

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

RAFAEL RODRIGUES LIMA

**ATIVACÃO MICROGLIAL, LESÃO DA SUBSTÂNCIA BRANCA E EXPRESSÃO  
DE NOGO-A EM RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA ESTRIATAL**

Belém  
2012

RAFAEL RODRIGUES LIMA

**ATIVACÃO MICROGLIAL, LESÃO DA SUBSTÂNCIA BRANCA E EXPRESSÃO  
DE NOGO-A EM RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA ESTRIATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Belém

2012

RAFAEL RODRIGUES LIMA

**ATIVACÃO MICROGLIAL, LESÃO DA SUBSTÂNCIA BRANCA E EXPRESSÃO  
DE NOGO-A EM RATOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA ESTRIATAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

**Aprovada em: 10/05/2012**

**Banca Examinadora**

---

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

- Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane do Socorro Ferraz Maia  
Faculdade de Farmácia – UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro  
Faculdade de Farmácia – UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roseane Borner de Oliveira  
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

*Aos meus pais, Aláide e Theodomiro,*

*Ao Marcio, Gabriel, Tássio e Victória.*

*Essa conquista é nossa!*

## AGRADECIMENTOS

*“Nada te perturbe, Nada te espante,  
Tudo passa, Deus não muda,  
A paciência tudo alcança;  
Quem a Deus tem, Nada lhe falta: Só Deus basta”  
Santa Tereza D'Avila*

À Deus, por tudo que recebi, aprendi e vivenciei em todos esses anos de pós graduação.

Ao Prof. Wallace pela orientação em todas as fases desta investigação. E muito mais do que a orientação, pela formação científica durante o mestrado e doutoramento.

À Prof<sup>a</sup>. Suely Lamarão, pela presença marcante em toda minha formação docente e científica. Seu incentivo, exemplo e amizade foram decisivos para que continuasse a trilhar os caminhos da vida acadêmica depois da iniciação científica.

À Luana Santana, pela amizade e cumplicidade em todos os momentos da elaboração deste trabalho. Muito obrigado por toda solicitude e presença nos momentos mais difíceis.

Ao Rafael Fernandes e Ana Carolina Alves pela amizade, companheirismo e disponibilidade durante esses últimos anos de doutoramento. Sem vocês, essa trajetória teria sido mais cansativa, desgastante e menos divertida. Muito obrigado.

À Luanna Fernandes e ao Elder Nascimento pelo auxílio nas contagens. Também, pelo auxílio em sala de aula, me ajudando a vencer o cansaço e falta de tempo em dias de experimento.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Adriano, Júnior, Nelson, Patrycy, Diego e Ijair por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Às amigas e Cristiane Maia e Marta Monteiro, pelas contribuições no processo de qualificação deste trabalho.

A todos meus amigos, em especial Márcia, Roberta e Ana Cássia por todo incentivo, e por um dia termos nos permitido juntos sonhar e desejar a docência universitária.

Ao Marcio, pela presença, amor e compreensão em todos os momentos de ausência durante o doutoramento.

Ao meu pai pelo “sim” constante a todos meus projetos de vida, sacrificando ou suprimindo muitas vezes os seus. Nada disso seria possível sem você.

A Minha mãe, meu grande amor, pelas orações, formação e toda dedicação. Ao teu lado, com tuas orações e carinho, foi onde sempre me refiz, me fortaleci e ganhei novo impulso para continuar, sempre que a dúvida, desânimo ou decepção se fizeram presentes. Ter você como mãe é muito mais que qualquer dádiva divina.

*Penso que só há um caminho para a ciência ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonar-se por ele; casar e viver feliz com ele até que a morte vos separe – a não ser que encontrem outro problema ainda mais fascinante, ou, evidentemente, a não ser que obtenham uma solução. Mas, mesmo que obtenham uma solução, poderão então descobrir, para vosso deleite, a existência de toda uma família de problemas-filhos, encantadores ainda que talvez difíceis, para cujo bem-estar poderão trabalhar, com um sentido, até ao fim dos vossos dias.*

Karl Popper

## RESUMO

O objetivo desta investigação foi avaliar o padrão degenerativo de diversos tratos de substância branca após lesão isquêmica estriatal, correlacionando o processo degenerativo com os padrões de ativação microglial e expressão de Nogo-A. Para isso, foi induzida isquemia focal com injeção estereotáxica de endotelina no estriado de ratos adultos, e nos animais controle apenas injetou-se solução salina estéril. Os animais foram perfundidos 3, 7, 14 e 30 dias após isquemia. O cérebro removido, pós-fixado, crioprottegido, cortado em criostato e os cortes obtidos submetidos à investigação imunistoquímica com os seguintes anticorpos: Anti-GFAP (1:2000, Dako), Anti-Tau-1 (1:500, Chemicon), Anti-MBP (1:100, Chemicon International), Anti-Nogo A (1:100, Invitrogen), Anti-Iba1 (1:1000, WAKO), Anti-ED1 (1:500, Serotec) e Anti-MHC-II (1:100 Abcam), além da visualização do padrão lesivo com violeta de cresila. As lâminas marcadas pelos diferentes métodos foram avaliadas qualitativamente e algumas também quantitativamente (Anti-Nogo A, Anti-ED1, Anti-MHC-II e Anti-Tau-1), com contagens realizadas no estriado e no corpo caloso. Os dados foram tabulados, submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) e capturadas microfotografias dos achados mais representativos. As lâminas coradas com violeta de cresila revelaram um aumento da densidade celular pela infiltração de células inflamatórias à área isquêmica, com aumento expressivo ao 7º dia. Nas lâminas imunomarcadas para GFAP foi encontrado aumento progressivo da população de astrócitos, assim como um aumento do volume celular em 7 e 14 dias. Oligodendrócitos patológicos marcados com Tau-1 tiveram pico de marcação ao 3º dia no estriado e ao 7º dia no corpo caloso, e a perda de compactação de mielina identificada pelo MBP foi melhor observada ao 14º dia, nos diferentes tratos. A ativação microglial identificada pelas diferentes imunomarcações apresentou seu pico ao 7º dia, tanto em estriado como em corpo caloso, porém no corpo caloso com um número muito menor quando comparado com o estriado. A morfologia microglial sofreu variações, sendo encontrado o fenótipo ramificado nos animais controles, assim como nos tempos precoces e tardios pós isquemia e o padrão amebóide/fagocítico ao 7º dia, coincidente com o maior número de células ativadas. A contagem de células Nogo-A + teve seu pico observado ao 3º dia no estriado, não sendo observadas no corpo caloso diferenças de expressão de Nogo-A entre 3 a 14 dias, apenas uma diminuição quando comparado a 30 dias. Sendo assim, microinjeções de ET-1 no estriado induziram conspícua perda tecidual, concomitante com ativação microglial progressiva, astrocitose, perda da imunoreatividade para proteína básica de mielina e lesão de oligodendrócitos em diversos tempos de sobrevivência após isquemia focal. Estes eventos acometem alguns tratos de SB, como o corpo caloso. O estabelecimento da evolução temporal destes eventos neuropatológico é a base para estudos futuros, nos quais se deverá manipular a resposta inflamatória com intuito de minimizar estas alterações teciduais.

**Palavras-chave:** Isquemia, acidente vascular encefálico, neurodegeneração, lesão de substância branca, astrocitose, ativação microglial.

## ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the degenerative pattern of several white matter tracts after striatal ischemic injury, correlating degenerative process standards with the microglial activation and expression of Nogo-A. For this purpose, focal ischemia was induced with stereotactic injection of endothelin in striatum of adult rats, and only in the control animals injected with sterile saline. The animals were perfused 3, 7, 14 and 30 days after ischemia. The brain removed, postfixed, cryoprotected, cut into cryostat sections obtained and submitted to immunohistochemical investigation with the following antibodies: anti-GFAP (1:2000, Dako), anti-Tau-1 (1:500, Chemicon), Anti-MBP (1:100, Chemicon International), Anti-Nogo-A (1:100, Invitrogen), Anti-Iba1 (1:1000, WAKO), ED1 (1:500, Serotec) and Anti-MHC II (Abcam 1:100), besides the viewing of the damage pattern with cresyl violet. Slides are marked by different methods were evaluated qualitatively and quantitatively also some (Anti-Nogo A, anti-ED-1, anti-MHC-II and anti-tau-1), counts were carried out in the striatum and in the corpus callosum. The data were tabulated, statistically analyzed by Tukey test ( $p < 0.05$ ) and micrographs taken of the findings more representative. The slides were stained with cresyl violet revealed an increase in cell density by the infiltration of inflammatory cells to the ischemic area, with a significant increase on day 7. The blades immunostained for GFAP was found progressive increase of the population of astrocytes and an increase in cell volume 7 and 14 days. Oligodendrocyte pathology marked with Tau-1 had peak marking the 3rd day in the striatum and the 7th day in the corpus callosum, and loss of myelin compaction identified by MBP was better at 14, in the different treatment. The microglial activation identified by different immunoblots showed a peak on day 7, both in striatum and in the corpus callosum, but in the corpus callosum with a much smaller number compared to the striatum. The morphology of microglial underwent changes, which found the branched phenotype in control animals, as well as in early and late times after ischemia and amoeboid default / phagocytic day 7, coinciding with the largest number of activated cells. The count of Nogo-A + cells peaked at 3 days observed in the striatum, and there were no differences in the corpus callosum expression Nogo-A 3 to 14 days, only a decrease compared to 30 days. Thus, microinjections of ET-1 induced conspicuous striatal tissue loss, concomitant with progressive microglial activation, astrocytosis, loss of immunoreactivity for myelin basic protein and oligodendrocytes damage in various survival times after focal ischemia. These events affect a few SB tracts, as the corpus callosum. The establishment of the temporal evolution of these events is the neuropathological basis for future studies, in which they should handle the inflammatory response in order to minimize these tissue changes.

**Keywords:** Ischemia, stroke, neurodegeneration, white matter lesions, astrocytosis, microglial activation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata pontual dos eventos prejudiciais na isquemia cerebral.....	15
Figura 2 - Diagramação da área de injeção e padrão lesional estabelecido.....	22
Figura 3 - Diagramação esquemática dos campos de contagem realizados no estriado.....	26
Figura 4 - Diagramação esquemática dos campos de contagem realizados no corpo caloso .....	26
Figura 5 - Prancha com micrografias do estriado coradas com violeta de cresila.....	28
Figura 6 - Prancha com micrografias de Imunoistoquímica para GFAP no estriado .....	30
Figura 7 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para GFAP no corpo caloso.....	31
Figura 8 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para MBP no estriado.....	33
Figura 9 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para MBP no corpo caloso.....	34
Figura 10 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para Iba1 no estriado.....	36
Figura 11 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para Iba1 no corpo caloso.....	37
Figura 12 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para ED1 no estriado.....	39
Gráfico 1- Análise quantitativa do número de células ED1+ no estriado.....	40
Figura 13 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para ED1 no corpo caloso.....	41
Gráfico 2 - Análise quantitativa do número de células ED1+ no corpo caloso.....	42
Figura 14 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para MHC-II no estriado.....	44
Gráfico 3 - Análise quantitativa do número de células MHC-II+ no estriado.....	45
Figura 15 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para MHC-II no corpo caloso...	46
Gráfico 4 - Análise quantitativa do número de células MHC-II+ no corpo caloso.....	47
Figura 16 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para Tau-1 no estriado.....	49
Gráfico 5 - Análise quantitativa do número de células Tau-1+ no estriado.....	50
Figura 17 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para Tau-1 no corpo caloso.....	51
Gráfico 6 - Análise quantitativa do número de células Tau-1+ no corpo caloso.....	52
Figura 18 - Prancha com micrografias de imunoistoquímica para Nogo-A no estriado.....	54
Gráfico 7 - Análise quantitativa do número de células Nogo-A+ no estriado.....	55

Figura 19 - Prancha com micrografias de imunistoquímica para Nogo-A no corpo caloso .....	56
Gráfico 8 - Análise quantitativa do número de células Nogo-A+ no corpo caloso.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
AVE	Acidente Vascular Encefálico
ET-1	Endotelina-1
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
MBP	Proteína básica de mielina
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
EUA	Estados Unidos da América
SB	Substância Branca
SC	Substância Cinzenta
SNC	Sistema Nervoso Central
NIH	<i>Society for Neuroscience, National Institutes of Health</i>
CEPAE – UFPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará
IP	Intraperitoneal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
MCAO	Modelo de Oclusão da Artéria Cerebral Média
HMGB1	Proteína de Alta Mobilidade Box 1
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Óxido nítrico sintase
NMDA	N-metil-D-Aspartato

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	13
1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	14
1.3. INFLAMAÇÃO E DESORDENS NEURAIS AGUDAS .....	16
1.4. LESÃO DA SUBSTANCIA BRANCA APÓS ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO .....	17
1.5. NOGO A E PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS .....	17
1.6. HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL .....	18
1.7. OBJETIVOS .....	20
<b>1.7.1. Objetivo Geral</b> .....	20
<b>1.7.2. Objetivos Específicos</b> .....	20
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
2.1. ANIMAIS E PROCEDÊNCIA.....	21
2.2. INDUÇÃO DA ISQUEMIA FOCAL ESTRIATAL .....	21
2.3. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO TECIDUAL .....	23
2.4. ANÁLISE HITOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA .....	23
<b>2.4.1. Visualização da área de lesão</b> .....	23
<b>2.4.2. Estudos Imunohistoquímicos</b> .....	24
2.5. ANÁLISE QUALITATIVA.....	25
2.6. ANÁLISE QUANTITATIVA .....	25
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	26
<b>3. RESULTADOS</b> .....	27
3.1. VISUALIZAÇÃO DA ÁREA DE LESÃO .....	27
3.2. MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ASTROCITOSE PROGRESSIVA NO ESTRIADO E CORPO CALOSO.....	29
3.3. MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ENDOTELINA-1 INDUZEM PERDA PROGRESSIVA DA REATIVIDADE PARA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA.....	32
3.4. MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ISQUEMIA FOCAL COM ATIVAÇÃO MICROGLIAL PROGRESSIVA.....	35
3.5. AS CÉLULAS MICROGLIAIS EXPRESSAM PROGRESSIVAMENTE MHC CLASSE II APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL.....	43
3.6. AUMENTO DO NÚMERO DE OLIGODENDRÓCITOS PATOLÓGICOS (TAU- 1+) TANTO NO ESTRIADO COMO NO CORPO CALOSO APÓS ISQUEMIA INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1.....	48
3.7. A LESÃO ISQUÊMICA INDUZIDA POR ENDOTELINA-1 INDUZ AUMENTO PROGRESSIVO DA EXPRESSÃO DE NOGO A TANTO NO ESTRIADO COMO NO CORPO CALOSO.....	
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	58
4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL.....	58

4.2. ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR ENDOTELINA-1.....	59
4.3. MICROGLIOSE APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL INDUZIDA POR INJEÇÕES DE ENDOTELINA-1.....	61
4.4. DANOS A OLIGODENDRÓCITO E BAINHA DE MIELINA APÓS ISQUEMIA FOCAL.....	63
4.5. EXPRESSÃO PROGRESSIVA DE NOGO-A INDUZIDA PELO PROCESSO ISQUÊMICO.....	65
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil ocupa a sexta posição entre os países com maior índice de acometimentos por acidente vascular encefálico (AVE). A incidência de morte por doença cerebrovascular e do coração suplantou a de morte por doenças infecciosas desde a década de 60, e a incidência de AVE no Brasil é a maior da América Latina (LOTUFO, 2005; LOTUFO e BENSENOR, 2007). Ocorrem cerca de 795.000 casos por ano nos EUA, cerca de 1,5 milhões na china e mais de 100.000 casos por ano no Brasil. Estima-se que a cada 40 segundos uma pessoa tenha AVE nos EUA e uma pessoa irá morrer a cada 4 minutos. O número de novos casos no mundo será de cerca de 18 milhões em 2015 e 23 milhões em 2030 (MOSKOWITZ et al. 2010). Além disso, muitas pessoas que não falecem ficam com sequelas neurológicas permanentes devido ao AVE prévio (TAYLOR et al. 1996). Estes números fazem do AVE uma doença de grande importância epidemiológica e clínica.

A ocorrência de AVE possui alto custo emocional e econômico para os indivíduos acometidos e para sociedade. Em um estudo feito no início da década de 90 por Taylor e colaboradores (1996), estima-se que os custos por pessoa acometida de hemorragia subaracnóide, infarto hemorrágico e infarto isquêmico são, respectivamente, 228.000, 123.000 e 90.000 dólares por pessoa. O custo anual agregado gasto com pessoas acometidas por esses tipos de AVE foi de 40,6 bilhões de dólares, sendo que deste total, 29 bilhões foram direcionados para pessoas acometidas de infarto isquêmico. No Brasil, apenas no ano de 2003, segundo dados do Ministério da Saúde, cerca de 129.000 brasileiros morreram desta condição patológica, enquanto que um número ainda maior permaneceu com sequelas permanentes (LOTUFO, 2005).

Investimentos em pesquisas que investiguem potenciais terapias para doenças do sistema nervoso central (SNC) é um aspecto fundamental, tanto para a possibilidade do estabelecimento de terapias efetivas para estas doenças, o que significa auxílio indelével à saúde de milhões de pessoas, bem como para a economia do país, que poderá direcionar estes recursos para a melhoria do sistema de saúde e pesquisas translacionais.

## 1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Os eventos fisiopatológicos do AVE são extremamente complexos e envolvem mecanismos diversos (MOSKOWITZ et al. 2010). Em virtude de o tecido cerebral depender quase que exclusivamente do mecanismo da fosforilação oxidativa para a produção de energia, a demanda de oxigênio e glicose por este órgão é muito grande (LO et al. 2005; LO et al. 2003). O oxigênio e a glicose chegam ao cérebro a partir do fluxo sanguíneo graças a uma vascularização cerebral complexa formada a partir das artérias cerebrais anterior, média e posterior, responsáveis pela irrigação do córtex cerebral, núcleos da base e outras estruturas talâmicas (LENT, 2002).

Já que o tecido nervoso tem um consumo relativamente alto de oxigênio (o encéfalo recebe 15% do fluxo de sangue e consome 20% do oxigênio disponível na circulação) e glicose, pode-se imaginar que uma interrupção do fluxo sanguíneo cria um déficit energético altamente prejudicial para o funcionamento das células nervosas que ficam impossibilitadas de manter o seu funcionamento normal (MITSIOS et al. 2006). Além da diminuição dos substratos requeridos pela célula, há também um acúmulo de catabólitos potencialmente tóxicos que danificam ainda mais o tecido nervoso (DIRNAGL et al. 1999; MERGENTHALER et al. 2004).

A lesão cerebral isquêmica resulta de uma sequencia complexa de eventos fisiopatológicos que incluem: excitotoxicidade, estresse oxidativo, despolarização periinfarto, inflamação e morte celular programada (Figura 1).

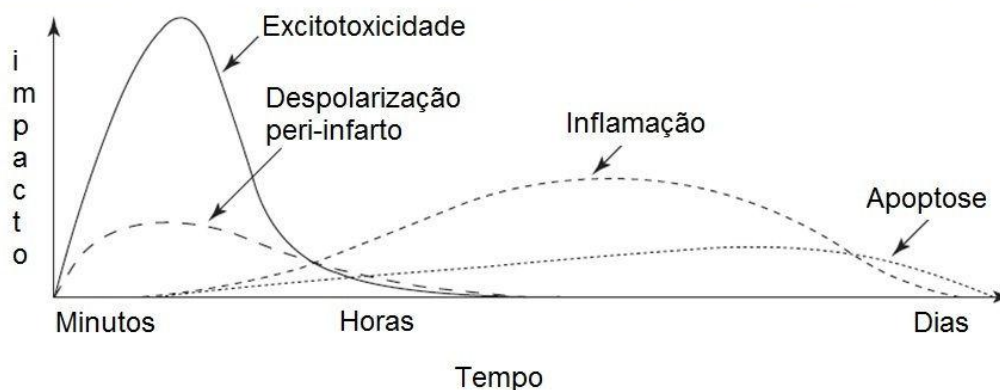


Figura 1. Cascata pontual dos eventos prejudiciais na isquemia cerebral focal. Minutos após o início do déficit de perfusão focal, mecanismos excitatórios podem prejudicar neurônios e as células gliais. Além disso, a excitotoxicidade desencadeia os eventos da despolarização periinfarto, a resposta inflamatória e os mecanismos de morte celular programada. O eixo X reflete a evolução da cascata no tempo, o eixo Y ilustra o impacto de cada elemento da cascata no final. Adaptado de (DIRNAGL et al. 1999).

Os mecanismos fisiopatológicos destes eventos são discutidos em revisões especializadas (GILMAN, 2006; MITSIOS et al. 2006; SAVITZ e FISHER, 2007). Na lesão cerebral isquêmica são observadas duas áreas bastante distintas: Centro isquêmico e Penumbra isquêmica.

A redução do fluxo sanguíneo no centro isquêmico causa uma pane nos processos metabólicos, no suprimento energético, na homeostasia iônica, com a perda da integridade celular (GILMAN, 2006; SAVITZ e FISHER, 2007). Como resultado, as células presentes no centro isquêmico morrem por necrose (LO, 2008). A penumbra isquêmica é formada pela área ao redor do centro isquêmico, onde os neurônios são morfológica e eletrofisiologicamente viáveis, mas que podem ser tardiamente comprometidos por mecanismos lesivos secundários (ASTRUP et al. 1977; LO, 2008). Nesta área, os vasos colaterais promovem uma circulação residual que é insuficiente para manter a homeostasia do tecido. Com a interrupção da homeostasia celular, as células localizadas na região de penumbra isquêmica morrem lentamente por apoptose (LO, 2008).

Após lesão isquêmica do tecido nervoso, inúmeros processos patológicos induzem um processo contínuo de morte celular por necrose e apoptose, com comprometimento conspícuo das substâncias branca e cinzenta (LO, 2008; MOSKOWITZ et al. 2010). A lesão se expande além do sítio de lesão primária, um fenômeno conhecido como degeneração neuronal secundária (TATOR e FEHLINGS, 1991). Durante este fenômeno, neurônios e axônios que são inicialmente viáveis degeneram tardiamente aumentando os danos funcionais (GOMES-LEAL, 2002; TATOR e FEHLINGS, 1991). Inúmeros mecanismos são envolvidos no fenômeno de degeneração secundária, mas inflamação, excitotoxicidade e estresse oxidativo são fatores de considerável importância (BAPTISTE e FEHLINGS, 2007). Área de infarto no centro isquêmico pode expandir com o tempo e afetar a região de penumbra. Este fato foi observado no encéfalo de alguns pacientes com AVE isquêmico que não foram submetidos ao tratamento com trombolíticos (LO et al. 2003). Como descrito também por Lo et al. (2003), alguns pacientes que apresentam a área de infarto isquêmico no território de oclusão da artéria cerebral média, inicialmente na região correspondente ao estriado, podem apresentar a expansão desta área de lesão para regiões corticais, meses após o evento isquêmico. Relatou-se que o uso de trombolíticos pode minimizar esta



expansão da área de infarto para a penumbra isquêmica (LO et al. 2003; MOSKOWITZ et al. 2010).

### 1.3. INFLAMAÇÃO E DESORDENS NEURAIS AGUDAS

O papel da resposta inflamatória durante doenças do SNC ainda é controverso (LUCAS et al. 2006; SCHWARTZ et al. 2006). Existem evidências que a resposta inflamatória induz tanto efeitos deletérios (GOMES-LEAL, et al. 2005; HAYAKAWA et al. 2008; LAMPL et al. 2007; POPOVICH et al. 1999; SOUZA-RODRIGUES et al. 2008; YRJANHEIKKI et al. 1999), como benéficos (GOMES-LEAL et al, 2007; LALANCETTE-HEBERT et al. 2007; NEUMANN et al. 2006). Após desordens neurais agudas experimentais e em seres humanos, ocorre resposta inflamatória caracterizada por recrutamento de neutrófilos e linfócitos em uma fase inicial, e intensa ativação microglial/macrofágica em fases mais tardias (ARUMUGAM et al. 2005; CLARK et al. 1993; GOMES-LEAL, et al. 2005; GOMES-LEAL et al. 2004; LIMA et al. 2008; OLIVEIRA et al. 1998; SOUZA-RODRIGUES et al. 2008; GOMES-LEAL, et al. 2012).

A ativação microglial é um evento patológico importante após inúmeras desordens neurais, incluindo AVE (BLOCK et al. 2007; GOMES-LEAL, et al. 2005; GOMES-LEAL, et al. 2004; GOMES-LEAL et al. 2007; MORIOKA et al. 1993). Demonstrou-se que o bloqueio da ativação microglial com minociclina, uma tetraciclina sintética, induz neuroproteção tecidual significativa, correspondendo a até 65% de diminuição da área de infarto cortical e a 45 % da área de infarto estriatal (HEWLETT e CORBETT, 2006; YRJANHEIKKI et al. 1999). O bloqueio da ativação microglial também é efetivo em outras doenças do SNC incluindo lesão aguda da medula espinhal (STIRLING et al. 2004) e excitotoxicidade (GUIMARÃES et al. 2010). Outros componentes celulares da resposta inflamatória parecem contribuir para o processo lesivo durante doenças do SNC. O bloqueio do recrutamento de neutrófilos e linfócitos induz neuroproteção em diversas condições experimentais, incluindo lesão da medula espinhal (TAOKA et al. 1998; TAOKA et al. 1997) e isquemia (HIROSE et al. 2000; PRICE et al. 2006; NEUMANN et al. 2008; ARUMUGAM et al. 2005).

#### 1.4. LESÃO DA SUBSTÂNCIA BRANCA APÓS ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Em humanos, a substância branca corresponde a aproximadamente 50% do volume total do cérebro. Portanto, lesões nessas regiões contribuem significativamente para os déficits observados em estados patológicos (MATUTE et al. 2007). Tratos de substância branca do SNC têm uma importante função de transporte de sinais neurais da medula espinhal para o cérebro, e vice-versa. No entanto, novas abordagens sugerem que em vários distúrbios neuronais, incluindo trauma cerebral e da medula espinhal, malária, AVE, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica, tanto morte de células gliais como a lesão direta dos tratos de substância branca poderiam ser as principais causas dos déficits funcionais subsequentes aos eventos citados (MEDANA e ESIRI, 2003; GENTLEMAN et al. 1993). Um importante fator que corrobora essa hipótese encontra-se nos déficits funcionais significativos observados no SNC após lesões isquêmica e traumática, nos quais se encontra disfunção da substância branca ao invés de disfunção da substância cinzenta (BLIGHT e DECRESCITO, 1986).

Os efeitos nocivos de uma alteração patológica primária no SNC (anóxia ou trauma, por exemplo) são exacerbados durante a degeneração neuronal secundária, ou seja, a área da lesão se estende para regiões adjacentes ou até mesmo distantes do da lesão primária (LO et al. 2003; MOSKOWITZ et al. 2010), através dos mecanismos já discutidos. Acredita-se que os déficits funcionais gerados por desordens neurais agudas são causados, principalmente, pelos processos de degeneração da substância branca (oligodendrócitos, mielina e cilindro axonal (MATUTE et al. 2007; KANELLOPOULOS et al. 2000). Na medula e no encéfalo, relatou-se alterações no citoesqueleto de oligodendrócitos, tanto em modelos experimentais excitotóxicos quanto isquêmicos (IRVING, 1996a , 1996b e 1997; LI et al. 2000), o que revela uma clara ligação entre os mecanismos de excitotoxicidade e/ou inflamação e disfunção da substância branca (KANELLOPOULOS et al. 2000; MATUTE et al. 2007).

#### 1.5. NOGO-A E PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS

A incapacidade de regeneração axonal no SNC após lesões severas promove limitações na recuperação funcional (DONOGHUE, 1997). Essa falha regenerativa tem sido atribuída em parte às proteínas associadas à mielina no SNC

(FILBIN, 2003) e com a cicatriz glial que se forma no local da lesão (SILVER e MILLER, 2004). Vários inibidores do crescimento axonal, inclusive Nogo-A (GRANDPRÉ et al. 2000), glicoproteína associada à mielina (MCKERRACHER et al. 1994) e da glicoproteína de oligodendrócito (WANG et al. 2002a, 2002b), exercem seus efeitos através do receptor de Nogo (FOURNIER et al. 2001) e outros co-receptores, incluindo p75NTR, LINGO-1 e TROY (WANG et al. 2002a, b; NIEDEROST et al. 2002).

Inibidores de crescimento axonal obtiveram um considerável interesse no tratamento de trauma medular e AVE isquêmico nos últimos anos (SCHWAB, 2004; BUCHLI e SCHWAB, 2005; YIU e HE, 2006; HAREL e STRITTMATTER, 2006). Várias proteínas com efeitos repulsivos ou inibitórios sobre o crescimento axonal foram identificadas no SNC adulto (YIU e HE, 2006). Entre estas, a proteína de membrana Nogo-A foi mostrada capaz de impedir a regeneração axonal e plasticidade in vivo (SCHWAB, 2004; BUCHLI e SCHWAB, 2005; YIU e HE, 2006; HAREL e STRITTMATTER, 2006).

O gene Nogo gera três principais proteínas, Nogo-A,-B e-C, mas apenas Nogo-A tem atividade inibitória de crescimento axonal, além de uma distribuição preferencial pelo SNC (CHEN et al. 2000; GRANDPRÉ et al. 2000). As funções de Nogo-B e-C são em grande parte desconhecidas. Tem sido sugerido que Nogo-B controla a angiogênese, promovendo a migração de células endoteliais, mas também se mostrou capaz de inibir a proliferação de células musculares lisas das túnicas vasculares (ACEVEDO et al. 2004). A inibição de Nogo-A com anticorpos neutralizantes se mostrou eficaz na recuperação do brotamento axonal em modelos de trauma na medula espinhal de roedores e de primatas (SCHNELL e SCHWAB, 1990; BREGMAN et al. 1995; MERKLER et al. 2001; LIEBSCHER et al. 2005; FREUND et al. 2006), assim como após AVE isquêmico (PAPADOPOULOS et al. 2002; WIESSNER et al. 2003; MARKUS et al. 2005; SEYMOUR et al. 2005).

## 1.6. HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

A lesão de substância branca é um importante evento patológico após AVE e outras desordens agudas do SNC (MEDANA et al. 2003; COLEMAN e PERRY, 2002), mas este evento patológico secundário não foi estudado sistematicamente em tempos mais tardios após AVE. Em estudos prévios,

descrevemos alguns desses eventos patológicos no SNC de ratos tanto após excitotoxicidade (GOMES-LEAL, et al. 2004; GOMES-LEAL, et al.2005; LIMA, et al.2008; DOS SANTOS, et al. 2007), como após isquemia focal (COSTA, 2006; DOS SANTOS, et al.2007) em tempos de sobrevivência curtos.

Após AVE experimental, relatou-se intensa reação microglial em áreas distantes do centro isquêmico (MORIOKA et al. 2003). Nestas circunstâncias experimentais, as células microgliais parecem fagocitar restos de substância branca (SCHMITT et al. 1998; KOSEL et al. 1997). Recentemente, relatou-se fenômeno similar após AVE em humanos (THIEL e HEISS, 2010).

Como citado anteriormente, a resposta inflamatória no SNC possui uma natureza dúbia (SCHWARTZ et al. 2006; IADECOLA e ANRATHER, 2011). Os diversos componentes da resposta neuroimune podem ser benéficos e prejudiciais após lesão do SNC. No entanto, não está definido o papel da inflamação no processo de degeneração tardia dos tratos de SB após lesão isquêmica estriatal.

Neste trabalho, investigou-se o padrão degenerativo de diversos tratos de substância branca após lesão isquêmica estriatal, correlacionando o processo degenerativo com os padrões de ativação microglial.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. Objetivo Geral:

Investigar os padrões de ativação microglial, astrocitose, lesão de oligodendrócitos, desmielinização e expressão de NOGO A no estriado e corpo caloso após lesão isquêmica estriatal induzida por microinjeções de endotelina-1 (ET-1).

### 1.7.2. Objetivos Específicos:

1.7.2.1. Descrever a histopatologia geral da lesão estriatal induzida por microinjeções de endotelina-1 em ratos adultos em tempos agudos e crônicos;

1.7.2.2 Descrever, qualitativamente e quantitativamente, os padrões de ativação microglial e astrocitose no estriado e corpo caloso, em tempos agudos e crônicos, após AVE experimental;

1.7.2.3 Descrever a expressão de NOGO A no estriado e corpo caloso em tempos agudos e crônicos após lesão isquêmica estriatal;

1.7.2.4 Descrever os padrões lesivos em oligodendrócitos, avaliando a expressão qualitativa e quantitativa de Tau-1 em diferentes tempos de sobrevivência após isquemia estriatal

1.7.2.5 Descrever a influência da lesão isquêmica estriatal sobre os padrões de reatividade da proteína básica de mielina em tempos agudos e crônicos após a indução isquêmica

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS E PROCEDÊNCIA

Para o presente estudo, utilizou-se ratos adultos, entre 4 de idade, da raça Wistar, fêmeas, com massa corpórea variando entre 250 e 290g, provenientes do Biotério da UFPA. Todos os procedimentos experimentais e as manipulações com os animais foram realizados em obediência às normas sugeridas pela *Society for Neuroscience, National Institutes of Health* (NIH, USA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE - UFPA), parecer BIO-038-12(Anexo 01).

### 2.2. INDUÇÃO DA ISQUEMIA FOCAL ESTRIATAL

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (72 mg/Kg) e xilazina (9 mg/Kg) via intraperitoneal (i.p.). Os reflexos corneano e de retirada da pata foram testados antes dos animais serem posicionados em um aparelho estereotático (Insight, Brasil). A estereotaxia foi implementada somente quando estes reflexos foram abolidos pela anestesia.

A isquemia focal foi induzida com microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) (Sigma-Aldrich, EUA) quantidade de 80 pmoles de ET-1 diluídos em 1 $\mu$ l de solução salina estéril. Este modelo experimental de indução de AVE já está estabelecido em nosso grupo (SOUZA-RODRIGUES *et al*, 2008).

Para indução da isquemia estriatal por ET-1, inicialmente foi feita uma incisão sagital na superfície do crânio, divulsão dos tecidos moles subjacentes, exposição da calota craniana e determinação das coordenadas estereotáticas. Após o estabelecimento da área de injeção através da estereotaxia, uma pequena abertura na estrutura óssea foi realizada utilizando uma broca esférica carbide nº 05 estéril acoplada a um motor de baixa rotação, com refrigeração constante, na tentativa de se evitar o aquecimento e destruição tardia do tecido ósseo circundante. Após trepanação óssea, a dura-máter foi removida para se ter uma visualização melhor do córtex cerebral. Em seguida, uma micropipeta de vidro com ponta de 10-20  $\mu$ m e graduações de 1  $\mu$ l (Sigma-Aldrich, EUA) foi posicionada de acordo com as coordenadas estereotáticas de Paxinos (1982): 2,5 médio-lateral; 1,2 antero-posterior; 4,5 dorso-ventral (Figura 2).

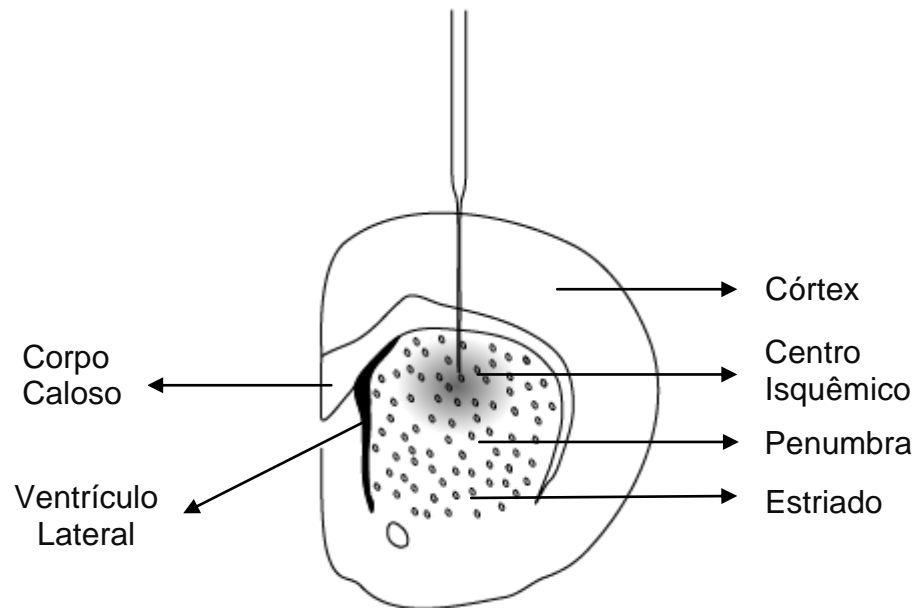


Figura 2: Diagramação esquemática representando em cinza a área de injeção e padrão lesional estabelecido.

Os animais controle foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, sendo injetado nestes animais o mesmo volume por região apenas de solução salina estéril.

Após a injeção, a micropipeta permaneceu estacionária por cinco minutos antes de ser retirada lentamente do parênquima estriatal. Em seguida, foi realizada a limpeza da área cirúrgica com solução fisiológica estéril, em especial dos detritos presentes sobre a superfície óssea, coaptação das bordas dos tecidos moles e sutura com fio de Nylon nº4.

Para um melhor conforto dos animais, utilizou-se uma manta térmica para manter a temperatura corporal do animal estável em 37°C durante todo o procedimento cirúrgico. A temperatura também foi monitorada por meio de um termômetro clínico retal. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com instrumental esterilizado e barreiras de proteção apropriadas, para manutenção de níveis adequados de biossegurança. Após a cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida à vontade, em gaiolas individuais, por tempos de sobrevivência equivalentes a 3, 7, 14 e 30 dias, sendo utilizados 5 animais isquêmicos e 3 controles por tempo de sobrevivência.

### 2.3. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO TECIDUAL

Após os tempos de sobrevivência já especificados, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (90 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (9 mg/Kg) e perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com solução salina a 0,9% heparinizada, seguida de paraformaldeído a 4%.

Após a perfusão dos animais, os respectivos encéfalos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados no mesmo fixador utilizado na perfusão por 12h e crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose e glicerol. Em seguida, os mesmos foram embebidos em *Tissue tek*, congelados em câmara de criostato (Carl Zeiss, Mícron, Alemanha), com efeito Peltier (- 55 °C).

Secções coronais com 50 µm e 20 µm de espessura foram obtidas para análise da área de lesão e imunohistoquímica, respectivamente. De cada animal foram obtidas 4 lâminas com secção de 50 µm, intercaladas com outras 10 lâminas com secções de 20 µm por intervalo, sendo obtida inicialmente uma secção de 50 µm, a qual demarcou o início da área coletada, seguida das 10 lâminas com secções de 20 µm, e assim por diante, encerrando-se a coleta com a última lâmina de 50 µm, de maneira que toda extensão rostro-caudal da lesão tenha sido coletada. Essa sistemática auxiliou também na hora da escolha de secções por técnica de imunohistoquímica, para que não fossem escolhidas lâminas muito próximas e se tenha avaliado, tanto qualitativamente quanto nas contagens, regiões distintas.

Todas as secções foram montadas durante a microtomia diretamente em lâminas gelatinizadas. Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 h antes de qualquer outro procedimento histológico. Após este período, as mesmas foram conservadas à temperatura de -20°C aguardando imunohistoquímica ou outro procedimento histológico. Maiores detalhes do processamento histológico, ver anexo - 2.

### 2.4. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA

#### 2.4.1. Visualização da Área da Lesão

Os padrões lesivos foram avaliados em secções de 50 µm coradas com violeta de cresila. A área de lesão foi identificada pelo palor tecidual (área com ausência de corpos neuronais e/ou necrose tecidual induzida pelo processo



isquêmico). De cada animal foram avaliadas 4 secções ao longo da extensão rostro-caudal da lesão

#### 2.4.2. Estudos Imunoistoquímicos

Para investigação dos padrões de marcação de ativação microglial, danos à substância branca, e expressão de Nogo-A utilizaram-se os seguintes anticorpos:

- **Anti-Iba1** (1:1000, WAKO): Um anticorpo que reconhece uma proteína quelante de  $Ca^{++}$  presente no citoplasma microglial (ITO et al. 1998);
- **ED-1** (1:500, Serotec): marcador para micróglia/macrófagos ativados, o qual identifica um epítipo na membrana de lisossomas no citoplasma de micróglia/macrófagos ativados (DIJKSTRA et al. 1985);
- **Anti-MHC-II** (1:100, Abcam): Um anticorpo que reconhece a proteína do complexo principal de histocompatibilidade classe II (THORED et al. 2009).
- **Anti-Tau-1** (1:500, Chemicon).: Os oligodendrócitos submetidos a condições patológicas foram marcados com o anticorpo anti-Tau-1. Este anticorpo marca um epítipo desfosforilado da proteína Tau entre os resíduos de serina 199 a 204 em oligodendrócitos patológicos (IRVING, et al. 1996; IRVING, et al. 2001; GUIMARÃES et al. 2010).
- **Anti-MBP** (1:100, Chemicon International): anticorpo monoclonal que reconhece a proteína básica de mielina, um componente da mielina compacta (IRVING et al. 1997; GOMES-LEAL et al. 2005).
- **Anti-GFAP** (1:2000, Dako): marcador para astrócitos, o qual identifica a proteína ácida fibrilar glial, um componente do citoesqueleto dessa célula glial (GOMES-LEAL et al. 2004);
- **Anti-Nogo-A** (1:100, Invitrogen): Um componente de oligodendrócitos, considerado um inibidor de regeneração axonal (BUCHLI & SCHWAB, 2005; CHEATWOOD et al. 2008).

## 2.5. ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e imunoistoquímicos foram inspecionadas em microscópio binocular Nikon Eclipse E200. Imagens de secções com campos mais ilustrativos foram obtidas com um sistema de fotomicroscopia digital utilizando-se o programa de computador Moticam 2500<sup>®</sup> acoplado ao fotomicroscópio Nikon 50i.

Das avaliações imunoistoquímicas, o padrão de desmielinização, reatividade astrocitária e morfologia microglial foram averiguados apenas qualitativamente.

## 2.6. ANÁLISE QUANTITATIVA

Para a avaliação quantitativa dos padrões histopatológicos foram realizadas contagens de marcações imunoistoquímicas, usando microscópio binocular Nikon Eclipse E200, através de uma gradícula de contagem de 0,00625 mm<sup>2</sup> acoplada a uma das oculares, em objetiva 40x.

Foram contadas 3 secções/animal/imunoistoquímica, com um total de 9 campos avaliados por secção no estriado (Figura 3), em que se avaliou o estriado ipsilateral (isquêmico), em seus terços dorsal e médio.

Foi também contada a porção dorsal do corpo caloso ipsilateral, com 3 campos por secção. Pelo fato do corpo caloso apresentar dimensões reduzidas em comparação ao tamanho total da gradícula, foi utilizada uma área de apenas 0,001875 mm<sup>2</sup> (Figura 4).

Foram contados os números de oligodendrócitos patológicos, células Nogo-A positivas, células microgliais ED-1 e MHC-II positivas para os diferentes grupos experimentais, nos diferentes tempos de sobrevivência. As médias das contagens e os valores de erro padrão foram obtidos e plotados em coordenadas cartesianas.

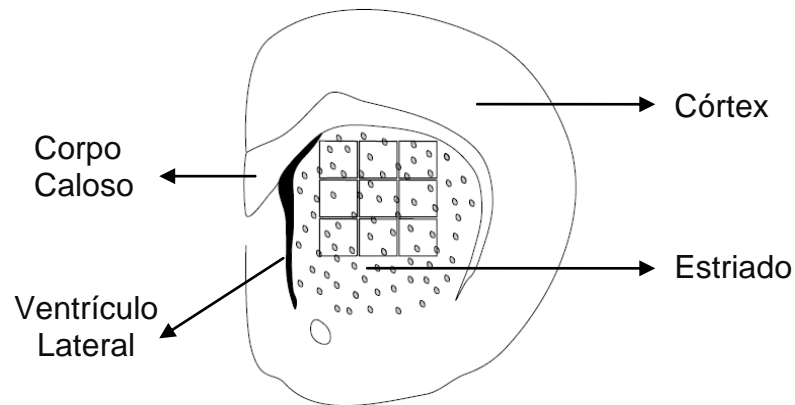


Figura 3: Diagramação esquemática dos campos de contagem realizados no estriado.

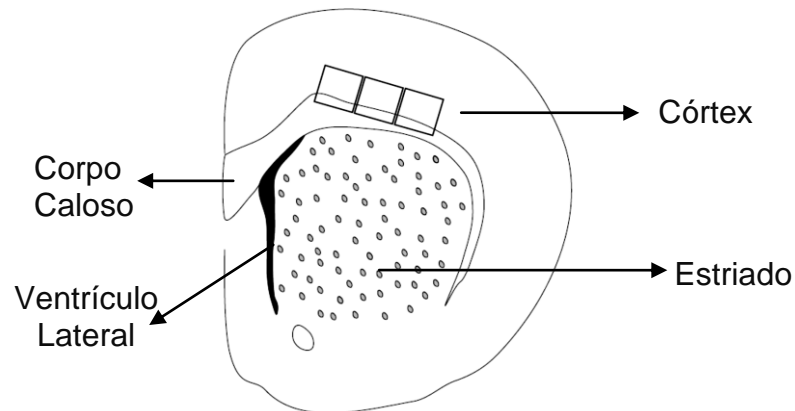


Figura 4: Diagramação esquemática dos campos de contagem realizados no corpo caloso.

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

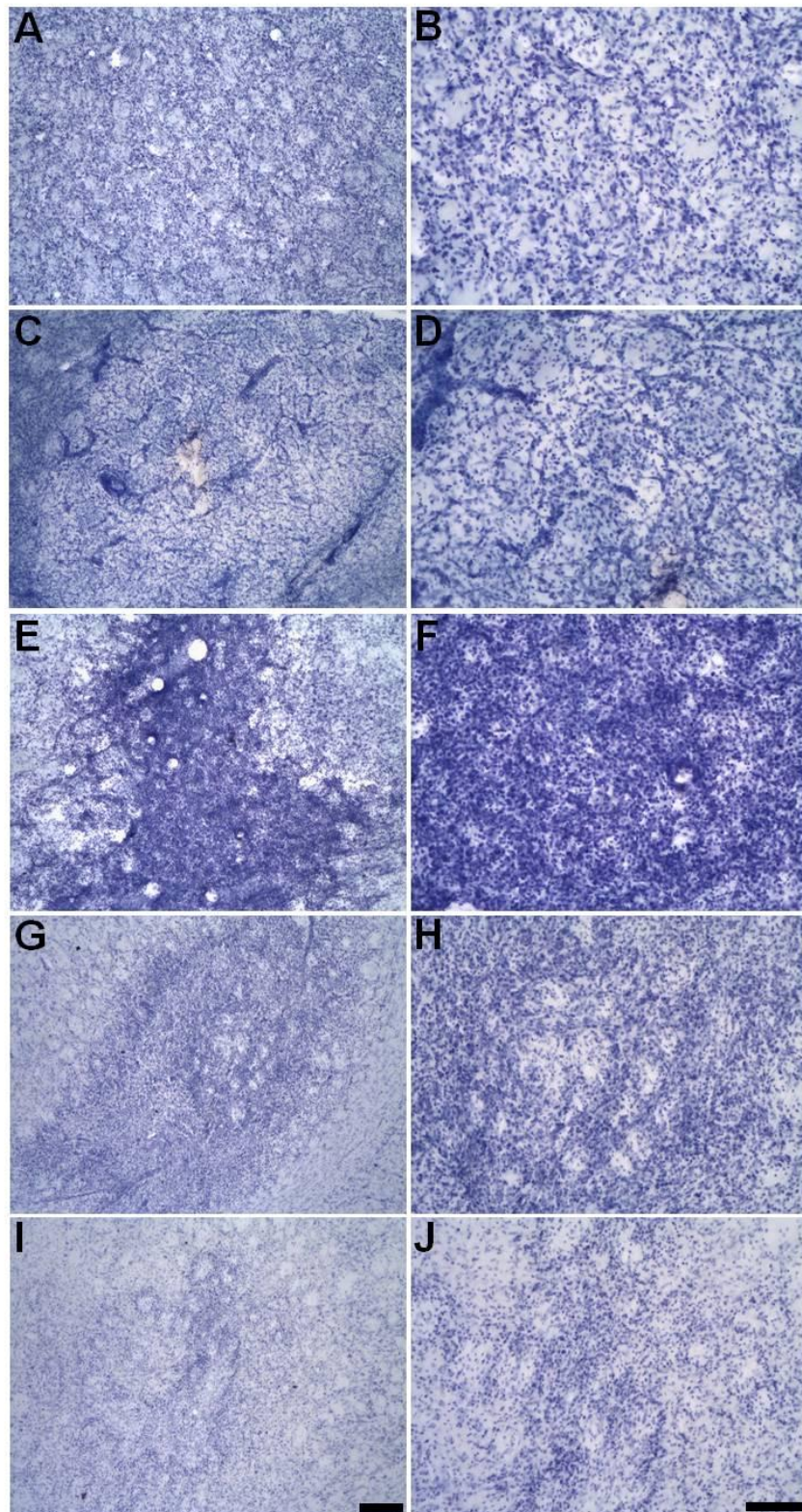
Foi utilizada análise de variância (ANOVA) com critério de correção a *posteriore* de Tukey para fazer a avaliação das diferenças entre os grupos controle e isquêmico, por tempo de sobrevida, em cada análise imunohistoquímica. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos textualmente e em gráficos com média e erro padrão (média  $\pm$  erro padrão).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. VISUALIZAÇÃO DA ÁREA DE LESÃO**

A análise das secções coradas com violeta de cresila mostrou que os animais injetados com solução salina estéril apresentaram dano mecânico negligenciável, sem resposta inflamatória considerável na área de injeção, ausência de edema e com preservação da densidade celular em todos os tempos de sobrevivência investigados (Figura 5A-B).

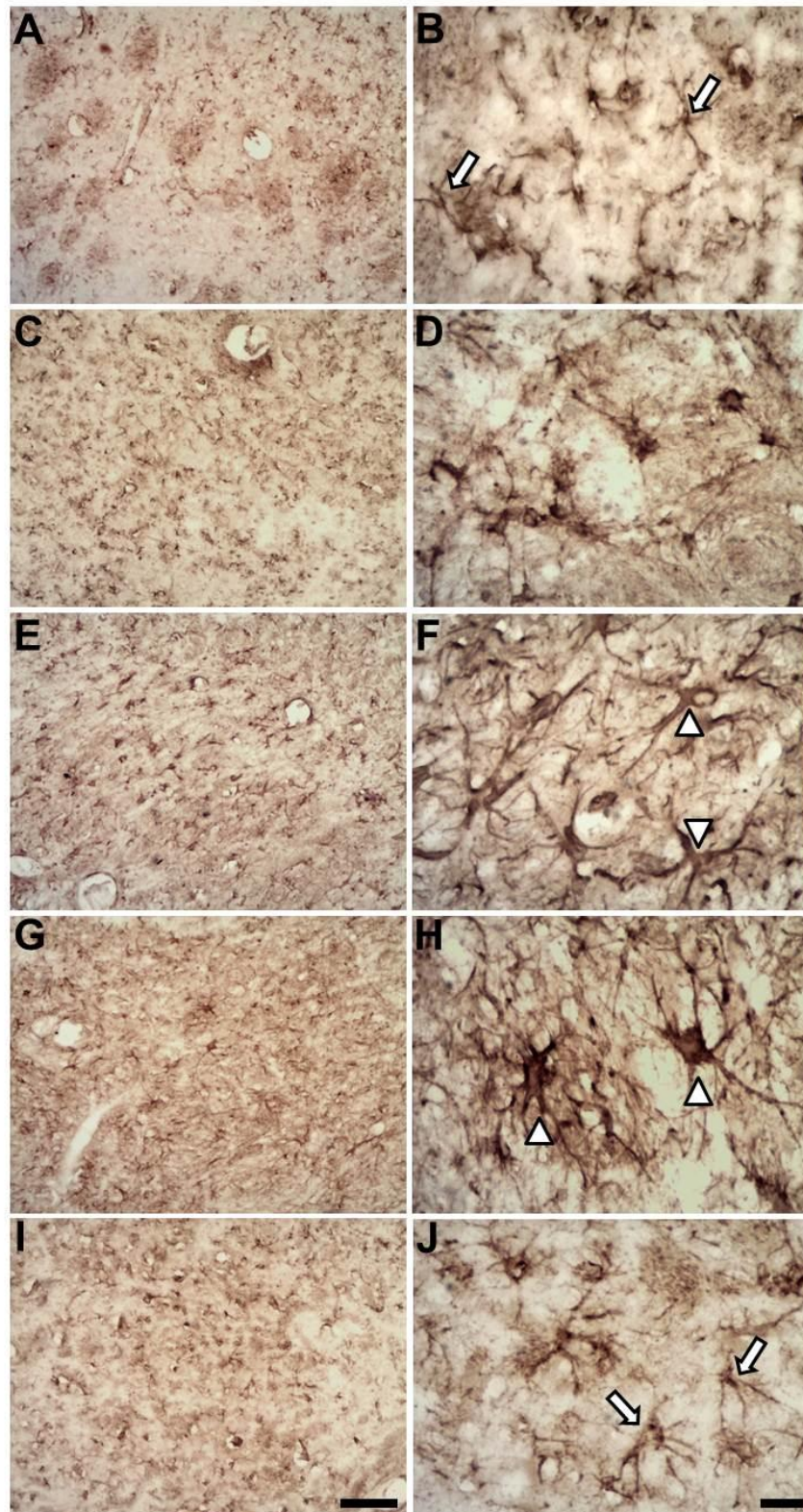
Nos animais isquêmicos, observou-se um intenso infiltrado inflamatório a partir do terceiro dia, com aumento ao sétimo e diminuição progressiva a partir do décimo quarto dia (Figura 5C-J). Houve diminuição progressiva de corpos celulares entre 3 e 30 dias após a injeção de ET-1, em comparação aos animais controle (Figura 5).



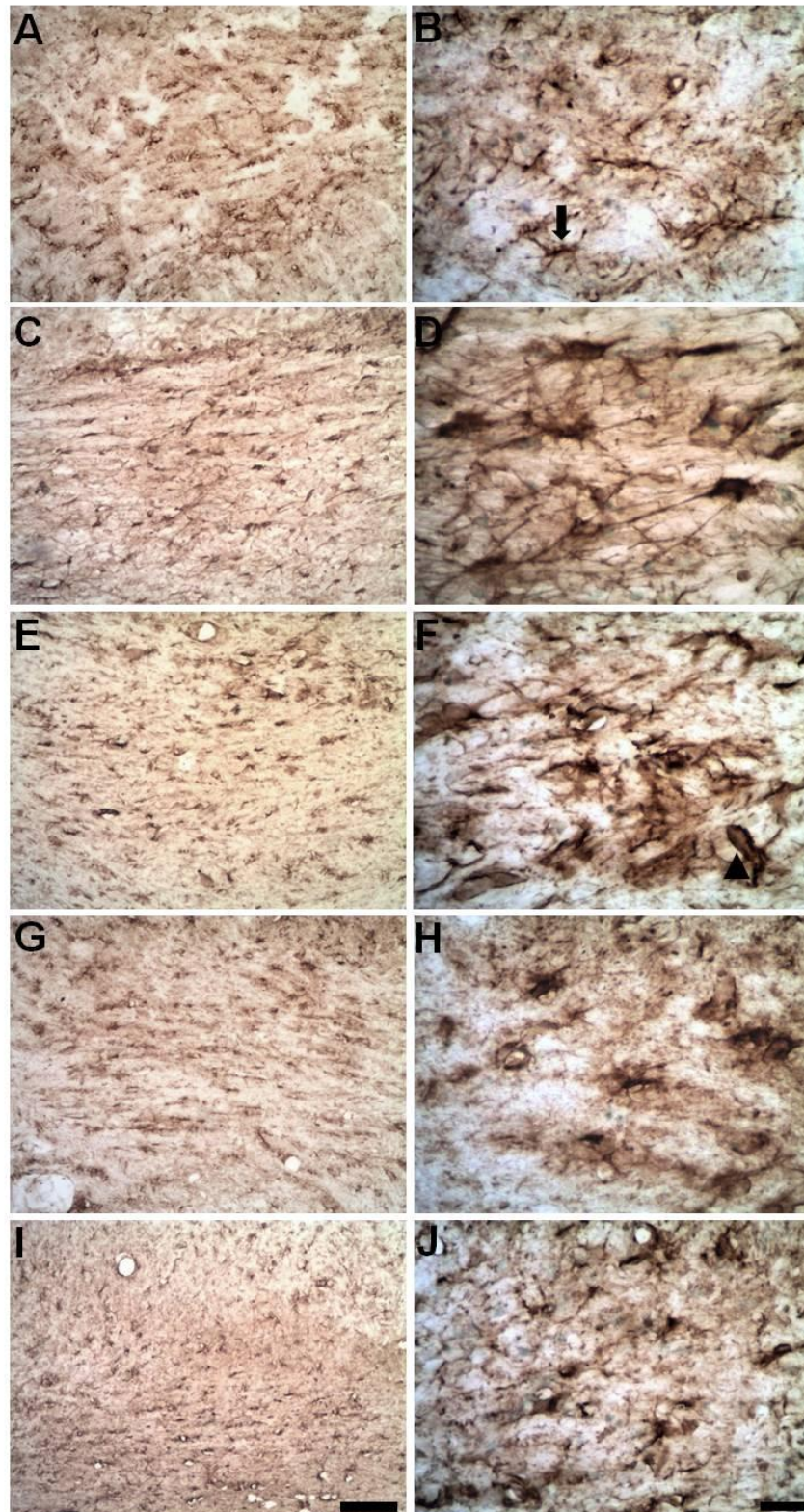
**Figura 5** – Prancha com micrografias do estriado isquêmico coradas com violeta de cresila. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. A, C, G, E, I: escala de 200 µm. B,D, F, H, E, J: escala de 100 µm.

### 3.2. MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ASTROCITOSE PROGRESSIVA NO ESTRIADO E CORPO CALOSO

A reação/ativação astrocitária foi analisada pela imunohistoquímica para GFAP, um marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004). No grupo controle, não houve mudanças na morfologia astrocítica, revelando um padrão morfológico ramificado e corpo celular com parâmetros morfométricos normais, em ambas áreas estudadas (Figura 6A-B e 7A-B). A análise qualitativa nos animais isquêmicos sugere um aumento progressivo da densidade e volume celular até o 14º dia, com diminuição do tamanho e número de células ao 30º dia pós-indução isquêmica, tanto no estriado (Figura 6C-J), como no corpo caloso (Figura 7C-J).



**Figura 6** - Prancha com micrografias de imunohistoquímica para GFAP no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas em B,J apontando astrócitos com morfologia normal e cabeças de seta em F,H apontando astrócitos hipertróficos. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu$ m. B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu$ m.

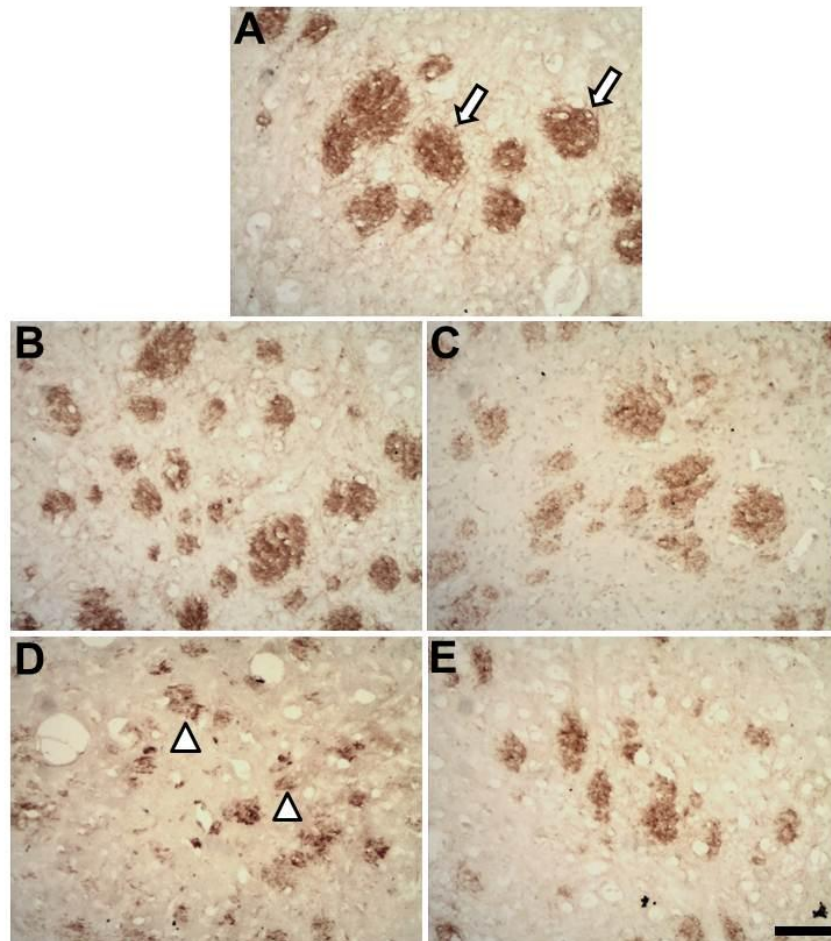


**Figura 7** - Prancha com micrografias de imunistoquímica para GFAP no corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Seta em B apontando astrócito com morfologia normal e cabeça de seta em F apontando astrócito hipertrófico. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .

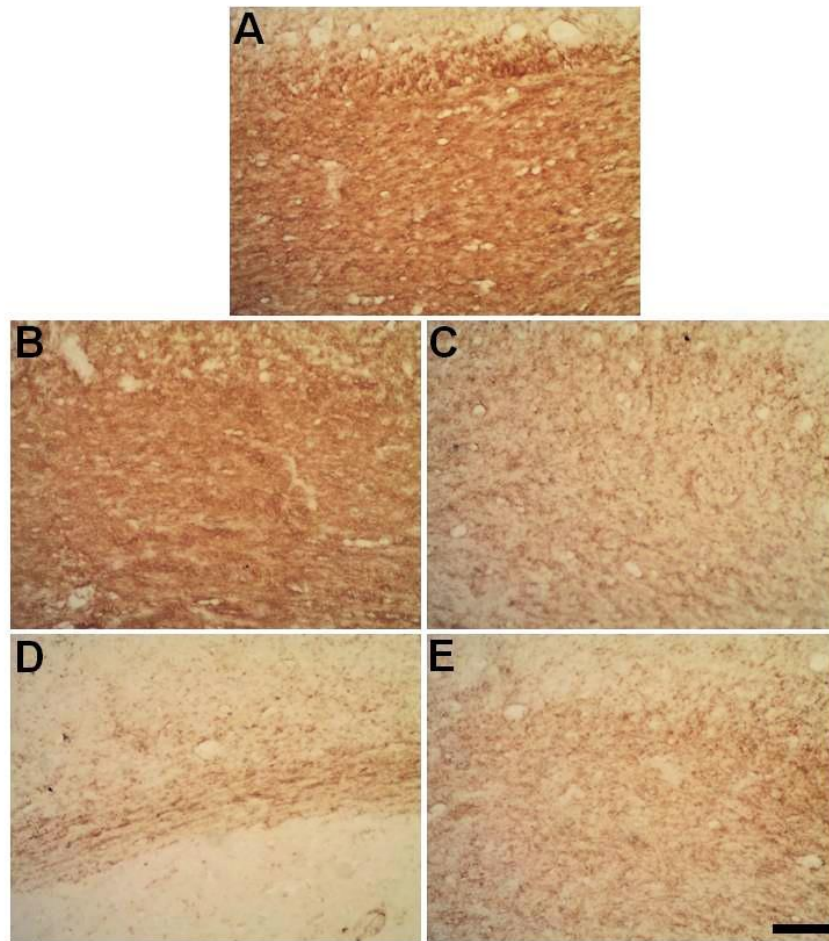


### 3.3 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ENDOTELINA-1 INDUZEM PERDA PROGRESSIVA DA REATIVIDADE PARA PROTEINA BÁSICA DE MIELINA

A imunomarcção da bainha de mielina foi realizada utilizando-se um anticorpo anti-MBP, um componente da mielina compacta (IRVING et al. 1997; GOMES-LEAL et al. 2005). A análise sugere diminuição progressiva da imunoreatividade para MBP, tanto no estriado (Figura 8B-E) quanto no corpo caloso (Figura 9B-E) dos animais isquêmicos quando comparados aos animais controles (Figuras 8A e 9A). Esta diminuição de imunorreatividade foi máxima entre 7 (Figuras 8C e 9C) e 14 dias (Figuras 8D e 9D) após a indução isquêmica, ocorrendo em menor intensidade ao trigésimo dia (Figuras 8E e 9E) .



**Figura 8** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para MBP em tratos de substância branca no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (B), 7 (C), 14 (D) e 30 dias (E) após a indução isquêmica. Setas em A apontando tratos de substância branca estriatais seccionados transversalmente com alta reatividade para Anti-MBP. Cabeça de seta em D apontando tratos de substância branca com descompactação de mielina (baixa reatividade para MBP). Escala de 100  $\mu$ m.

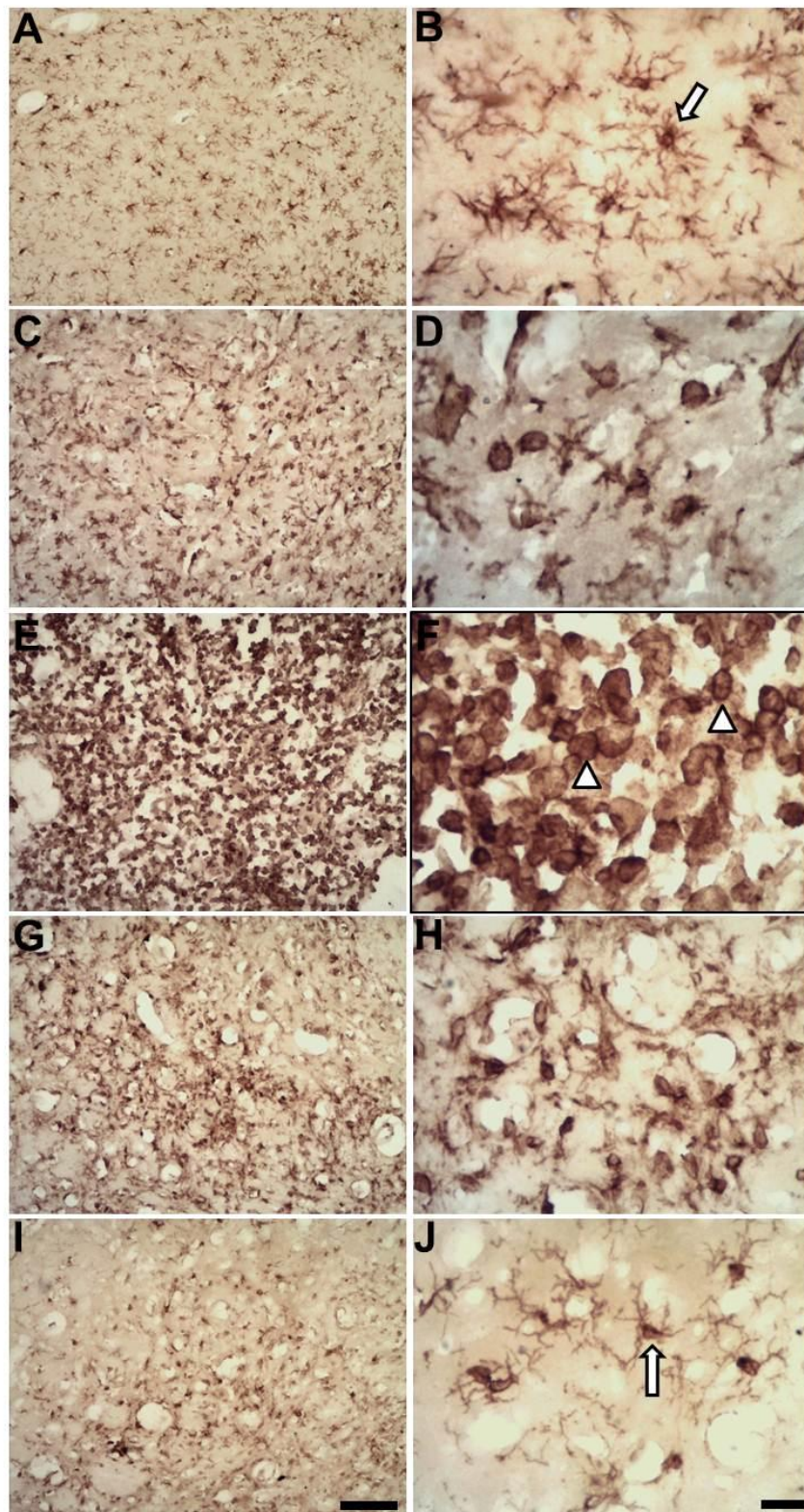


**Figura 9** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para MBP em tratos de substância branca do corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (B), 7 (C), 14 (D) e 30 dias (E) após a indução isquêmica. Escala de 100  $\mu\text{m}$ .

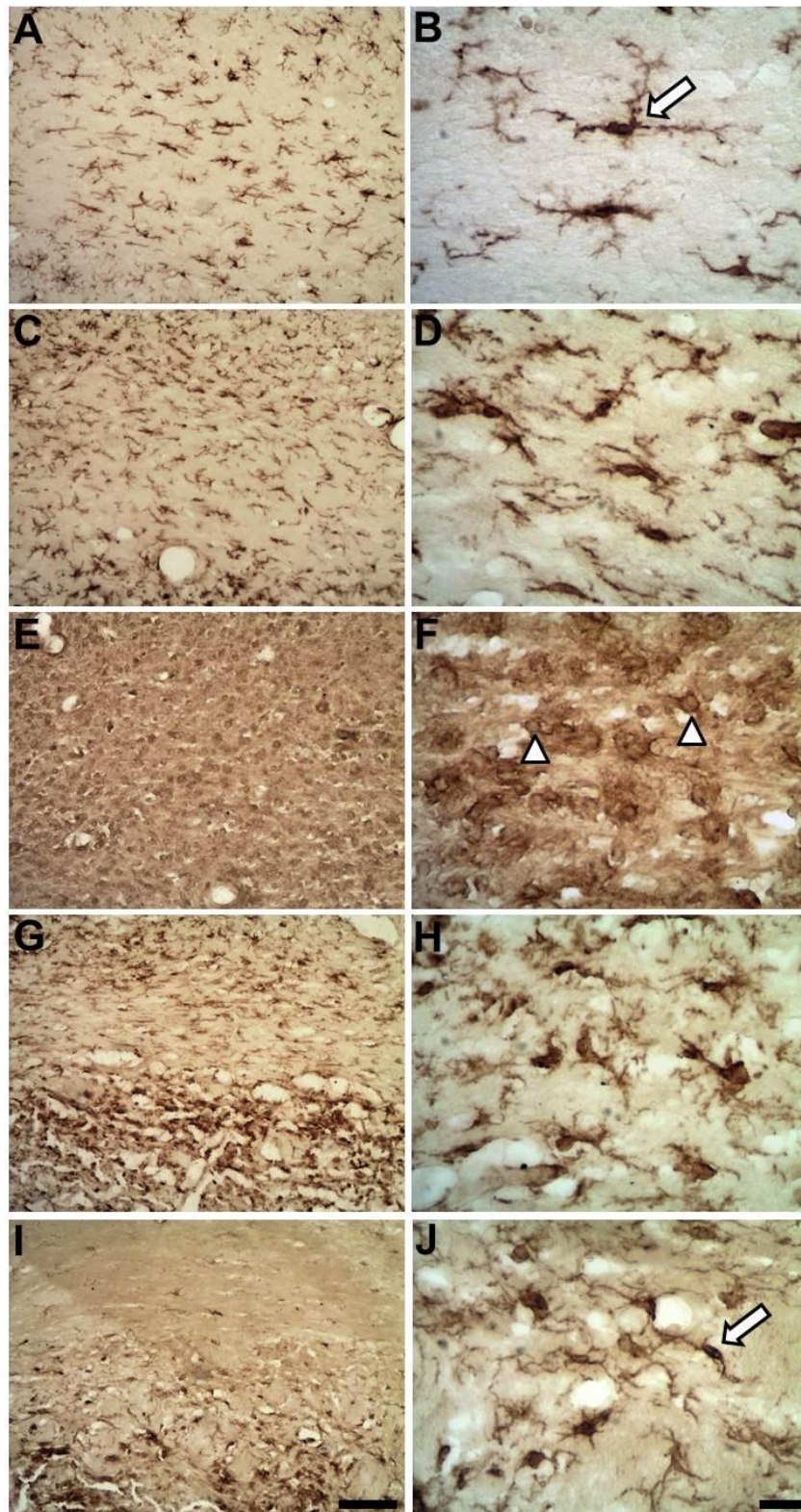
### 3.4 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ISQUEMIA FOCAL COM ATIVAÇÃO MICROGLIAL PROGRESSIVA

A análise da ativação microglial foi realizada através das imunohistoquímicas para Iba1 (ITO et al., 1998) e ED1 (DIJKSTRA et al., 1985). Considerou-se o padrão morfológico, o qual variou do ramificado (microglia não-ativada), amebóide (microglia ativada, tanto residente quanto a proveniente do compartimento vascular) e macrófagica (fagocítica, residente e também a derivada de monócitos do compartimento vascular). Nos animais controle, observou-se predominância do padrão ramificado, tanto no estriado (Figura 10A-B), como no corpo caloso (Figura 11A-B). Nos animais isquêmicos, houve ativação microglial progressiva (microgliose) entre 3 e 14 dias após a indução isquêmica (Figuras 10 e 11), com pico em torno de 7 dias pós-isquemia (Figuras 10 e 11).

O padrão morfológico variou de acordo com o período avaliado. Ao 3º dia, houve claro aumento do número de células Iba1+, com surgimento de microglia do tipo amebóide (Figuras 10C-D e 11C-D). Ao 7º dia, observou-se uma total predominância dos tipos amebóide e fagocítico (células arredondadas) (Figuras 10E-F e 11E-F). A partir do 14º dia, observou-se um retorno gradual de células Iba1+ ao padrão ramificado (Figuras 10G-J e 11G-J). Estas alterações microgliais foram mais conspícuas na região de lesão isquêmica estriatal (Figura 10).



**Figura 10** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Iba1 no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas em B,J apontando micróglia ramificada e cabeças de seta em F apontando micróglia com morfologia fagocítica. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu$ m. B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu$ m.

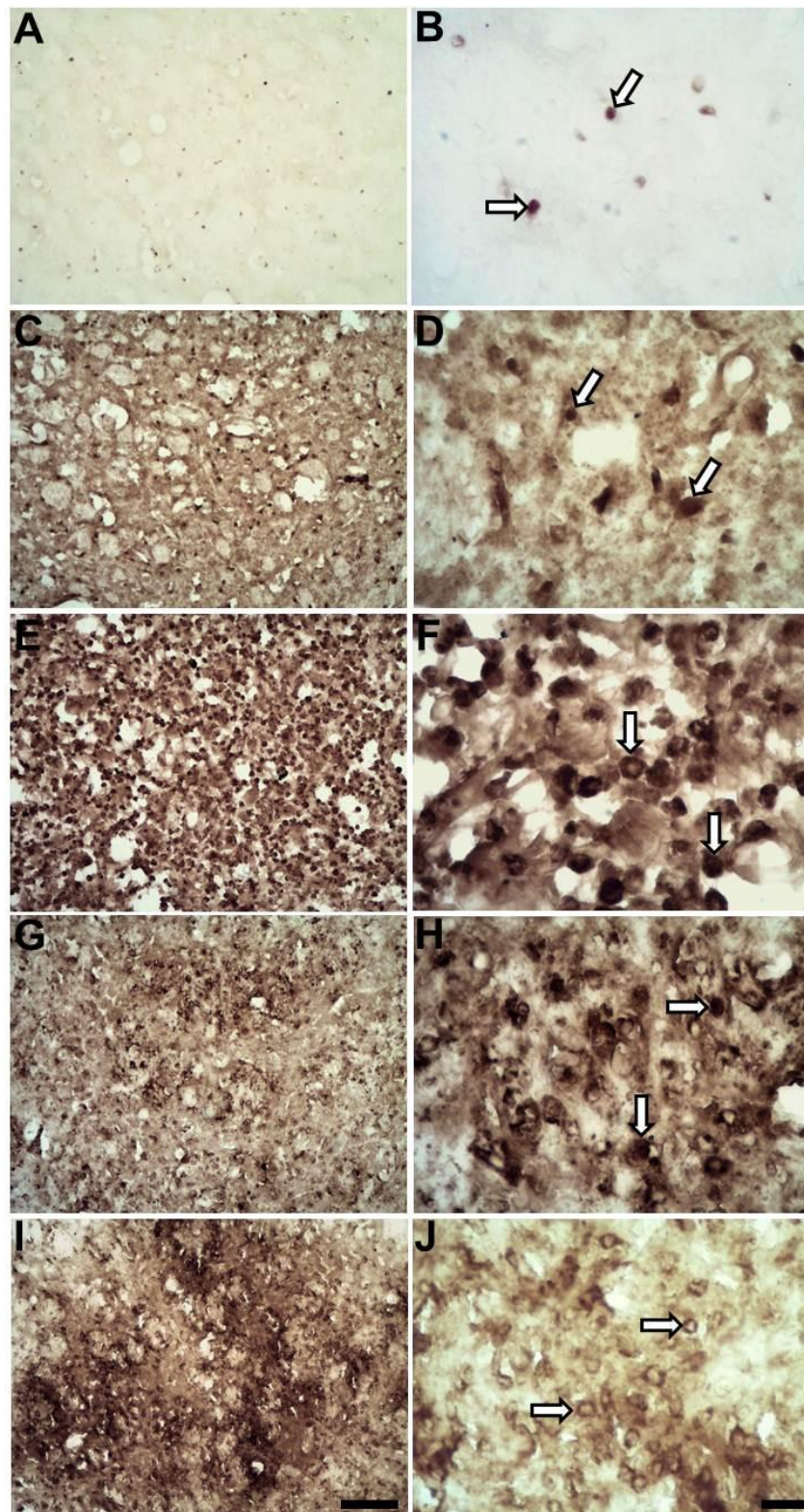


**Figura11** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Iba1 no corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas em B, J apontando micróglia ramificada e cabeças de seta em F apontando micróglia com morfologia fagocítica A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .

Como especificado, a análise da ativação microglial também utilizou o anticorpo ED1 que marca macrófagos ativados derivados da micróglia residente e de monócitos sanguíneos (DIJKSTRA et al., 1985).

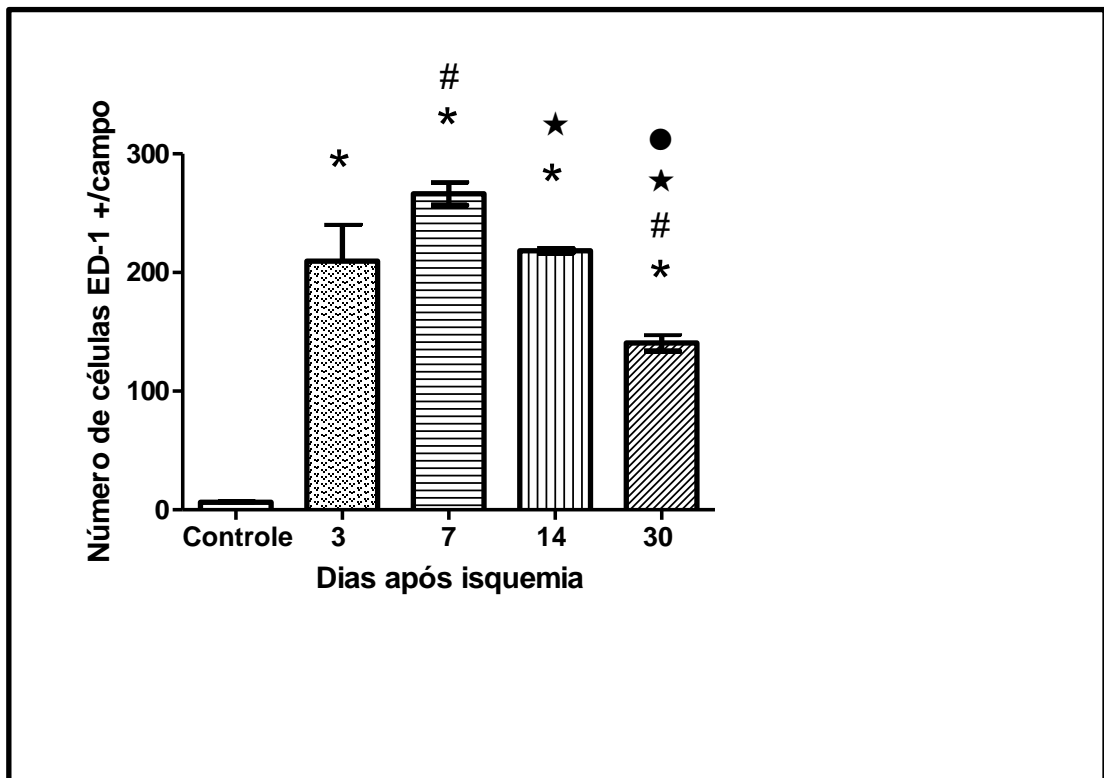
Na análise qualitativa comparativa entre os grupos estudados, houve um aumento intenso da expressão de células ED1+ no parênquima estriatal isquêmico entre 3 e 7 dias após a indução isquêmica (Figura 12C-E). Este aumento da expressão foi gradual, com pico em torno do sétimo dia, mas permanecendo elevado em 14 dias e diminuindo no tempo de sobrevivência de 30 dias. Estes resultados foram confirmados por análise quantitativa do número de células ED1+ (Gráfico 1). O número de células ED1+/campo foi de  $(6,44 \pm 0,29)$  no estriado de animais controle (Gráfico1). A indução da lesão isquêmica induziu um aumento do número de células ED1+ a partir do 3º dia ( $209,65 \pm 13,89$ ), com pico entre 7 ( $266,40 \pm 9,81$ ) e 14 dias ( $218,40 \pm 1,69$ ) após a indução isquêmica. Houve uma diminuição do número de células ED1+/campo ao 30º dia ( $140,66 \pm 7,14$ ), mas este número continuou elevado em relação aos animais controle.

No corpo caloso dos animais controle não foram encontradas células ED1+/campo ( $0 \pm 0$ ) (Figura 13A-B e Gráfico 2). A indução da lesão isquêmica aumentou o número de células ED1+/campo ao 3º dia ( $0,20 \pm 0,20$ ) (Figuras 13 e Gráfico 2), com pico ao 7º dia ( $1,06 \pm 0,36$ ). Houve uma ligeira redução ao 14º ( $0,60 \pm 0,24$ ) e uma grande diminuição do número de células ED1+ ao 30º dia ( $0 \pm 0$ ) (Figuras 13 e Gráfico 2). Estes resultados foram estatisticamente diferentes em relação aos animais controle e entre os tempos de sobrevivência investigados (Gráfico 2).

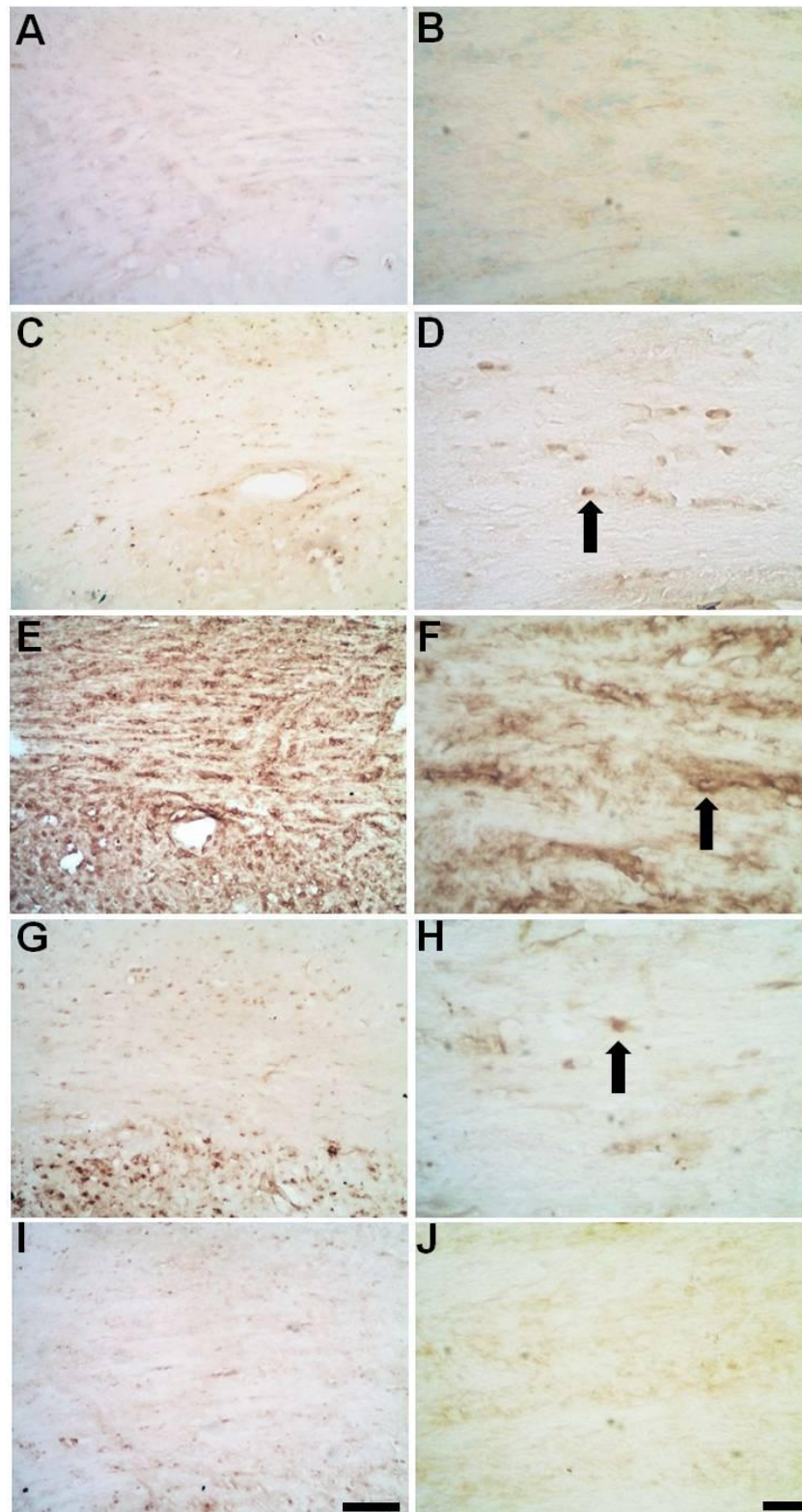


**Figura 12** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para ED1 no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células ED-1 positivas. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .

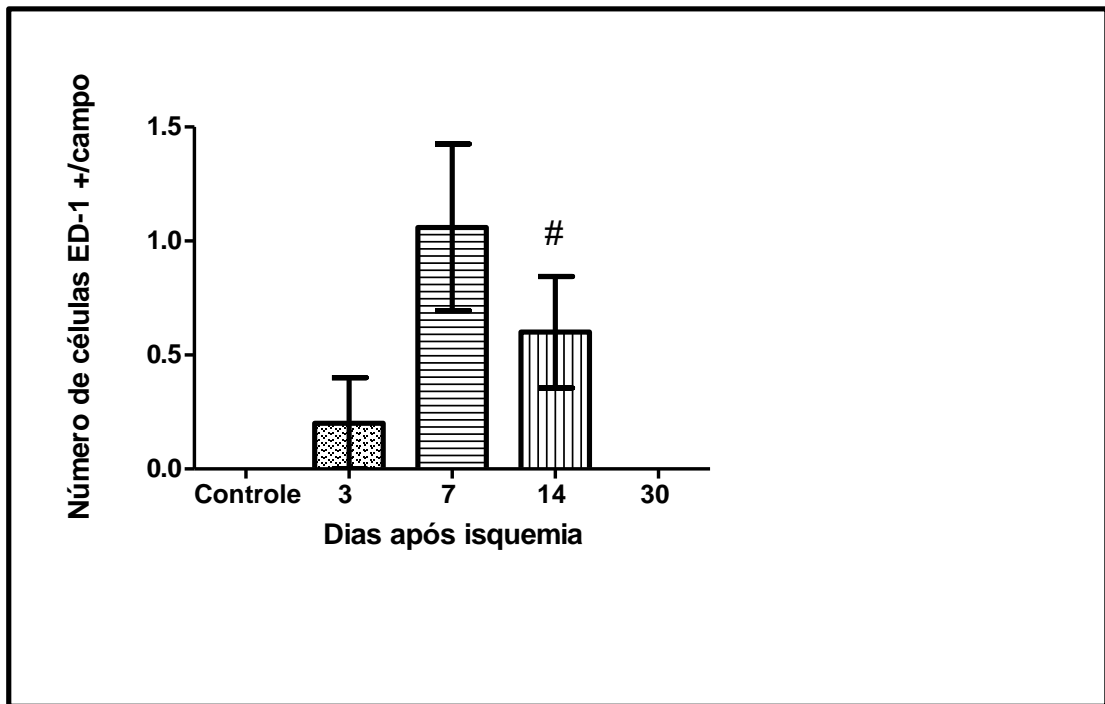




**Gráfico 1** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células ED1+ no estriado isquêmico. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias, (●) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 14 dias.



**Figura 13** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para ED1 no corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células ED-1 positivas. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$

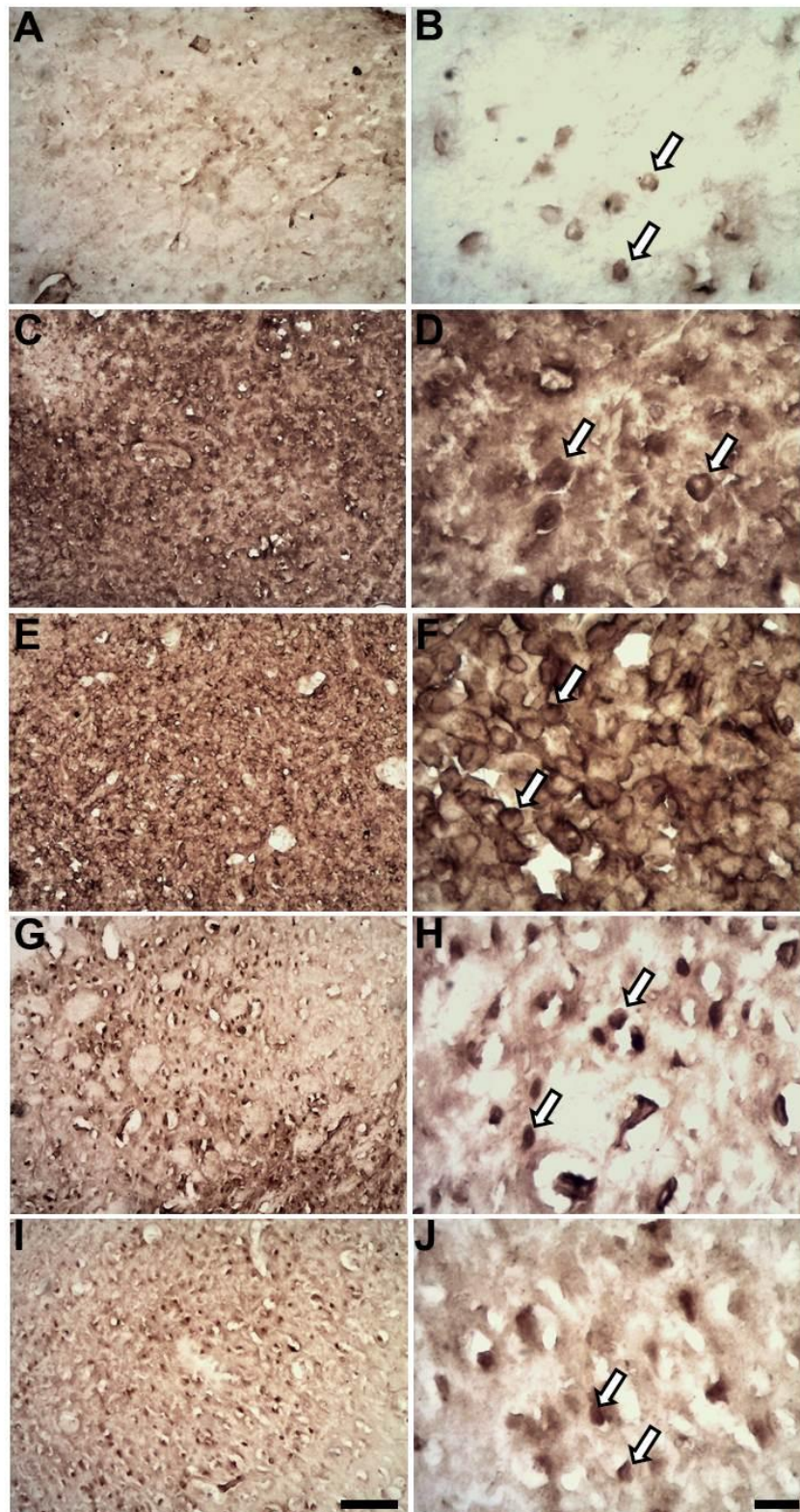


**Gráfico 2**– Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células ED1+ no corpo caloso ipsilateral. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias.

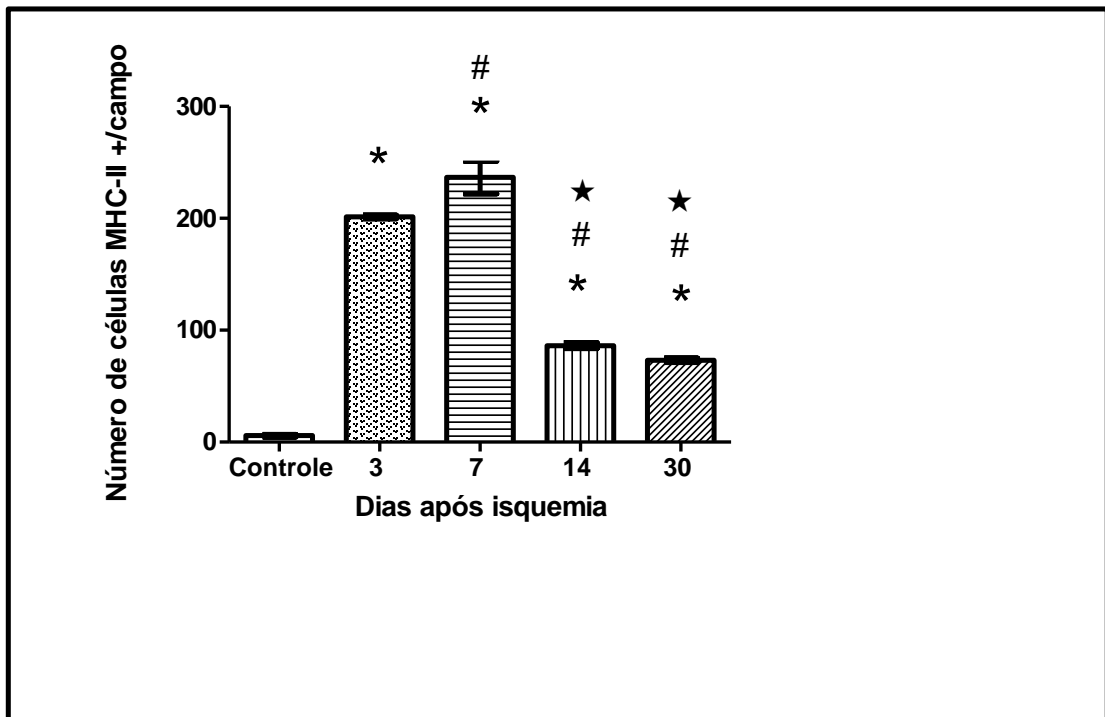
### 3.5 AS CÉLULAS MICROGLIAIS EXPRESSAM PROGRESSIVAMENTE MHC CLASSE II APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

A expressão de MHC classe II nas células microgliais foi avaliada no grupo controle e entre 3 e 30 dias após isquemia, tanto no estriado como no corpo caloso (Figuras 14 e 15). No grupo isquêmico houve um aumento progressivo entre 3 e 7 dias do número de células MHC-II+ no estriado. Este número foi reduzido ao 14º dia com redução posterior ao 30º (Figura 14). Estes resultados foram confirmados por análise quantitativa (Gráfico 3). Houve aumento gradual do número de células MHC-II + no estriado dos animais isquêmicos, do 3º (201,26 ±1,54) ao 7º dia (236,57 ±14,58), com uma diminuição abrupta do 7º para o 14º dia (86,20 ±2,69), mantendo níveis próximos ao 30º dia (73,20 ±1,98). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos pós-isquemia quando comparados aos animais controles (Gráfico 3). Não se encontrou diferença estatística entre 14º e 30º dia.

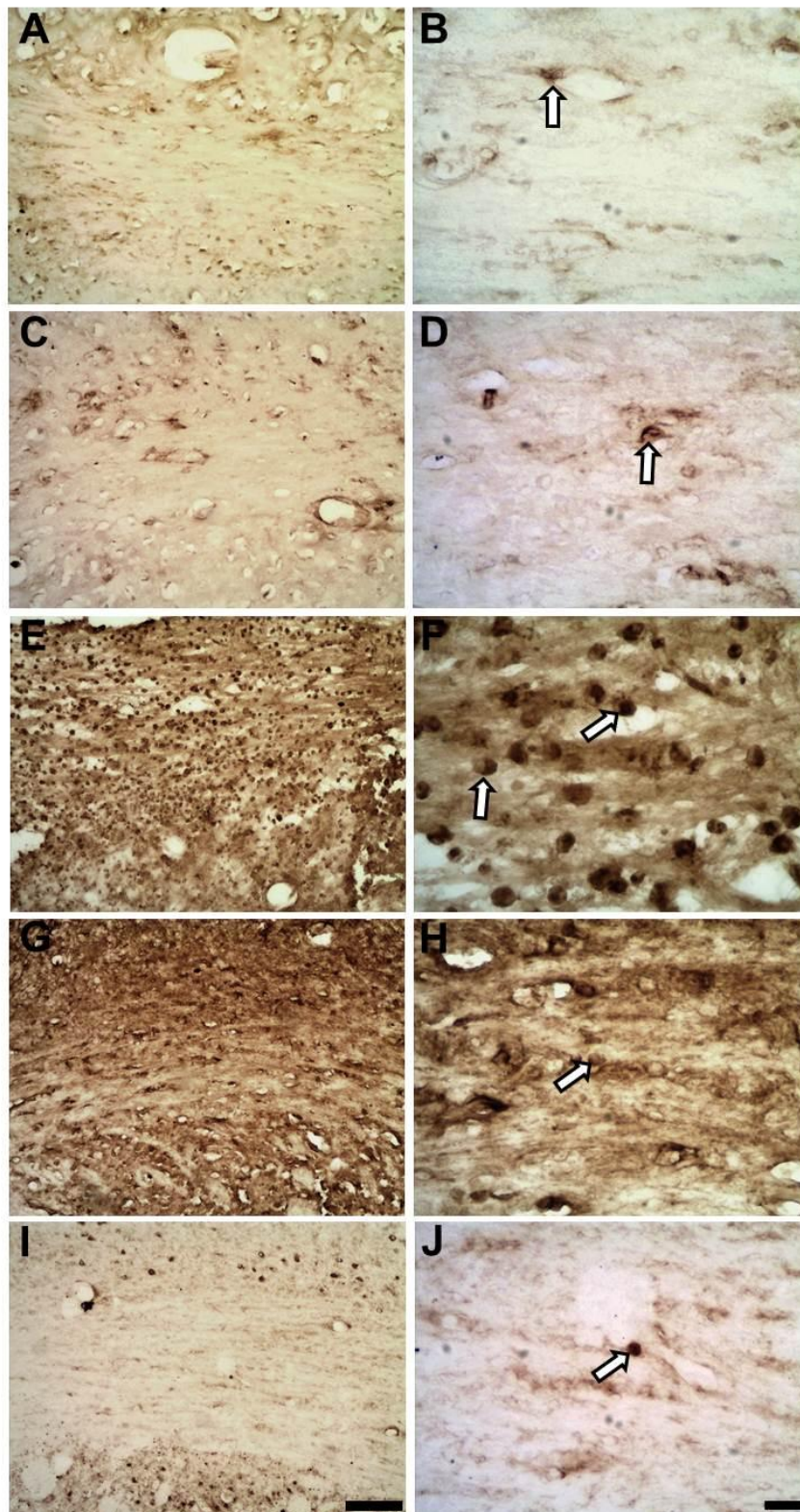
No corpo caloso, o número de células MHC-II + foi menor quando comparado ao estriado, porém também tendo sido encontrado um pico ao 7º dia (5,40 ±1,12), com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao 3º dia (1,80±0,80). Também foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação ao sétimo dia ao se comparar a redução encontrada ao 30º dia (0,73±0,30). No grupo controle foi encontrada (1,55 ±0,79) e ao 14ºdia (1,99±0,84) (Figuras 15 e Gráfico 4).



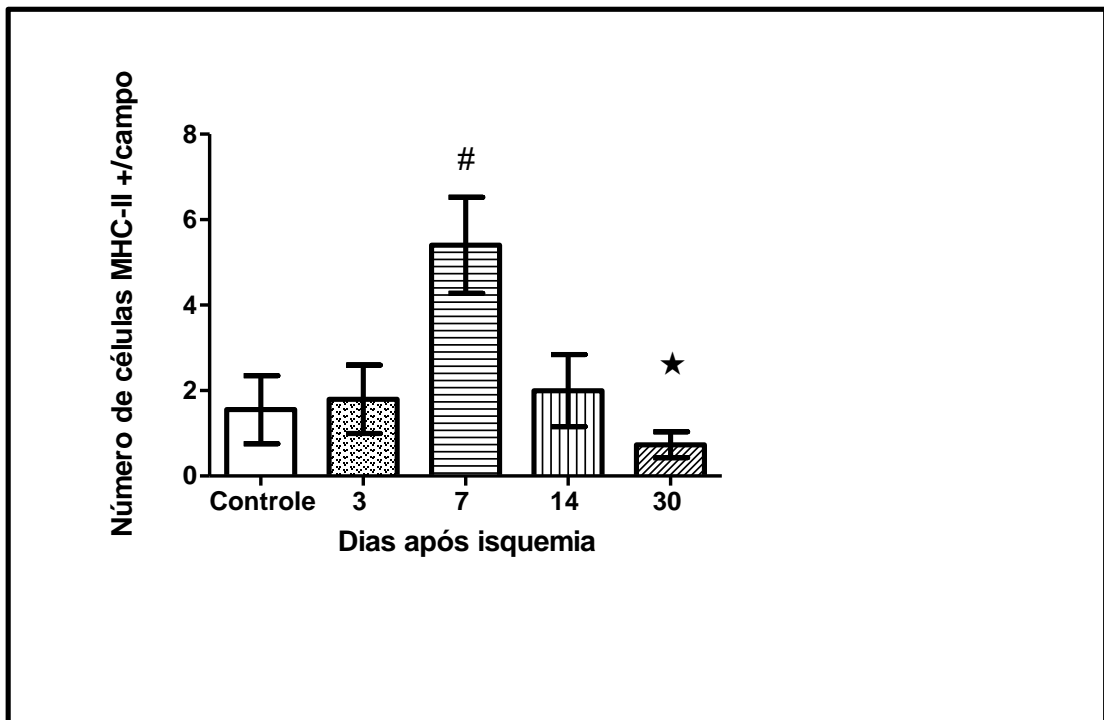
**Figura 14** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para MHC-II no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células MHC-II +. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .



**Gráfico 3** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células MHC-II+ no estriado isquêmico. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias.



**Figura 15** - Prancha com micrografias de imunistoquímica para MHC-II no corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células MHC-II +. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu$ m. B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu$ m.



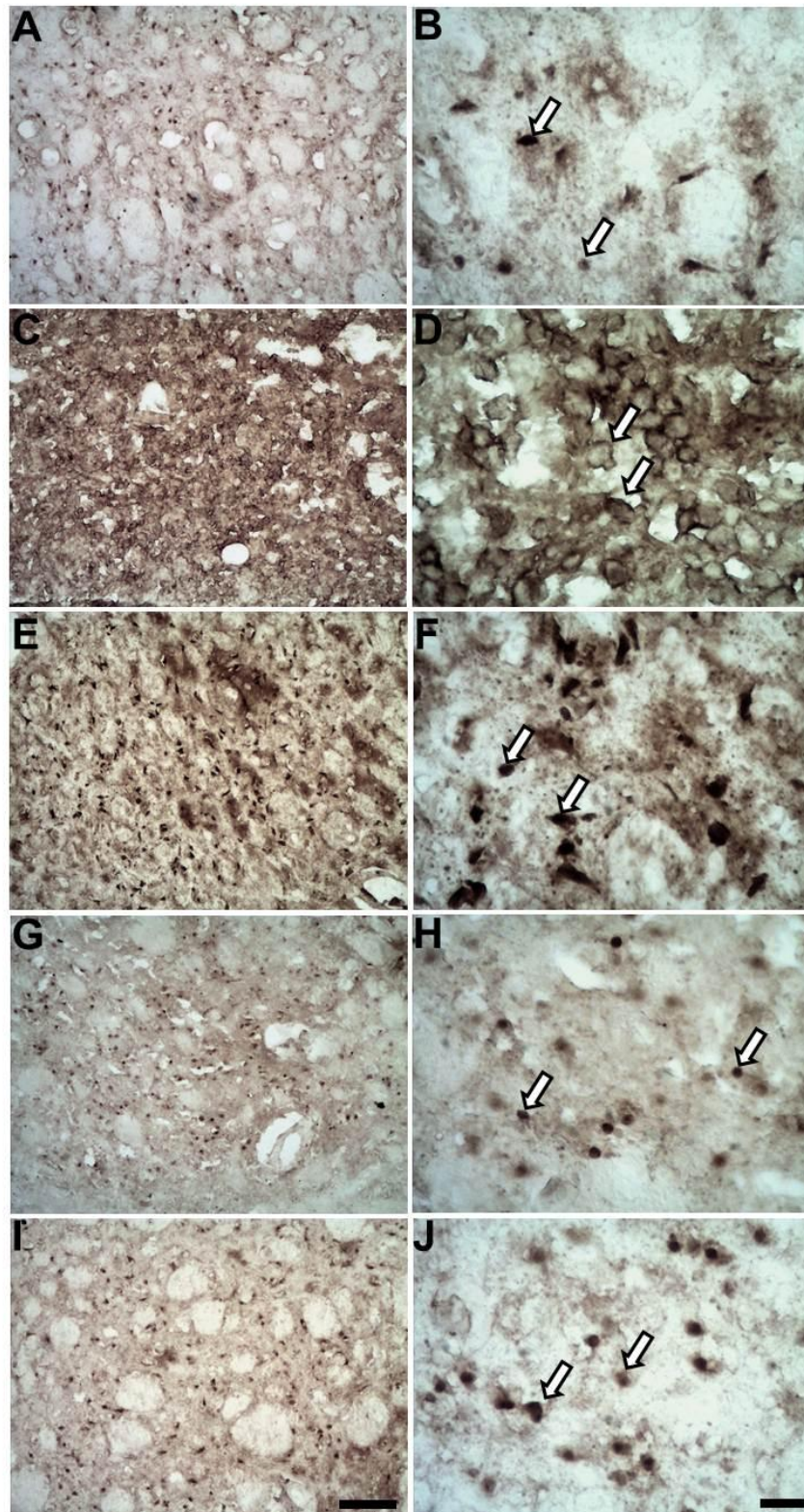
**Gráfico 4** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células MHC-II+ no corpo caloso ipsilateral. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias.



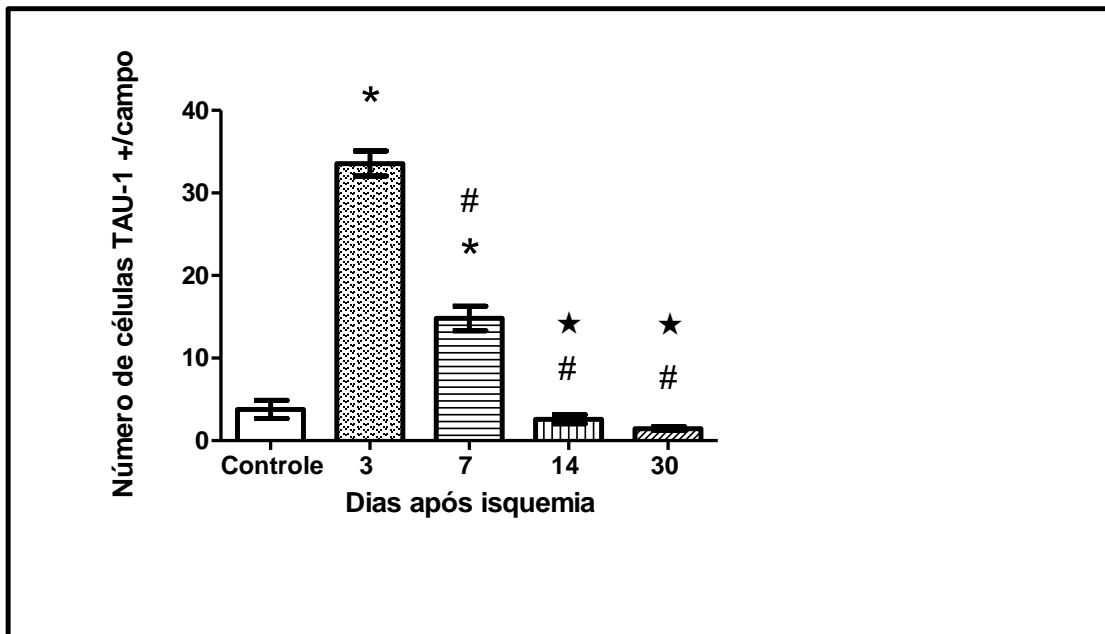
### 3.6. AUMENTO DO NÚMERO DE OLIGODENDRÓCITOS PATOLÓGICOS (TAU-1+) TANTO NO ESTRIADO COMO NO CORPO CALOSO APÓS ISQUEMIA INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

A imunistoquímica para TAU-1 revelou um aumento progressivo na expressão desta proteína no estriado de animais isquêmicos ao 3º dia ( $33,56 \pm 1,51$ ) (Figura 16 C-D). Houve uma diminuição significativa até o 7º dia ( $14,80 \pm 1,49$ ) (Figura 16 E-F). Não foi encontrada diferença entre os animais controles e os animais isquêmicos de 14 ( $2,59 \pm 0,55$ ) (Figura 16 G-H) e 30 ( $1,46 \pm 0,22$ ) dias (Figura 16 I-J) (Gráfico 5).

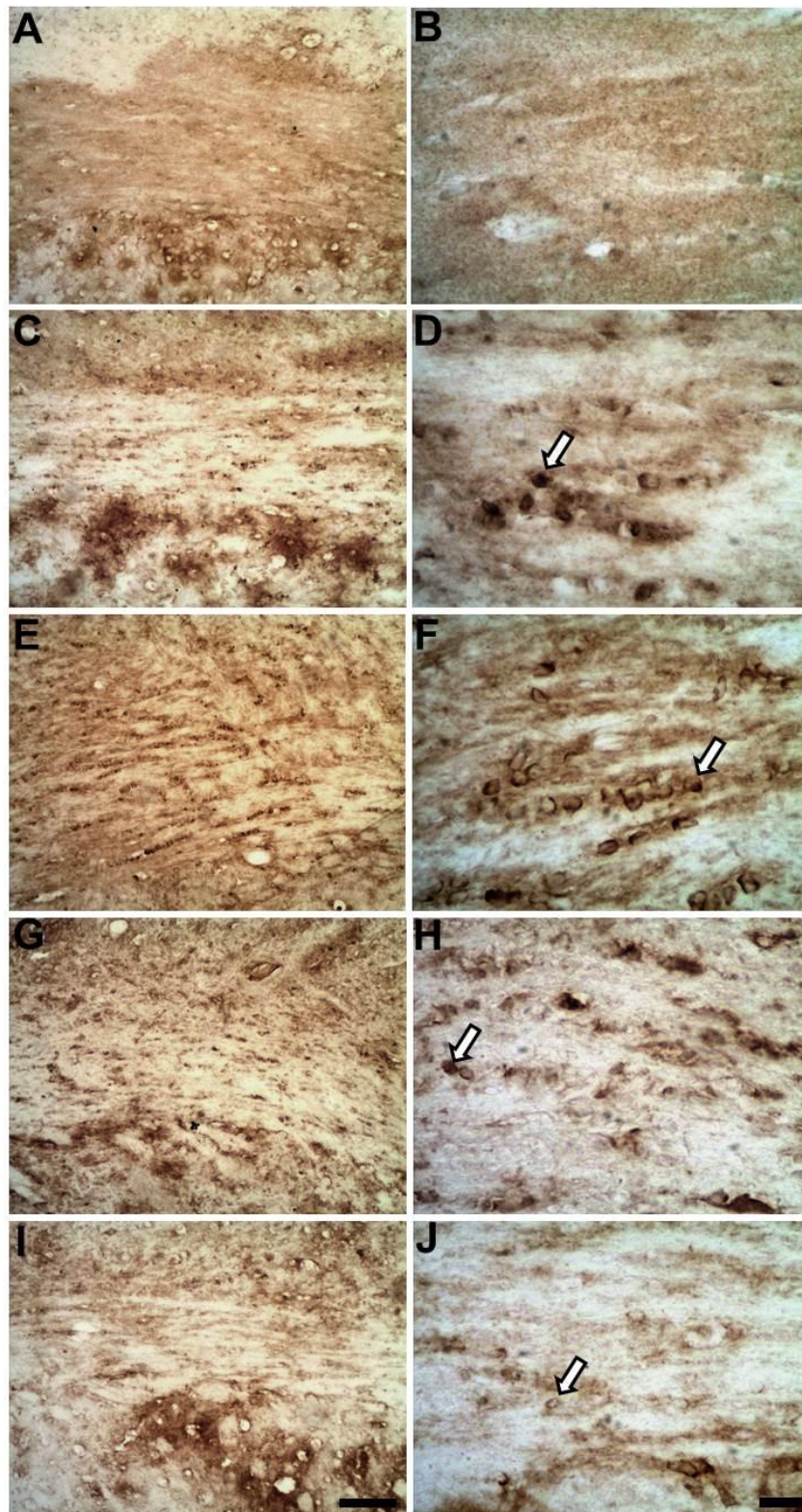
No corpo caloso, o pico de células TAU-1 + ocorreu ao 7º dia ( $8,06 \pm 1,21$ ), com diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle ( $0 \pm 0$ ) assim quando comparado aos demais grupos isquêmicos, sendo encontrado ao 3º dia ( $3,20 \pm 0,80$ ), ao 14º ( $1,80 \pm 0,48$ ) e ao 30º dia ( $1,53 \pm 0,37$ ). Não foi encontrada diferença entre os demais grupos quando comparados entre si. Ver figura 17 e Gráfico 6.



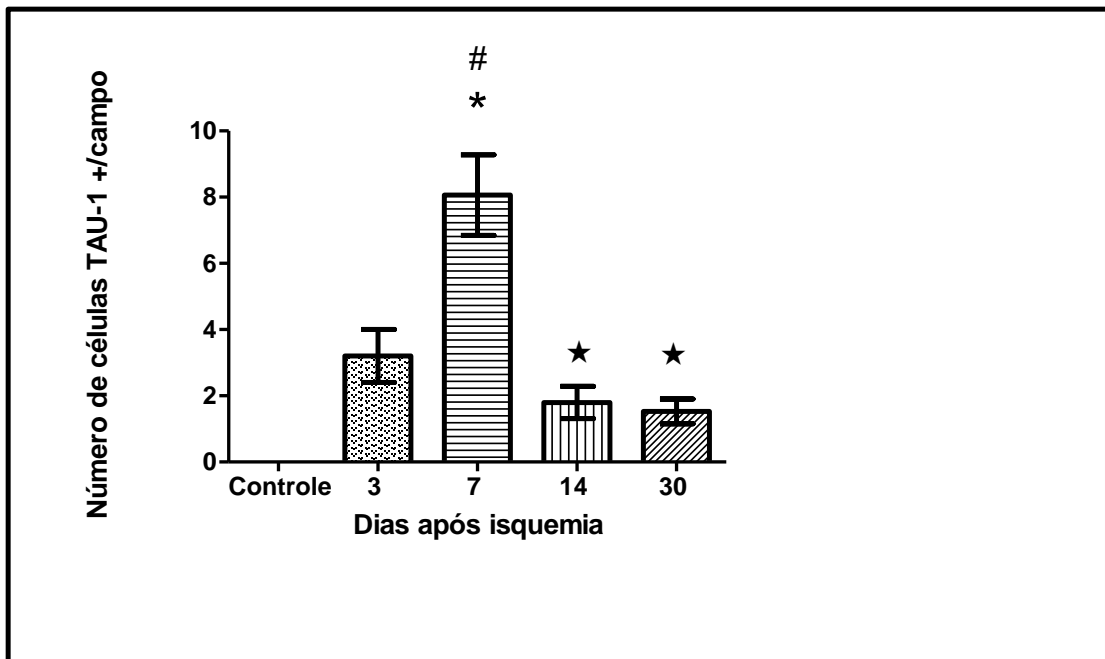
**Figura 16** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Tau-1 no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células Tau-1+. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .



**Gráfico 5** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Tau-1+ no estriado isquêmico. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias.



**Figura 17**– Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Tau-1 no corpo caloso. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células TAU-1+. A, C, E, G, I: escala de 100 µm. B, D, F, H, J: escala de 20 µm.

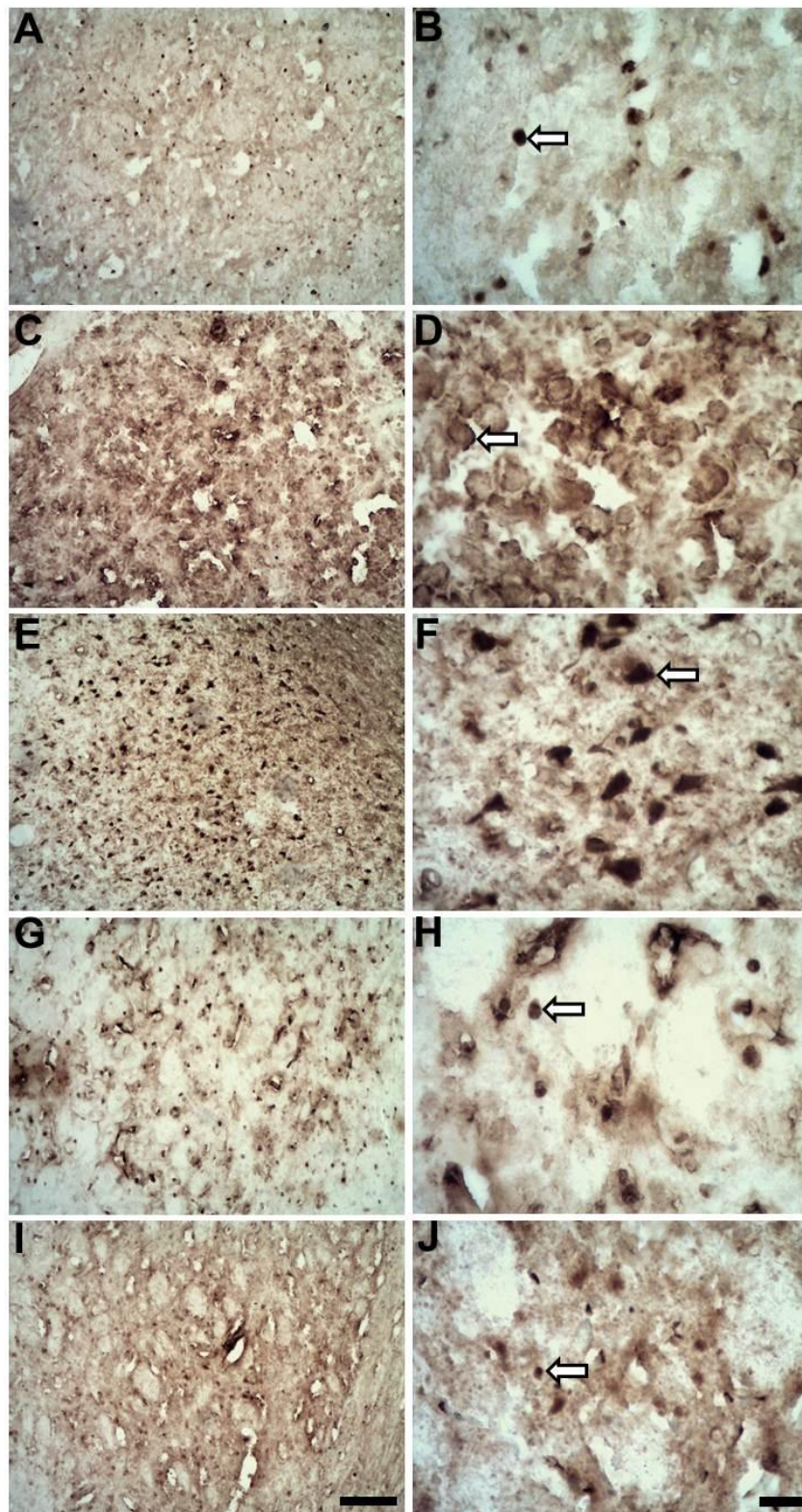


**Gráfico 6** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Tau-1 + no corpo caloso ipsilateral. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias.

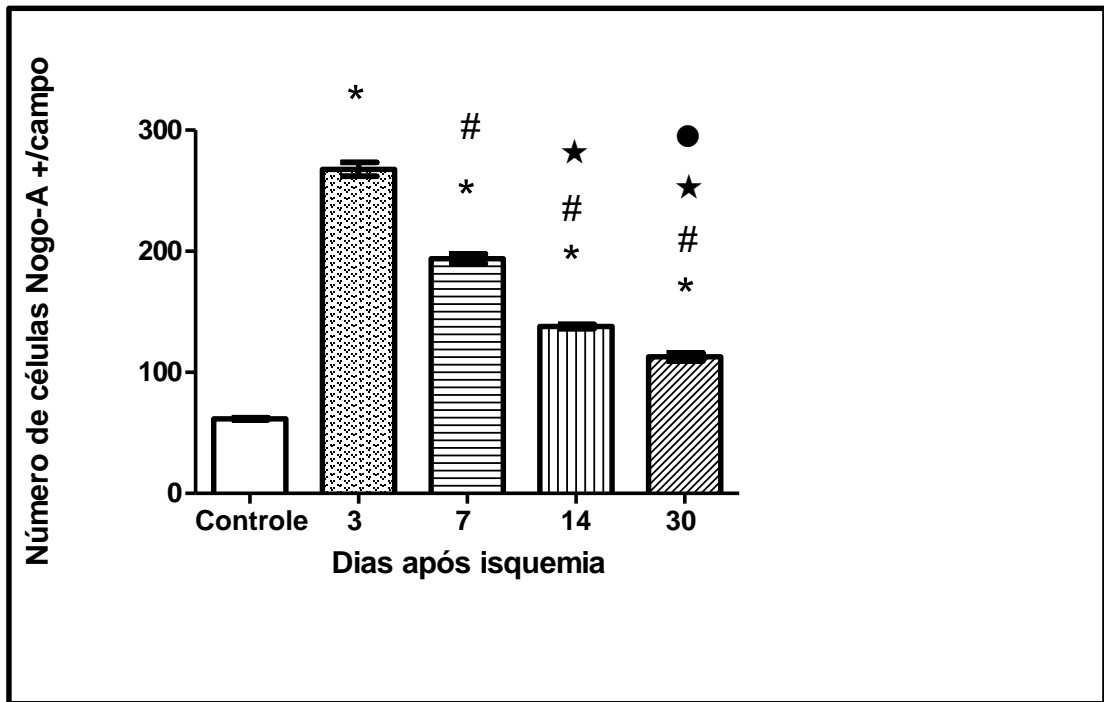
### 3.7. A LESÃO ISQUÊMICA INDUZIDA POR ENDOTELINA-1 INDUZ AUMENTO PROGRESSIVO DA EXPRESSÃO DE NOGO-A TANTO NO ESTRIADO COMO NO CORPO CALOSO

O Anti-Nogo-A no estriado revelou um aumento da expressão de células Nogo-A + no estriado de animais isquêmicos ao 3º dia ( $267,59 \pm 5,69$ ) (Figura 18 C-D e Gráfico 7). Houve uma diminuição progressiva até o 30º dia ( $112,79 \pm 3,39$ ) (Figura 18 I-J e Gráfico 7) com diferença estatisticamente significativa entre os tempos pós-isquemia. Todos os grupos isquêmicos apresentaram diferença estatística quando comparado aos animais controle.

No corpo caloso, todos os grupos isquêmicos apresentaram aumento da expressão de células Nogo-A + quando comparados ao grupo controle ( $3,77 \pm 0,22$ ) (Figura 19 A-B e Gráfico 8). A quantidade de células Nogo-A + sofreu variações entre o 3º ( $22,26 \pm 2,58$ ) e 14º dias ( $27,26 \pm 1,63$ ), porém sem significância estatística. Foi encontrada uma redução dessas células no 30º dia ( $15,53 \pm 0,79$ ) (Gráfico 8).

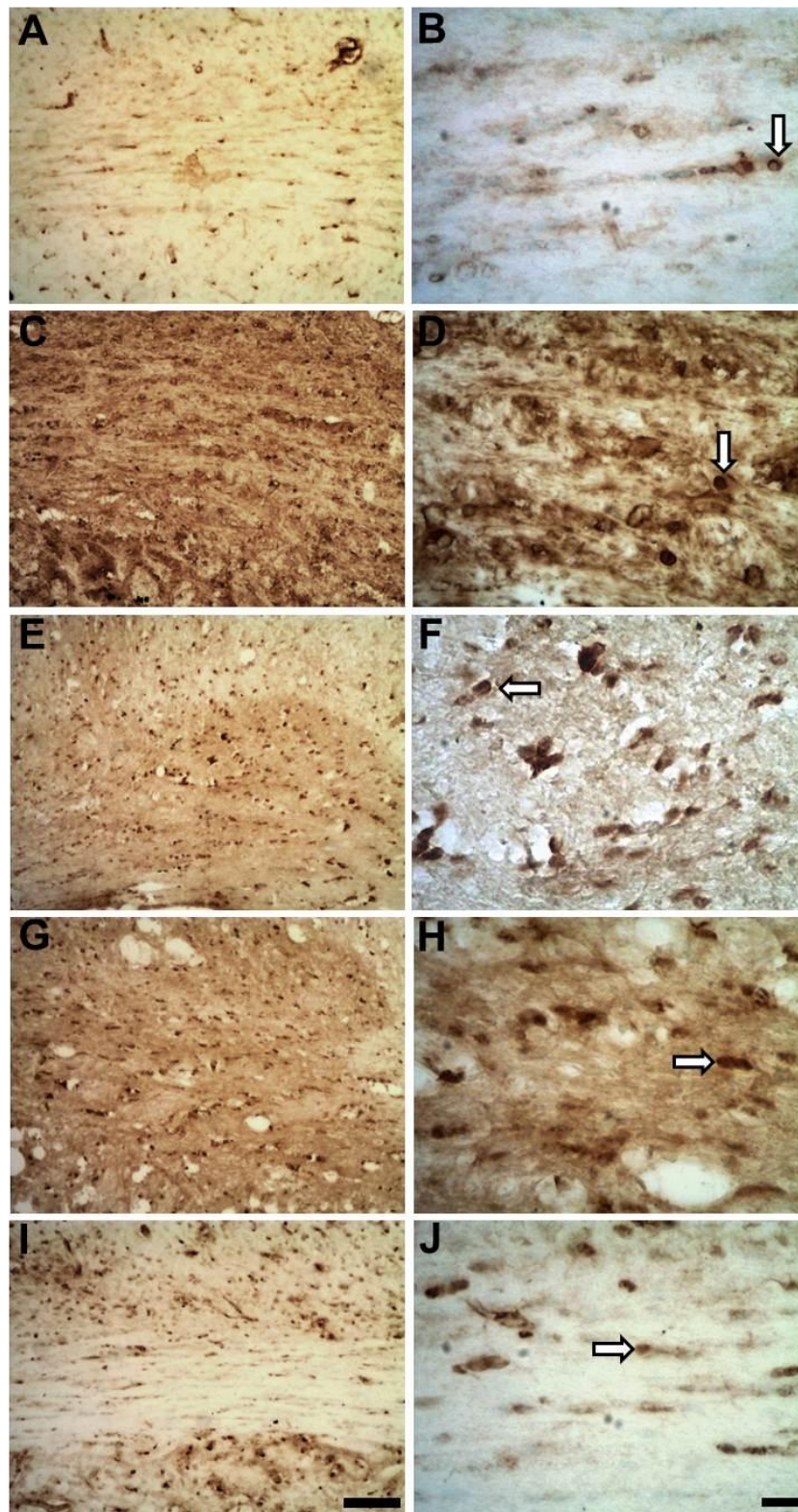


**Figura 18** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Nogo-A no estriado isquêmico. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células Nogo-A+. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu\text{m}$ . B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu\text{m}$ .

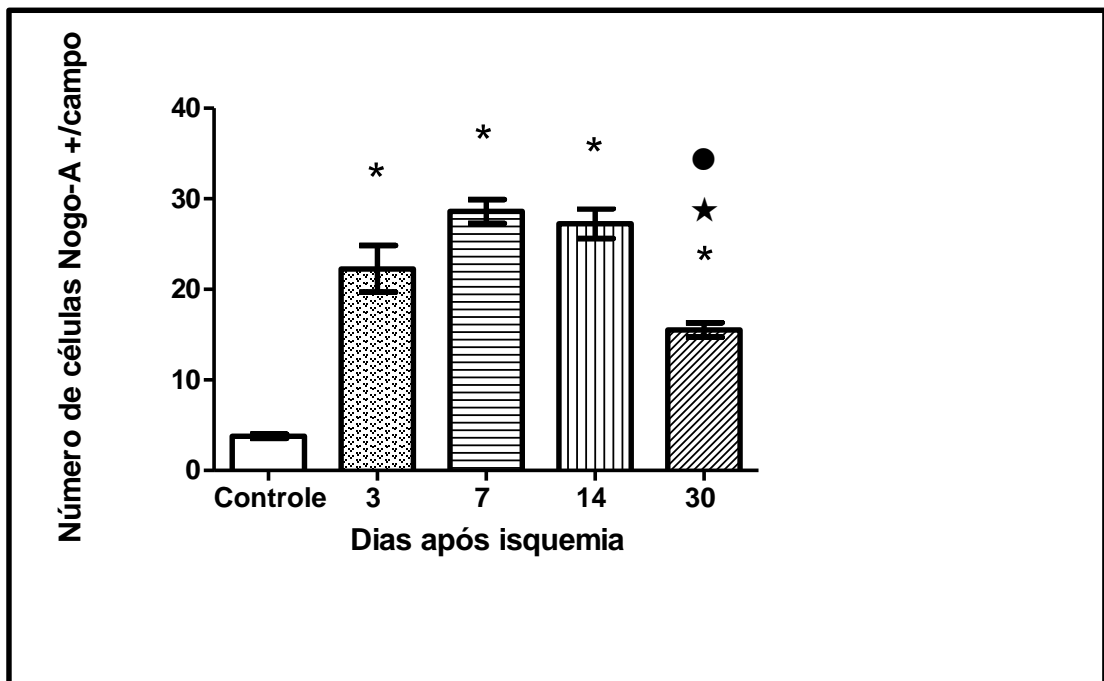


**Gráfico 7** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Nogo-A+ no estriado isquêmico. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (#) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 3 dias, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias, (●) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 14 dias.





**Figura 19** – Prancha com micrografias de imunohistoquímica para Nogo-A no corpo caloso ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-B) ou isquêmicos injetados com ET-1 em 3 (C-D), 7 (E-F), 14 (G-H) e 30 dias (I-J) após a indução isquêmica. Setas apontando células Nogo-A+. A, C, E, G, I: escala de 100  $\mu$ m. B, D, F, H, J: escala de 20  $\mu$ m.



**Gráfico 8** – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células Nogo-A+ no corpo caloso ipsilateral. Representação com média e erro padrão. Controle, 3, 7, 14 e 30 dias após a indução isquêmica, com  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle. (\*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (★) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 7 dias, (●) representando diferença estatística em comparação ao grupo de 14 dias.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

Nessa investigação, o modelo escolhido para indução isquêmica foi a injeção estereotáxica de Et-1. Sozmen et al. (2009) e Nikolov et al. (1993) afirmam que a ET-1 não age de maneira tóxica propriamente dita, porém produz uma vasoconstrição local e supressão do fluxo sanguíneo por até três horas no local da injeção (FUXE et al. 1992; HUGHES et al. 2003). A regulação do fluxo sanguíneo pela injeção de ET-1 tem sido usada para produzir diferentes tipos de agressões isquêmicas, como as realizadas por nosso grupo, em isquemias corticais e estriatais (FRANCO et al. 2012; SOUZA-RODRIGUES et al. 2008)

Outra metodologia muito difundida na indução de AVE em roedores é o modelo de oclusão da artéria cerebral média. Neste modelo, um delgado filamento é inserido na origem da artéria cerebral para ocluir o vaso e induzir isquemia. Embora com a remoção do filamento, geralmente após 1 hora, ocorra a reperfusão tecidual, os danos estabelecidos são severos e difusos, atingindo todo o neocortex parietal ipsilateral, assim como estriado dorsal e gânglios da base (NIESWANDT, 2011; KLEINSCHNITZ et al. 2007; PHAM et al. 2010).

Este modelo de oclusão da artéria cerebral média envolve a oclusão temporária ou permanente desta artéria e produz áreas grandes e bem definidas de infarto, no entanto, ele requer intervenção cirúrgica extensa para expor esta artéria e ocluir o vaso, que pode levar a complicações. Modelos de isquemia permanentes também são questionáveis em sua representação de acidente vascular cerebral humano, onde trombo desintegração é comum, e reperfusão muitas vezes ocorre depois de acidente vascular cerebral, como resultado de recanalização (MIDDLETON et al. 1995).

Entretanto, o modelo de oclusão da artéria cerebral média não se mostrou aplicável à esta investigação, visto que o enfoque era avaliar área de lesão primária e secundária, o que se tornou possível com a injeção de ET-1 no estriado dorsal, avaliando-se o corpo caloso como área secundária de lesão.

A injeção estereotáxica de ET1 próxima da artéria cerebral média tem se mostrado capaz de produzir uma redução profunda do fluxo de sangue que leva a lesão isquêmica cerebral no território vascularizado por essa artéria (ROBINSON et

al. 1990;. SHARKEY et al. 1993, 1994; SHARKEY E BUTCHER, 1995; MACRAE et al. 1993; MOYANOVA et al. 1998; BIERNASKIE et al. 2001; BOGAERT et al. 2000; CALLAWAY et al. 2000). No modelo aplicado nesta investigação o volume, concentração e coordenadas estereotáxicas adotadas permitiram a indução de uma isquemia focal restrita ao estriado, sem atingir regiões circundantes.

#### 4.2. ASTROCITOSE APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR ENDOTELINA-1

Nesta investigação foi encontrado aumento progressivo da reação astrocitária após lesão isquêmica, em especial a partir do 7º dia pós isquemia, sendo encontrado ao 14º dia astrócitos bem reativos e hipertróficos.

Os astrócitos são células gliais envolvidas na homeostasia do SNC. Estas funções não são apenas necessárias para o tecido nervoso em condições fisiológicas de trabalho, mas também em muitas condições patológicas, incluindo AVE. Os astrócitos podem contribuir com danos por propagação de depressão alastrante ou envio de sinais pro-apoptóticos (ANDERSON et al. 2010).

Os astrócitos também podem inibir a regeneração através da participação na formação da cicatriz glial. Por outro lado, os astrócitos são importantes liberadores de agentes antioxidantes de defesa e na secreção de fatores de crescimento, o que provavelmente fornece neuroproteção em fase aguda, bem como a promoção neurogênese e regeneração na fase crônica após a lesão (ANDERSON et al. 2010).

Em investigações sobre funções astrocíticas em meios de cultura, os astrócitos mostraram resposta à redução de oxigênio com uma regulação positiva de sua capacidade glicolítica, uma característica que possivelmente os torna mais resistentes à anóxia que os neurônios (MARRIF e JUURLINK, 1999). No entanto, após isquemia focal permanente, os sinais de morte astrocitária foram relatados antes dos neurônios apresentarem sinais de danos irreversíveis (GRACIA et al. 1993; LIU et al. 1999). Os resultados recentes demonstram que o metabolismo intermediário, tanto neuronal quanto astrocitário, são alterados de maneira semelhantemente em 30 minutos após isquemia focal (HABERG et al. 2001).

Nesta investigação não utilizamos parâmetros quantitativos que permitissem detectar uma diminuição da população de astrócitos, mas a análise qualitativa sugere um aumento de reatividade da imunoistoquímica para GFAP, além de características morfométricas que revelam um corpo celular maior e exibem

processos mais espessos e longos. Novos estudos em modelos de isquemia focal são necessários para esclarecer se a diminuição da reatividade e volume celular encontrado ao 30º dia nesta investigação está acompanhada de uma diminuição da população de astrócitos.

Funções de proteção dos astrócitos, como captação de glutamato, regulação de íons potássio, e eliminação de radicais livres podem se tornar comprometidas em condições isquêmicas. Após lesão, essas células gliais podem liberar seu conteúdo de glutamato contribuindo para a exacerbação do dano primário (GOMES-LEAL et al. 2004). Por outro lado, a ativação astrocitária descrita aqui (de 7 até 14 dias com pequena diminuição até o 30º dia) e também relatada em outros estudos, pode ser interpretada como uma reação benéfica à uma lesão tecidual (LI et al. 2005), embora astrocitose excessiva e a sua cicatriz glial venham a prejudicar a regeneração axonal em fases crônicas após desordens agudas (GALTREY e FAWCETT, 2007).

A turgescência astrocitária observada em algumas investigações é uma resposta rápida à isquemia, a qual pode induzir a uma liberação adicional de glutamato, redução do espaço extracelular alterações das concentrações iônicas, podendo gerar um quadro de excitotoxicidade (KIMELBERG, 2000; SYKOVA, 1997, 2001)

Astrócitos reativos produzem e liberam mediadores inflamatórios, tais como as citocinas e as quimiocinas, bem como vários fatores de crescimento (RIDET, 1997; LITTLE e O'CALLAGHA, 2005). Além dessa reatividade aumentada para proteína ácida fibrilar glial (GFAP, sítio de marcação de nossa investigação imunistoquímica em astrócitos), ocorre também uma regulação positiva de nestina e vimentina (CLARKE et al. 1994; HOLMIN et al. 1997). Curiosamente, vimentina e nestina são expressas durante o desenvolvimento e são geralmente pouco expressas quando as células amadurecem (PIXLEY e DE VELLIS, 1984; SANCHO-TELLO et al. 1995).

Além disso, os astrócitos reativos apresentam processos alongados em áreas circunvizinhas à isquemia. Tais achados sugerem que os astrócitos também respondem à lesão através da adoção de um fenótipo mais imaturo, podendo tais mudanças contribuir pelo menos em parte para recuperação da rede astrogliar (KAJIHARA et al. 2001).

#### 4.3. MICROGLIOSE APÓS LESÃO ISQUÊMICA FOCAL INDUZIDA POR INJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

Neste estudo, microinjeções estriatais de ET-1 induziram intensa ativação microglial entre 3 e 30 dias após a indução isquêmica. O pico de ativação ocorreu em torno de 7 dias, reduzindo posteriormente, mas mantendo-se elevado em relação aos animais controle, mesmo 30 dias após o início do processo isquêmico. Estes estudos são consistentes com relatos anteriores, utilizando o modelo da ET-1 (GRESLE et al. 2006; MOYANOVA et al. 2007; NIKOLOVA et al. 2009; SOUZA-RODRIGUES et al. 2008) ou outros modelos de isquemia focal, como a oclusão da artéria cerebral média com o método do filamento (MORIOKA et al. 1993; NIU et al. 2012; THORED et al. 2009).

Células microgliais são sensores sensíveis de alterações patológicas (KREUTZBERG, 1996). Estudos experimentais utilizando quimeras sugerem que a micróglia residente é a primeira população a responder ao processo lesivo, seguida de macrófagos hematogênicos (derivados da corrente sanguínea) (SCHILLING et al. 2005; SCHROETER et al. 1997). No estudo em questão, é possível que o pico inicial de ativação microglial esteja relacionado às ações da micróglia residente e ativação mais tardia de macrófagos hematogênicos (SCHILLING et al. 2005; SCHROETER et al. 1997).

No presente estudo, foi descrito o padrão morfológico de ativação microglial até 30 dias após o evento isquêmico, mas não foi avaliado o papel da micróglia ativada no modelo experimental em questão. As células microgliais apresentam um papel dúbio após desordens neurais agudas e podem contribuir para reparo tecidual ou mesmo exacerbar o processo lesivo (GOMES-LEAL, et al. 2012). Alguns estudos sugerem que a ativação microglial após isquemia contribui para reparo tecidual (LALANCETTE-HEBERT et al. 2007; NEUMANN et al. 2006; NEUMANN et al. 2008; THORED et al. 2009).

Em um modelo de hipóxia em cultura organotípica de hipocampo, o bloqueio microglial exacerba o processo lesivo, contribuindo para o aumento da percentagem de morte neuronal (NEUMANN et al. 2006). A utilização de microscopia de dois fótons mostrou interação direta entre micróglia e neurônios no referido estudo (NEUMANN et al. 2006). O mesmo grupo mostrou que as células microgliais fagocitam neutrófilos após isquemia, o que contribui para neuroproteção (NEUMANN et al. 2008). O bloqueio da fagocitose de neutrófilos por micróglia

exacerba o processo lesivo, o que aumenta a porcentagem de morte neuronal (NEUMANN et al. 2008). Neste estudo, a presença de neutrófilos no ambiente isquêmico claramente contribui para a perda de neurônios. Em outra investigação, a ablação genética da proliferação e ativação microglial contribui para o aumento da área de infarto isquêmico, exacerba o processo inflamatório e resulta em maior morte celular programada (LALANCETTE-HEBERT et al. 2007). Neste estudo, uma população de células microgliais Mac-2 positivas libera o fator de crescimento IGF-1 (do inglês, insulin-like growth factor) o que parece contribuir para o papel neuroprotetor microglial.

Em estudos prévios do nosso grupo, utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média, foi demonstrado que as células microgliais são ativadas até 6 semanas após a indução isquêmica, tanto no estriado como na zona subventricular (THORED et al. 2009). Neste estudo, observou-se que as células microgliais da zona subventricular liberam IGF-1, o que pode contribuir para um papel benéfico da microglia no nicho neurogênico. Neste caso, a microglia moderadamente ativada pode interagir com neuroblastos, contribuindo para a sua sobrevivência no ambiente isquêmico.

A microgliose descrita no presente estudo pode contribuir para perda tecidual. Diversos estudos sugerem que a modulação da ativação microglial contribui para neuroproteção (FRANCO et al. 2012; GUO et al. 2011; HAMBY et al. 2007; TANG et al. 2010; YRJANHEIKKI et al. 1999). O bloqueio microglial com a tetraciclina minociclina induz neuroproteção em ratos adultos após MCAO (YRJANHEIKKI et al. 1999). Neste estudo, houve uma redução da ativação de ciclo-oxigenases e liberação de prostaglandina concomitante com redução de até 65% da área de infarto isquêmico cortical. Houve redução de cerca de 45 % da área de infarto estriatal.

A inibição da ativação microglial com PJ34, um inibidor de polimerase (ADP ribose) suprime a inflamação e diminui a perda neuronal em até 84% (HAMBY et al. 2007). Outros estudos sugerem que a minociclina pode agir em microglia, diminuindo a liberação da proteína HMGB1 (do inglês, high-mobility group box-1), a qual age similarmente às citocinas pró-inflamatórias, o que minimizaria o processo lesivo induzido pela reação inflamatória (HAYAKAWA et al. 2008).

Estudos recentes sugerem que a expressão de caspases ativas, incluindo caspase 3, em microglia pode contribuir para um fenótipo deletério nestas

células, fazendo com as mesmas possam induzir morte neuronal através da liberação de citocinas anti-inflamatórias e níveis elevados de NO, através da ativação excessiva de iNOS (BURGUILLOS et al. 2011). Os eventos anteriormente descritos podem contribuir para perfis benéficos e prejudiciais no ambiente isquêmico

Foi demonstrada ativação microglial no corpo caloso, com pico em torno de 7 dias. A redução da ativação microglial ocorreu mais rapidamente. Poucas células ativadas foram encontradas em 30 dias. No corpo caloso, a ativação microglial pode estar relacionada à fagocitose de componentes da SB afetados pelo processo lesivo, incluindo corpos celulares, cilindro axonal e mielina (HAYES et al. 1987; 1988). Alguns estudos sugerem que a expressão de MHC-classe II em micróglia pode estar relacionada à fagocitose de componentes da SB e não, necessariamente, à apresentação de antígenos em desordens neurais agudas, como lesão da medula espinhal (SCHMITT et al. 1998; SCHMITT et al. 2000). Apesar de que a ativação microglial pode contribuir para a lesão de SB, a fagocitose realizada por estas células pode também ser benéfica, propiciando um ambiente mais ameno a processos regenerativos. Existem evidências que sugerem que uma maior eficácia do poder fagocítico de macrófagos pode estar relacionada a uma maior capacidade regenerativa (PERRY e GORDON, 1987).

Estudos futuros devem investigar a influência do bloqueio microglial no processo lesivo após isquemia estriatal. Deve-se averiguar o que acontece com a área ou volume de infarto, número de oligodendrócitos patológicos, a expressão de Nogo-A e com os padrões de desmielinização. Ablação seletiva da micróglia com anticorpos conjugados à saporina ou com minociclina pode ser usada para este fim.

#### 4.4. DANOS A OLIGODENDRÓCITO E BAINHA DE MIELINA APÓS ISQUEMIA FOCAL

Nesta investigação foi detectada uma injúria a oligodendrócitos ao 3º dia pós-isquemia no estriado, e ao 7º dia no corpo caloso. Entretanto, a descompactação de mielina só foi encontrada mais tardiamente em ambas regiões, com perda mais pronunciada visualizada ao 14º dia.

Injúria a oligodendrócitos tem sido demonstrada ocorrer rapidamente em resposta à isquemia. Irving et al. (1997) observaram mudanças estruturais ao



citoesqueleto de oligodendrócitos entre 20 a 40 minutos após oclusão da artéria cerebral média. Essas mudanças foram visualizadas com aumento da imunorreatividade para proteína associada a microtúbulo, Tau-1, a qual tem sido utilizada como eficiente marcador para injúrias à oligodendrócitos em diversos estudos de indução isquêmica (IMAI et al. 2001; DEWAR e DAWSON, 1995; MCCRACKEN et al. 2002; GRESLE et al. 2006; GUIMARÃES et al. 2010).

Hughes et al. (2003) investigaram a imunorreatividade para Tau-1 em 7 e 14 dias após a microinjeção de ET-1 no estriado de ratos, e demonstraram que os oligodendrócitos próximos à lesão isquêmica já não expressavam Tau-1 nestes períodos. Em nosso trabalho, o pico de células Tau-1+ no estriado ocorreu ao 3º dia, com diminuição significativa ao 7º dia, sendo encontrado ao 14º e 30º dias resultados semelhantes aos animais controle. Mesmo padrão de diminuição temporal de células Tau-1+ foi relatado por Guimarães et al. 2010, após indução de lesão excitotóxica por NMDA no estriado. Nestes estudo não foi elucidado se esta diminuição de imunorreatividade pós isquemia está associada com a perda de células, ou se os oligodendrócitos sobreviveram e conseguiram reverter o dano e consequentemente a morfologia normal com o passar dos dias pós isquemia.

Outros trabalhos mostram que grande número de oligodendrócitos sofre apoptose em tempos mais tardios após desordens neurais, incluindo AVE e lesão da medula espinhal (SHUMAN et al. 1997; EMERY et al. 1998; BEATTIE et al. 2000; STIRLING et al. 2004; GOLDENBERG-COHEN et al. 2005; YUNE et al. 2007).

Utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média, Gresle et al. (2006) encontraram o pico de marcação para Tau-1, no corpo caloso ipsilateral 48 a 72 horas após isquemia, enquanto que neste estudo encontramos apenas em 7 dias. Tal diferença no corpo caloso pode ser justificada pelos modelos experimentais diferentes, dos quais a injeção de ET-1 promove um dano menos extensivo e mais focal.

A pronunciada descompactação de mielina e perda de imunorreatividade do MBP nos tratos estriatais e corpo caloso em tempos mais tardios, quando comparado aos danos à oligodendrócitos, corroboram com estudos prévios que identificaram o mesmo padrão temporal tardio de descompactação da mielina (LIMA et al. 2008; SOUZA-RODRIGUES et al. 2008).

#### 4.5. EXPRESSÃO PROGRESSIVA DE NOGO-A INDUZIDA PELO PROCESSO ISQUÊMICO

Nogo-A é uma proteína que tem sido caracterizada como inibitória do crescimento axonal após injúria no SNC. Outros estudos mostraram que a expressão de Nogo-A se encontra elevada após indução isquêmica. A partir da utilização do modelo de oclusão da artéria cerebral média identificou-se o aumento significativo da expressão de Nogo-A 28 dias após isquemia em todas as regiões atingidas pela indução. Nesta investigação, encontramos o aumento da expressão de Nogo-A em um período bem mais precoce, ao terceiro dia no estriado e do terceiro ao décimo quarto no corpo caloso mantendo níveis mais elevados quando comparado ao 30º dia e aos animais controle. (CHEATWOOD et al. 2008; CHEN et al, 2000; GRANDPRE et al, 2000).

## 5. CONCLUSÕES

Microinjeções de ET-1 no estriado induziram conspícua perda tecidual, concomitante com ativação microglial progressiva, astrocitose, perda da imunoreatividade para proteína básica de mielina e lesão de oligodendrócitos em diversos tempos de sobrevivência após isquemia focal. Estes eventos acometem alguns tratos de SB, como o corpo caloso. O estabelecimento da evolução temporal destes eventos neuropatológico é a base para estudos futuros, nos quais se deverá manipular a resposta inflamatória com intuito de minimizar estas alterações teciduais.

## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, L.; YU, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; MIAO, R.Q.; KIM, J.E.; FULTON, D.; TEMPST, P.; STRITTMATTER, S.M.; SESSA, W.C.. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. **Nat Med**, v. 10, p. 382– 388, 2004.

ARUMUGAM, T. V., GRANGER D. N., MATTSON M. P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Med**, v.7, p. 229-242, 2005.

ARUMUGAM, T. V., GRANGER D. N., MATTSON M. P.. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Med**, v. 7,p. 229-242, 2005.

ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N.M.; LASSEN, N.A. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. **Stroke**, v. 8, p. 51–57, 1977.

BAPTISTE, D. C., FEHLINGS, M. G.. Update on the treatment of spinal cord injury. **Prog Brain Res**, v. 161, p. 217-233, 2007.

BEATTIE, M. S.; FAROOQUI, A. A. e BRESNAHAN, J. C. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J Neurotrauma**, v. 17, p. 915-925, 2000.

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

BLIGHT, A.R.; DECRESCITO, V.. Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. **Neuroscience**. v.19, p. 321-41, 1986.

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

BLUMENFELD, H. **Neuro Thr Clin Cases**. 1a edição. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002

BOGAERT, L.; SCHELLER, D.; MOONEN, J.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; EBINGER, G. e MICHOTTE, Y. Neurochemical changes and laser Doppler flowmetry in the endothelin-1 rat model for focal cerebral ischemia. **Brain Res**, v. 887, p. 266-275, 2000.

BREGMAN, B.S., KUNKEL-BAGDEN, E.; SCHNELL, L.; DAI H.N.; GAO, D.; SCHWAB, M.E.. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. **Brain Res**, 1200C, p. 78-88, 1995.

BUCHLI, A.D.; SCHWAB, M.E.. Inhibition of Nogo: a key strategy to increase regeneration, plasticity and functional recovery of the lesioned central nervous system. **Ann Med**, v. 37, p. 556–67, 2005.

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

CALLAWAY, J. K.; KNIGHT, M. J.; WATKINS, D. J.; BEART, P. M.; JARROTT, B. e DELANEY, P. M. A novel, rapid, computerized method for quantitation of neuronal damage in a rat model of stroke. **J Neurosci Methods**, v. 102, p. 53-60, 2000.

CHEATWOOD, J. L.; EMERICK, A. J.; SCHWAB, M. E.; KARTJE, G. L.. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat. **Stroke**. v. 39, p. 2091-2098, 2000.

CHEN, M.S.; HUBER, A.B.; VAN DER HAAR, M.E.; FRANK, M.; SCHNELL, L.; SPILLMANN, A.A.; CHRIST, F.; SCHWAB, M.E.. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. **Nature** v. 403. p. 434–9, 2000.

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

CLARKE, S. R.; SHETTY, A. K.; BRADLEY, J. L. e TURNER, D. A. Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. **Neurorep**, v. 5, p. 1885-1888, 1994.

COLEMAN, M.; PERRY, V. Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. **Trends Neurosci**, v. 25, p. 532-537, 2002.

DIJKSTRA, C. D.; DOPP, E. A.; JOLING, P.; KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Adv Exp Med Biol**, v. 186, p. 409-419, 1985.

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

DONOGHUE, J.P., Limits of reorganization in cortical circuits. **Cereb. Cortex** v.7, p. 97–99. 1997.

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

EKDAHL, C. T.; CLAASEN, J. H.; BONDE, S.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O.. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 13632-13637, 2003.

EMERY, E.; ALDANA, P.; BUNGE, M. B.; PUCKETT, W.; SRINIVASAN, A.; KEANE, R. W.; BETHEA, J. e LEVI, A. D. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. **J Neurosurg**, v. 89, p. 911-920, 1998.

FILBIN, M.T., Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. **Nat. Rev. Neurosci**, v.4, p. 703–713, 2003.

FOURNIER, A.E., GRANDPRE, T., STRITTMATTER, S.M., Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. **Nature**, v.409, p.341–346, 2001.

FRANCO, E. C.; CARDOSO, M. M.; GOUVEIA, A.; PEREIRA, A. e GOMES-LEAL, W. Modulation of microglial activation enhances neuroprotection and functional recovery derived from bone marrow mononuclear cell transplantation after cortical ischemia. **Neurosci Res**, v. n. p. 2012.

FREUND, P.; SCHMIDLIN, E.; WANNIER, T.; BLOCH, J.; MIR, A.; SCHWAB, M.E.; ROUILLER, E.M.. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates. **Nat Med**, v.12 p.790–2, 2006.

FUXE, K.; KUROSAWA, N.; CINTRA, A.; HALLSTROM, A.; GOINY, M.; ROSEN, L.; AGNATI, L. F. e UNGERSTEDT, U. Involvement of local ischemia in endothelin-1 induced lesions of the neostriatum of the anaesthetized rat. **Exp Brain Res**, v. 88, p. 131-139, 1992.

GALTREY, C. M. e FAWCETT, J. W. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. **Brain Res Rev**, v. 54, p. 1-18, 2007.

GARCIA, J. H.; YOSHIDA, Y.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, Z. G.; LIAN, J.; CHEN, S. e CHOPP, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am J Pathol**, v. 142, p. 623-635, 1993.

GENTLEMAN, S. M., NASH, M. J., SWEETING, C. J., GRAHAM, D. I., ROBERTS, G. W.. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. **Neuroscience Letters**, v.160, p.139-144, 1993.

GILMAN, S., Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. **Exp Neurol**, v.199, p. 28-36. 2006.

GOLDENBERG-COHEN, N.; GUO, Y.; MARGOLIS, F.; COHEN, Y.; MILLER, N. R. e BERNSTEIN, S. L. Oligodendrocyte dysfunction after induction of experimental anterior optic nerve ischemia. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, p. 2716-2725, 2005.

GOMES-LEAL, W. ***Inflamação aguda, resposta glial e degeneração axonal em um modelo de excitotoxicidade na medula espinhal*** . 2002 (Tese em Neurociências) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

GOMES-LEAL, W. Microglial Physiopathology: How to Explain the Dual Role of Microglia after Acute Neural Disorders? **Brain and Behavior**. Aceito para publicação. 2012.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANCO-DINIZ, C. W.; PERRY, V. H.. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol** v.190, p.456-467, 2004.

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

GOMES-LEAL, W.; HELDMAN, U.; THORED, P.; GISLER, R.; EKDAHL, C.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O.. Activated microglia with neuroprotective phenotype concomitant with long-lasting neurogenesis in the adult subventricular zone after stroke. Poster. Evaluation of Swedish Research Council-Swedish Diabetes Association Research **Foundation-Juvenile Diabetes Research Foundation and Academy of Finland in Stem Cell Research**. 2007.

GRANDPRE, T.; NAKAMURA, F.; VARTANIAN, T.; STRITTMATTER, S.M.. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. **Nature**, v.403, p.439-444, 2000.

GRESLE, M. M.; JARROTT, B.; JONES, N. M. e CALLAWAY, J. K. Injury to axons and oligodendrocytes following endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion in conscious rats. **Brain Res**, v. 1110,p. 13-22, 2006.

GUIMARAES, J. S.; FREIRE, M. A.; LIMA, R. R.; PICANCO-DINIZ, C. W.; PEREIRA, A.; GOMES-LEAL W.. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. **Brain Res**, v. 6; p.182-93, 2010.

GUO, Z. D.; WU, H. T.; SUN, X. C.; ZHANG, X. D. e ZHANG, J. H. Protection of minocycline on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. **Acta neurochirurgica**, v. 110, p. 71-74, 2011.

HABERG, A.; QU, H.; SAETHER, O.; UNSGARD, G.; HARALDSETH, O. e SONNEWALD, U. Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 21, p. 1451-1463, 2001.

HAMBY, A. M.; SUH, S. W.; KAUPPINEN, T. M. e SWANSON, R. A. 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.

HAREL, N.Y.; STRITTMATTER, S.M.. Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury? **Nat Rev Neurosci** v.7, p.603-616, 2006.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; NOZAKO, M.; HAZEKAWA, M.; MISHIMA, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, v.39, p.951-958, 2008.

HAYES, G. M.; WOODROOFE, M. N. e CUZNER, M. L. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. **J neuro sci**, v. 80, p. 25-37, 1987.

HAYES, G. M.; WOODROOFE, M. N. e CUZNER, M. L. Microglia express MHC class II in normal and demyelinating human white matter. **Ann N Y Acad Sci**, v. 540, p. 501-503, 1988.

HEWLETT, K. A. e 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.

HIROSE, K.; OKAJIMA, K.; TAOKA, Y.; UCHIBA, M.; TAGAMI, H.; NAKANO, K.; UTOH, J.; OKABE, H. e KITAMURA, N. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. **Ann Surg**, v. 232, p. 272-280., 2000.

HOLMIN, S.; ALMQVIST, P.; LENDAHL, U. e MATHIESEN, T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. **Eur J Neurosci**, v. 9, p. 65-75, 1997.

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

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

IRVING, E. A.; BENTLEY, D. L.; PARSONS, A. A.. Assessment of white matter injury following prolonged focal cerebral ischaemia in the rat. **Acta Neuropathol (Berl)**, v. 102, p. 627-635, 2001.

IRVING, E.A.; MCCULLOCH, J.; DEWAR, D.. Intracortical perfusion of glutamate in vivo induces alterations of tau and microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the rat. **Acta Neuropathol**, v.92, p.186-196, 1996a.

IRVING, E.A.; NICOLL, J.; GRAHAM, D.I.; DEWAR, D.. Increased tau immunoreactivity in oligodendrocytes following human stroke and head injury. **Neurosci Lett**, v.213, p.189-192, 1996b.

IRVING, E.A.; YATSUSHIRO, K.; MCCULLOCH, J.; DEWAR, D.. Rapid alteration of tau in oligodendrocytes after focal ischemic injury in the rat: involvement of free radicals. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.17, p.612-622, 1997.



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

KAJIHARA, H.; TSUTSUMI, E.; KINOSHITA, A.; NAKANO, J.; TAKAGI, K. e TAKEO, S. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies. **Brain Res**, v. 909, p. 92-101, 2001.

KANELLOPOULOS, G.K.; XU, X.M.; HSU, C.Y.; LU, X.; SUNDT, T.M.; KOUCHOUKOS, N.T.. White matter injury in spinal cord ischemia: protection by AMPA/kainate glutamate receptor antagonism. **Stroke**, v.31, p.1945-1952, 2000.

KLEINSCHNITZ, C.; POZGAJOVA, M.; PHAM, M.; BENDSZUS, M.; NIESWANDT, B. e STOLL, G. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. **Circulation**, v. 115, p. 2323-2330, 2007.

KOSEL, S.; EGENSPERGER, R.; BISE, K.; ARBOGAST, S.; MEHRAEIN, P. GRAEBER, M. B.. Long-lasting perivascular accumulation of major histocompatibility complex class II-positive lipophages in the spinal cord of stroke patients: possible relevance for the immune privilege of the brain. **Acta Neuropathol (Berl)**, v. 94, p. 532-538, 1997.

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

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

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

LI, S.; STYS, P.K.. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. **J Neurosci**, v.20 p.1190-8200, 2000.

LIEBSCHER, T.; SCHNELL, L.; SCHNELL, D.; SCHOLL, J.; SCHNEIDER, R.; GULLO, M.; FOUAD, K.; MIR, A.; RAUSCH, M.; KINDLER, D.; HAMERS, F. P. SCHWAB, M. E.. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. **Ann Neurol**, v. 58, p. 706-719, 2005

LIMA, R. R.; GUIMARAES-SILVA, J.; OLIVEIRA, J.L.; COSTA, A.M.R; SOUZA-RODRIGUES, R.; DOS SANTOS, C.D.; PICANÇO-DINIZ, C.W; GOMES-LEAL, W.. Diffuse Axonal Damage, myelin impairment, astrocytosis and Inflammatory Response Following Microinjections of NMDA into The Rat Striatum. **Inflammation**, v.3, p. 24-35. 2008

LITTLE, A. R. e O'CALLAGHA, J. P. Astrogliosis in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines? **Neurotoxicology**, v. 22, p. 607-618, 2001.

LIU, D.; SMITH, C. L.; BARONE, F. C.; ELLISON, J. A.; LYSKO, P. G.; LI, K. e SIMPSON, I. A. Astrocytic demise precedes delayed neuronal death in focal ischemic rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 68, p. 29-41, 1999.

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

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

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

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

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

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J. e GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, n. p. S232-240, 2006.

MACRAE, I. M.; ROBINSON, M. J.; GRAHAM, D. I.; REID, J. L. e MCCULLOCH, J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 13, p. 276-284, 1993.

MACREZ, R.; ALI, C.; TOUTIRAIS, O.; LE MAUFF, B.; DEFER, G.; DIRNAGL, U.; VIVIEN, D.. Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. [www.thelancet.com/neurology](http://www.thelancet.com/neurology) v. 10 2011

MARKUS, T.M.; Tsai, S.Y.; Bollnow, M.R.; Farrer, R.G.; O'Brien, T.E.; Kindler-BAUMANN, D.R.; RAUSCH, M.; RUDIN, M.; WIESSNER, C.; MIR, A.K.; SCHWAB, M.E.; KARTJE, G.L.. Recovery and brain reorganization after stroke in adult and aged rats. **Ann Neurol**, v.58, p.950–953, 2005.

MARRIF, H. e JUURLINK, B. H. Astrocytes respond to hypoxia by increasing glycolytic capacity. **J Neurosci Res**, v. 57, p. 255-260, 1999.

MATUTE, C.; ALBERDI, E.; DOMERCQ, M.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M.V.; PÉREZ-SAMARTÍN. A.; RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD A, et al. Excitotoxic damage to White matter. **J Anat**; v.210, p.693-702, 2007.

MCKENZIE, K. J.; MCLELLAN D. R.; GENTLEMAN S. M.; MAXWELL W. L.; GENNARELLI T. A.; GRAHAM D. I.. Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury? **Acta Neuropat**, v.92, p. 608-613, 1996.

MCKERRACHER, L.; DAVID, S.; JACKSON, D.L.; KOTTIS, V.; DUNN, R.J.; BRAUN, P.E.. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. **Neuron**, v.13, p.805–811, 1994.

MEDANA, I. M., ESIRI, M. M.. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. **Brain**, v.126, p.515-530, 2003.

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

MERKLER, D.; METZ, G.A.; RAINETEAU, O.; DIETZ, V.; SCHWAB, M.E.; FOUAD, K.. Locomotor recovery in spinal cord injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. **J Neurosci**, v.21 p.365–373, 2001.

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

MORIOKA, T.; KALEHUA, A. N.; STREIT, W. J.. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. **J Comp Neurol**, v.327, p.123-132, 1993.

MOSKOWITZ, M.; LO, H.; IADECOLA, C.. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67 2010.

MOSKOWITZ, M.; LO, H.; IADECOLA, C.. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, p. 181-198, 2010.

MOYANOVA, S. G.; KORTENSKA, L. V.; MITREVA, R. G.; PASHOVA, V. D.; NGOMBA, R. T. e NICOLETTI, F. Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. **Brain Res**, v. p. 2007.

MOYANOVA, S.; KORTENSKA, L.; KIROV, R. e ILIEV, I. Quantitative electroencephalographic changes due to middle cerebral artery occlusion by endothelin 1 in conscious rats. **Arch Physiol Biochem**, v. 106, p. 384-391, 1998.

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

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

NIEDEROST, B.; OERTLE, T.; FRITSCH, J.; MCKINNEY, R.A.; BANDTLOW, C.E.. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. **J. Neurosci**, v.22, p.10368–10376. 2002.

NIESWANDT, B.; KLEINSCHNITZ, C. e STOLL, G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? **J Physiol**, v. 589, p. 4115-4123, 2011.

NIKOLOVA, S.; MOYANOVA, S.; HUGHES, S.; BELLYOU-CAMILLERI, M.; LEE, T. Y. e BARTHA, R. Endothelin-1 induced MCAO: dose dependency of cerebral blood flow. **J neurosci methods**, v. 179, p. 22-28, 2009.

NIU, F. N.; ZHANG, X.; HU, X. M.; CHEN, J.; CHANG, L. L.; LI, J. W.; LIU, Z.; CAO, W. e XU, Y. Targeted mutation of Fas ligand gene attenuates brain inflammation in experimental stroke. **Brain behav immun**, v. 26, p. 61-71, 2012.

OLIVEIRA, R. B.; GOMES-LEAL, W.; DO-NASCIMENTO, J. L.; PICANCO-DINIZ, C. W.. Methylmercury intoxication and histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity in the striate cortex of adult cats. **Braz J Med Biol Res**, v.31, p.1157-1161, 1998.

PAPADOPOULOS, C.M.; TSAI, S.Y.; ALSBIEI, T.; O'BRIEN, T.E.; SCHWAB, M.E.; KARTJE, G.L.. Functional recovery and neuroanatomical plasticity following middle cerebral artery occlusion and IN-1 antibody treatment in the adult rat. **Ann Neurol**, v.51, p.433–441, 2002.

PERRY, V. H. e GORDON, S. Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. **J Exp Med**, v. 166, p. 1138-1143, 1987.

PHAM, M.; KLEINSCHNITZ, C.; HELLUY, X.; BARTSCH, A. J.; AUSTINAT, M.; BEHR, V. C.; RENNE, T.; NIESWANDT, B.; STOLL, G. e BENDSZUS, M. Enhanced cortical reperfusion protects coagulation factor XII-deficient mice from ischemic stroke as revealed by high-field MRI. **Neuroimage**, v. 49, p. 2907-2914, 2010.

PIXLEY, S. K. e DE VELLIS, J. Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. **Brain Res**, v. 317, p. 201-209, 1984.

POPOVICH, P. G.; GUAN, Z.; WEI, P.; HUITINGA, I.; VAN ROOIJEN, N.; STOKES, B. T.. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. **Exp Neurol**, v.158, p.351-365, 1999.

PRICE, C. J.; WANG, D.; MENON, D. K.; GUADAGNO, J. V.; CLEIJ, M.; FRYER, T.; AIGBIRHIO, F.; BARON, J. C.; WARBURTON, E. A.. Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. **Stroke**, v. 37, p. 1749-1753, 2006.

RIDET, J. L.; MALHOTRA, S. K.; PRIVAT, A. e GAGE, F. H. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. **Trends Neurosci**, v. 20, p. 570-577, 1997.

SAIJO, K.; GLASS, C. K.. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 775-787, 2011.

SANCHO-TELLO, M.; VALLES, S.; MONTOLIU, C.; RENAU-PIQUERAS, J. e GUERRI, C. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. **Glia**, v. 15, p. 157-166, 1995.

SAVITZ, S. I.; AND FISHER M.. Future of neuroprotection for acute stroke: in the aftermath of the SAINT trials. **Ann Neurol**, v. 61, p.396-402, 2007.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; MULLER, M.; STRECKER, J. K.; RINGELSTEIN, E. B. e KIEFER, R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Exp Neurol**, v. 196, p. 290-297, 2005.

SCHMITT, A. B., BUSS, A.; BROOK, G.A.; NACIMIENTO, S.; NOTH, J.; KREUTZBERG, G.W.. Dynamic of microglial activation in the spinal cord after cerebral infarction are revealed by expression of MHC class II antigen. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 24, p. 167-176, 1998.

SCHMITT, A. B.; BUSS, A.; BREUER, S.; BROOK, G. A.; PECH, K.; MARTIN, D.; SCHOENEN, J.; NOTH, J.; LOVE, S.; SCHRODER, J. M.; KREUTZBERG, G. W. e NACIMIENTO, W. Major histocompatibility complex class II expression by activated microglia caudal to lesions of descending tracts in the human spinal cord is not associated with a T cell response. **Acta Neuropathol**, v. 100, p. 528-536, 2000.

SCHNELL, L.; SCHWAB, M.E.. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. **Nature**, v. 72, p.343:269, 1990.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; HUITINGA, I.; WITTE, O. W. e STOLL, G. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. **Stroke**, v. 28, p. 382-386, 1997.

SCHWAB, M.E.. Nogo and axon regeneration. **Curr Opin Neurobiol**, v.14, p.118–124, 2004.

SCHWARTZ, M.; Butovsky, O.; Bruck, W.; Hanisch, U. K.. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends Neurosci**, v.29, p.68-74, 2006.

SEYMOUR, A.B.; ANDREWS, E.M.; TSAI, S.Y.; MARKUS, T.M.; BOLLNOW, M.R.; BRENNEMAN, M.M.; OBRIEN, T.E.; CASTRO, A.J.; SCHWAB, M.E.; KARTJE, G.L.. Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.25, p.1366–1375, 2005.

SHARKEY, J. e 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.

SHARKEY, J.; BUTCHER, S. P. e KELLY, J. S. Endothelin-1 induced middle cerebral artery occlusion: pathological consequences and neuroprotective effects of MK801. **J Auton Nerv Syst**, v. 49 Suppl, p. S177-185, 1994.

SHARKEY, J.; RITCHIE, I. M. e KELLY, P. A. Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 13, p. 865-871, 1993.

SHUMAN, S. L.; BRESNAHAN, J. C. e BEATTIE, M. S. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. **J Neurosci Res**, v. 50, p. 798-808, 1997.

SILVER, J.; MILLER, J.H.; Regeneration beyond the glial scar. **Nat. Rev. Neurosci.** v.5, p.146–156, 2004.

SOUZA-RODRIGUES, R. D.; LIMA, R. R.; GUIMARAES-SILVA, J.; COSTA, A. M.; DOS SANTOS, C. D.; PICANÇO-DINIZ, C. W., GOMES-LEAL, W.. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Res**. v. 20, p. 78-88, 2008.

SOZMEN, E. G.; KOLEKAR, A.; HAVTON, L. A. e CARMICHAEL, S. T. A white matter stroke model in the mouse: axonal damage, progenitor responses and MRI correlates. **J Neurosci Methods**, v. 180, p. 261-272, 2009.

STIRLING, D. P.; KHODARAHMI, K.; LIU, J.; MCPHAIL, L. T.; MCBRIDE, C. B.; STEEVES, J. D.; RAMER, M. S.; TETZLAFF, W.. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, p. 2182-2190, 2004.

SYKOVA, E. Extracellular space volume and geometry of the rat brain after ischemia and central injury. **Adv Neurol**, v. 73, p. 121-135, 1997.

SYKOVA, E. Glial diffusion barriers during aging and pathological states. **Prog Brain Res**, v. 132, p. 339-363, 2001.

TANG, M.; ALEXANDER, H.; CLARK, R. S.; KOCHANNEK, P. M.; KAGAN, V. E. e BAYIR, H. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest. **J cereb blood flow metab**, v. 30, p. 119-129, 2010.

TAOKA, Y.; OKAJIMA K., MURAKAMI, K.; JOHNO, M.; NARUO, M.. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. **Brain Res**, v. 799, p.264-269, 1998.

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; UCHIBA, M.; MURAKAMI, K.; KUSHIMOTO, S.; JOHNO, M.; NARUO, M.; OKABE, H.; TAKATSUKI K.. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. **Neuroscience**, v.79, p.1177-1182, 1997.

TATOR, C. H.. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. **Brain Pathol**, v.5, p.407-413, 1995.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G.. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. **J Neurosurg**, v.75, p.15-26, 1991.

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

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

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

WANG, K.C.; KIM, J.A.; SIVASANKARAN, R.; SEGAL, R.; HE, Z.. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. **Nature** v.420, p.74–78, 2002a.

WANG, K.C.; KOPRIVICA, V.; KIM, J.A.; SIVASANKARAN, R.; GUO, Y.; NEVE, R.L.; HE, Z.. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. **Nature** v.417, p.941–944, 2002b.

WIESSNER, C.; BAREYRE, F.M.; ALLEGRINI, P.R.; MIR, A.K.; FRENTZEL, S.; ZURINI, M.; SCHNELL, L.; OERTLE, T.; SCHWAB, M.E.. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 h after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J Cereb Blood Flow Metab**, v.23, p.154–165, 2003.

YIU, G.; HE, Z.. Glial inhibition of CNS axon regeneration. **Nat Rev Neurosci**, v.7, p.617–27, 2006.

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

YUNE, T. Y.; LEE, J. Y.; JUNG, G. Y.; KIM, S. J.; JIANG, M. H.; KIM, Y. C.; OH, Y. J.; MARKELONIS, G. J. e OH, T. H. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes

by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 27, p. 7751-7761, 2007.



## ANEXO I – PARECER CEPAE

**PARECER BIO038-12**

**Projeto: ATIVAÇÃO MICROGLIAL, LESÃO DA SUBSTÂNCIA BRANCA E EXPRESSÃO DE NOGO A EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA ESTRIATAL**

**Coordenador: Prof. MSc Rafael Rodrigues Lima**

**Área Temática: Biologia**

**Vigência: 03/2009 a 03/2013**

**Nº no CEPAE-UFPa: BIO038-12**

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 é 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 3988/2011 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, 02 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal  
Presidente CEPAE-UFPa

## ANEXO II – PROTOCOLO DE BANCADA

### 1. TAMPÕES

#### 1.1. Tampão Fosfato 0.4M (pH 7.2-7.4)

Para o preparo de 1l: Acrescentar 10.5g de fosfato de sódio monohidratado à 200 ml de água destilada (solução A). Acrescentar 114g fosfato de sódio dodecahidratado à 800ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (solução B). Misturar as duas soluções e ajustar o pH para 7.2-7.4, se necessário.

#### 1.2. Tampão Fosfato 0.1M

Para o preparo de 1l: Diluir 250 ml de tampão fosfato 0.4M em 750 ml de água destilada.

#### 1.3. Tampão Fosfato 0.05M

Para preparar 1l: Diluir 500 ml de tampão fosfato 0.1M em 500ml de água destilada.

#### 1.4. Tampão Fosfato Salina

Para o preparo de 1l: Acrescentar 9 g de cloreto de Sódio em 1L de tampão fosfato 0.1M.

#### 1.5. Tampão Fosfato Salina Tween

Para o preparo de 1l: Acrescentar 0,5 ml de tween 20% em 1l de tampão fosfato salina tween.

#### 1.6. Tampão Borato 0.2M (pH 9.0)

Adicionar 12.2g de ácido bórico à 1l de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Corrigir o pH para 9.0 com hidróxido de sódio.

## 2. FIXADOR

### 2.1. Paraformaldeído 4%

Para o preparo de 1l: Diluir 40g de paraformaldeído com 500 ml de H<sub>2</sub>O previamente aquecida a 60°C. Misturar a solução de paraformaldeído (fria) com 500 ml de tampão fosfato 0.2M e corrigir o pH para 7.2-7.4 necessário. O paraformaldeído deve ser preparado no dia do experimento para melhores resultados.

## 3. SOLUÇÃO CRIOPROTETORA

### 3.1. Solução Crioprotetora I

Adicionar 50g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

### 3.2. Solução Crioprotetora II

Adicionar 100g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

### 3.3. Solução Crioprotetora III

Adicionar 150g de sacarose e 45 ml de glicerina em 450ml de tampão fosfato 0.05M

Trocar de solução sempre que a espécime se apresentar flutuante.

## 4. ANÁLISE HISTOLÓGICA

### Violeta de Cresila

Usada para corar seções espessas previamente a análise imunohistoquímica.

### 4.1. Preparo da Solução de Violeta de Cresila

Dissolver 0.25g de acetato de violeta de cresila em 100 ml de H<sub>2</sub>O. Ajustar o pH para 3.3 com ácido acético.

### 4.2. Coloração Para Violeta de Cresila (seções de 50µm)

Deixar seções de 50 µm nas seguintes soluções:

- a. solução H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> /ácido acético – 7 min
- b. solução de violeta de cresila – 14 min
- c. álcoois 70%, 80% e 90% -1.5 min em cada
- d. álcool absoluto I– 1 min
- e. álcool absoluto II – 1 min
- f. xileno I – 1 min
- g. xileno II – 1 min
- h. montar as secções entre lâmina e lamínula com Entelan (Merck) ou outro meio de inclusão

## 5. IMUNOISTOQUÍMICA

### 5.1. Pré Tratamento das Secções

Com a finalidade de melhorar o padrão de reação antígeno-anticorpo, realizou-se pré tratamento das secções com tampão borato.

### 5.2. Pré Tratamento com Tampão Borato

As secções retiradas do freezer, após alcançarem temperatura ambiente, são imersas em tampão borato (pH 9.0) aquecido a 60 °C, em banho maria por 20 minutos. A temperatura é mantida constante neste período, sendo ao fim desse período retiradas do banho maria, resfriadas por 20 minutos, ainda dentro da solução de tampão borato, para se seguir o protocolo.

### 5.3 Imunoistoquímica Para ED1, MHC-II, MBP, TAU-1, GFAP e IBA-1 e NOGO-A.

- a. Secções de 20 µm, já montadas em lâminas, são submetidas ao pré tratamento com tampão borato;
- b. Lavagem em tampão fosfato salina por 3 min, sob agitação constante em agitador orbital (60 rpm);
- c. Imersão em metanol +peróxido de hidrogênio a 1% (100ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/250ml de metanol) por 20 minutos;
- d. Demarcação das secções com caneta hidrofóbica;
- e. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
- f. Bloqueio em soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário por 1 hora. No caso dos anticorpos ED1, MHC-II, MBP, TAU-1 o soro normal de

- cavalo a 10%. No caso dos anticorpos anti GFAP, IBA-1 o soro normal de cabra a 10 % foi utilizado;
- g. Após o bloqueio em soro normal, retira-se o excesso de soro, e as secções são expostas ao anticorpo primário, diluído no mesmo soro usado por técnica, *overnight* . As diluições usadas são: ED1 (1:500, Serotec), GFAP (1:2000, Dako), Nogo-A (1:100, Invivogen) MPB (1:100, Chemicon Internacional), IBA-1 (1:1000, Wako), MHC-II (1:100, Abcam), TAU-1 (1:500, Chermicon Internacional) ;
  - h. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
  - i. Exposição ao anticorpo secundário, por duas horas, nas as seguintes diluições: para os anticorpos ED1, MHC-II, MBP, TAU-1 utilizou-se o anticorpo secundário biotinilado anti-cavalo feito em camundongo (1:100, Vector). Para os anticorpos anti GFAP, IBA-1 utilizou-se o anticorpo secundário biotinilado feito em cabra anti coelho (5:1000, Vector).
  - j. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
  - k. Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, vector) por 2h minutos (uma gota da solução A + uma gota da solução B em 5ml de tampão fosfato salina, preparado com 40 min de antecedência);
  - l. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 4 vezes de 3 minutos;
  - m. Reação em diamino benzidina (DAB) para revelação. Aliquotas de DAB foram descongeladas e diluídas em 250 ml de tampão fosfato 0.1M em uma cubeta. Antes do início da reação, acrescentou-se à solução de DAB 130  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As secções montadas em lâminas dispostas em uma cesta histológica foram imersas na solução de DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e monitoradas com auxílio de um microscópio até que o padrão da reação fosse satisfatório. Em seguida, as secções foram desidratadas e cobertas com lamínula com auxílio de Entelan (Merck).