Uma vez apropriadamente organizadas, desencadeiam a destruição dos patógenos invasores e, por último, o processo de reparo da lesão. Todavia, ao controlar mecanismos nocivos, como observado após a exposição a substâncias tóxicas, a resposta inflamatória pode se tornar crônica e resultar em edema persistente, dor, e eventualmente, no aumento ou prolongamento da lesão tecidual (JIANG *et al.*, 2011).

Desta forma, observa-se que a resposta inflamatória pode ocorrer em razão de componentes moleculares e celulares através da interface celular da microvasculatura endotelial. Assim, quando ocorre o AVENC, a microglia, os astrócitos, as células endoteliais e os neurônios liberam citocinas, como a IL – 1 e o TNF, que promovem o recrutamento, a ativação, e finalmente, a adesão dos leucócitos ao endotélio da

microvasculatura cerebral. Estes leucócitos ativados obstruem o canal vascular, e seguem pela transmigração até as áreas infartadas juntamente com os monócitos/macrófagos (THORED *et al.*, 2007).

#### 1.2.5.3 Neutrófilos

Os neutrófilos se acumulam no cérebro cerca de trinta minutos após a isquemia no órgão. Sua transmigração é mediada por três classes de moléculas de adesão celulares – as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas, cuja expressão é regulada por sinalização intra-celular e por citocinas. O recrutamento de neutrófilos ao encéfalo isquêmico inicia com o rolamento destas células pela parede de vasos sanguíneos endoteliais, mediado pelas selectinas; e seguido da pela ativação e aderência neutrofflica, sob mediação das integrinas e imunoglobulinas. Quando aderidos à parede de vasos sanguíneos endoteliais, os neutrófilos migram pelo parênquima cerebral, propiciados pela ruptura da barreira hemato-encefálica (BHE). Este recrutamento pode obstruir a microcirculação e prejudicar a restauração completa do fluxo sanguíneo cerebral depois da reperfusão, e por sua vez, causar dano tecidual adicional após a isquemia, o que é descrito como o fenômeno isquêmico de não-refluxo. Uma vez que ocorre a penetração dos neutrófilos no encéfalo isquêmico, eles podem desencadear dano tecidual em virtude da liberação de radicais de oxigênio livres e enzimas proteolíticas (CHEN *et al.*, 2011; NEUMANN *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2006).

#### 1.2.5.4 Linfócitos

Células T ativadas podem entrar no parênquima do SNC e se acumular no local de lesão, assim têm sido fortemente implicadas à resposta inflamatória, desencadeando em dano axonal e morte neuronal, provavelmente em virtude da produção de fatores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e o óxido nítrico. Por outro lado, as células T infiltradas no SNC também podem manifestar um caráter neuroprotetor, sob determinadas circunstâncias, dependendo do subtipo de linfócitos T envolvidos no estado de ativação (SCHROETER & JANDER, 2005; CUI & BENOWITZ; 2009). Em resposta à isquemia cerebral, os linfócitos surgem rapidamente ao local de lesão, em torno de 24 horas, embora não sejam ordinariamente participantes do SNC, e, uma vez que os mecanismos que induzem sua infiltração permanecem inconclusivos, sabe-se que a ruptura da BHE exerce um papel fundamental para o influxo dessas células, seja por via direta, ao permitir o movimento livre dos linfócitos, ou indireta, pela perda dos antígenos cerebrais, o que resulta na migração de linfócitos ativados (BECKER, 2009; DOYLE *et al.*, 2008).

#### 1.2.5.5 Monócitos

Os monócitos circulam pelo sangue, medula óssea e baço e não se proliferam em estado normal. Apresentam-se como efectoras do sistema imune, equipadas com receptores de quimiocinas e receptores de adesão que medeiam sua migração a partir do sangue para os tecidos, durante a infecção. Os monócitos produzem citocinas inflamatórias e fagocitam células e moléculas tóxicas, bem como podem se diferenciar em células dendríticas inflamatórias ou macrófagos durante a inflamação. A sua migração para os tecidos e sua diferenciação em células dendríticas e macrófagos são determinadas provavelmente pelo ambiente inflamatório e pelos receptores associados ao reconhecimento de patógenos. No AVENC, a distinção entre monócitos e macrófagos/microglia é imprescindível para definir a contribuição da resposta inflamatória sistêmica

ou local para a evolução da lesão, visto que na fase aguda, os macrófagos podem ser oriundos tanto da microglia residente, quanto dos monócitos infiltrados do sangue periférico. Logo, a compreensão da contribuição das células da linhagem monocítica no local de lesão é de suma importância para o estabelecimento de novos parâmetros terapêuticos (GEISSMANN *et al.*, 2010; BECKER, 2009; GUILLEMIN & BREW, 2004).

#### 1.2.5.6 Macrófagos

Os macrófagos são células fagocíticas presentes em tecidos linfóides e não-linfóides, que estão envolvidos na homeostase por meio de sua função fagocitária e produtora de fatores tróficos. Os macrófagos possuem grande quantidade de receptores de reconhecimento de patógenos, tornando-os eficientes na fagocitose e na indução da produção de citocinas inflamatórias. A partir da ocorrência de um evento isquêmico, ocorre a ativação e a migração de macrófagos perivasculares, e concomitantemente, os monócitos/ macrófagos sanguíneos e linfócitos atravessam a BHE rompida a fim de alcançarem a área de lesão (SCHROETER & JANDER, 2005; GEISSMANN *et al.*, 2010).

#### 1.2.5.7 Microglia

Os monócitos derivados do sangue ou da medula óssea podem atravessar a BHE, em condições fisiológicas, e se fixarem no parênquima do SNC como células microgliais. A microglia normalmente apresenta uma aparência extremamente ramificada, mas quando ativada assume uma morfologia mais amebóide e expressa marcadores de superfície que a

deixa virtualmente indistinguível dos macrófagos e dos monócitos circulante. A ativação microglial corresponde ao passo inicial da resposta inflamatória do SNC, e conforme o estímulo, este passo pode ser seguido pela infiltração de monócitos circulantes, neutrófilos e células T, além de astrocitose reativa. Contudo, a ativação microglial não se constitui num estado univalente, sendo que as mudanças na morfologia e na expressão gênica variam enormemente com a natureza, a força e a duração do estímulo (CUI & BENOWITZ; 2009; KELLER *et al.*, 2011; RANSOHOFF & PERRY, 2009).

As células microgliais migram para o local da lesão e podem se proliferar, em respostas a um dano no SNC, induzindo alterações no ambiente neuronal, na descarga e na condução de neurônios. No estado ativado, a microglia é capaz de produzir várias citocinas inflamatórias, radicais livres, óxido nítrico, metaloproteases e glutamato – necessários para o reparo tecidual, mas que também são potencialmente neurotóxicos (JIANG *et al.*, 2011; RANSOHOFF & PERRY, 2009; GRAEBER & STREIT, 2010).

A presença de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex* – MHC) e de moléculas co-estimulativas, levam a microglia a agir como uma célula apresentadora de antígeno. Entretanto, a inflamação aguda, demonstrada pela ativação microglial, pode em algumas circunstâncias, prejudicar os neurônios e agravar o dano primário, por isso que alguns autores defendem a inibição microglial como estratégia para diminuir a lesão causada pelo insulto isquêmico (CZLONKOWSKA & KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, 2010).

A ativação microglial pode ser induzida pela isquemia encefálica, causando liberação de substâncias, muitas das quais são citotóxicas e/ou citoprotetoras. Nos estágios mais tardios, microglia e astrócitos proliferam no território isquêmico e ao redor deste, secretam e respondem a citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais geram

profundos efeitos na resposta inflamatória e na regeneração após a isquemia. A hipótese de que micróglia/macrófagos são necessariamente prejudiciais depois do evento isquêmico ainda permanece obscura, embora muitas linhas de evidência apontem que a microglia contribua para a lesão (KELLER *et al.*, 2011; KAUSHAL & SCHLICHTER, 2008; JIANG *et al.*, 2011).

Contudo, outros estudos sugerem que micróglia/macrófagos e seus fatores secretados também possam proteger as células residentes do SNC – o que é conhecido como o papel dual da micróglia, embora se saiba sua relevância para o desenvolvimento da patogênese após isquemia encefálica. Por conseguinte, o fenótipo microglial depende do tipo de estímulo (e do receptor de ativação, ou seja, a natureza das moléculas secretadas pela microglia ativada relaciona-se estritamente ao tipo de estímulo acionador (NEUMANN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2005; RIBES *et al.*, 2010; DEIERBORG *et al.*, 2010).

#### 1.2.5.8 Astrócitos

As células astrocitárias são mais resistentes que os neurônios ao insulto hipóxico, sendo que realizam sua resposta, através da produção de mediadores inflamatórios, como os radicais livres, as citocinas, as quimiocinas, proteases e mediadores vasoativos. Além disso, exercem um papel de destaque na captação fisiológica de glutamato no parênquima tecidual, mas ao serem afetados pelo ambiente isquêmico, os próprios astrócitos liberam glutamato para o espaço extracelular, agravando a excitotoxicidade. Quando ativados após AVENC, ocorre o aumento da expressão da proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein* – GFAP), desencadeando no fenômeno chamado de (astro) gliose reativa, caracterizada por mudanças estruturais e funcionais específicas ao redor da área isquêmica. Por outro lado, a ativação de astrócitos - importante para o processo de regeneração - é parcialmente estimulada por citocinas derivadas das células microgliais,

portanto a perda das funções protetoras da microglia pode contribuir para progressão da neurodegeneração (SCHMID-BRUNCLIK *et al.*, 2008; STREIT *et al.*, 2009).

### 1.2.6 Apoptose

Ao contrário da necrose, tipo de morte celular predominante no centro isquêmico, a apoptose – morte celular programada – ocorre nas células da penumbra isquêmica, mediante estímulos provenientes dos radicais livres, da ligação com receptores de morte, danos ao DNA, ativação de proteases e desequilíbrio iônico (MOSKOWITZ *et al.*, 2010; DOYLE *et al.*, 2008).

O dano isquêmico causa resposta precoce na expressão gênica do complexo Bcl - 2 (do inglês *B-cell lymphoma 2*) e da proteína citoplasmática p53, além da liberação de moléculas pró-apoptóticas como o citocromo c e o fator de indução à apoptose oriundo da mitocôndria, o que por sua vez, leva a ativação de caspases e outros genes que aumentam a morte celular. A cascata de caspases pode ser ativada por uma rota extrínseca ou também chamada de “receptor-dependente de morte”, ou por uma via intrínseca ou via “receptor-independente de morte”, de localização mitocondrial (EKSHYYAN, 2004; ELDADAH & FADEN, 2000).

Os mecanismos dependentes e independentes de caspase estão relacionados à isquemia cerebral focal, na qual ocorre aumento na expressão de Fas e de mediadores da via extrínseca dependente de caspase, incremento da expressão das caspases 1, 3 e 9, e da caspase clivada 8 na penumbra isquêmica. Desta forma, sugere-se que o bloqueio da caspase 3 possa ser benéfico para a redução do tamanho do infarto, após isquemia transitória focal (SIMS & MUYDERMAN, 2010; TARAWNEH & GALVIN, 2010).

Além disso, mecanismos pró-apoptóticos moleculares, incluindo aqueles ativados por citocinas inflamatórias, levam a liberação de proteínas mitocondriais apoptóticas, como o citocromo c e o fator de indução a apoptose (do inglês *apoptosis-inducing factor* - AIF). A indução da clivagem, pela calpaína, de moléculas como AIF, também promove a ativação da via mitocondrial intrínseca de apoptose, por isso as intervenções potencialmente neuroprotetoras consistem na utilização de inibidores de calpaína, inibidor de PARP 3 - amino benzoamido (3ABA) e de estrogênio, pois desencadeiam na expressão do Bcl2, de inibidores de Bax, e muitos outros agentes que estimulam o metabolismo energético aeróbio, controlando a ocorrência de apoptose (BECKER, 2006; ROBERTSON *et al.*, 2009).

### 1.3. TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O acidente vascular encefálico isquêmico agudo possui uma janela temporal limitada, portanto requer avaliação imediata para a formulação do diagnóstico correto e, posteriormente, a realização do tratamento adequado. Os protocolos primários de manejo dos AVENCs e de prevenção secundária visam a modificação dos fatores de risco vasculares – a hipertensão, o tabagismo, a estenose carotídea, a fibrilação arterial, a inatividade física, a diabetes mellitus e a dislipidemia – com conscientização e utilização de medicamentos, tais como os agentes antiplaquetários, as drogas anti-hipertensivas, os agentes que combatem as dislipidemias, e as medicações anticoagulantes (CUMBLER *et al.*, 2010; CAMARGO *et al.*, 2005).

O recurso medicamentoso recente foi a implementação da administração endovenosa do ativador do plasminogênio tecidual (tPA, do inglês *tissue plasminogen activator*), nos

casos de isquemia cerebral aguda, porém sua eficácia pode ser limitada pela severidade da isquemia, idade avançada do paciente, presença de hipertensão, tamanho da oclusão arterial, ocorrência de suprimento sanguíneo colateral, tempo entre o evento isquêmico e o tratamento, e inflamação associada à reperfusão (PANDIAN, 2009).

Apesar de aprovada há 10 anos aproximadamente, a utilização do tPA para o tratamento da isquemia encefálica aguda ainda é incomum, tendo um alcance de apenas 3 a 5% dos pacientes em virtude da janela temporal reduzida para sua administração de forma segura. Além disso, outro fator complicador, que ocorre em países em desenvolvimento como o Brasil – é a desinformação a cerca do tPA e a reduzida disponibilidade do medicamento nos sistemas públicos de saúde. Isto evidencia uma falha no tratamento aos pacientes, na janela terapêutica adequada, e consecutivamente, prejudica a chance de sobrevivência e a possibilidade de atenuação das complicações da doença (SACCO *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2009; CUMBLER *et al.*, 2010).

Desta forma, observa-se que a terapia trombolítica está altamente relacionada com o futuro dos pacientes, e que o tempo de resposta ao AVENC não somente limita as opções de tratamento, mas também pode representar piores prognósticos, devido ao prolongamento do tempo da isquemia (DENES *et al.*, 2010).

Para tanto, muitos tratamentos experimentais tem sido testados em sua eficácia e segurança, principalmente visando a restauração da perfusão cerebral e a neuroproteção (SACCO, 2007), dentre os quais se destaca o uso da hipotermia terapêutica (ALAM, 2011), que se constitui na estratégia de neuroproteção mais sólida atualmente, a administração de altas doses de albumina humana (GINSBERG *et al.*, 2004); a utilização de drogas anti-inflamatórias, como a minociclina (YRJÄNHEIKKI *et al.*, 1999); trombolíticas (HACKE *et al.*, 1995) e mais recentemente o transplante de células-tronco (TARAWNEH & GALVIN, 2010).

### 1.3.1 Minociclina

O desafio atual para o tratamento do AVENC é entender os processos que levam à lesão encefálica pós-isquemia e assim identificar novos parâmetros para intervenção. Neste contexto, como a inflamação se configura num importante fator da lesão isquêmica encefálica, representa então, a maior oportunidade para se entender, e, sobretudo, tratar o AVENC isquêmico (SWEILEH *et al.*, 2009; DENES *et al.*, 2010).

Secundariamente a condições pré-existentes e à imunossupressão induzida pelo AVENC, a isquemia encefálica predispõe os pacientes a infecções que, se não tratadas, poderão produzir um impacto negativo sobre a resolutividade final. Em modelos animais de isquemia experimental focal, tem sido demonstrado que o AVENC induz imunodeficiência através do eixo hipotalâmico-hipofisário e do sistema nervoso simpático, que pode ser detectada poucas horas após a isquemia cerebral e persistir por semanas, por isso os pacientes que sofreram isquemia encefálica apresentam maior suscetibilidade a infecções (VOGELGESANG *et al.*, 2008).

Os efeitos resultantes, como febre, hipotensão e hipóxia são responsáveis pelo impacto sobre a sobrevivência neuronal na penumbra isquêmica, além de serem reconhecidos como preditores adicionais do prognóstico obscuro nesses pacientes. Neste sentido, o tratamento antimicrobiano pode ser administrado antecipadamente, a fim de reduzir as taxas de infecção relacionadas ao AVENC e, assim, propiciar um prognóstico mais favorável (IONITA *et al.*, 2010).

Em função dos efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores demonstrados por alguns antibióticos, iniciou-se a investigação com minociclina, e verificou-se que esta droga exibe resultados importantes em modelos animais, quando administrada após a isquemia cerebral, desencadeando numa melhoria significativa no prognóstico da doença cerebrovascular (YRJÄNHEIKKI *et al.*, 1999; LAMP *et al.*, 2007).

A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, com uma molécula altamente lipofílica, capaz de penetrar na BHE. Consiste num antibiótico efetivo contra infecções de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Seus mecanismos de ação em relação à atividade antimicrobiana são baseados nas características das tetraciclinas, que inibem a síntese protéica das bactérias (DOMERCQ & MATUTE, 2004; KIM & SUH, 2009).

Apesar de não ser totalmente claro qual o mecanismo de ação da minociclina no AVENC isquêmico, o fármaco parece exercer influência em pontos diversificados da resposta inflamatória e apoptose. Na resposta inflamatória, estudos demonstram que a minociclina bloqueia a ativação e infiltração de leucócitos, atenua a permeabilidade da BHE, inibe as enzimas MMPs e NOS, modula mediadores inflamatórios e reduz a ativação e a proliferação microglial (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; YONG *et al.*, 2004; STIRLING *et al.*, 2005; MACHADO *et al.*, 2006; HEWLETT & CORBETT, 2006; HAYAKAWA *et al.*, 2008).

A minociclina também desempenha efeitos neuroprotetores em modelos de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla e lesão medular. Em modelos animais de AVENC, a minociclina tem sido relacionada com a redução do volume de infarto e com a amenização dos déficits funcionais. Sendo que o mecanismo, mais comumente sugerido da neuroproteção induzida pela minociclina, perpassa pela modulação da atividade microglial, além do estímulo à neurogênese (DU *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2009; CORDEIRO DE SOUZA, 2011; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; YENARI *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Terapia Celular

O transplante de células-tronco surge como uma terapia promissora para o AVENC. A terapia celular tem mostrado sucesso em modelos experimentais de isquemia encefálica, mediante a utilização de vários tipos celulares, como os progenitores neurais, células da medula óssea e do sangue, cuja melhora parece se estender à recuperação funcional após isquemia (CHOPP *et al.*, 2009; BLISS *et al.*, 2010).

As células-tronco derivadas da medula óssea são descritas como multipotentes e passíveis de serem atraídas para os tecidos lesionados em virtude de mecanismos quimiotáticos, por conseguinte, têm sido utilizadas mais frequentemente, tanto em estudos pré-clínicos quanto em estudos piloto e ensaios clínicos. Em modelos experimentais, tem sido sugerido que os possíveis efeitos terapêuticos podem ser devido à produção de fatores tróficos pelas células derivadas da medula óssea, e à indução de angiogênese, neurogênese e sinaptogênese, favorecendo a remodelagem do encéfalo (SHEN *et al.*, 2007; CHOPP; LI, 2002; MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007; BORLONGAN *et al.*, 2004; CAPLAN, 2009; BARBOSA DA FONSECA *et al.*, 2010).

Células-tronco mesenquimais e células mononucleares da medula óssea promovem melhora dos desfechos funcionais em modelos animais de AVENC, quando administradas por via endovenosa, intra-arterial e intracerebral. Evidências de estudos pré-clínicos indicam que o principal mecanismo da terapia celular não corresponde ao transplante diretamente, mas aos efeitos tróficos, anti-inflamatórios e imunomodulatórios, que ocorrem na fase aguda e persistem até que as células transplantadas morram (GIRALDI-GUIMARAES *et al.*, 2009; VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010).

A fração mononuclear da medula óssea contém dois tipos de células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais e as hematopoiéticas, além das células progenitoras hematopoiéticas e progenitores endoteliais. Foi demonstrado que sua utilização pode proporcionar recuperação funcional quando administradas 1 dia após a isquemia (WANG *et al.*, 2008; VASCONCELOS DOS SANTOS *et al.*, 2010).

A rota de administração pode determinar a escolha do momento para o transplante, conforme a finalidade terapêutica. O transplante intravascular pode requerer um fornecimento mais precoce, visto que as células utilizam-se de sinais inflamatórios agudos, para alcançar a área lesionada. Em contrapartida, a injeção intraparenquimatosa poderia ser beneficiada por uma administração mais tardia, a fim de favorecer a sobrevivência celular, já que o ambiente inflamatório agudo acarretaria em prejuízos para as células transplantadas (BORLONGAN *et al.*, 2004; BLISS *et al.*, 2010).

#### 1.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Enfermidades neurais agudas e crônicas, como a isquemia encefálica, apresentam uma resposta imune, caracterizada pela indução precoce de componentes inflamatórios, que contribuem diretamente para a extensão da lesão e piora do quadro funcional. Embora a inflamação seja reconhecida como um evento chave no AVENC isquêmico, ainda é controverso se o processo inflamatório é a causa ou o resultado dos mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam na mortalidade e nos déficits funcionais que podem ocorrer nos pacientes (OFFNER *et al.*, 2009; GOMES-LEAL *et al.*, 2005; POPOVICH *et al.*, 1999; DEIERBORG *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2009; SHENHAR-TSARFATY *et al.*, 2008).

Dados experimentais mostram que a modulação inflamatória pode ser benéfica aos neurônios e atenuar os danos gerados por toxinas, lesão mecânica, isquemia e processos crônicos. Portanto, a manipulação da resposta inflamatória propicia a oportunidade para novos métodos de tratamento para as enfermidades agudas e crônicas que acometem o SNC, como a isquemia encefálica, e, desta forma, representa um foco terapêutico plausível para intervenções (CZŁONKOWSKA & KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, 2010; JIANG *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2010; POPOVICH *et al.*, 1999).

Neste sentido, em razão de muitos estudos demonstrarem associação entre infecções agudas ou crônicas e o AVENC isquêmico, sugere-se que a antibioticoterapia possa reduzir o tamanho da área de infarto, bem como produzir melhoras funcionais, já que alguns antibióticos funcionam como drogas anti-inflamatórias, como é o caso da minociclina. Contudo, os guias para prevenção e tratamento do AVENC não recomendam um regime antibiótico específico, visto que as evidências sobre o tipo de medicamento e a janela temporal adequada ainda não são completamente conclusivas, por isso é fundamental que sejam feitas novas pesquisas que esclareçam o papel dos medicamentos anti-inflamatórios para a prevenção das complicações neurológicas, provocadas pelo AVENC isquêmico, por meio da promoção da preservação tecidual e da recuperação funcional (MURATA *et al.*, 2010; YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; DEIERBORG *et al.*, 2010; IONITA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2006; MACHADO *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2004).

Por outro lado, o desenvolvimento de estudos com células-tronco torna a terapia celular um tratamento promissor para as doenças do SNC, incluindo o AVENC. Assim, a administração de células-tronco pode ser benéfica para os desfechos clínicos dos pacientes após isquemia, por atuar na melhora da neuroinflamação causada após o evento, portanto fomenta-se que esta modulação também promova atenuação do ambiente fisiopatológico

desfavorável, propiciando a neuroproteção (MENDEZ-OTERO *et al.*, 2007; FRANCO, 2009; RIEGELSBERGER *et al.*, 2011; BLISS *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011).

Neste sentido, uma vez que o transplante de células derivadas da medula óssea tem sido aplicado em pacientes com enfermidades hematológicas há muitos anos, discute-se a implementação desta mesma terapia celular às doenças do SNC, como o AVENC, já que as células transplantadas podem prover fatores tróficos aos neurônios e células gliais, e assim, desencadear benefícios funcionais, propiciar aumento na angiogênese, neurogênese e sinaptogênese, favorecendo a remodelagem do tecido encefálico (CHEN, *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003, CHOPP, LI, 2002; LINDVALL *et al.*, 2004).

Porém, o ambiente inflamatório agudo, encontrado por essas células no local da lesão, pode ser um entrave para que elas ajam de forma eficaz durante o processo de lesão secundária do AVENC isquêmico, podendo até haver rejeição em função da resposta inflamatória celular, principalmente em decorrência da ativação microglial (BLISS *et al.*, 2010; COYNE *et al.*, 2006).

Em estudos prévios de nosso grupo, investigou-se como a modulação da ativação microglial influencia as ações terapêuticas de células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas, via endovenosa, na fase aguda após isquemia experimental do córtex motor (FRANCO, 2009), e no estriato (CARDOSO, 2010), nos quais, encontrou-se evidências experimentais de que a diminuição da ativação microglial é benéfica para as ações das células transplantadas 24h após isquemia.

Como demonstrado previamente, as células-tronco mesenquimais e as células mononucleares da medula óssea melhoram os desfechos funcionais em modelos animais de isquemia encefálica, independentemente da forma de administração, seja por via endovenosa, intra-arterial ou intra-cerebral, por produzirem efeitos agudos e persistentes

no encéfalo antes de haver morte celular (CHEN *et al.*, 2001, 2003, CHOPP, LI, 2002, GIRALDI-GUIMARÃES *et al.*, 2009; BARBOSA DA FONSECA *et al.*, 2010).

Nesta dissertação, induziu-se isquemia focal no estriato de ratos adultos para a investigação dos efeitos isolados do bloqueio da ativação microglial pela minociclina, e das ações das células mononucleares da medula óssea (CMMOs), que foram transplantadas diretamente no estriato, com base na hipótese de que ambos poderiam resultar na melhora do microambiente tecidual encefálico pós-AVENC isquêmico agudo, e assim promover neuroproteção e recuperação funcional (HU *et al.*, 2011; RIEGELSBERGER *et al.*, 2011).

## 2 OBJETIVOS

### 2.3 GERAL

2.3.1. Investigar os efeitos da minociclina, comparando-os aos efeitos neuroprotetores das células da fração mononuclear da medula óssea, transplantadas diretamente no estriato na fase aguda após isquemia experimental focal induzida por microinjeções de ET-1 no estriato de ratos adultos.

### 2.4 ESPECÍFICOS

2.4.1. Investigar os efeitos do transplante intraestriatal de células da fração mononuclear da medula óssea após isquemia focal aguda, sobre a área de lesão, a densidade neuronal, o número de células apoptóticas e os padrões de ativação microglial macrofágica;

2.4.2. Avaliar os efeitos da minociclina sobre a área de lesão, a densidade neuronal, o número de células apoptóticas e os padrões de ativação microglial macrofágica, comparando os padrões histopatológicos obtidos com aqueles presentes em animais dos grupos controle e transplantados com células da fração mononuclear da medula óssea;

2.4.3. Avaliar, através de testes comportamentais específicos, se as terapias experimentais implantadas possuem efeitos sobre a recuperação funcional dos animais submetidos à isquemia estriatal.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o presente estudo, utilizou-se ratos adultos machos da raça *Wistar*, pesando entre 250 e 350 gramas. Todos foram alojados em gaiolas contendo entre 4 e 5 animais, com água e comida *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação do Comitê de Ética de pesquisa em animais da Universidade do Federal do Pará (CEPAE – UFPA), sob protocolo BIO0030-09 (Anexo II), e em obediência às normas internacionais sugeridas pelo *National Institute of Health e Society for Neuroscience*.

Foram utilizados 12 ratos, distribuídos em 04 grupos experimentais, descritos na tabela abaixo:

**TABELA 1:** Delineamento dos grupos experimentais da presente pesquisa.

| GRUPO | EXPERIMENTO  | ANIMAIS |
|-------|--|---------|
| 1     | SALINA: grupo não tratado, animais isquêmicos, porém tratados com solução salina estéril.                                | 4       |
| 2     | MINOCICLINA: animais isquêmicos, tratados com minociclina, via intraperitoneal, durante sete dias.                       | 4       |
| 3     | CMMOs: animais isquêmicos, tratados com $1 \times 10^6$ células mononucleares por via intraestriatal, 24 h após a lesão. | 3       |
| 4     | DOADOR DE CÉLULAS MONONUCLEARES  | 1       |
|       | TOTAL  | 12      |

### 3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E MODELO DE ISQUEMIA FOCAL

A isquemia focal foi induzida com microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) (Sigma, Brasil). Este modelo experimental de isquemia focal é utilizado de rotina em nosso laboratório (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010) e possui vantagens e facilidades técnicas (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007), em relação aos modelos tradicionais de isquemia experimental que consistem no clampeamento de artérias cerebrais através de cirurgia complexa (ZHAO *et al.*, 1994; WINDLE *et al.*, 2006).

No presente estudo, previamente à indução de isquemia focal por microinjeções de ET-1, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (72 mg/ kg) e xilazina (9 mg/ kg) via intraperitoneal (i.p.). A fim de verificar se os ratos encontravam-se sob efeito da anestesia, foram testados dois reflexos: o corneano, mediante estimulação do globo ocular; e o de retirada pata, estimulado pela aplicação de tato profundo, em caráter de aperto, no membro inferior.

Após o rebaixamento do nível reativo por ação dos anestésicos, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336) (Figura 2), onde permaneceram fixados pela cabeça durante toda a cirurgia, através do meato acústico externo, bilateralmente (Figura 3).



Figura 2: Aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336) (A). Animal posicionado no estereotáxico para os procedimentos cirúrgicos (B).

Fonte: Dados da autora, 2011.

Posteriormente, realizou-se uma incisão na linha média do crânio para expor o bregma, utilizado como referência anatômica, para o estabelecimento das coordenadas estereotáxicas – ântero-posterior, médio-lateral e dorsoventral, com valores de 0,7 mm, 2,5 mm e 4 mm (a partir da dura máter). Estas coordenadas são adequadas para microinjeções estriatais (Figura 4).

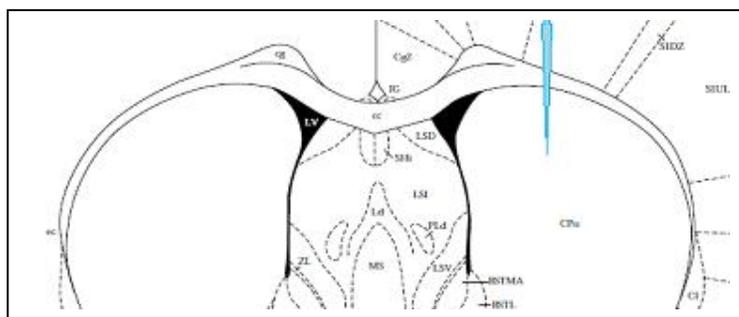


Figura 3: Localização da injeção de ET – 1 no estriato dos animais.

Fonte: Imagem adaptada de Paxinos, 2007.

Após a identificação estereotáxica da área a ser injetada com ET-1, ao microscópio cirúrgico, efetuou-se um orifício na calota craniana no lado esquerdo, com o auxílio de uma broca, e posteriormente, a dura-máter foi removida para propiciar a visualização do córtex cerebral. Após realizado o orifício pérvio, introduziu-se uma micropipeta de vidro, com ponta de 10-20  $\mu\text{m}$  e graduações de 1  $\mu\text{L}$  (Sigma, Brasil), para injeção de 80 pMol de ET-1 diluídos em 1  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril diretamente no estriato no hemisfério esquerdo (Figura 5). Para a preparação da ET-1 ser usada para a indução isquêmica, uma alíquota contendo 5  $\mu\text{L}$  de 160 pMol de ET-1, foi diluída com a adição de 5  $\mu\text{L}$  de azul colanil, usado para identificação mais precisa do sítio de injeção. Após a injeção, a micropipeta permaneceu estacionária por 5

minutos no parênquima estriatal para facilitar a difusão de ET-1. Após este período, a mesma foi lentamente removida para evitar refluxo da solução de ET-1, e em seguida, fechou-se a incisão com uma sutura disposta sagitalmente.

Posteriormente à cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida à vontade no decorrer do tempo de sobrevivência – 7 dias.



Figura 4: Momento da injeção de ET – 1 com micropipeta de vidro (apontada pela seta).  
Fonte: Dados da autora, 2011.

### 3.3 TRATAMENTO COM MINOCICLINA

O protocolo de administração de minociclina para realização da inibição microglial (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; GUIMARÃES *et al.*, 2010). A primeira dose (50 mg/kg) foi administrada duas horas após a indução da isquemia estriatal. Esta mesma dose foi administrada nas três aplicações seguintes, chamadas de “doses de ataque”, com intervalos de 12 horas. Posteriormente, iniciou-se a fase de manutenção do tratamento medicamentoso, com redução da dose (25 mg/kg) e alteração no intervalo de aplicação para 24 horas, até o sexto dia após a indução isquêmica.

Nos animais do grupo controle, injetou-se o mesmo volume de solução salina estéril a 0,9%, obedecendo-se as mesmas estratégias em relação a horários, intervalos de tempo e volumes da solução.

### 3.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

24 horas após a indução isquêmica, transplantou-se, utilizando uma seringa de *Hamilton*® (Modelo 702),  $1 \times 10^6$  de CMMOs, diluídos em 5  $\mu$ L de solução salina estéril a 0,9% diretamente no parênquima estriatal, de acordo com as coordenadas estereotáticas previamente descritas.

Como experimento controle, injetou-se 5  $\mu$ L de solução salina estéril a 0,9% diretamente no estriato.

### 3.5 EXTRAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

O protocolo de extração das CMMOs foi adaptado de GIRALDI-GUIMARÃES *et al.* (2009). O animal doador foi anestesiado como previamente descrito. Após abolição dos reflexos de retirada da pata e corneano, o mesmo foi sacrificado através de deslocamento cervical. Em ambiente estéril, o fêmur e a tíbia de cada pata foram dissecados e imersos em solução salina estéril a 0,9%. Na capela de fluxo laminar (Veco, Clean Plus – CFLH-09), as epífises dos ossos foram cortadas e a medula óssea extraída para um tubo plástico cônico (14 ml), em jatos de solução nutriente - DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, D8900-10X1L) com auxílio de uma seringa de 10 ml, cuidadosamente inserida no canal da medula óssea. No tubo plástico, a medula óssea foi mecanicamente dissociada, e depois, centrifugada por 5 minutos (Centribio, 80-2B). O sobrenadante foi descartado, a mistura de células novamente suspensa

em 2ml de DMEN-F12, transferida para outro tubo plástico contendo 2 ml de gradiente de Ficol (108 31-6X100XL) e centrifugada por 30 minutos. As células foram extraídas do meio presente entre o Ficol e a solução nutritora. Em um terceiro tubo plástico, as células foram centrifugadas em três tempos de cinco minutos em 3 ml de salina estéril, com ressuspensão das células entre uma lavagem e outra (Figura 6).

Depois da última lavagem, quantificou-se as células viáveis, que foram selecionadas pelo teste da incorporação azul de tripan. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 0,9 ml de solução nutritora e 0,1 ml de soro fetal bovino. Posteriormente, uma alíquota foi retirada desta última solução para contagem das células mononucleadas na Câmara de Neubauer (Hemocitômetro), tomando-se por base, inicialmente, o fator de diluição igual a 10 (dez) (FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010, CORDEIRO DE SOUZA, 2011).

O volume contendo  $1 \times 10^6$  CMMOs foi injetado diretamente no estriato dos animais, como previamente descrito.

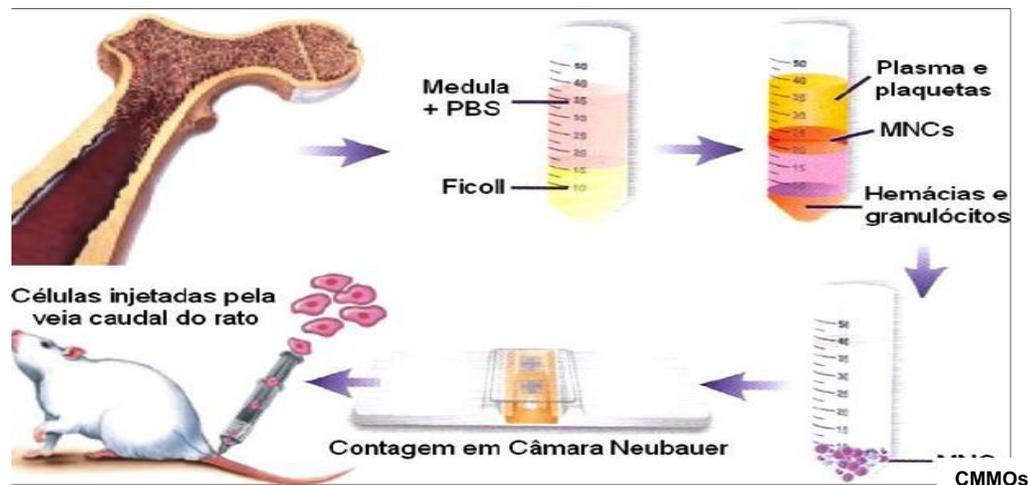


Figura 5: Extração, obtenção e administração de células-tronco extraídas a partir da medula óssea vermelha em gradiente de Ficol (FRANCO, 2009). Adaptou-se a rota de administração, de via endovenosa (como mostrada na figura) para injeção intraparenquimatosa.

### 3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Para a avaliação funcional dos animais, foram efetuados dois testes comportamentais, o teste do campo aberto (adaptado de WALSH, CUMMINS, 1976) e o teste de remoção do adesivo (baseado em SUGHRUE *et al.*, 2006). O primeiro objetivou quantificar a atividade exploratória motora do animal, e o segundo, fornecer dados a cerca de suas respostas de cunho sensoriomotor.

No dia anterior à cirurgia, a fim de registrar as linhas de base do estado funcional dos ratos, realizou-se os testes comportamentais, os quais também foram executados posteriormente à cirurgia em dias específicos, conforme a linha temporal da figura abaixo:



0: Teste para aferição da linha de base; ↓: dia da cirurgia estriatal; 1,3 e 7: dias após a cirurgia nos quais foram executados os testes.

#### 3.6.1 Teste do Campo Aberto

O campo aberto foi realizado numa caixa de 60x60 centímetros (cm) de tamanho e 50 cm de altura, com fundo e paredes brancos, subdividida em 16 quadrados de 15 cm no piso, sendo 4 centrais e 12 periféricos (Figura 7).

O teste teve a finalidade de mensurar a atividade motora dos ratos, uma vez que funcionou como instrumento para observar as ações exploratórias espontâneas de cada animal, em um intervalo de cinco minutos. O tempo foi contado a partir da colocação do animal no centro do campo de teste, momento em que se iniciou a filmagem (Sony®, *Cyber Shot* W210). A máquina filmadora foi posicionada a uma distância de 150 cm do revestimento

inferior da caixa. Para a análise, foram tomados como base os seguintes parâmetros adaptados de Walsh & Cummins (1976):

- a. Latência – tempo que o animal demorava para sair do ponto de partida;
- b. Distância percorrida – número de quadrantes atravessados nesta atividade;
- c. Tempo empregado na deambulação – através da contagem em cronômetro independente;
- d. Frequência do comportamento de levantar-se;
- e. Tempo empregado na auto-limpeza.

Desta forma, avaliaram-se cinco parâmetros relacionados ao teste: latência – tempo decorrido entre a colocação do animal no centro do aparato e o início da movimentação; distância percorrida durante o teste, contabilizada a partir da contagem dos cruzamentos pelos animais das linhas demarcadas no fundo da caixa; tempo empregado na deambulação – registro do intervalo de tempo em que o animal caminhou pelo aparato de teste; frequência do comportamento de levantar-se (do inglês *rearing*); e auto-limpeza (do inglês *grooming*), caracterizada pela utilização das patas dianteiras e língua para a higiene individual.

O teste do campo aberto foi efetuado nos dias 1, 3 e 7 pós-cirúrgicos em animais isquêmicos tratados com solução salina (N=4), com CMMO (N=3) e minociclina (N=4) com objetivo de detectar possíveis alterações no comportamento motor após a indução isquêmica.

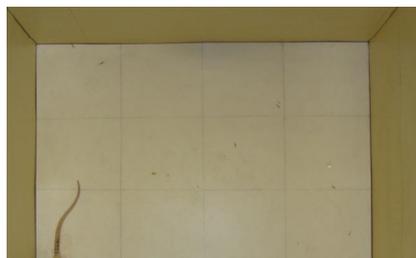


Figura 6: Animal posicionado na caixa após o teste do campo aberto.

Fonte: Dados da autora, 2011.

### 3.6.2 Teste de Remoção do Adesivo Modificado

Neste experimento, utilizou-se o teste modificado de remoção do adesivo, adaptado de Sughrue *et al.* (2006). Na versão modificada do teste de remoção do adesivo utilizada neste trabalho, uma pequena manga foi confeccionada com um pedaço de fita adesiva de papel verde de 3,0 cm de comprimento por 1,0 cm de largura, e colocada sobre uma das patas dianteiras do animal (Figura 8). A resposta do animal foi medida através da sua tentativa de tirar a fita com a língua e / ou com a pata contralateral, disponibilizando 5 tentativas para cada membro, separada e alternadamente. Desta forma, com o auxílio de dois cronômetros mediu-se a quantidade de tempo empregada na tentativa de retirar a fita. Com um cronômetro, programava-se o tempo de 30s, o qual era fornecido ao animal para cada pata, e com o outro cronômetro, registrava-se o período utilizado pelo animal para tentar tirar a fita do punho. Caso, em 30s o animal não conseguisse retirar a fita, esta era retirada do punho do rato com auxílio de uma tesoura.

Foram excluídos o pior e o melhor rendimento a fim de atenuar os desvios para cada animal.

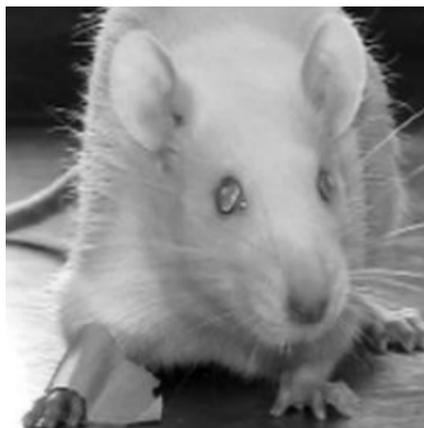


Figura 7: Animal sendo submetido ao teste de remoção do adesivo adaptado de Sughrue *et al.* (2006).

Fonte: Dados da autora, 2011.

### 3.7 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

No sétimo dia, após a indução isquêmica, ao término dos testes comportamentais, os animais foram profundamente anestesiados como previamente descrito e perfundidos através do ventrículo esquerdo com 250 a 300 ml de solução salina tamponada (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) e heparinizada, seguida de 250 a 300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Em seguida, executou-se a retirada do encéfalo com auxílio de tesoura e alveolótomo. Os encéfalos foram pós-fixados durante 24 horas no mesmo fixador usado na perfusão e crioprotetidos em concentrações crescentes de sacarose diluída em mistura de glicerina com PB 0,05M (pH 7,2 – 7,4) (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Após a crioproteção, os encéfalos foram imersos em gel (*Tissue Tek*) para confecção dos blocos de corte e cortados em criostato (Carl Zeiss, Mícron, HM505E, Alemanha), com o qual se obteve secções coronais de 30 e 50  $\mu\text{m}$  de espessura contendo a região estriatal com a lesão isquêmica. Estas secções eram organizadas da seguinte forma: em cada lâmina eram colocadas 3 secções; e a cada intervalo entre 6 lâminas com secções de 30 $\mu\text{m}$ , era composta uma com secções de 50  $\mu\text{m}$ . Estas secções foram diretamente montadas em lâminas gelatinizadas a partir do criostato e conservadas em *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização. Os cortes mais finos foram utilizados para marcação imunohistoquímica e os mais espessos para análise histopatológica de rotina com violeta de cresila (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

### 3.8 HISTOPATOLOGIA DE ROTINA

A análise histopatológica de rotina foi realizada em secções coronais coradas com violeta de cresila (Sigma, Brasil) nas secções de 50  $\mu\text{m}$  (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008). Esta coloração foi efetuada para identificar a área de lesão isquêmica, a qual foi reconhecida

pela presença do azul de colanil, palor tecidual, perda de corpos celulares e infiltrado inflamatório.

### 3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

O procedimento de imunohistoquímica foi realizado em secções coronais de 30  $\mu\text{m}$  (vide Protocolo de imunohistoquímica em Anexo I). Para avaliarmos os padrões de perda neuronal, inflamação e morte celular programada após isquemia estriatal, utilizou-se os seguintes anticorpos:

#### **3.9.1. Neurônios:**

Os pericários neuronais foram marcados com anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon), que reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios maduros (MULLEN *et al.*, 1992).

#### **3.9.2. Marcadores Inflamatórios:**

A presença de macrófagos e microglia ativados na área da lesão e nas regiões circunvizinhas foi identificada através do anticorpo ED1 (1:500, Serotec), que reconhece um epítipo na membrana dos lisossomos de macrófagos ativados (ROBINSON *et al.*, 1986).

#### **3.9.3. Marcação de Células Apoptóticas:**

Para identificarmos as células apoptóticas, utilizou-se o anticorpo anti-caspase 3 ativa (1:250, Promega) (LALANCETTE-HEBERT *et al.*, 2007).

### 3.10 ANÁLISE QUANTITATIVA



corpos neuronais no estriato era demarcada e, posteriormente, utilizava-se o software para quantificar as dimensões da região isquêmica.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de um critério, com correção de Tukey e Teste T de Student. Em todas as análises considerou-se  $p < 0.05$  como nível de significância. O software *GraphPad Prism* foi utilizado para a análise estatística.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES TÍPICOS DE LESÃO ISQUÊMICA

Posteriormente à indução isquêmica estriatal, os animais foram observados para averiguação de possíveis déficits motores imediatos. Verificou-se a partir da remissão da depressão central produzido pela anestesia, que os animais apresentaram desvio ipsilateral do tronco, quando na posição de decúbito ventral estática, somada à retração da pata contralateral para junto do corpo, inferiormente. Observou-se a movimentação circular do animal para o mesmo lado da lesão isquêmica, isto é, o deslocamento em círculos para a esquerda.

### 4.2. ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS APÓS MICROINJEÇÕES DE ET-1 NO ESTRIATO DE RATOS ADULTOS

A lesão induzida pela injeção de 80 pmol de ET-1 no estriato de ratos foi visualizada, primariamente, em secções coronais do encéfalo com 50 µm de espessura, coradas por violeta de cresila. A área de injeção da ET-1 foi caracterizada por palor, perda tecidual (em função da morte celular por necrose no centro isquêmico) e infiltrado inflamatório, característicos do processo fisiopatológico decorrente da isquemia (Figura 10A). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios utilizando o mesmo modelo experimental (HUGHES *et al.*, 2003; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008).

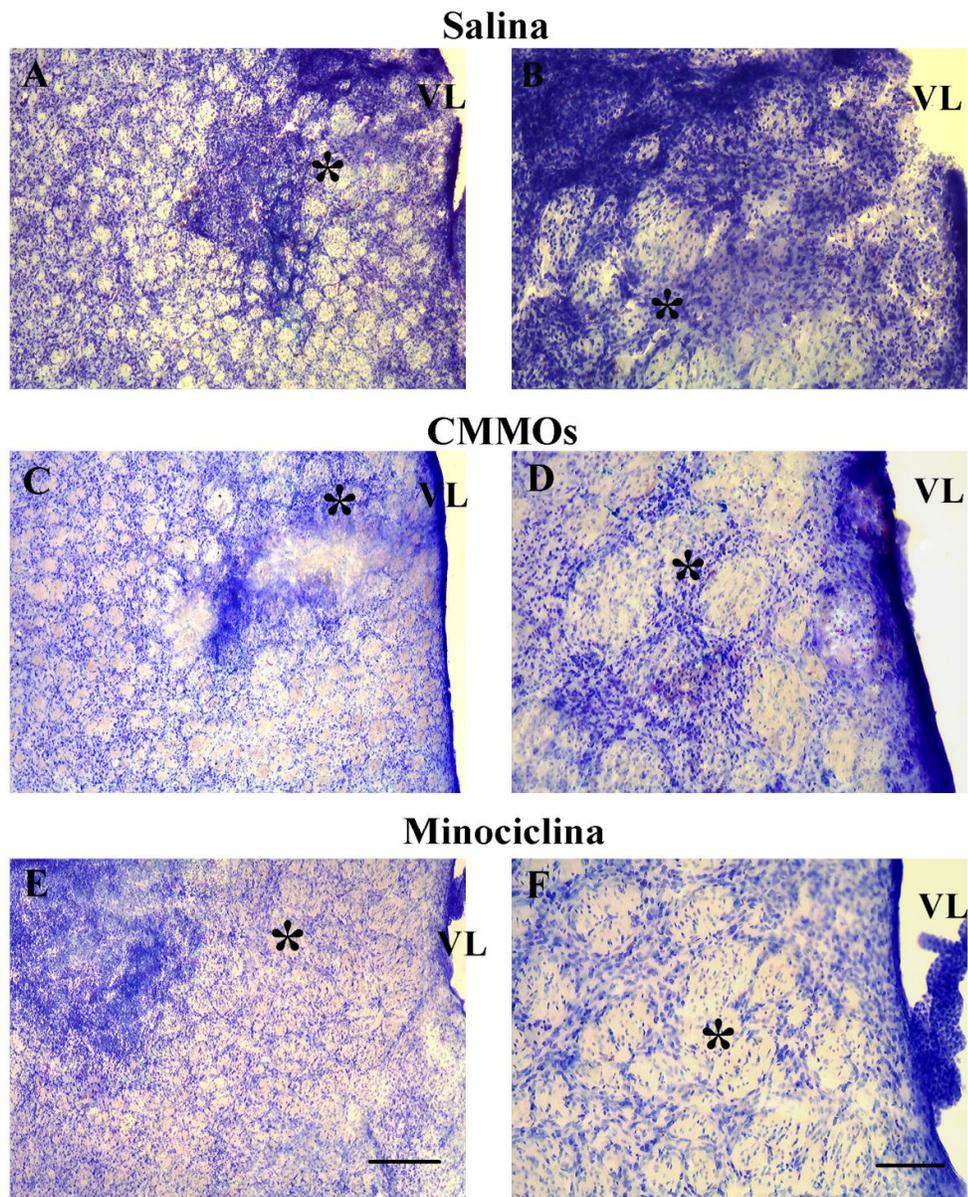


Figura 10: Análise histopatológica das lesões isquêmicas coradas com violeta de cresila. Animal isquêmico tratado com solução salina estéril (A-B); CMMOs (C-D) ou minociclina (E-F). \*Centro de lesão; VL (Ventrículo lateral); Escala: 400  $\mu\text{m}$  (A, C, E); 40 $\mu\text{m}$  (B, D, F).

Como descrito na metodologia, avaliou-se, especificamente, a perda neuronal através

da imunohistoquímica para NeuN, um marcador de corpos neuronais adultos. Microinjeções de ET-1 induziram perda neuronal no estriato isquêmico (Figura 11A-B). A região de perda neuronal foi claramente reconhecida pela quase que total rarefação de corpos celulares (Figura 11A-B). Em torno do centro necrótico, corpos neuronais puderam ser observados (Figura 11B).

Concomitante à perda neuronal, observou-se intensa ativação microglial/macrofágica, como revelado pela imunohistoquímica para ED1 (Figura 11C-D). As células microgliais/macrófagos ativados apresentaram-se arredondadas, representando o estágio máximo de ativação morfológica microglial, tanto no centro isquêmico, como na região perinfarto (Figura 11D).

Células apoptóticas (caspase-3+) foram observadas na região do estriato isquêmico (Figura 11E-F). Estas células foram encontradas, principalmente, na região em torno do centro isquêmico (Figura 11F).

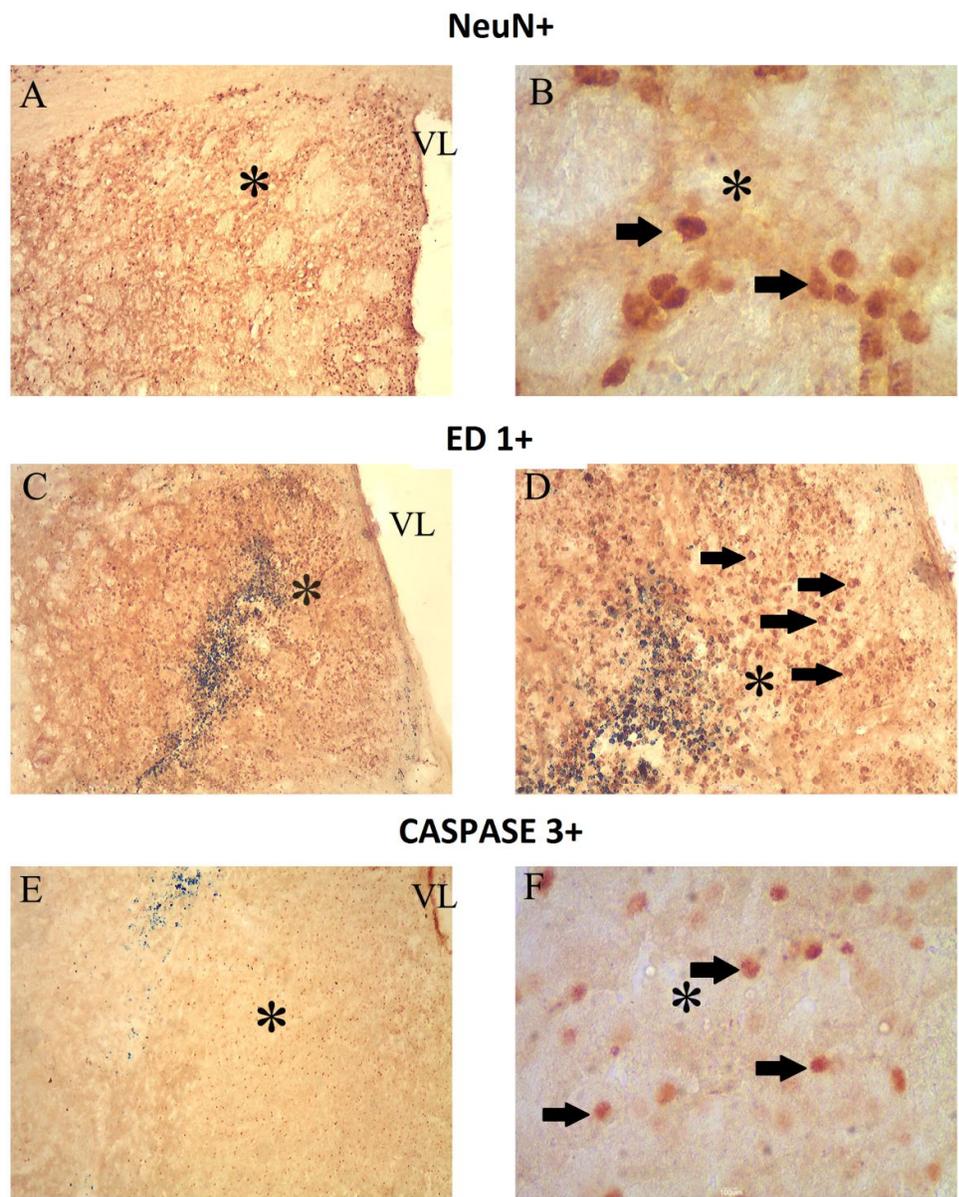


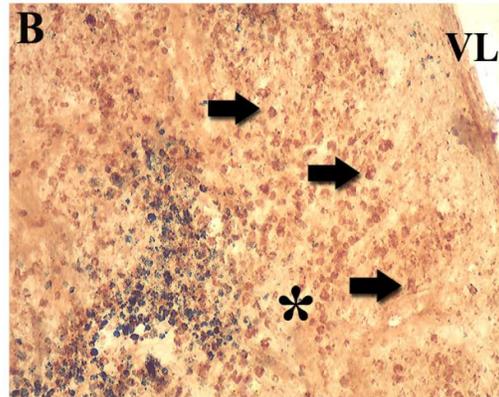
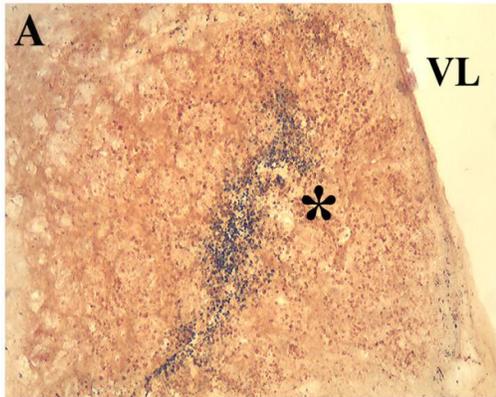
Figura 11: Após isquemia estriatal, houve perda neuronal (A - B), intensa ativação microglial/ macrofágica (C - D) e morte neuronal por apoptose na área peri-infarto (E - F) . Animais tratados com salina estéril (A-F). As setas apontam para células NeuN+, ED1+ e Caspase-3, respectivamente em B, D e F. \* Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). Escala: 400  $\mu$ m (A, C, E); 40 $\mu$ m (B, D, F).

#### 4.3 O TRATAMENTO COM CMMOs DIMINUI DE FORMA MAIS SIGNIFICATIVA A ATIVAÇÃO MICROGLIAL DO QUE A MINOCICLINA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

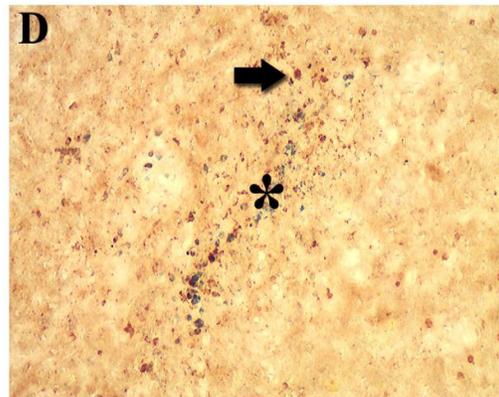
Neste estudo, comparamos os efeitos da minociclina, um consagrado inibidor microglial (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), e do transplante intraestriatal de CMMOs sobre o padrão de ativação microglial/macrofágica após isquemia estriatal (Figura 12). Observou-se que tanto o transplante de CMMOs quanto a administração da minociclina reduziram o número de células ED1+ no estriato de ratos adultos 7 dias após a isquemia, comparado aos animais isquêmicos com solução salina estéril (Figura 12 A-B). Estes resultados foram confirmados quantitativamente (Figura 12G).

As médias das densidades de células ED1+/campo foram 276,3 ( $\pm$  9,3), 133,8 ( $\pm$  6,8) e 244,6 ( $\pm$  7,1) para os animais tratados com salina estéril, CMMOs e minociclina, respectivamente (Figura 12G). Como inferido da análise da Figura 12, o transplante intraestriatal de CMMOs induz uma redução mais significativa no número de células ED1+ do que a minociclina.

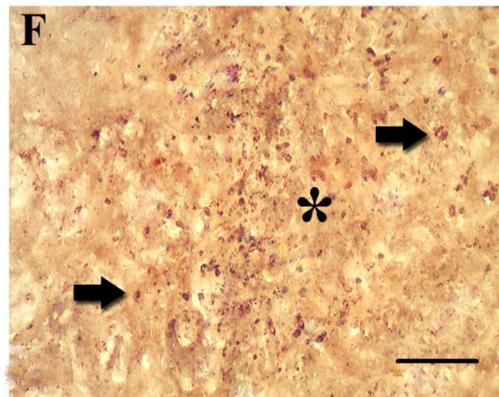
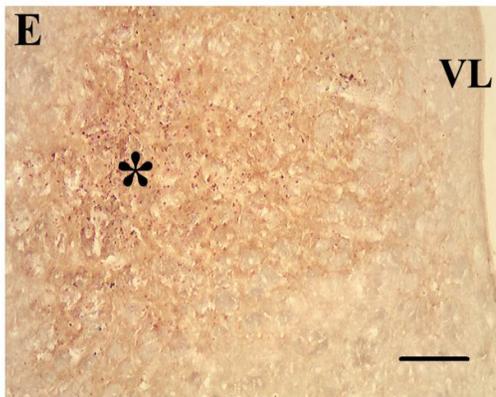
**Salina**



**CMMOs**



**Minociclina**



G

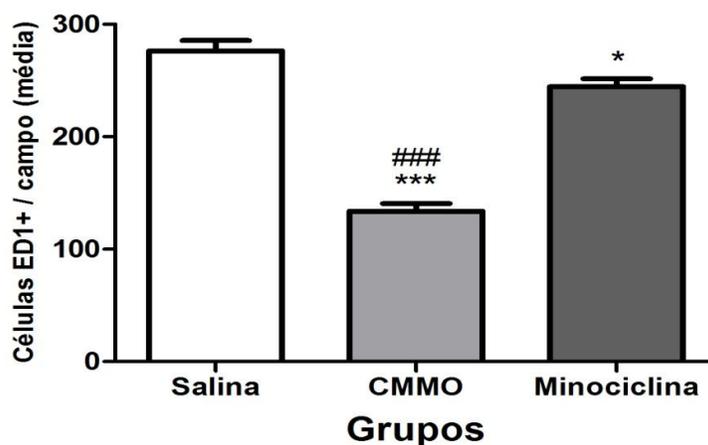


Figura 12: Inibição da ativação microglial/ macrofágica por CMMOs e minociclina após isquemia estriatal. Animais tratados com salina estéril (A-B), CMMOs (C-D) ou minociclina (E-F) 7 dias após a indução isquêmica. Quantificação do número de células ED1+ em todos os grupos experimentais (G). Notar que o tratamento com CMMOs reduz mais significativamente o número de células ED1+ (\* $p < 0,05$  entre salina e minociclina; \*\*\* $p < 0,01$  entre salina e CMMOs;### $p < 0,01$  entre CMMOs e Minociclina – ANOVA / Tukey). As setas apontam para células ED1+. \*Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). Marcação escura: azul de colanil. Escala: 400  $\mu\text{m}$  (A, C, E); 40 $\mu\text{m}$  (B, D, F).

#### 4.4. OS TRATAMENTOS COM CMMOs E MINOCICLINA DIMINUEM A ÁREA DE LESÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

A área de lesão da lesão isquêmica foi calculada por meio do software *ImageJ* nas secções imunomarcadas com NeuN. As formas de tratamento empregadas, tanto a terapia celular com CMMOs quanto a medicamentosa, utilizando minociclina induziram redução significativa da área isquêmica, quando comparadas com os valores dos animais isquêmicos que receberam somente solução salina. No entanto, a comparação entre as abordagens terapêuticas empregadas demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa dos seus efeitos sobre a área de lesão (Figura 13H e Tabela 2: Valores de área de

lesão isquêmica calculados pelo software *ImageJ*.

| <b>GRUPOS EXPERIMENTAIS</b> | <b>ÁREA DE LESÃO<br/>(mm<sup>2</sup>)</b> | <b>% DE REDUÇÃO</b> |
|-----------------------------|---|---------------------|
| <b>Salina</b>               | <b>2.555</b>                              | <b>0</b>            |
| <b>CMMO</b>                 | <b>824</b>                                | <b>67,75%</b>       |
| <b>Minociclina</b>          | <b>790</b>                                | <b>69,1%</b>        |

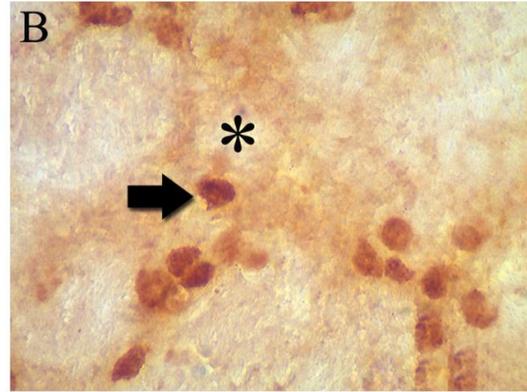
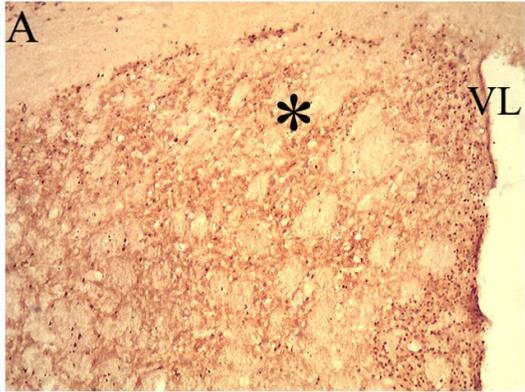
#### 4.5 O TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E O TRATAMENTO COM MINOCICLINA INDUZEM NEUROPROTEÇÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Para investigar a preservação dos neurônios estriatais após a indução isquêmica, corpos de neurônios diferenciados foram marcados com a imunohistoquímica para NeuN – marcador de neurônios diferenciados (MULLEN *et al.*, 1992).

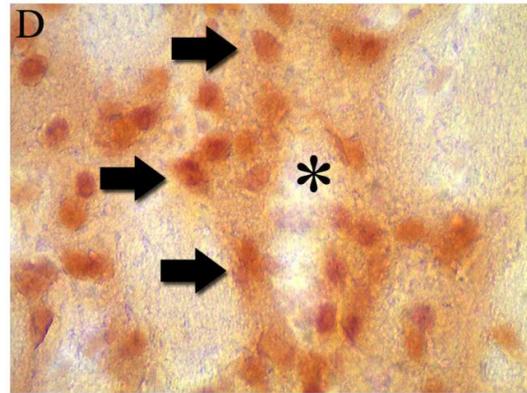
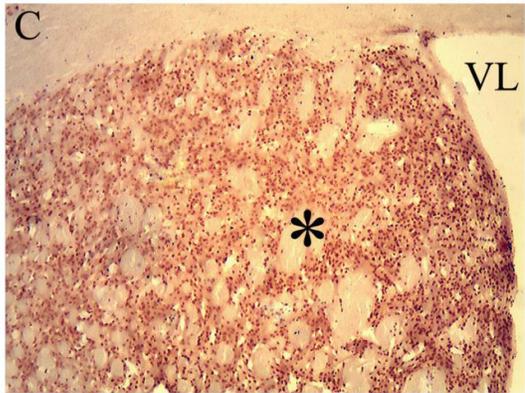
Como relatado anteriormente, houve perda neuronal após a isquemia estriatal, como observado nos animais isquêmicos tratados com solução salina estéril (Figura 13A-B, G). Tanto o transplante intraestriatal de CMMOs (Figura 12C-D, G) como o tratamento com minociclina (Figura 13E-F, G) reduziram a perda neuronal. Estes resultados foram confirmados através da análise quantitativa (Figura 13G). As médias das densidades de células NeuN+/campo foram 61,3 ( $\pm$  1,5); 86,8 ( $\pm$  3,4) e 81 ( $\pm$  3,4) para os animais isquêmicos tratados com salina estéril, CMMOs e minociclina, respectivamente (Figura 13G). O aumento da densidade neuronal em relação ao grupo controle apresentou diferença estatística (\* $p$ <0,01, ANOVA-Tukey, Figura 13G). Não houve diferença entre as médias dos grupos de animais tratados com CMMOs e minociclina (\* $p$ >0,05, ANOVA-Tukey, Figura

13G).

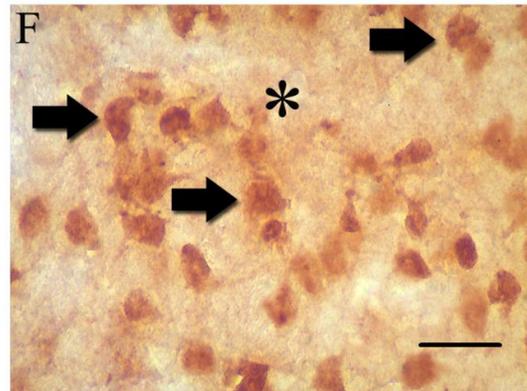
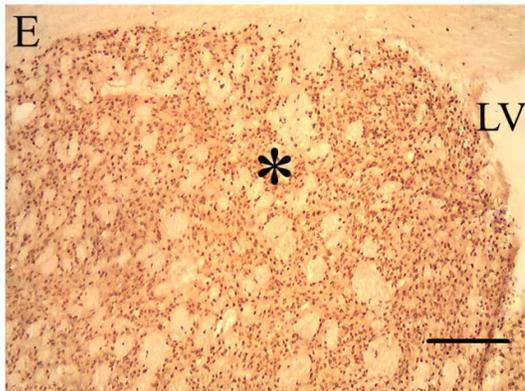
### Salina



### CMMOs



### Minociclina



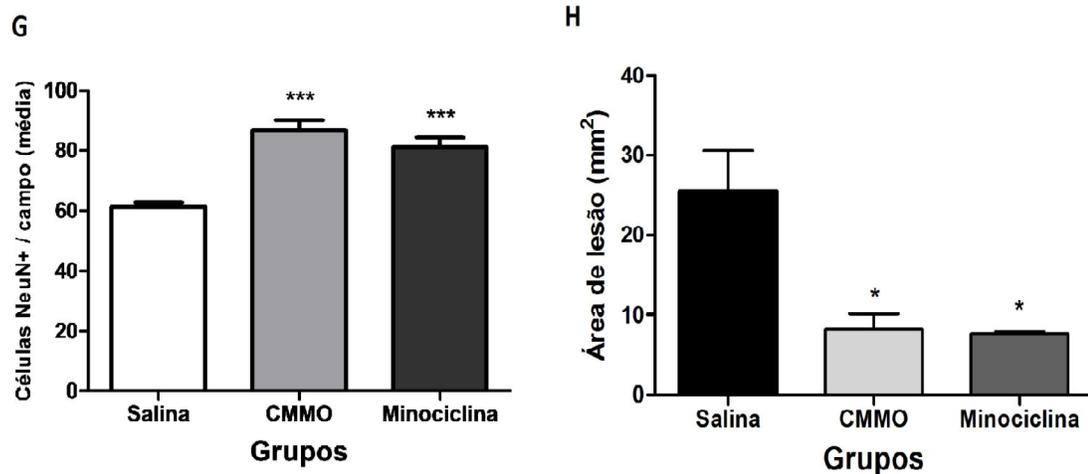


Figura 13: Neuroproteção por CMMOs e minociclina após isquemia estriatal. Animais tratados com salina estéril (A-B), CMMOs (C-D) ou minociclina (E-F) 7 dias após a indução isquêmica. Quantificação do número de células NeuN+ (G) e da área de lesão em todos os grupos experimentais (H). Notar que os tratamentos com CMMOs e minociclina reduzem de maneira extremamente significativa o número de células NeuN+, e também diminuem significativamente a área de lesão, mas não diferiram entre si. (\* $p < 0,05$  comparação dos tratamentos com salina – ANOVA / Tukey). As setas apontam para células NeuN+. \* Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). Escala: Escala: 400  $\mu\text{m}$  (A, C, E); 40  $\mu\text{m}$  (B, D, F).

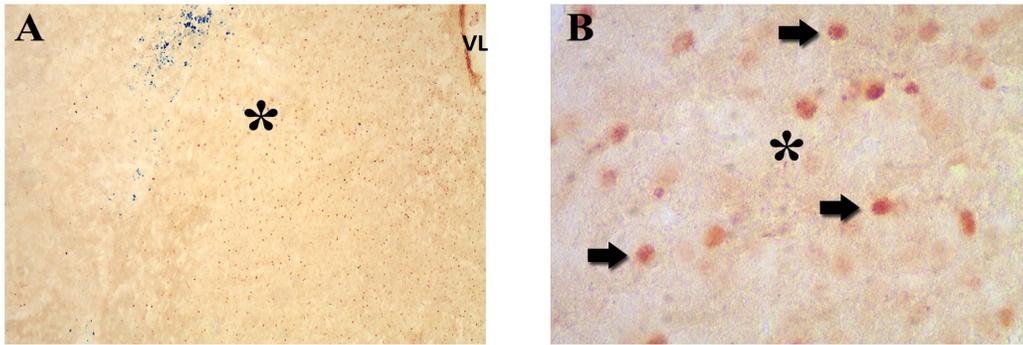
#### 4.6 EFEITO ANTI-APOPTÓTICO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DA INIBIÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Para investigar o efeito das abordagens terapêuticas propostas sobre a ocorrência de morte celular programada após isquemia focal no estriato, utilizou-se a imunohistoquímica para caspase-3 ativa – um marcador específico de apoptose (LALANCETTE-HEBERT, 2007)

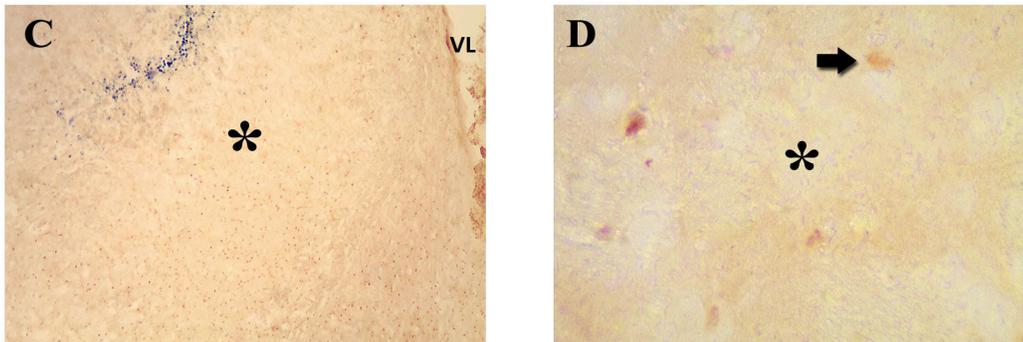
Como relatado anteriormente, microinjeções de ET-1 induziram isquemia focal estriatal, o que deflagrou a presença de um grande número de células caspase-3+ na penumbra isquêmica (Figura 14A-B, G). Tanto o transplante estriatal de CMMOs (Figura 14C-D) como o tratamento com minociclina (Figura 14E-F) diminuíram o número de células caspase-3+ no

estriato isquêmico, o que foi confirmado por análise quantitativa (Figura 14G, \* $p < 0.01$ , ANOVA-Tukey). As médias dos números de células caspase-3+/campo foram 26,5 ( $\pm 1,6$ ); 13,1 ( $\pm 0,7$ ) e 19,7 ( $\pm 1,1$ ) para os animais isquêmicos tratados com solução salina estéril, CMMOs e minociclina, respectivamente (Figura 14G). As reduções das médias de células caspase-3+/campo foram estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (Figura 14G, \* $p < 0.01$ , ANOVA-Tukey). Os resultados mostram que o tratamento com CMMOs induziu uma redução maior do número de células apoptóticas no estriato isquêmico do que a minociclina (Figura 14G, \* $p < 0.01$ , ANOVA-Tukey).

### Salina



### CMMOs



### Minociclina

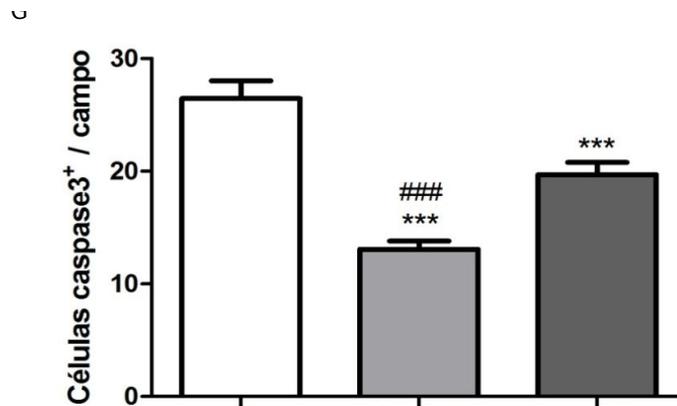
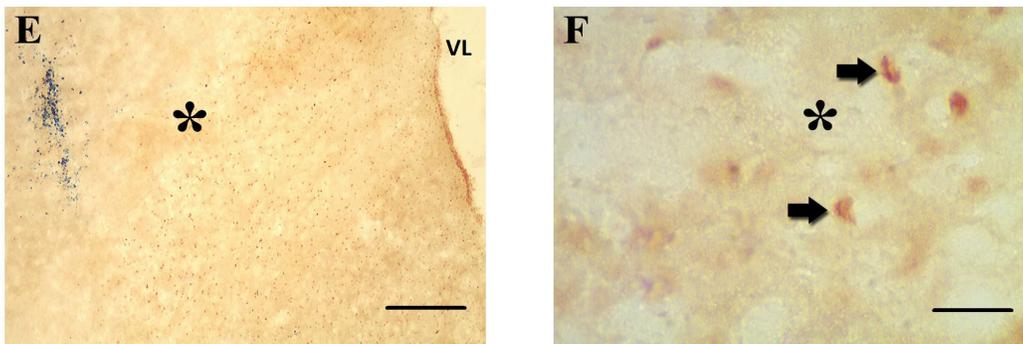


Figura 14: Efeito anti-apoptótico por ação de CMMOs e minociclina após isquemia estriatal. Animais tratados com salina estéril (A-B), CMMOs (C-D) ou minociclina (E-F) 7 dias após a indução isquêmica. Quantificação do número de células Caspase-3+ em todos os grupos experimentais (G). Notar que o tratamento com CMMOs reduz mais significativamente o número de células Caspase-3+ (\*p < 0,05 entre salina e minociclina; \*\*\*p < 0,01 entre salina e CMMOs;###p < 0,01 entre CMMOs e Minociclina – ANOVA / Tukey ). As setas apontam para células Caspase-3+. \* Centro de lesão. Escala: 400 um (A, E, F); 40um (B, D, F).

#### 4.7 EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DO TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE O PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DE RATOS ISQUÊMICOS (TESTE DE REMOÇÃO DO ADESIVO)

Para avaliar a resposta sensório-motora dos animais que sofreram isquemia focal através de microinjeções de ET – 1, foi aplicado o Teste de remoção do adesivo modificado (SUGHRE *et al*, 2006) com a finalidade de quantificar a recuperação das alterações funcionais induzidas pelo processo isquêmico, bem como investigar os efeitos do transplante de CMMOs e tratamento com minociclina sobre o comportamento funcional.

##### 4.7.1 Análise da evolução da pata direita 1, 3 e 7 dias após a isquemia:

Com a finalidade de avaliar somente o desempenho da pata direita em função do tempo de sobrevivência, efetuou-se a comparação entre todos os grupos experimentais e em todos os dias de teste. Desta forma, pôde-se verificar que no primeiro dia, os animais dos grupos Salina e Minociclina apresentaram déficit funcional, quando comparados à linha de base, ao passo que o grupo CMMO não mostrou alterações. Ao terceiro dia, apenas o grupo Minociclina diferiu da linha de base, no entanto, quando analisada a transição entre o terceiro e o sétimo dia, observa-se a melhora funcional deste grupo, na medida em que se assemelha

com a linha de base, indicando um padrão de normalidade. Ao sétimo dia, todos os grupos apresentaram comportamento sensório-motor similar, sem diferir da linha de base (Figura 15).

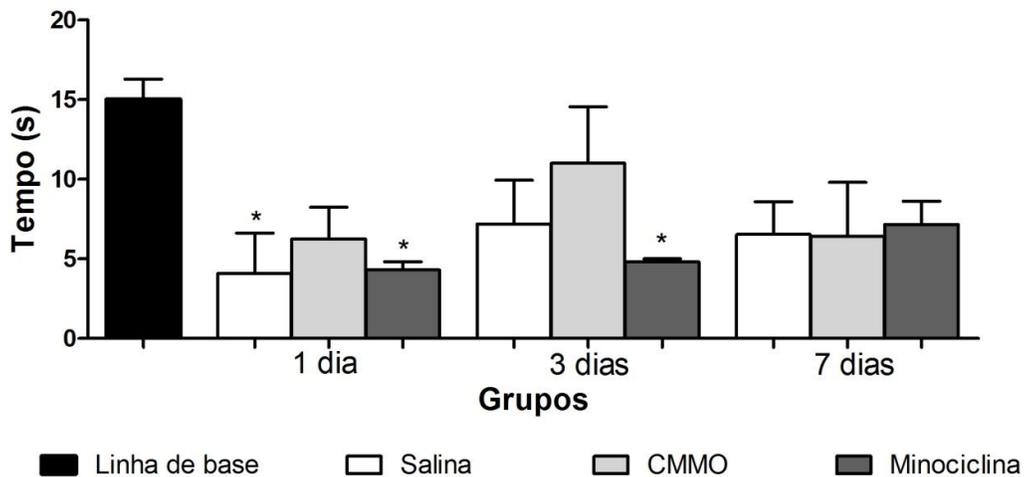


Figura 15: Comparação do comportamento sensoriomotor da pata D 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico. Os grupos tratados com solução salina e minociclina demonstraram déficit funcional na pata D, em relação à linha de base ao primeiro dia (\* $p < 0,05$  - ANOVA / Tukey).

#### 4.7.2 Desempenho Sensoriomotor da pata esquerda 1, 3 e 7 após o evento isquêmico:

Ao se analisar o comportamento funcional da pata esquerda nos três dias de aplicação do teste de remoção do adesivo modificado (SUGHRE *et al*, 2006), verificou-se que somente o grupo Minociclina apresentou déficit sensoriomotor, quando comparado com a linha de base, ao primeiro dia, entretanto cursou com recuperação funcional ao terceiro dia. Com o passar do tempo de sobrevivência, o grupo Salina mostrou queda de desempenho, evidenciada no sétimo dia, quando apresentou diferença significativa com a linha de base e com o grupo Minociclina (Figura 16).

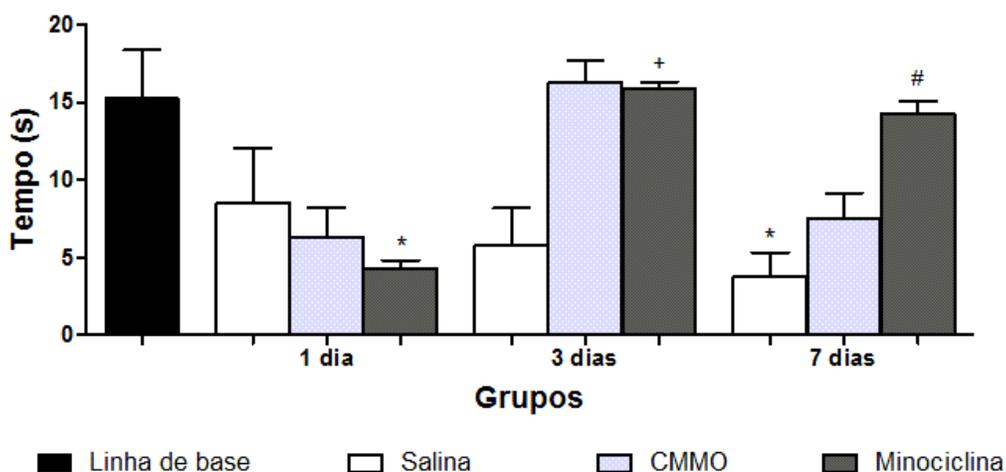


Figura 16: Comparação do comportamento sensoriomotor da pata esquerda inter e intragrupos 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico. Desempenho da pata esquerda (E). Notar que apenas o grupo Salina cursou com déficit funcional ao longo do tempo de sobrevivência (\*Comparação dos grupos com a linha de base; #Comparação com os valores do grupo salina ao longo do tempo de sobrevivência; +Comparação entre os valores do grupo minociclina;  $p < 0,05$  - ANOVA / Tukey).

#### 4.8 EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE A ATIVIDADE MOTORA EXPLORATÓRIA DE RATOS ISQUÊMICOS (TESTE DO CAMPO ABERTO)

Para avaliar a atividade motora espontânea (locomoção de cunho exploratório e de auto-cuidado) dos ratos isquêmicos utilizou-se o teste do Campo Aberto adaptado de Walsh & Cummins (1976).

O teste do campo aberto foi efetuado nos dias 01, 03 e 07 pós-cirúrgicos em animais isquêmicos tratados com solução salina (N=4), com CMMO (N=3) e com minociclina (N=4) com o objetivo de detectar possíveis alterações no comportamento motor após a indução isquêmica.

## 4.8.2 Latência

Ao analisar o tempo em que o animal demorava para iniciar o movimento na caixa de teste, verificou-se que somente os animais do grupo tratado com solução salina apresentou bradicinesia comparados à linha de base. Estes animais apresentaram maior latência em todos os tempos de sobrevivida investigados. Os animais tratados com CMMOs ou minociclina não apresentaram diminuição na sua capacidade de iniciar movimentos na caixa de teste (Figura 17).

A análise estatística revelou diferenças entres os grupos CMMOs e minociclina em relação ao grupo de animais tratados com solução salina, ao passo que não demonstraram diferenças entre si (Figura 20, \* $p < 0,05$  – ANOVA-Tukey).

Ao terceiro dia, os grupos CMMO e minociclina apresentaram menor latência em relação ao grupo de animais tratados com solução salina, o qual continuou apresentando diferenças em relação á linha de base.

Ao sétimo dia, os comportamentos funcionais relacionados com a iniciação de movimentos assemelharam-se aos achados encontrados ao terceiro dia.

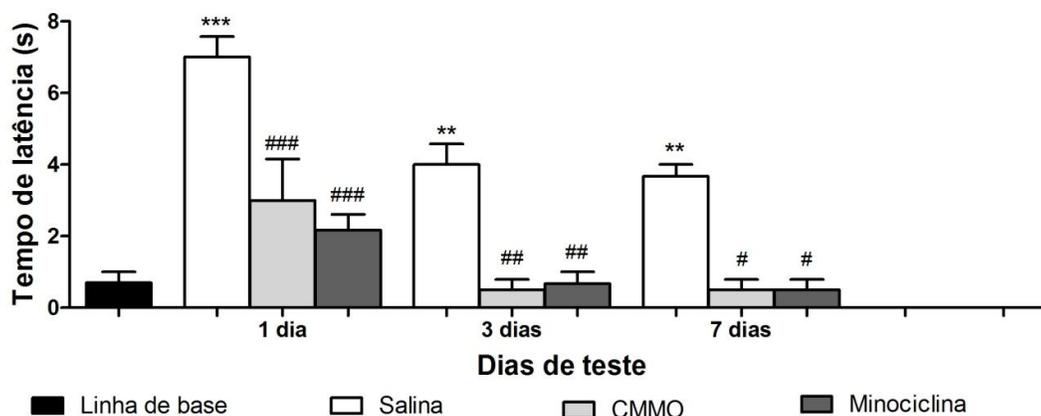


Figura 17: Análise da latência no teste to campo aberto. Os animais tratados com salina apresentaram diferenças

em relação à linha de base em todos os tempos de sobrevida investigados. Houve diminuição da latência nos animais tratados com CMMOs e minociclina em relação ao grupo tratado com salina em todos os tempos de sobrevida investigados. \*Comparação com a linha de base; #Comparação com grupo Salina;  $p < 0,05$  – ANOVA/Tukey).

### **5.8.2. Distância percorrida**

A fim de quantificar o espaço explorado pelo rato no aparato de teste, mensurou-se a distância percorrida através da contagem das travessias nas demarcações no revestimento inferior da caixa.

Ao primeiro e terceiro dias todos os grupos apresentaram diminuição na taxa de deambulação em relação à linha de base (Figura 18,  $p < 0,01$  ANOVA-Tukey). Ao sétimo dia, os animais dos grupos CMMO e minociclina melhoraram suas taxas de deambulação, comparando-se à linha de base, mas diferindo do grupo de animais tratados com salina (Figura 18,  $p < 0,01$  ANOVA-Tukey). Neste tempo de sobrevida, os animais tratados com minociclina apresentaram uma distância percorrida maior que os animais tratados com CMMOs (Figura 18,  $p < 0,01$  ANOVA-Tukey).

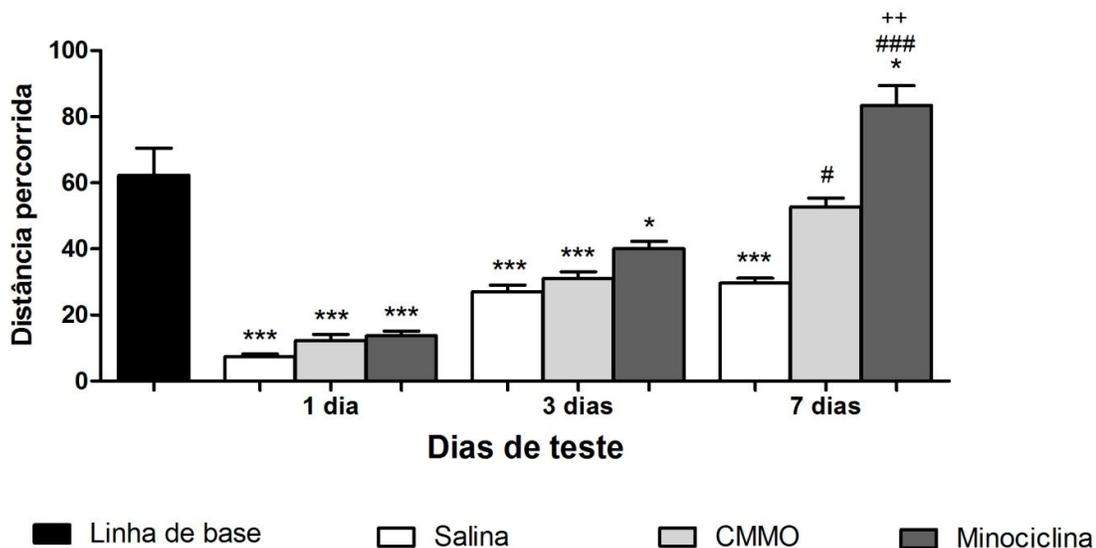


Figura 18: Análise da distância percorrida no teste do campo aberto. Todos os grupos apresentaram diferença estatística em relação à linha de base, exceto CMMO e Minociclina que melhoraram ao sétimo dia. (\*Comparação com linha de base; #Comparação com Salina; +Comparação entre CMMO e minociclina;  $p < 0,05$  – ANOVA / Tukey).

#### 4.8.3 Tempo empregado na deambulação

Neste teste, mensurou-se o período de tempo utilizado para deambulação. Todos os grupos apresentaram uma diminuição do tempo de deambulação 1 e 3 dias após a indução isquêmica, em relação à linha de base (Figura 19). Ao sétimo dia, os animais tratados com CMMOs e minociclina apresentaram maior tempo de deambulação em relação ao grupo tratado com salina, não diferindo da linha de base (Figura 19). Comparados com o grupo tratado com salina, os animais tratados com CMMOs apresentaram maior taxa de deambulação ao primeiro e sétimo dia, e os tratados com minociclina, ao sétimo dia (Figura 19), enquanto que ao terceiro dia, os animais de todos os grupos apresentavam o mesmo padrão funcional no tocante à caminhada.

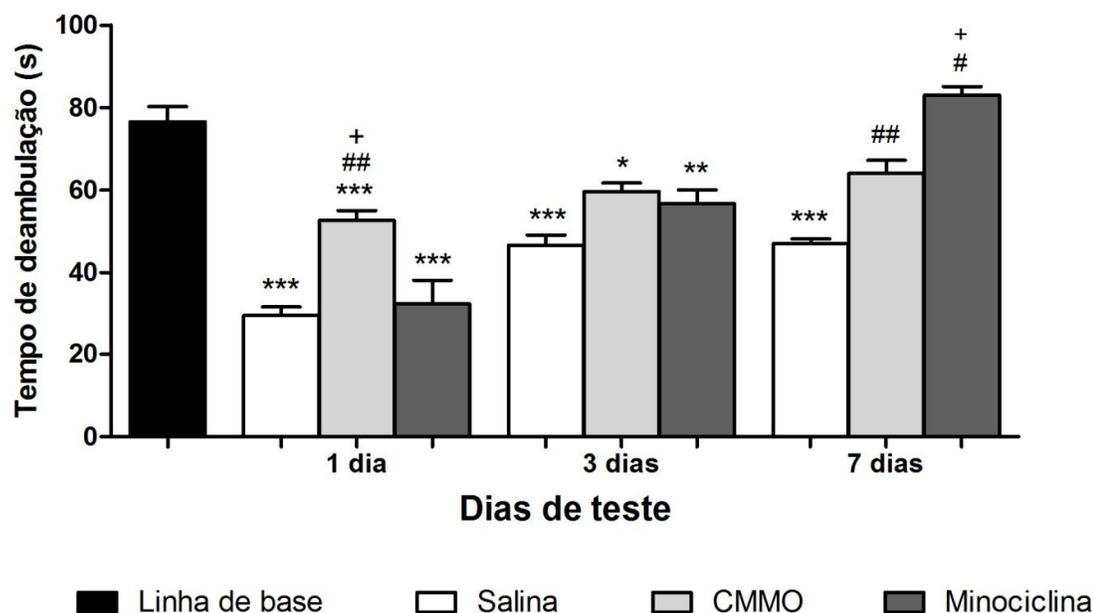


Figura 19: Análise do tempo empregado à deambulação no teste to campo aberto. Todos os grupos apresentaram diferenças em relação à linha de base em todos os tempos de sobrevivência investigados, exceto os animais tratados com CMMOs e Minociclina ao sétimo dia, que também diferiram entre si. No grupo Minociclina, a melhora foi evidenciada pelas comparações intragrupo em relação à sobrevivência (\*Comparação com linha de base; #Comparação com Salina; Comparação intergrupos no sétimo dia; Comparação intragrupo Minociclina; \* ou p < 0,05 – ANOVA / Tukey).

#### 4.8.4 Comportamento de levantar-se

Nós investigamos o comportamento do animal em erguer-se na caixa de teste, apoiando-se na parede da mesma. Após a isquemia, houve uma diminuição da taxa de levantar-se em animais de todos os grupos experimentais, em relação à linha de base (Figura 20). Ao sétimo dia pós-isquemia, os animais tratados com CMMOs ou minociclina não diferiram da linha de base. O grupo tratado com minociclina apresentou melhora em relação ao grupo controle tratado com solução salina (Figura 20).

O grupo isquêmico sem conduta terapêutica foi comparado com os tratados, resultando

em diferença estatisticamente significativa apenas com o Minociclina ao sétimo dia. Os tratados com minociclina apresentaram melhora em função do tempo e mostraram-se superiores aos tratados com CMMOs ao sétimo dia, após a indução isquêmica, embora este último grupo tenha também melhorado do primeiro ao sétimo dia (Figura 20).

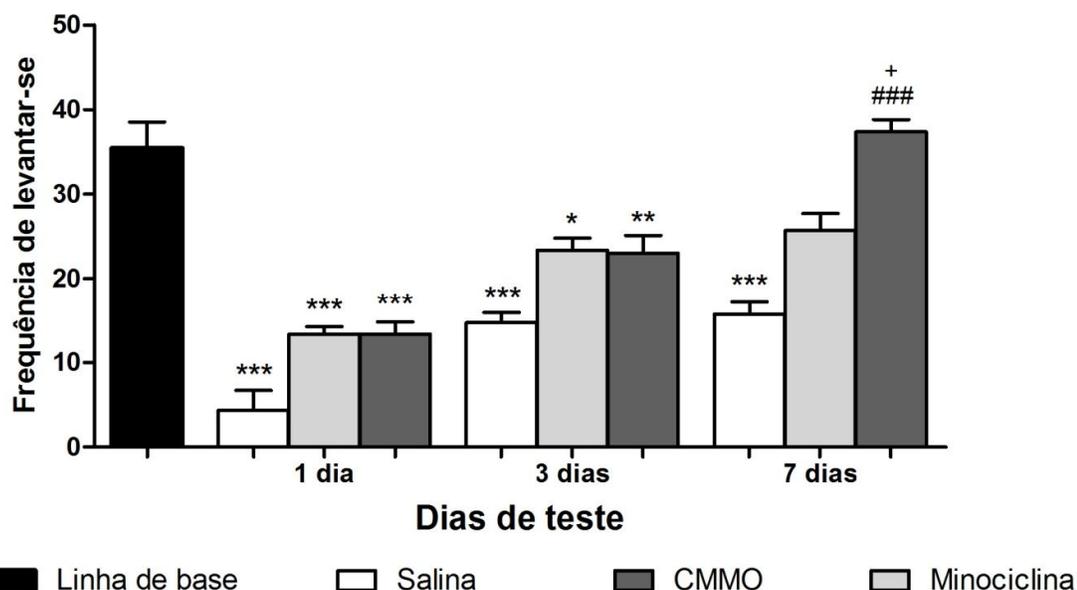


Figura 20: Análise do comportamento de levantar-se no teste to campo aberto. Todos os grupos apresentaram diferenças em relação à linha de base, em todos os tempos de sobrevivência investigados, exceto os animais tratados com CMMOs e Minociclina ao sétimo dia, que também diferiram entre si (\*Comparação com linha de base; #Comparação com Salina; Comparação intergrupos no sétimo dia; +Comparação entre minociclina e CMMOs;  $p < 0,05$  – ANOVA / Tukey).

#### 4.8.5 Autolimpeza

Com a finalidade de avaliar os animais em uma atividade funcional e rotineira, mensurou-se o comportamento de autolimpeza. O tempo despendido com a autolimpeza foi menor em todos os grupos experimentais e em todos os tempos de sobrevivência em relação à linha de base (Figura 21).

Ao primeiro dia do teste, os ratos tratados com minociclina apresentaram desempenho superior àqueles submetidos apenas à injeção de salina, ou aos outros animais tratados com CMMOs (Figura 21). Ao terceiro de teste, todos os ratos demonstraram comportamento similar, com exceção dos tratados com CMMOs que apresentaram um tempo maior de autolimpeza em relação aos ratos tratados com minociclina, pois o primeiro teve melhor rendimento, enquanto que no dia 7 não houve diferenças entre os ratos após indução isquêmica, independente da terapêutica empenhada.

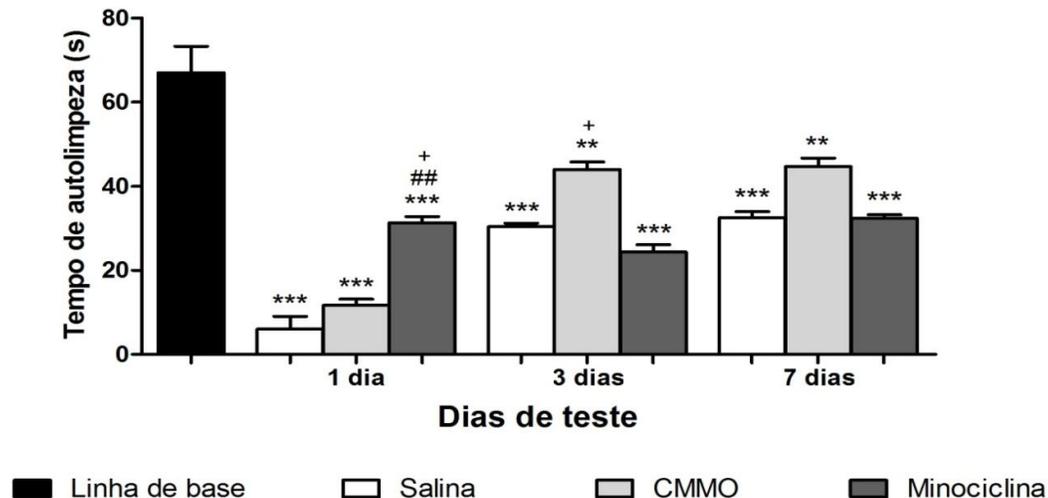


Figura 21: Análise do comportamento de autolimpeza no teste to campo aberto. Todos os grupos apresentaram diferenças em relação à linha de base em todos os tempos de sobrevivência investigados. Os animais tratados com minociclina apresentaram desempenho melhor que os que receberam solução salina e CMMOs, ao primeiro dia. Em contrapartida, ao terceiro dia os animais tratados com CMMOs foram melhores aos que receberam minociclina (\*Comparação com linha de base; #Comparação com Salina;+Comparação entre CMMOs e minociclina;  $p < 0,05$  – ANOVA/ Tukey).

## 5. DISCUSSÃO

Na presente dissertação, realizou-se indução isquêmica no estriato de ratos adultos através de microinjeções de ET -1 a fim de investigar os efeitos isolados das células mononucleares da medula óssea, transplantadas 1 dia após o AVENC experimental, e da tetraciclina minociclina no tecido lesionado. Foram avaliados os seguintes parâmetros: área de lesão isquêmica, ativação microglial, proteção de neurônios, morte celular programada e recuperação funcional. Observou-se que ambas as terapias utilizadas induziram neuroproteção e recuperação funcional. A terapia celular exibiu melhores resultados na redução da ativação microglial e da morte celular programada, de maneira significativa.

#### 5.1. O MODELO EXPERIMENTAL E A INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL EM RATOS ADULTOS

Foram injetados 80 pmol de ET – 1 no estriato dos animais com a finalidade de provocar lesão isquêmica focal e transitória, considerando que a isquemia encefálica pode se apresentar de várias formas, dependendo do tipo ou da gravidade do comprometimento circulatório (HOSSMANN, 2008).

A escolha deste modelo objetivou a indução de um infarto focal, considerando-se a alta frequência deste evento patológico em humanos, o que possibilita a implementação de estratégias futuras para o tratamento de pacientes com doença cerebrovascular (DOS SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010)

Considerando que em torno de 65% dos AVENCs por oclusão vascular apresentam lesões no território de irrigação da artéria cerebral média, incluindo os núcleos da base, supridos pelas artérias lentículo-estriadas, escolheu-se realizar a isquemia focal diretamente no estriato, considerando que os danos causados pelo modelo de oclusão da artéria cerebral média apresentam variações na área de lesão produzida e nos déficits sensório-motores. Isto

pode ocorrer pela oclusão do lúmen de outras artérias (HOSSMANN, 2008; WINDLE *et al.*, 2006; PEELING *et al.*, 2006; DITTMAR *et al.*, 2003).

Além do exposto acima, no modelo de oclusão da artéria cerebral média pode ocorrer dano em locais não usuais ao que ocorre no AVENC humano, além do caráter altamente invasivo da cirurgia para a introdução do filamento, o que gera grande mortalidade nos animais (SHARKEY, BUTCHER, 1995; DITTMAR *et al.*, 2003).

Ao passo que no modelo de lesão isquêmica focal por microinjeções de ET-1, o potente efeito vasoconstritor do peptídeo produz redução local do fluxo sanguíneo, produzindo lesão isquêmica restrita ao sítio de injeção, com menor invasividade. Outras vantagens correspondem ao fato da diminuição do fluxo sanguíneo induzida pela injeção de ET-1 embora rápida, não seja imediata, e ainda, a reperfusão ocorrer depois de muitas horas, o que são características presentes no AVENC em humanos (PEELING *et al.*, 2006; DURUKAN & TATLISUMAK, 2007; BIERNASKIE *et al.*, 2001).

## 5.2. O TRATAMENTO COM CMMOs DIMINUI DE FORMA MAIS SIGNIFICATIVA A ATIVAÇÃO MICROGLIAL DO QUE A MINOCICLINA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Os resultados mostram que o transplante intraestriatal de CMMOs induz um efeito supressor sobre a ativação microglial/macrofágica, inclusive superior ao observado pela minociclina (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010). Este resultado foi revelado pela redução significativa no número de células ED1+. Este resultado confirma e estende achados anteriores que sugerem que as CMMOs possuem um potente efeito anti-inflamatório e imunomodulador em modelos experimentais de AVENC. Resultados similares foram observados com outros tipos de células-tronco em tecidos neurais e não neurais (BRENNEMAN *et al.*, 2010; KEIMPEMA, *et al.*, 2009; SCHWARTING *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010; CAPONE *et al.*, 2007; JUNG, 2010).

Em resultados prévios do nosso grupo, mostramos que o transplante intravenoso de CMMOs, após isquemia focal do córtex motor ou do estriato de ratos adultos, induz neuroproteção e reduz significativamente a ativação microglial/macrofágica no tecido isquêmico (FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010). Neste estudo, ampliou-se estes resultados prévios modificando a rota do transplante, investigando os efeitos da CMMOs através de transplante intraestriatal. Uma análise comparativa destes experimentos sugere que os efeitos anti-inflamatórios, neuroprotetores e sobre a recuperação funcional são mais intensos quando o transplante de CMMOs é realizado diretamente no parênquima neural por haver maior concentração de células no local de lesão, e estas, por sua vez, ao serem transplantadas tecido, continuam exibindo a ação de liberar fatores de crescimento e vários componentes da matriz extracelular, que realizam na medula óssea, por meio da adaptação do seu perfil de expressão ao tecido “anfitrião”, favorecendo a liberação de fatores tróficos, como o BDNF (do inglês *brain derived neurotrophic factor*) e o NGF (do inglês *nerve growth factor*), em maior escala. O BDNF age propiciando a sobrevivência dos neurônios preexistentes, pois estimula a expressão da citocina anti-inflamatória IL – 10, além do crescimento e diferenciação de células jovens, enquanto o NGF reduz a ocorrência de apoptose (JIANG *et al.*, 2011; HUANG & REICHARDT, 2001).

Em virtude disso, o transplante de  $1 \times 10^6$  CMMOs diretamente no estriato, 24 horas após isquemia, reduziu 20% a mais a área de lesão do que o transplante endovenoso proposto por Franco (2009), tendo em vista sua disponibilidade no tecido e a possibilidade de modular a resposta inflamatória desde a fase aguda em função do tempo de sua administração, já que o mesmo o transplante intraparenquimatoso, realizado 7 dias após a indução isquêmica pode não ser eficiente na redução da área de infarto, como fora encontrado por Andrews *et al* (2008).

Em virtude do AVENC geralmente ser seguido por uma resposta inflamatória aguda e

prolongada no tecido nervoso, mais pronunciada no centro do infarto, poderia haver uma rápida degradação das células transplantadas na área de lesão. Entretanto, as CMMOs transplantadas modulam este ambiente inflamatório facilitando suas próprias ações e, certamente, contribuindo para neuroproteção (JIANG *et al.*, 2011; SARNOWSKA *et al.*, 2009; KEIMPEMA *et al.*, 2009; SCHWARTING *et al.*, 2008; CAPONE *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que estas células podem liberar fatores de crescimento, essenciais para o reparo tecidual, e para aumentar a angiogênese por meio da indução da resposta neovascular por ingerência da angiopoietina-1, o que resulta em significativo aumento do fluxo sanguíneo para a área isquêmica, melhorando a inflamação e favorecendo o reparo (CHEN *et al.*, 2002, 2003; CHO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2003; CUI *et al.*, 2008).

Assim, a liberação de fatores de crescimento angiogênicos pode influenciar na redução do processo inflamatório, a exemplo do VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*), o FGFb (do inglês *fibroblastic growth factor basic*) e a angiopoietina-1, que influenciam a maturação e manutenção do sistema vascular, e são sintetizados pelas CMMOs (AL-KHALDI *et al.*, 2003; CUI *et al.*, 2009; MIKI *et al.*, 2007). Além da capacidade angiogênica, as CMMOs podem promover sinaptogênese e neurogênese no tecido encefálico lesionado, e, propiciar a recuperação funcional após AVENC, por meio de vias diversas de transplante (CHEN *et al.*, 2001; BONILLA *et al.*, 2009; OPYDO-CHANEKA & ABROWSK, 2011).

Além da terapia celular, inúmeras intervenções têm sido desenvolvidas para controlar a microglia relacionada à inflamação (HELDMANN, 2011; HOEHN, 2005; LOANE & BYRNES, 2010). Recentemente, a minociclina vem sendo investigada como um agente neuroprotetor após AVENC (LAMPL *et al.*, 2007; FAGAN, 2010) e em diversas desordens neurais humanas (LeWITT, 2004; YONG, 2004). Na presente dissertação, observou-se que a minociclina induziu diminuição da ativação microglial, tal qual descrito anteriormente

(YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Os benefícios da minociclina estão relacionados a ações pleiotrópicas, que incluem proteção mitocondrial e inibição das caspases 1 e 3, minimizando efeitos apoptóticos, inibição de vias bioquímicas de metaloproteinases, além da inibição microglial. A proteção tecidual, obtida pela inibição microglial, é também relacionada à diminuição da liberação de TNF- $\alpha$  e outras citocinas nestas células gliais. Outro importante mecanismo de ação da minociclina é a inibição da proteína 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1, do inglês, *high-mobility group box 1*), que age como uma citocina e é fundamental para as ações inflamatórias das células microgliais (HAILER, 2008; KIM *et al.*, 2009; HAYAKAWA *et al.*, 2008).

### 5.3 OS TRATAMENTOS COM CMMOs E MINOCICLINA DIMINUEM A ÁREA DE LESÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

A partir do cálculo da área de lesão pelo software *ImageJ*, observou-se que as duas abordagens terapêuticas usadas foram eficazes na redução da área de infarto isquêmico. A redução da área de infarto foi de 67,75% nos animais tratados com CMMOs e 69,1% nos tratados com minociclina, sem diferença estatística entre os tratamentos. Estes resultados confirmam estudos prévios, em que o bloqueio microglial com minociclina (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999) ou o tratamento com CMMOs (PAVLICHENKO *et al.*, 2008; GIRALDI-GUIMARAES *et al.*, 2009) diminuem consideravelmente a área de infarto após oclusão da artéria cerebral média.

Uma possibilidade interessante, é que o tratamento concomitante com minociclina e CMMOs possuam efeitos sinérgicos. Estudos recentes do nosso grupo sugerem que o

tratamento concomitante de minociclina com transplante intravenoso de CMMOs apresenta efeitos sinérgicos após lesão isquêmica do córtex motor (FRANCO, 2009) e do estriato (CARDOSO, 2010). Esta possibilidade deve ser verificada em investigações futuras após transplante intraestriatal, como realizado no presente estudo.

#### 5.4 O TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E O TRATAMENTO COM MINOCICLINA INDUZEM NEUROPROTEÇÃO APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Como mostrado nesta e em nossas investigações prévias, (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008) microinjeções de ET-1 induzem perda neuronal massiva após isquemia estriatal. Neste estudo, observou-se que o bloqueio microglial com minociclina e o transplante de CMMOs induzem preservação neuronal, avaliada quantitativamente pela contagem do número de células NeuN+. Estes resultados sugerem que a modulação da ativação microglial no ambiente isquêmico, na fase aguda após AVENC estriatal, favorece a proteção de neurônios estriatais.

Em um estudo recente, observamos que o tratamento com a minociclina preserva a substância branca após lesão aguda do estriato de ratos adultos induzida por microinjeções de NMDA (GUIMARÃES *et al.*, 2010), o que concorda com os resultados da presente investigação. Além disso, como discutido anteriormente, o bloqueio microglial com minociclina induz conspícua preservação tecidual no córtex frontoparietal e estriato de ratos adultos submetidos à oclusão da artéria cerebral média (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999). Tal qual comentado previamente no tópico a cerca dos efeitos anti-inflamatórios das terapias utilizadas nesta investigação, estudos futuros devem investigar possíveis efeitos neuroprotetores das terapias aplicadas concomitantemente, em diferentes tempos de sobrevida. Esta preservação neuronal decorrente das duas terapias empregadas pode ser conseguida através da ação anti-inflamatória e/ou imunomodulatória das células microgliais,

como descrito anteriormente. Inúmeros estudos sugerem que a modificação do microambiente neural pode minimizar a perda neuronal e aumentar a sobrevivência de neurônios na região peri-infarto. Hamby *et al.*, (2007) mostraram que a inibição microglial com PJ34, um inibidor de poli(ADP-ribose) polimerase, reduz a perda neuronal no hipocampo em até 84%, em um modelo de isquemia global. Assim como, imunomoduladores, como a ciclosporina A, são neuroprotetores e induzem maior sobrevivência de alguns tipos de células-tronco transplantados após isquemia experimental (HAILER, 2008; MOSKOWITZ *et al.*, 2010; ROTA NODARI, 2010).

Os mecanismos da ação neuroprotetora das CMMOs foram anteriormente discutidos, sob a perspectiva de seus efeitos anti-inflamatórios (BRENNEMAN *et al.*, 2010; JUNG, 2010; SCHWARTING *et al.*, 2008; CHOPP *et al.*, 2009). Estes efeitos anti-inflamatórios e/ou imunomoduladores podem ter contribuído para a preservação neuronal relatada no presente estudo. Em estudos recentes no nosso grupo, observou-se conspícua preservação neuronal após transplante intravenoso de CMMOs 24 horas após isquemia focal do córtex motor (FRANCO, 2009) ou estriato (CARDOSO, 2010). A neuroproteção foi aumentada após tratamento concomitante de transplantante de CMMOs e minociclina (FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010), indicando que a modulação do ambiente inflamatório facilita as ações terapêuticas das CMMOs transplantadas. Estes resultados são corroborados por trabalhos anteriores que mostram que a modulação da ativação microglial por minociclina favorece a sobrevivência de progenitores de oligodendrócitos transplantados na medula espinhal de ratos predispostos geneticamente a sofrerem desmielinização ou de neurônios fetais de porco transplantados no estriato de ratos não lesionados. E ainda, a minociclina pode apresentar, além da clássica ação sobre a ativação microglial, um mecanismo de ação sobre o recrutamento de linfócitos, o que já havia sido descrito para a ciclosporina (ROTA NODARI, 2010; MICHEL-MONIGADON *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm demonstrado que as CMMOs migram no tecido encefálico lesionado quando transplantadas sistematicamente ou localmente, e exibem efeitos parácrinos que podem ser subjacentes aos benefícios terapêuticos da terapia com CMMOs (AL-KHALDI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2001, 2004, 2003a; HOSSMANN, 2006; CUI *et al.*, 2009). As CMMOs transplantadas podem aumentar sinais endógenos que aumentem o remodelamento neurovascular, contribuindo para o aumento da neurogênese endógena após AVENC (SNAPYAN *et al.*, 2009),

Assim como, a indução da neuroproteção pelas CMMOs também pode estar relacionada ao aumento da angiogênese e a arteriogênese através da liberação de fatores de crescimento, proteases e quimiocinas, como o TGF –  $\beta$ , o FGFb, VEGF, e o fator 1 derivado do estroma (SDF1, do inglês *stroma derived factor 1*) (BORLONGAN *et al.*, 2004; CAPLAN, 2009; da SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008). Estes fatores regulam a proliferação, migração das células progenitoras endoteliais e musculares lisas (CUI *et al.*, 2008), além do remodelamento estrutural do compartimento, e, conseqüentemente, da elevação da circulação encefálica, favorecendo a preservação tecidual extracelular (AL-KHALDI *et al.*, 2003; BORLONGAN *et al.*, 2004; HOSSMANN, 2006), propiciando a neovascularização (SHYU *et al.*, 2008).

#### 5.5.EFEITO ANTI-APOPTÓTICO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DA MINOCICLINA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Nesta dissertação, verificou-se que as abordagens terapêuticas investigadas reduziram a ocorrência de morte celular programada após isquemia focal, avaliada pela diminuição no número de células caspase-3+ no estriato isquêmico. Os resultados mostraram que o tratamento com CMMOs induziu uma redução mais expressiva do número de células

apoptóticas no estriato isquêmico do que a minociclina.

Em um estudo recente do nosso grupo, observou-se que o transplante intravenoso de CMMOs e o tratamento com minociclina reduziram o número de células caspase-3+ após isquemia focal do córtex motor (FRANCO, 2009), o que corrobora com os achados desta dissertação. No estudo de Franco (2009), o tratamento concomitante com CMMOs e minociclina provocou uma diminuição mais pronunciada no número de células apoptóticas, quando comparada aos tratamentos isolados. Em estudos futuros, deve-se investigar se o tratamento concomitante, de CMMOs transplantadas localmente e minociclina, possui efeitos sinérgicos sobre o padrão de morte celular programada após transplante intraestriatal de CMMOs.

Outros autores relatam que o tratamento com CMMOs em cultura organotípica de hipocampo com privação de oxigênio e glicose também provoca redução no número de células caspase-3+. O transplante intravenoso de células mesenquimais ou do estroma da medula óssea, um componente importante da fração mononuclear, também reduz apoptose neuronal após oclusão da artéria cerebral média em roedores. Como no presente estudo, a redução das células apoptóticas ocorreu principalmente na região peri-infarto. A liberação de fatores tróficos como bFGF e VEGF parecem ser responsáveis pelos efeitos anti-apoptóticos das células tronco adultas transplantadas (SARNOWSKA *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2003)

Inúmeros estudos sugerem que a minociclina reduz a morte celular programada após desordens neurais agudas, incluindo isquemia (MATSUKAWA, *et al.*, 2009), lesão excitotóxica hipocampal (HEO *et al.*, 2006) e trauma da medula espinhal (STIRLING *et al.*, 2004). A minociclina reduz a morte celular programada de neurônios na penumbra isquêmica após oclusão da artéria cerebral média em roedores (HAYAKAWA *et al.*, 2008). Esta tetraciclina exerce suas ações nas duas vias de morte celular apoptótica – a via caspase-

dependente e a via caspase-independente (HEO *et al.*, 2006). O mecanismo primário de sua ação anti-apoptótica é a inibição direta da liberação do citocromo c pela mitocôndria, o que está relacionado com a ativação da caspase-3, quando em concentrações entre 20 e 100 mg (MATSUKAWA, *et al.*, 2009; KIM & SUH, 2009). No entanto, como sugerido por Matsukawa *et al.* (2009), os efeitos parecem ser dose-dependentes, considerando que doses em torno ou maiores que 100 mg/kg parecem não induzir neuroproteção, e ao contrário, contribuir para lesão tecidual, o que foi considerado nesta pesquisa, visto que utilizou-se a dose de 50 mg/kg.

Na presente dissertação, mostrou-se que o transplante de CMMOs diretamente no estriato foi mais eficaz na diminuição de células caspase-3+ do que a minociclina. A maior eficácia do transplante de CMMOs pode estar relacionada ao fato de que estas células são veículos liberadores de fatores neurotróficos, o que pode contribuir para maior preservação neuronal e, conseqüentemente, menor incidência de apoptose (CHOPP *et al.*, 2009; SARNOWSKA *et al.*, 2009). Como já relatado, inúmeros estudos sugerem que as CMMOs liberam diversos fatores tróficos, incluindo VEGF (MIKI *et al.*, 2007), BDNF (NOMURA *et al.*, 2005), GDNF (do inglês *glial derived neurotrophic factor*) (HORITA *et al.*, 2006) e angiopoetina-1 (ONDA *et al.*, 2008).

## 5.6.EFEITO DO TRANSPLANTE INTRAESTRIATAL DE CMMOs E DO TRATAMENTO COM MINOCICLINA SOBRE O PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR E A ATIVIDADE MOTORA EXPLORATÓRIA DE RATOS ISQUÊMICOS

A análise dos testes comportamentais revelou que tanto o tratamento com minociclina, como o transplante de CMMOs melhoraram o desempenho sensório-motor dos animais isquêmicos comparativamente aos animais controle. Estes resultados estão de acordo com

estudos recentes do nosso grupo, que utilizaram transplante intravenoso de CMMOs após lesões isquêmicas do córtex motor (FRANCO, 2009) e estriato (CARDOSO, 2010). Outros autores relataram, isoladamente, os efeitos da minociclina (LIU, 2007; HEWLETT & CORBETT, 2006) ou das CMMOs (CHEN *et al.*, 2003; CHO, 2010; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011) sobre a recuperação funcional de animais isquêmicos, mas poucos estudos compararam os efeitos destas diferentes abordagens, no mesmo modelo experimental (FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010).

No teste de remoção do adesivo, ao se avaliar o desempenho das patas direita e esquerda, observou-se déficit no hemicorpo direito, no primeiro e terceiro dia de teste, para os grupos tratados com salina estéril e minociclina, ao passo que no sétimo dia, os animais tratados com minociclina apresentaram melhora funcional.

Vale ressaltar que a avaliação da atividade sensório-motora dos membros superiores faz-se imperativa, pois o comportamento motor, fundamental para o desempenho das atividades rotineiras, deve ser priorizado na avaliação dos desfechos do AVENC, enfatizando-se, a mensuração da função de manipulação (CHO, 2010). Os resultados deste estudo demonstram a recuperação funcional do quadrante superior do corpo. Sendo que torna-se relevante, visto que cerca de 85% dos pacientes que tiveram AVENC, 55 a 75% podem apresentar déficit funcional no membro superior ainda após três meses, caso não recebam conduta terapêutica adequada, e a melhora funcional no membro superior parético é principalmente determinada pela facilitação do movimento da mão parética (KWAKKEL & KOLLEN, 2007; CAROD-ARTAL *et al.*, 2009).

A ciência básica tem melhorado o entendimento sobre os mecanismos adjacentes à recuperação funcional após lesão encefálica, e iniciado a identificação de estratégias que facilitem esses mecanismos – a exemplo do treinamento intensivo dos membros superiores em atividades bimanuais (NUDO *et al.*, 1996, TAUB *et al.*, 2002; LUFT *et al.*, 2004, WOLF

*et al.*, 2006), como é exigido para a remoção do adesivo durante o teste realizado na presente dissertação.

No que tange a atividade exploratória dos ratos, verificou-se que aqueles tratados com CMMOs e minociclina não apresentaram bradicinesia, quando comparados com os animais que receberam apenas solução salina estéril. Em pacientes com lesão isquêmica encefálica, os déficits motores impactam diretamente sobre a capacidade funcional, socialização e qualidade de vida, o que sucinta a implementação de intervenções de reabilitação e tratamentos específicos que facilite o convívio no meio social (HOBART *et al.*, 2002; CAROD-ARTAL *et al.*, 2009). Os resultados aqui apresentados sugerem que a terapia celular com CMMOs e a minociclina são abordagens promissoras para garantir a estabilidade funcional na capacidade de iniciação de movimentos.

Ainda em relação à funcionalidade, deve-se considerar a possibilidade de autonomia dos pacientes, durante suas atividades de vida diária, após o AVENC. Por conseguinte, a execução das tarefas habituais de forma semi-independente ou independente se configura num importante critério para a qualidade de vida desses pacientes. Com base nisso, esta pesquisa investigou nos comportamentos de levantar-se, autolimpeza, e deambulação (tanto o tempo empregado para esta atividade quanto a distância percorrida) no teste do campo aberto. Os resultados mostraram que os animais isquêmicos tratados com salina estéril apresentaram piores desempenhos em relação aos tratados com CMMOs e minociclina. Este achado possui vasta importância clínico-funcional, quando se considera que os déficits motores e sensoriais podem comprometer as atividades de vida diária e o autocuidado dos pacientes (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

## 5.7 O PAPEL NEUROPROTETOR DA MICROGLIA

Neste estudo, por diversas vezes, enfatizou-se o papel prejudicial das células microgлияis após isquemia. No entanto, a função microglial é extremamente complexa e, diversos estudos sugerem que estas células gliais podem desempenhar tanto papéis benéficos como papéis prejudiciais após isquemia e outras doenças do SNC (SCHWARTZ *et al.*, 2006; BLOCK & HONG, 2007; HAILER *et al.*, 2008). Após isquemia, as células microgлияis podem liberar fatores tróficos como IGF-1 e citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, que podem controlar o ambiente inflamatório e propiciar a neuroproteção (LALANCETTE-HEBERT *et al.*, 2007; NEUMANN *et al.*, 2006). Estas células gliais também podem fagocitar neutrófilos após isquemia experimental, induzindo considerável neuroproteção (NEUMANN *et al.*, 2008). Além disso, as células microgлияis parecem contribuir para a neurogênese endógena no encéfalo adulto, modulando a sobrevivência e a produção de progenitores neurais, liberando fatores neurotróficos, como IGF-1 (THORED *et al.*, 2009; BATTISTA *et al.*, 2006; EKDAHL *et al.*, 2003; NEUMANN *et al.*, 2006).

Os resultados apresentados acima alertam para o fato que o bloqueio completo da ativação microglial não é uma abordagem terapêutica adequada, porque, neste caso, os efeitos benéficos das células microgлияis também seriam inibidos. A modulação microglial pode ser uma abordagem apropriada, já que os efeitos prejudiciais seriam inibidos, enquanto que os efeitos benéficos, maximizados. Acredita-se que a fração mononuclear da medula óssea contenha progenitores de células microgлияis benéficas com grande capacidade de liberar fatores tróficos e citocinas anti-inflamatórias. Esta hipótese é apoiada por investigações recentes (SHECHTER *et al.*, 2009). Segundo esta hipótese, a minociclina modularia especificamente os efeitos deletérios de células microgлияis, o que explicaria, parcialmente, seus efeitos neuroprotetores. No entanto, como discutido anteriormente, outros efeitos pleiotrópicos desta tetraciclina poderiam ser responsáveis pelos efeitos neuroprotetores. A explicação desta ação dupla da função microglial deve ser estabelecida em estudos futuros.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Microinjeções de 80 pMol de ET-1 no estriato de ratos adultos produzem isquemia focal com alterações histopatológicas e neurocomportamentais evidentes;
- O tratamento com minociclina ou CMMOs inibiu a ativação microglial, mas este fenômeno foi mais expressivo após transplante de CMMOs, o que sugere um importante papel imunomodulador destas células;
- Ambos os tratamentos induziram neuroproteção evidenciada pela diminuição da área de lesão e do número de células apoptóticas, e maior preservação neuronal;
- As abordagens terapêuticas investigadas melhoraram a recuperação funcional dos animais isquêmicos em relação aos animais controle, o que foi revelado pela utilização de testes comportamentais específicos para a avaliação da função sensório-motora;

Estudos futuros, utilizando tempos de sobrevivência mais prolongados, após o bloqueio microglial, são necessários para a averiguação se os efeitos encontrados são duradouros. Outras investigações também são necessárias para observação dos efeitos concomitantes da terapia celular com o tratamento com minociclina. Neste caso, pode haver um sinergismo das ações destas duas abordagens neuroprotetoras e imunomodulatórias

## REFERÊNCIAS

AL-KHALDI, A., et al.. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. **Gene. Ther.** v. 10, p. 621–629, 2003.

ALAM, M. et al. Hyperthermia up-regulates matrix metalloproteinases and accelerates basement membrane degradation in experimental stroke. **Neuroscience Letters.** 2011.

ANDREWS, E.M. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. **Experimental neurology.** v. 211, p. 588–592, 2008.

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

BARBOSA DA FONSECA, L.M. *et al.* Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection. **Experimental Neurology.** v. 221, p. 122–128, 2010.

BATTISTA, D. C. C. *et al.* Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci.** v. 23, p. 83-93, 2006.

BECKER, K. Sensitization and tolerization to brain antigens in stroke. **Neuroscience.** v. 158, p. 1090–1097, 2009.

BECKER, K. Innate and adaptive immune responses in CNS disease. **Clinical Neuroscience Research.** v. 6, p. 227–236, 2006.

BIEGON, A. *et al.* Region-selective effects of neuroinflammation and antioxidant treatment on peripheral benzodiazepine receptors and NMDA receptors in the rat brain. **J. Neurochem.** v. 82, p. 924–934, 2002.

BIERNASKIE, J.; CORBETT, D. Enriched rehabilitation training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. **J Neurosci.** v. 21, p. 5272-5280, 2001.

BLISS, T.M. *et al.* Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. **Neurobiology of Disease.** v. 37, p. 275–283, 2010.

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

BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. **Free Radic. Biol. Med.** v. 40, n. 3, p. 388–397, 2006.

BONILLA, M.C. *et al.* Delayed intraslesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury, **Brain Inj.** v. 23, p. 760–769, 2009.

BORLONGAN, C.V. *et al.* Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. **Brain Res.** v. 1010, p. 108–116, 2004.

BRENNEMAN, M. *et al.* Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.** v.30, n.1, p.140-149, Jan. 2010.

BROUNS, R.; DE DEYN, P.P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clinical Neurology and Neurosurgery,** 2009.

CAMARGO, E.C.S. et al. Stroke in Latin America. **Neuroimag Clin N Am.** v.15. p. 283 – 296, 2005.

CAPLAN, A.I.. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J. Pathol.** 217,318–324, 2009.

CAPLAN, L.R. Now is an exciting time to care for stroke patients. **South Med J.** v. 96, p. 329-330, 2003.

CAPONE, C. *et al.* Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. **PLoS One.** v.2, n.4, p.e373, 2007.

CARDOSO, M.M. et al. Bloqueio microglial e transplante endovenoso de células da Fração mononuclear da medula óssea após isquemia estriatal. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 85 f. Fev. 2010.

CAROD-ARTAL, F. J. *et al.* Determinants of quality of life in Brazilian stroke survivors. **Journal of the Neurological Sciences.** v. 284, p. 63–68, 2009.

CHEN, F.M. *et al.* Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. **Biomaterials.** v. 32, p. 3189 – 3209, 2011.

CHEN, Y, C. *et al.* Induced pluripotent stem cells and regenerative medicine. **Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics.** p.1-6, 2011.

CHEN, J. *et al.* Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. **Brain Res.** v. 1005, p. 21–28, 2004.

CHEN, J. *et al.* Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. **Circ. Res.** v. 92, p. 692–699, 2003.

CHEN, J. *et al.* Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats, **Stroke.** v. 32, n. 4, p. 1005–1011, 2001.

CHEN, J.; LI, Y.; CHOPP, M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. **Neuropharmacology.** v. 39, p. 711–716, 2000.

CHEN, X. *et al.* Human bone marrow stromal cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factors production, **J. Neurosci. Res.** v. 69, p. 687–691, 2002.

CHO, Goang-Won. The neuroprotective effect of erythropoietin-transduced human mesenchymal stromal cells in an animal model of ischemic stroke. **Brain research.** v. 1353, p. 1 – 13, 2010.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.** v. 1, p. 92–100, 2002.

CHOPP, M.; LI, Y.; ZHANG, Z.G. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. **Stroke.** v. 40, p. 143-145, 2009.

CONDUCTIER, G. *et al.* The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. **Journal of Neuroimmunology.** v. 224, p. 93–100, 2010.

CONNOR, M.D. *et al.* The burden of stroke in Black populations in sub-Saharan Africa. **Lancet Neurol.** v. 6, p. 269–78, 2007.

CORDEIRO DE SOUZA, C. Comparação dos tratamentos com minociclina e células da fração mononuclear da medula óssea na lesão aguda da medula espinhal. Dissertação

(Mestrado em Neurociências e Biologia Celular). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 80 f. Abr. 2011.

COYNE, T.M. *et al.* Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. **Stem Cells**. v.24, n.11, p. 2483 - 2492, 2006.

CRACK, P.; TAYLOR, J. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free radicals**, 2005.

CUI, Q.Y.Y.; BENOWITZ, L. I. The role of macrophages in optic nerve regeneration. **Neuroscience**. v. 158, p. 1039–1048, 2009.

CUI, X., *et al.* Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. **Neuroscience** v. 159, p. 744–750, 2009.

CUI, X., *et al.*, Treatment of stroke with (Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl) amino] diazen-1-ium-1, 2-diolate and bone marrow stromal cells upregulates angiopoietin-1/Tie2 and enhances neovascularization. **Neuroscience** v. 156, p. 155–164, 2008.

CUMBLER, E. Stroke Alert Program Improves Recognition and Evaluation Time of In-Hospital Ischemic Stroke. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**. v. 19, No. 6 (November-December), p. 494-496, 2010.

CZŁONKOWSKA A, A. B.; KURKOWSKA-JASTRZĘBSKA, I. Inflammation and gliosis in neurological diseases – clinical implications. **Journal of Neuroimmunology**, 2010.

DA SILVA MEIRELLES, L. *et al.* In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v. 26, p. 2287–2299, 2008.

DEIERBORG, T. *et al.* Brain injury activates microglia that induce neural stem cell proliferation *ex vivo* and promote differentiation of neurosphere-derived cells into neurons and oligodendrocytes. **Neuroscience**. v. 171, p. 1386–1396, 2010.

DENES, A. *et al.* **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 24. p. 708–723, 2010.

DENG, Y. B. *et al.* Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. **Neurological research**. v. 32, p. 148-156, 2010.

DHAWAN, J. *et al.* Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors. **NeuroImage**. v. 51, p. 599–605, 2010.

DITTMAR, M. *et al.* External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. **Stroke**. v. 34, p. 2252–2257, 2003.

DODICK, D.W.; GARGUS, J.J. Why migraines strike. **Sci. Am.** v. 299, p. 56, 2008.

DOMERCQ, M.; MATUTE, C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends in pharmacological Sciences**. v.25, n.12, p.609-612, Dec. 2004.

DOS SANTOS, C. D.P. *et al.* Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain Research**. v. 1172, p. 130-144, 2007.

DOYLE, K.P. *et al.*, M.P. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**. v. 55, p. 310-318, 2008.

DURUKAN; A.; TATLISUMAK, T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 87, n. 179, p. 179 – 197, 2007.

DU, Y. *et al.* Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 98, p. 14669–74, 2001.

EKDAHL, C.T. *et al.* Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 100, p.13632-13637, 2003.

EKSHYYAN, O.T.Y .Apoptosis in acute and chronic neurological disorders. **Front Biosci.** v. 9, p. 1567–76, 2004.

FAGAN, S. C. *et al.* Minocycline to improve neurologic outcome in stroke (MINOS): a dose-finding study. **Stroke.** v. 41, p. 2283-2287, 2010.

FERNANDES, P. T. *et al.* Perception and Attitude towards Stroke by Professionals of Emergency Medical Service in an Urban City in Southeastern Brazil. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.** v. 18, No. 3 (May-June), p. 195-197, 2009.

FRANCO, E.C.S. Resposta Inflamatória e Neuroproteção Após Transplante Endovenoso de Células Tronco da Medula Óssea em Ratos Submetidos à Isquemia Focal do Córtex Motor. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 109 f. Abr. 2009.

FURUKAWA, K. The actinsevering protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. **J. Neuroscience.** v. 17, p. 8178–86, 1997.

GEISSMANN, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science.** v. 327, 2010.

GINSBERG, M.D. *et al.* Albumin-based neurotherapeutics for acute ischemic stroke: from bench to bedside. In: Krieglstein, J., Klumpp, S. (Eds.), **Pharmacology of Cerebral Ischemia**. Medpharm Scientific Publishers. p. 421 - 433, 2004.

GIRALDI-GUIMARAES, A. *et al.* Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, 2009.

GOMES-LEAL, W. *et al.* Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res.** 1066, 57–70, 2005.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J. Microglia: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** v. 119, p. 89–105, 2010.

GUILLEMIN, G.J.; BREW, B.J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. **Journal of Leukocyte Biology.** v. 75, 2004.

GUIMARÃES, J.S. *et al.* Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. **Brain research.** v.1329, p. 182 – 193, 2010.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. **Neuroscience.** v. 175, p. 394–405, 2011.

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

HACKE, W. *et al.* Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS).

**JAMA.** v. 274, p. 1017–25, 1995.

HAILER, N.P. Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. **Prog Neurobiol.** v. 84, 2008.

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, 2008.

HELDMANN, U. *et al.*. Selective depletion of Mac-1-expressing microglia in rat subventricular zone does not alter neurogenic response early after stroke. **Experimental neurology**, 2011.

HEO, K. *et al.* Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice. **Neurosci Lett.** v. 398, p. 195-200, 2006.

HEWLETT, K.A.; CORBETT, D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. **Neuroscience.** v.141, n.1, p.27-33, 2006.

HOBART, J.C. *et al.* Quality of life measurement after stroke: uses and abuses of the SF-36. **Stroke.** v.33, p. 1348–56, 2002.

HOEHN, B.D.; PALMER, T.D.; STEINBERG, G.K. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. **Stroke.** v. 36, p. 2718-2724, 2005.

HORITA, Y. *et al.* Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemiamodel in the adult rat. **J. Neurosci. Res.** v. 84, p. 1495–1504, 2006.

HOSSMANN, K.A. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes.

**Neuropharmacology.** v. 55, p. 257-270, 2008.

HOSSMANN, K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cell. Mol.**

**Neurobiol.** v. 26, p. 1057–1083, 2006.

HU, X. et al. Minocycline attenuates ischemia-induced ventricular arrhythmias in rats.

**European Journal of Pharmacology.** v. 654, p. 274–279, 2011.

HUANG, J. *et al.* Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology.** v.

66, p. 232-245, 2006.

HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and

function. **Ann Rev Neurosci.** v. 24, p. 677–736, 2001.

HUGHES, P.M.; *et al.* Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-

1. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.** v.62, n.12, p.1276-1286, 2003.

IONITA, C.C. *et al.* Acute Ischemic Stroke and Infections. **Journal of Stroke and**

**Cerebrovascular Diseases.** p. 1-9, 2010.

JIANG, Y. *et al.* Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects Brain from ischemic

insult via modulating local Inflammation in rats. **Neuroscience.** v. 172, p. 398–405, 2011.

KAUSHAL, V.; SCHLICHTER, L.C. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a

new model of the stroke penumbra. **J. Neurosci.** v. 28, p. 2221–2230, 2008.

KELLER, A. F *et al.* Treatment with minocycline after disease onset alters astrocyte

reactivity and increases microgliosis in SOD1 mutant mice. **Experimental Neurology.** v.

228, p. 69–79, 2011.

KEIMPEMA, E. *et al.* Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces

lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. **Neuropathol Appl Neurobiol.** v. 35, 2009.

KIM, B.J. Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. **Journal of the Neurological Sciences**.v. 279, p. 70–75, 2009.

KIM, H.S.; SUH, Y.H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behav Brain Res**. v. 196, p. 168–79, 2009.

KWAKKEL, G.; KOLLEN, B. Predicting improvement in the upper paretic limb after stroke: a longitudinal prospective study. **Restor Neurol Neurosci**. v. 25, p. 453–60, 2007.

LAKHAN, S.E. *et al.* Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**. 2009

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

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

LEE, C.Z. *et al.* Dose-response effect of tetracyclines on cerebral matrix metalloproteinase-9 after vascular endothelial growth factor hyperstimulation. **J Cereb Blood Flow Metab**. v. 26, p. 1157– 1164, 2006.

LEWITT, P. A. Clinical trials of neuroprotection for Parkinson's disease. **Neurology**. v. 63, p. S23-31, 2004.

LINDVALL, O. *et al.* A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. **Nat. Med**. v. 10 (Suppl.), p. S42–S50, 2004.

LIU, Z. *et al.* Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. **Stroke**. v.38, n.1, p.146-152, 2007.

LO, E.H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nature Medicine**. v. 14, 2008.

LO, E.H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nat. Rev. Neurosci.** p. 399–415, 2003.

LOTUFO, P.A.; BENSEÑOR, I.M. Stroke mortality in Brazil: one example of delayed epidemiological cardiovascular transition. **International Journal of Stroke.** v. 4, p. 40–41, 2009.

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

LUFT, A.R. *et al.* Repetitive bilateral arm training and motor cortex activation in chronic stroke: a randomized controlled trial. **JAMA.** v. 292, p. 1853–1861, 2004.

MACHADO, L.S. *et al.* Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. **BMC Neurosci.** v. 7, n.56, 2006.

MANSUR, A.P. *et al.* Stroke and ischemic heart disease mortality trends in Brazil from 1979 to 1996. **Neuroepidemiology.** v. 22, n. 3, p. 179–83, 2003.

MASSARO, A.M. Stroke in Brazil: a South America perspective. **Int J Stroke.** v. 1, p. 113–5, 2006.

MATSUKAWA, N. *et al.* Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. **BMC Neuroscience.** v. 10, p. 126, 2009.

MENDEZ-OTERO, R. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. **Regen. Med.** v. 2, p. 417–423, 2007.

MICHEL-MONIGADON, D. *et al.* Minocycline Promotes Long-Term Survival of Neuronal Transplant in the Brain by Inhibiting Late Microglial Activation and T-Cell Recruitment. **Transplantation.** v. 89, p. 816–823, 2010.

MIKI, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-transferred bonemarrow stromal cells

engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia. **Neurosurgery**. v. 61, p. 586–594, 2007.

MOSKOWITZ, M. A. *et al.* The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**. 2010.

MURATA, Y. *et al.* Stroke Extension of the Thrombolytic Time Window With Minocycline in Experimental. **Stroke**. v. 39, p. 3372-3377, 2008.

NEUMANN, J. *et al.* Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci**. v. 28, p. 5965–5975, 2008.

NEUMANN, J. *et al.* Microglia provide neuroprotection after ischemia. **FASEB J**. v. 20, p. 714–716, 2006.

NOMURA, T. *et al.* I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stemcells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. **Neuroscience**. v. 136, p. 161–169, 2005.

NUDO, R.J. *et al.* Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. **Science**. v. 272, p. 1791–1794, 1996.

ONDA, T. *et al.* Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab**. v. 28, p. 329–340, 2008.

OPYDO-CHANEKA, M.; ABROWSKI, Z.D. Response of astrocytes and microglia/macrophages to brain injury after bone marrow stromal cell transplantation: A quantitative study. **Neuroscience Letters**. v. 487, p. 163–168, 2011.

PANDIAN, J.D. Re-canalization in acute ischemic stroke: the strategies. **Neurology**. v. 57, p. 20–27, 2009.

PAVLICHENKO, N. *et al.* Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. **Brain Research**, v. 1233, p. 203-213, 2008.

PAXINOS, GaW, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2007.

PEELING, J. *et al.* Protective Effect of Minocycline Treatment on Striatal Ischemia. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**. v. 15, n. 3, p. 101-105, 2006.

PENG, P. *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. **Neuron**. v. 49, p. 719-733, 2006.

PONTES-NETO, O.M. *et al.* Stroke awareness in Brazil: alarming results in a community-based study. **Stroke**. v. 39, p. 292–6, 2008.

POPOVICH, P.G., *et al.* Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. **Exp. Neurol.**v. 158, p. 351–365, 1999.

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

RIBES, S. *et al.* Fibronectin stimulates Escherichia coli phagocytosis by microglial cells. **Glia**. v. 58, p. 367–376, 2010.

RIEGELSBERGER, U.M. *et al.* Intravenous human umbilical cord blood transplantation for stroke: Impact on infarct volume and caspase-3-dependent cell death in spontaneously hypertensive rats. **Experimental Neurology**. v. 227, p. 218–223, 2011.

ROBERTSON, C.L. Mitochondrial mechanisms of cell death and neuroprotection in pediatric ischemic and traumatic brain injury. **Experimental Neurology**. v. 218, p. 371–380, 2009.

- ROBINSON, A.P. *et al.* Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. **Immunology**. v. 57, n. 2, p. 239-247, 1986.
- ROTA NODARI, L. *et al.* Long-term survival of human neural stem cells in the ischemic rat brain upon transient immunosuppression. **PloS one** . v. 5, p. 14035, 2010.
- SACCO, R.L. *et al.* Experimental treatments for acute ischaemic stroke. **Lancet**. v. 369, p. 331–41, 2007.
- SAPOSNIK, G.; DEL BRUTTO, O.H. Stroke in South America: a systematic review of incidence, prevalence, and stroke subtypes. **Stroke**. v. 34, n. 9, p. 2103– 7, 2003.
- SARNOWSKA, A. *et al.* The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. **Exp Neurol**. v. 215, p. 317-327, 2009.
- SAS, K. *et al.* Dementia, stroke and migraine — Some common pathological mechanisms. **Journal of the Neurological Sciences**. v. 299, p. 55–65, 2010.
- SHECHTER, R. *et al.* Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. **PLoS Med**. v. 6, 2009.
- SCHMID-BRUNCLIK, N. *et al.* Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation. **Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol**. 295, R864–R873, 2008.
- SCHROETER, M.; JANDER, S. T-cell cytokines in injury-induced neural damage and repair. **Neuromol Med** 7:1–13, 2005.
- SCHWARTZ, M. *et al.* Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends in Neuroscience**. v. 29, n. 2, p. 68-74, 2006.

SHARKEY, J.; BUTCHER, S.P. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. **J. Neurosci. Methods.** v. 60, p. 125–131, 1995.

SHEN, L.H. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. **Stroke.** v. 38, p. 2150–2156, 2007.

SHENHAR-TSARFATY, S. *et al.* Early signaling of inflammation in acute ischemic stroke: Clinical and rheological implications. **Thrombosis Research.** v. 122, p. 167–173, 2008.

SHYU, W.C. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 324, p. 834–849, 2008.

SIMS, N.R.; MUYDERMAN, H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. **Biochim Biophys Acta.** v. 1802, n. 1, p. 80–91, 2010.

SNAPYAN, M.; *et al.* Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain derived neurotrophic factor signaling. **J. Neurosci.** p. 4172–4188, 2009.

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

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

STIRLING, D.P.; *et al.* Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. **Adv Exp Med Biol.** v. 513, p. 87–113, 2002.

STREIT, W.J. *et al.* Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease.

**Acta Neuropathol.** v. 118, p. 475–485, 2009.

SUGHRUE, M.E. *et al.* An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. **J Neurosci Methods.** v.151, p. 83-89, 2006.

SWEILEH, W.M. *et al.* Discharge Medications Among Ischemic Stroke Survivors. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.** v. 18, No. 2 (March-April), p. 97-102, 2009.

TARAWNEH, R.M.D.; GALVIN, J.E. Potential Future Neuroprotective Therapies for Neurodegenerative Disorders and Stroke. **Clin Geriatr Med.** v. 26, p.125–147, 2010.

TAUB, E. *et al.* New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. **Nat. Rev. Neurosci.**v. 3, p. 228–236, 2002.

THORED, P. *et al.* O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia** 57:835–849, 2009.

THORED, P. *et al.* Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. **Stroke.** p. 3032–3039, 2007.

VASCONCELOS DOS SANTOS, A. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research.** v. 1306, p. 149 – 158, 2010.

VOGELGESANG, A., *et al.* Analysis of lymphocyte subsets in patients with stroke and their influence on infection after stroke. **Stroke.** v. 39, p. 237-241, 2008.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull.** v. 83, p. 482-504, 1976.

WANG, Y., *et al.* SDF-1 alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. **Brain Res.** v. 1195, p. 104–112, 2008.

WINDLE, V., *et al.* An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. **Exp Neurol.** v. 201, p. 324-334, 2006.

WOLF, S.L. , *et al.* Effect of constraint-induced movement therapy on upper extremity function 3 to 9 months after stroke: the EXCITE randomized clinical trial. **JAMA.** v. 296, p. 2095–2104, 2006.

XU, L. *et al.* Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. **BMC Neurol.** v. 4, n. 7, 2004.

YENARI, M. A. *et al.* Microglial Activation in Stroke: Therapeutic Targets.

**Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics.** v. 7, p. 378–391, 2010.

YONG, V.W., *et al.* The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurology.** v.3, n.12, p.744-751, 2004.

YRJÄNHEIKKI, J. *et al.* A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, p. 13496–13500, 1999.

ZHANG, Z.G.; CHOPP, M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. **Lancet Neurol.** ,p. 491–500, 2009.

ZHANG, J.; LI, Y.; CHEN, J.; YANG, M.; KATAKOWSKI, M.; LU, M.; CHOPP, M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. **Brain Res.** v. 1030, p. 19–27, 2007.

ZHANG, N. et al. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. **Stroke**, v. 36, p. 2220–2225, 2005.

ZHAO, Q, *et al.* Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. **Brain Res.** v. 649, p. 253-259, 1994.

ZHOU, B., et al. Mesenchymal stem/stromal cells (MSC) transfected with stromal derived factor 1 (SDF-1) for therapeutic neovascularization: Enhancement of cell recruitment and entrapment. **Med. Hypotheses.** v. 68, p.1268–1271, 2007.

ZŁONKOWSKA, A.; KURKOWSKA-JASTRZĘBSKA, I. Inflammation and gliosis in neurological diseases – clinical implications. **Journal of Neuroimmunology.** 2010.

## ANEXO I

### PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

As secções retiradas do *freezer* a  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram secas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos e foram submetidas ao seguinte protocolo adaptado de Gomes-Leal *et al*, 2005:

1. Lavagem com em PBS por 3 minutos;
2. Pré-tratamento em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear®) em uma temperatura constante de  $60^{\circ}\text{C}$ , durante 25 minutos. Após esse tempo, permaneceram na solução por mais 20 minutos para esfriamento em temperatura ambiente;
3. Lavagem em PBS por 3 minutos;
4. Imersão em solução metanol (QEEL) a 1,0% de peróxido de hidrogênio (30%;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Merck), na proporção de 1ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para cada 100ml de alcool metílico);
5. Lavagem em três tempos, de 3 minutos cada, em solução PBS/Tween (0,05%; Sigma-Aldrich);
6. Incubação em soro normal de cavalo, para os anticorpos anti-NeuN, anti-ED1, ou em soro normal de cabra para anti-caspase-3, em câmara úmida por um período de 1 hora. Os soros foram diluídos em PBS, numa proporção de 1:9;
7. Colocação nos respectivos anticorpos primários para incubação *over night*;
8. No dia seguinte, iniciou-se com 3 tempos de lavagem em PBS/Tween, com duração de 3 minutos cada;
9. Incubação por 2 horas em anticorpo secundário: anti-camundongo feito em cavalo (1:100; Vector) para os primários NeuN e ED1 (1:100, Serotec); anti-coelho feito em cabra para o primário Caspase-3 (1:200, Promega);
10. 3 lavagens de 3 minutos em PBS/Tween;
11. Incubação em Complexo Avidina-Biotina peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain®)

pelo período de 2 horas;

12. 4 lavagens em PBS/Tween por 3 minutos;
13. Revelação – realizada com diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich) como cromógeno, numa solução pré-montada (125mg DAB; 250ml de PB 0,1M, pH 7,2 – 7,4 e 130  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
14. Lavagem das secções em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4) por 2 minutos;
15. Desidratação em bateria de alcoois de concentração crescente (70, 80 e 90% por 01 minuto em cada e alcoois absolutos (100%) por um minuto e trinta segundos;
16. Diafinização em Xilol;
17. Montagem das lâminas com Entellan (Merck®).

## ANEXO II

### PROTOCOLO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

**PARECER BIO0030-09**

**Projeto: BLOQUEIO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL PARA A MAXIMIZAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA TRANSPLANTADAS APÓS ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO EXPERIMENTAL**

**Coordenador:** Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

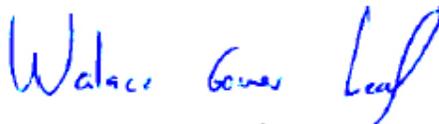
**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 01/2009 a 01/2012

**Nº no CEPAE-UFGA: BIO0030-09**

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 12 de dezembro de 2009



Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa

Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará