



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

ENIO MAURÍCIO NERY DOS SANTOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS PADRÕES NEURODEGENERATIVOS DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL**

Belém

2012

ENIO MAURÍCIO NERY DOS SANTOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS PADRÕES NEURODEGENERATIVOS DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL**

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

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Belém

2012

ENIO MAURÍCIO NERY DOS SANTOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS PADRÕES NEURODEGENERATIVOS DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL**

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

Aprovada em: 27 / 09 /2012

Banca Examinadora

_____ - Orientador

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof^a. Dr^a. Réia Sílvia Lemos

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia

Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

*Duda e Juju, que na inocência típica
das crianças, souberam compreender
os motivos das ausências
necessárias; Esta vitória é nossa!*

AGRADECIMENTOS

*“Quanto mais nos elevamos,
menores parecemos aos olhos daqueles que
não sabem voar.”
Friedrich Nietzsche*

A Deus, por ser o início de tudo, por ter me dado força e coragem ao longo desta jornada, e principalmente por ser a fonte de calma e serenidade durante os (muitos) momentos difíceis.

Ao Prof. Wallace Leal, pela orientação precisa em todas as fases desta investigação e principalmente pelo doutrinamento necessário ao longo dos anos para transformar um neófito em um constante aprendiz fascinado pela Neurociência. Agradeço a oportunidade de entrar no grupo;

Ao Prof. Antônio Pereira, responsável pela revisão do projeto que foi apresentado à Pós Graduação e que me garantiu o ingresso no programa;

Ao Prof. Rafael Rodrigues de Lima, que sempre foi solícito nos momentos em que necessitei de esclarecimentos, material de laboratório, espaço físico, reagentes ou simplesmente tempo para divagações. Obrigado por compartilhar seu conhecimento não só comigo, mas com todos os que o procuram (Alunos, alunos de iniciação científica, professores);

À direção do Instituto de Ciências Biológicas, nas figuras do diretor e vice, respectivamente Professores Julio Pieczarka e Maria Cristina Espósito, por terem se empenhado em conseguir minha liberação em tempo hábil para conclusão desta tese;

Ao Rafael Fernandes e Ana Carolina Alves pela amizade, companheirismo e principalmente por terem se tornado peças indispensáveis na reta final. Uma geração será insuficiente para agradecer o que fizeram por mim; muito obrigado.

A todos os colegas de laboratório, em especial ao Adriano, Diego e Ijair, pelo desprendimento com que atenderam as minhas necessidades.

À Antônia e à Carol, pela ajuda na formatação da aula de qualificação e na defesa; meu muito obrigado às duas.

À direção e coordenação das faculdades de Medicina e Biomedicina, onde atuo primariamente, por sempre terem incentivado e criado condições para o aprimoramento científico e crescimento dos profissionais que lá atuam, o que se traduz em melhoria da qualidade dos cursos como um todo.

Ao Biotério da Ufpa, nas figuras do Reginaldo Trindade e do Sr. Amarildo, que sempre se mostraram sensíveis em atender aos pedidos de animais utilizados no desenvolvimento desta tese.

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) pode ocorrer em qual região do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo o córtex cerebral é uma das regiões mais frequentemente afetadas por essa desordem neural aguda, embora inexistem investigações que tenham comparado o padrão lesivo em diferentes regiões corticais após isquemia focal de mesma intensidade. O objetivo desta investigação foi avaliar o padrão degenerativo de diferentes áreas corticais após lesão isquêmica focal. Para isso, induziu-se isquemia focal por microinjeções estereotáxicas de endotelina-1 (ET-1) nos córtices somestésico, motor e de associação de ratos adultos (N=45). Nos animais controle injetou-se o mesmo volume de solução salina estéril (N=27). Os animais foram perfundidos 1, 3, e 7 dias após o evento isquêmico. O encéfalo foi removido, pós-fixado, crioprotelado e seccionado em criostato. A histopatologia geral foi avaliada em secções de 50 µm coradas pela violeta de cresila. Secções de 20µm foram submetidas à imunohistoquímica para marcação de astrócitos (anti-GFAP), micróglia/macrófagos ativados (anti-ED1) e microglia em geral (anti-Iba1). Avaliou-se os padrões lesivos qualitativamente (por inspeção em microscópio óptico) e quantitativamente (pela contagem do número de células nos lados ipsi e contralateral à lesão), pela estatística descritiva e comparações intra e intergrupos com análise de variância com correção a posteriori de Tukey. Os animais isquêmicos apresentaram conspícua perda tecidual, ativação microglial e astrocitose entre 3 e 7 dias após a indução isquêmica, o que não foi observado nos animais controle. A perda tecidual e a ativação de células gliais foram mais intensas no córtex somestésico, depois no córtex motor, com intensidade reduzida na área de associação, o que foi confirmado por análise quantitativa. Os resultados sugerem que uma lesão isquêmica de mesma intensidade induz um padrão diferencial de

perda tecidual e neuroinflamação, dependendo da área cortical, e que as áreas sensoriais primárias e motoras são mais susceptíveis ao processo isquêmico do que áreas de associação.

Palavras-chave: Córtex Cerebral, Isquemia, acidente vascular encefálico, neurodegeneração, astrocitose, ativação microglial.

ABSTRACT

Stroke can occur in any region of the central nervous system (CNS). The cerebral cortex is one of the most often affected areas by this acute neural disorder, but there are no studies that have compared the damaging pattern in different cortical regions after a comparable focal ischemia. The aim of this investigation was to evaluate the degenerative pattern of different cortical areas after focal ischemic injury. Focal ischemia was induced by stereotaxic microinjections of endothelin-1 (ET-1) into the somatosensory, motor and association cortices of adult rats (N = 45). The control animals were injected with the same volume of sterile saline (N = 27). The animals were perfused 1, 3 and 7 days after the ischemic event. The brain was removed, postfixed, cryoprotected, and sectioned in a cryostat. The general histopathology was evaluated in 50µm sections stained with cresyl violet. 20µm sections were submitted to immunohistochemistry for astrocytes (anti-GFAP), activated microglia / macrophages (anti-ED1) and overall microglial population (anti-Iba1). The damaging patterns were qualitatively evaluated under optical microscopy and quantitatively by counting the number of cells in the ipsilateral and contralateral sides to injury. Descriptive statistics and comparisons within and between groups were performed using analysis of variance with Tukey post-hoc test. Conspicuous ischemic tissue loss, microglial activation and astrocytosis were observed mainly 3 and 7 days after ischemia, which was not observed in control animals. The tissue loss and activation of glial cells were more intense in the somatosensory cortex, followed by the motor cortex. The association cortex displayed less damage compared to other cortical areas, which was confirmed by quantitative analysis. The results suggest that an ischemic lesion of the same intensity induces a differential pattern of tissue loss and neuroinflammation, depending on the cortical area, and

that the primary sensory and motor areas are more susceptible to ischemia than association areas.

Keywords: Cerebral Cortex, Ischemia, Stroke, Neurodegeneration, Astrocytosis, Microglial Activation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	
Representação das áreas corticais cerebrais.....	17
FIGURA 2	
Representação esquemática das camadas corticais.....	18
FIGURA 3	
Fotomicrografia das diferenças citoarquitetônicas do córtex de mamíferos.....	20
FIGURA 4	
Cascata dos eventos prejudiciais em uma isquemia cerebral.....	24
FIGURA 5	
Representação esquemática do avanço da neurodegeneração na zona de penumbra.....	26
FIGURA 6	
Tabela demonstrando as coordenadas estereotáxicas utilizadas.....	37
FIGURA 7	
Prancha com fotomicrografias coradas com violeta de cresila em 1 dia.....	43
FIGURA 8	
Prancha com fotomicrografias coradas com violeta de cresila em 3 dias.....	44
FIGURA 9	
Prancha com fotomicrografias coradas com violeta de cresila em 7 dias.....	45
FIGURA 10	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para IBA-1 em 1 dia.....	47
FIGURA 11	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para IBA-1 em 3 dias.....	48
FIGURA 12	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para IBA-1 em 7 dias.....	49

FIGURA 13	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para ED-1 em 1 dia.....	51
FIGURA 14	
Gráfico representativo da análise quantitativa para ED-1 em 1 dia.....	52
FIGURA 15	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para ED-1 em 3 dias.....	53
FIGURA 16	
Gráfico representativo da análise quantitativa para ED-1 em 3 dias.....	54
FIGURA 17	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para ED-1 em 7 dias.....	55
FIGURA 18	
Gráfico representativo da análise quantitativa para ED-1 em 7 dias.....	56
FIGURA 19	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para GFAP em 1 dia.....	58
FIGURA 20	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para GFAP em 3 dias.....	59
FIGURA 21	
Prancha com fotomicrografias imunomarcadas para GFAP em 7 dias.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
AVE	Acidente Vascular Encefálico
ET-1	Endotelina-1
GFAP	Marcador de astrócitos, identifica a proteína ácida fibrilar glial do citoesqueleto.
IBA-1	Marcador que reconhece proteína quelante de Ca^{++}
ED1	Marcador de micróglia/macrófago
FDA	Food and Drug Administration
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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ANATOMIA DO CÓRTEX CEREBRAL.....	15
1.2 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS..	22
1.3 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO.....	23
1.4 MODELO DE INDUÇÃO ISQUÊMICA EXPERIMENTAL COM USO DE ENDOTELINA-1.....	31
1.5 HIPÓTESE E O PARADIGMA EXPERIMENTAL.....	33
1.6 OBJETIVOS.....	35
1.6.1 Objetivo Geral.....	35
1.6.2 Objetivos Específicos.....	35
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO.....	36
2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E MÉTODO DE INJEÇÃO DE ENDOTELINA- 1.....	36
2.3 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO TECIDUAL.....	38
2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	39
2.4.1 Visualização da Area de Lesão.....	39
2.4.2 Estudos Imunohistoquímicos.....	39
2.5 ANÁLISE QUALITATIVA.....	40
2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	40
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
3. RESULTADOS.....	42
3.1. A INJEÇÃO DE ENDOTELINA 1 INDUZ PERDA TECIDUAL EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS.....	42
3.2 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM UM PADRÃO DIFERENCIAL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS.....	46
3.3 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ASTROCITOSE PROGRESSIVA NEOCORTICAL.....	57
4. DISCUSSÃO.....	61

4.1 DISCUSSÃO SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL.....	61
4.2. O CÓRTEX SOMESTÉSICO É MAIS AFETADO PELO PROCESSO ISQUÊMICO QUANDO COMPARADO AOS CÓRTICES MOTOR E DE ASSOCIAÇÃO.....	62
4.3 O SIGNIFICADO DA MICROGLIOSE MAIS INTENSA NAS AREAS SOMESTÉSICA E MOTORA EM RELAÇÃO À ÁREA ASSOCIATIVA.....	65
4.4. PADRÕES DIFERENCIAIS DE ASTROCITOSE EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS SUBMETIDAS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL.....	67
5. CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO I	86
ANEXO II	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANATOMIA DO CÓRTEX CEREBRAL

O córtex forma a superfície com circunvoluções do encéfalo em homens e animais superiores, sendo este arranjo eficiente em aumentar a área relativa, sem crescer exageradamente o volume cefálico (DEFELIPE, 2011a), sendo a estrutura mais nova do encéfalo em termos evolutivos (neocórtex) e bastante desenvolvida em mamíferos. A parte funcional do córtex é uma camada delgada de neurônios, cerca de 20 a 25 mm² com 2 a 5 mm de espessura, contendo cerca de 80 a 100 bilhões de neurônios (LENT, 2012). O córtex recebe impulsos provenientes de todas as vias sensoriais, que aí se tornam conscientes e são interpretadas, e dele saem os impulsos nervosos relacionados ao controle dos movimentos voluntários, fenômenos psíquicos e funções cognitivas.

A maioria dos neurônios pode ser classificada em três tipos: granulares ou estelares, fusiformes e piramidais. Os neurônios granulares possuem axônios curtos e funcionam apenas como interneurônios, que transmitem estímulos para áreas vizinhas dentro do próprio córtex cerebral. Alguns são excitatórios e liberam o neurotransmissor glutamato, outros são inibitórios, alguns liberando o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Os neurônios fusiformes e piramidais dão origem a praticamente todas as fibras de eferência do córtex (BEAR, 2008).

Durante o desenvolvimento, o córtex cerebral é elaborado em pelo menos seis camadas, que vão aumentando de acordo com a proliferação diferenciada e migração das células (WANG et al., 2010). A mais externa é a camada molecular, rica em fibras de projeção horizontal e com poucos neurônios, seguida pelas camadas granular externa, piramidal externa, granular interna,

piramidal interna e polimorfa (I,II/III,IV,V e VI). Em cada camada predomina o tipo de neurônio que lhes empresta o nome, sendo que dentre os diversos tipos de células existe um predomínio das piramidais e granulares ou estelares.

As tentativas de localizar funções no córtex cerebral datam da descoberta de dois tipos de controle motor em áreas específicas do córtex no lobo frontal: controle da fala expressiva em 1862, por Broca, e controle do movimento voluntário em 1870, por Fritsch e Hitzig (CRAGG, 1967). As pesquisas subsequentes determinaram os vários córtices sensoriais: primário, secundário e terciário (visão, audição, sensações e gustação nos lobos occipital, parietal e temporal) respectivamente. Tanto nas áreas motora primária quanto somestésica, a representação cortical de uma parte do corpo é proporcional não ao seu tamanho, mas sim à quantidade de movimentos musculares realizados pela parte representada ou à importância funcional desta parte do corpo para a biologia da espécie.

Consideram-se áreas de associação aquelas que não se relacionam diretamente com motricidade ou sensibilidade. No homem, estas áreas ocupam um território muito extenso, conforme demonstrado a seguir:

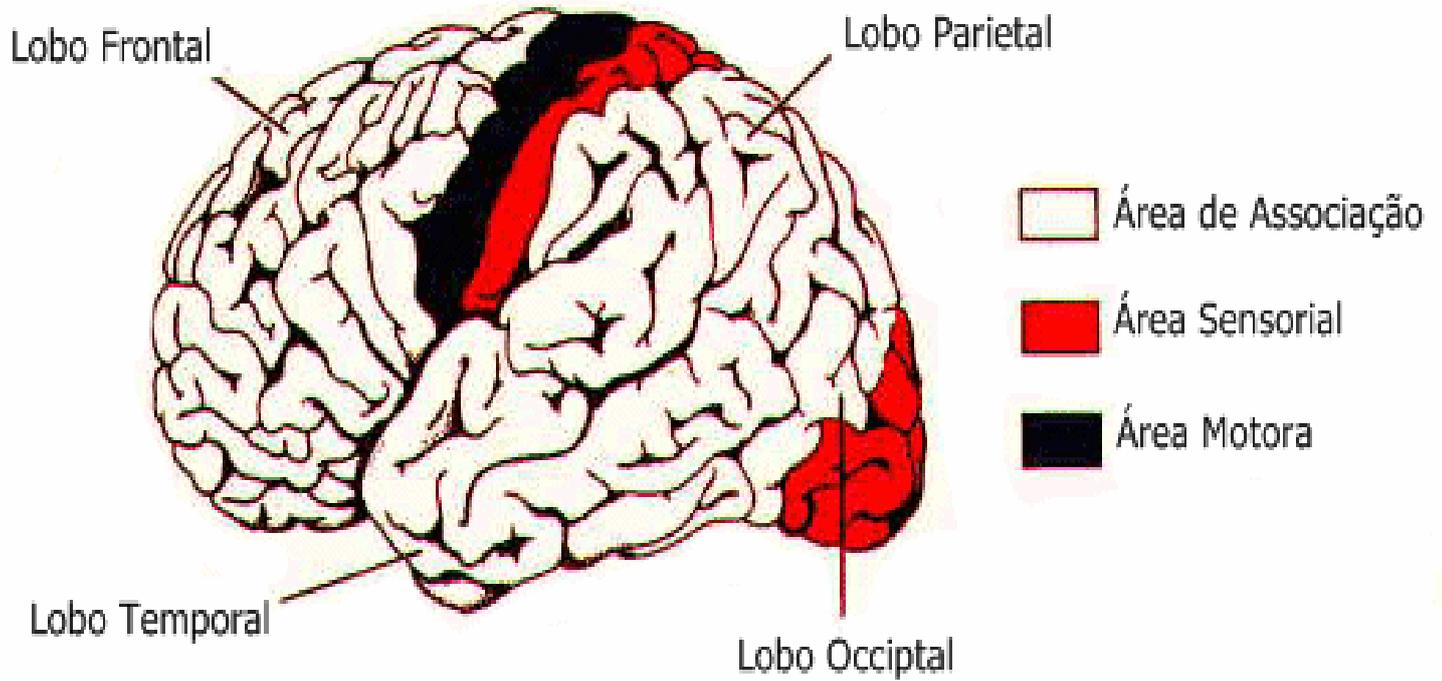


Figura 1. Representação esquemática das áreas motoras, sensoriais e de associação, localizadas no córtex cerebral. Adaptado de COSTA, 2000.

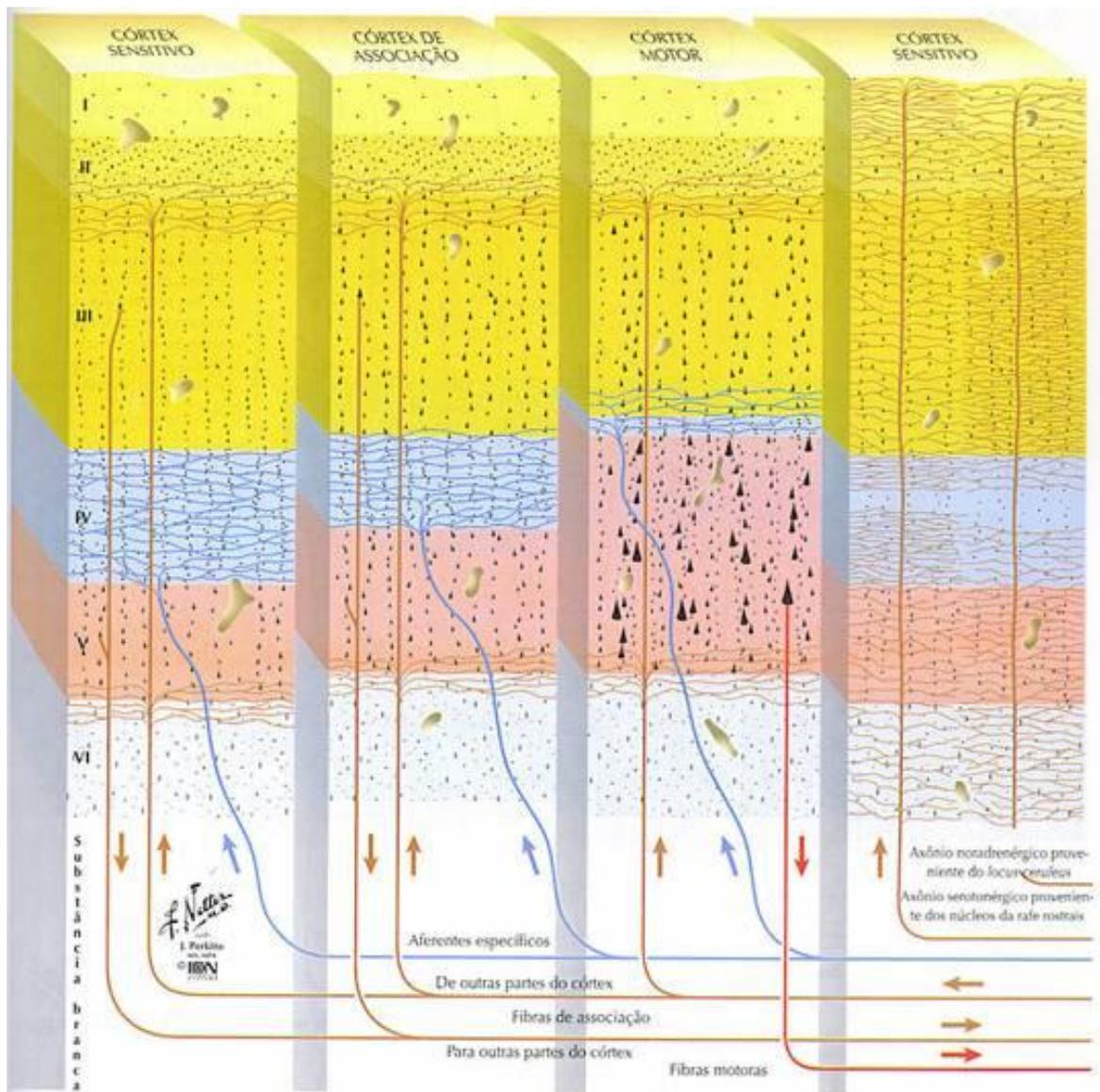


Figura 2. Representação esquemática das camadas corticais; Adaptado de NETTER, 2009.

Historicamente, sempre se associou o aumento na capacidade cognitiva a um aumento volumétrico na massa encefálica, culminando com a fundação, em 1889, da American Anthropometric Society, que tinha a proposta de avaliar, mensurar e pesar o encéfalo de seus membros, em geral pessoas notáveis

das artes, ciências, política, música e literatura, obtendo grande disparidade entre os extremos (680 g e 2,400 g) sendo que mesmo em um encéfalo com cerca de 50% menos de massa, pouco ou nenhum significado existe em relação a inteligência (DEFELIPE, 2006), confirmando a hipótese de que as características quantitativas e qualitativas das conexões entre os neurônios, sua maturação, aspectos moleculares, fisiológicos e bioquímicos, características genéticas, além da interação com o meio ambiente têm um grau de importância mais efetivo. Apesar disso, a espessura do neocórtex varia muito pouco mesmo em espécies diferentes, assim como a quantidade de neurônios em cada camada, que permanece aproximadamente constante entre as espécies (ELSTON, 2007).

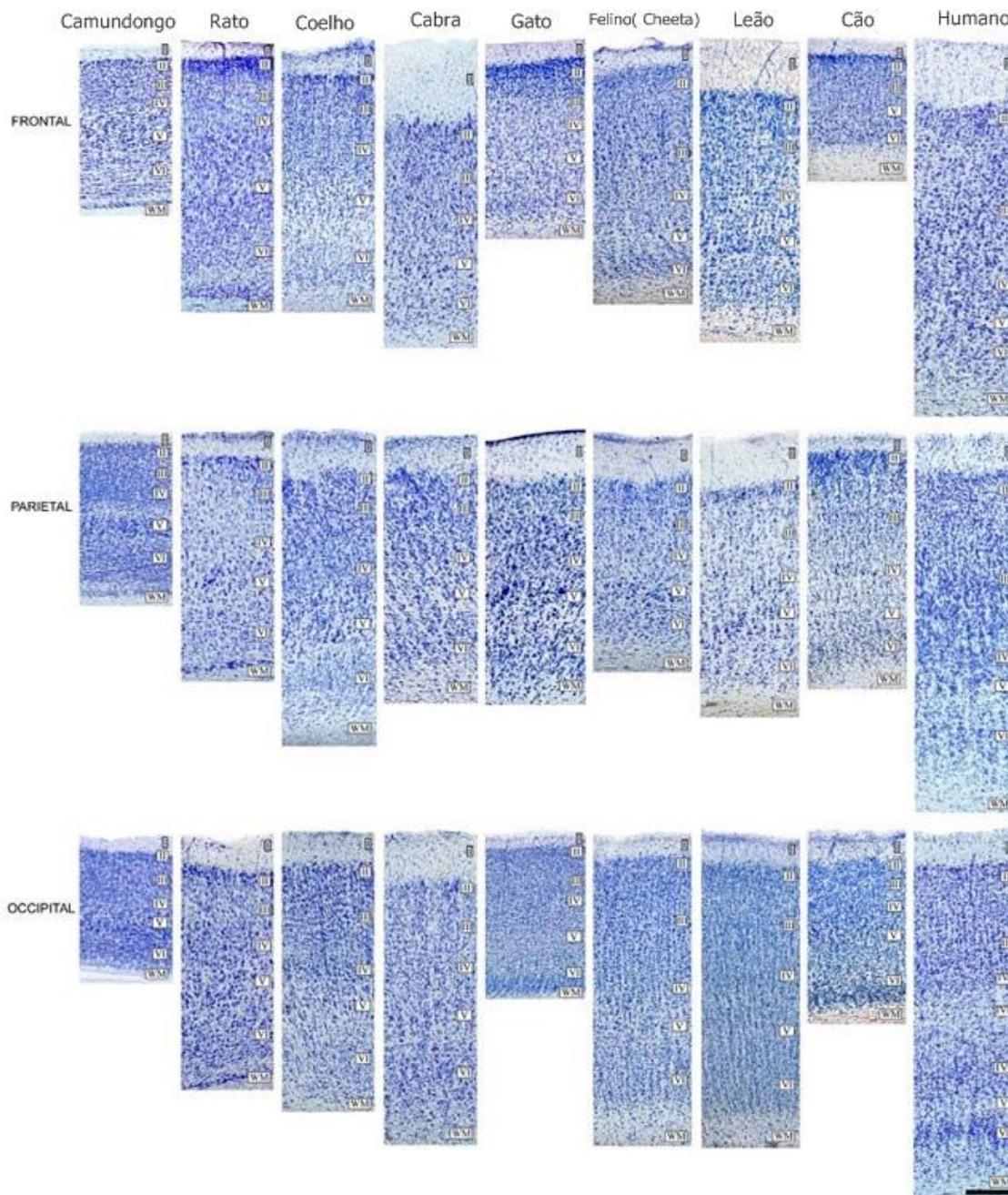


Figura 3. Diferenças citoarquitetônicas do córtex de mamíferos. Fotomicrografias de lâminas de 100 μm coradas pela técnica de Nissl demonstrando as diferenças entre áreas corticais frontal, parietal e occipital de humanos e outros mamíferos. Escala 250 μm . Adaptado de DEFELIPE,2011b.

Como citado anteriormente, a célula piramidal é o elemento mais abundante no córtex de mamíferos. Elas são a maior fonte de sinapses excitatórias extrínsecas e suas espinhas dendríticas os maiores alvos de conexões excitatórias pós-sinápticas(ELSTON, 2011). Como demonstrado anteriormente (ELSTON 2002,2003), diferenças no tamanho, complexidade, densidade de espinhos e arborização dendrítica podem influenciar em vários aspectos do funcionamento em nível celular, sub celular e em níveis de sistemas. Exemplificando, diferenças na arborização dendrítica podem influenciar na geometria do neurônio e na relação topográfica de recepção de aferências. Diferenças no diâmetro e na quantidade total de dendritos afetam as propriedades eletrotônicas celulares. Diferenças na densidade e na distribuição das aferências pela árvore dendrítica, assim como sua distribuição espacial são importantes, pois afetam primariamente a capacidade funcional do neurônio. Sendo assim, funções descritas como, por exemplo, planejamento, definição de prioridades e contextualização são extremamente dependentes do fenótipo das células piramidais (ELSTON, 2007).

1.2 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é definido como uma série de condições patológicas causadas pela oclusão ou rompimento de vasos sanguíneos que irrigam o cérebro (LO, DALKARA e MOSKOWITZ, 2003). O AVE isquêmico, causado pela diminuição de fluxo sanguíneo decorrente da oclusão de um vaso encefálico, é a ocorrência mais comum, mas a ausência de fluxo sanguíneo para o encéfalo como um todo, após parada cardíaca, também é considerado AVE (ALBERTS et al, 2011). Doenças neurodegenerativas agudas, como AVE, o trauma encefálico e da medula espinhal são a terceira causa mais freqüente de morte no mundo ocidental, perdendo apenas para o câncer e doenças cardíacas (KRAUS e MCARTHUR, 1996; KRAUS et al., 1984). Nos Estados Unidos da América (EUA) existem cerca de 3,5 milhões de pessoas com seqüelas neurológicas oriundas de AVE, que continua sendo a principal causa de déficits funcionais (DURUKAN e TATLISUMAK ,2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil é o sexto país com maior índice de desordens neurais agudas. Desde a década de 60, a morbidade por doenças cerebrais e cardíacas suplantou a de mortes por doenças infecciosas, sendo a maior incidência da América latina (LOTUFO, 2005a; LOTUFO, 2005b; LOTUFO e BENSENOR, 2007). Estima-se que o número de brasileiros com 60 anos ou mais acometidos por AVE exceda em mais de 100% o número atual de 16,5 milhões de pessoas (OMS, 2007) até 2025, atingindo o número de 34,5 milhões, equivalendo a 15,1% da população. Tal dimensão significativa de idosos, com tendência sempre crescente, mostra a necessidade e a importância de estudos específicos para este grupo etário, incluindo novas terapias através de abordagens experimentais para a elaboração de ensaios clínicos que possam contribuir para a

melhoria da qualidade de vida de pessoas acometidas por desordens neurais agudas (SESHADRI et al., 2006).

1.3 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O AVE isquêmico possui alguns fatores de risco similares aos que predispõe ao infarto do miocárdio, tais como: diabetes, hipertensão, aterosclerose e dislipidemias (Síndrome Metabólica), níveis sanguíneos elevados de homocisteína e fatores genéticos, por exemplo, polimorfismos de certos genes como o da sintase do óxido nítrico (NOS, do inglês nitric oxide synthase) endotelial, apolipoproteína E beta fibrinogênio (LO, DALKARA e MOSKOWITZ, 2003). A prevenção continua sendo o fator mais importante em diminuir o risco de AVE, embora drogas como os inibidores das enzimas conversoras de angiotensina, diuréticos e estatinas também possam diminuir esse risco (YUSUF, 2002). Mesmo com o relevante impacto epidemiológico e clínico, apenas um tratamento farmacológico utilizando o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (tissue plasminogen activator – tPA) foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), embora este tratamento não beneficie a maioria dos pacientes, além de apresentar graves efeitos colaterais, incluindo o risco de indução de acidente vascular encefálico hemorrágico durante tratamentos prolongados (GILMAN, 2006; LEES e DAWSON, 2007).

Os eventos fisiopatológicos associados com o AVE e outras doenças neurodegenerativas agudas são extremamente complexos e envolvem diversos mecanismos que perduram por horas e até mesmo vários dias (PETTY e WETTSTEIN, 1999).

Após oclusão permanente ou transitória de um vaso sanguíneo no encéfalo, a parte mais afetada com a redução rápida de fluxo sanguíneo será o

centro do território de vascularização do vaso, com diminuição subsequente dos níveis de ATP, falência metabólica, alterações iônicas e morte celular em questões de minutos (LIPTON, 1999; LO, DALKARA e MOSKOWITZ, 2003; YUSUF, 2002). A região periférica do território de vascularização apresenta-se, inicialmente, mais viável devido à vascularização colateral. Do ponto de vista morfológico podemos distinguir duas regiões distintas e bem delimitadas: o centro isquêmico e a região peri infarto ou penumbra isquêmica (FIGURA 4) ,cujas manifestações clínicas dependem da extensão, gravidade e principalmente da janela temporal envolvida até a reperfusão.

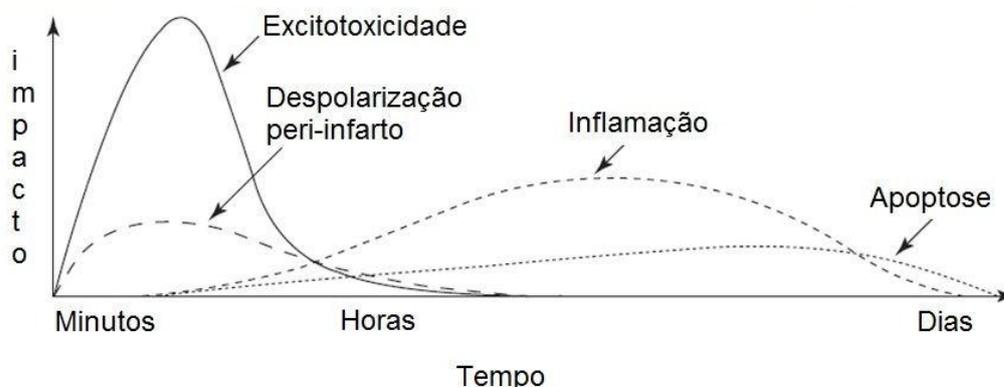


Figura 4. Cascata dos eventos prejudiciais em uma isquemia cerebral, minutos após o início do evento isquêmico. Mecanismos excitatórios podem prejudicar neurônios e as células gliais e a excitotoxicidade desencadeia os eventos da despolarização periinfarto, a resposta inflamatória e os mecanismos de morte celular programada. Adaptado de DIRNAGL et al, 1999.

Nestas regiões, ocorrem diferentes tipos de morte celular, incluindo necrose e apoptose (GREEN, 2003). Os principais mecanismos patológicos da lesão isquêmica são complexos e incluem a falência da barreira hematoencefálica, disfunção iônica com perda da homeostase celular, excitotoxicidade, estresse

oxidativo com toxicidade mediada pela formação de radicais livres e derivados do ácido araquidônico, resposta inflamatória, depressão alastrante (DURUKAN et al. 2007) e morte celular programada ou apoptose (ARUMUGAN, GRANGER E MATTSON, 2005; GINSBERG et al., 1999; MEAIRS et al., 2006; PRASS et al., 2007; WANG et al, 2007). Estes eventos patológicos induzem lesão no centro isquêmico, e depois na região peri-infarto nos tempos mais tardios, através de um mecanismo conhecido como degeneração secundária (DE KEYSER et al.,1999). Este fenômeno patológico consiste em eventos que podem atingir células inicialmente ilesas ou que foram afetadas apenas parcialmente pela anóxia ou hipóxia. Mesmos neurônios e axônios que são apenas parcialmente afetados pela isquemia podem degenerar tardiamente se não forem submetidos a intervenções neuroprotetoras ou quando o evento infamatório não for modulado adequadamente (TATOR e FEHLINGS, 1991).

Horas após a ocorrência do AVE, o que também é válido tanto para trauma cerebral (encefálico) quanto medular, ocorre uma expansão da área de lesão para a penumbra isquêmica, o que agrava o prognóstico neurológico (LO, DALKARA E MOSKOWITZ, 2003). O comprometimento funcional da área de penumbra isquêmica envolve mecanismos patológicos secundários, que são detectáveis imediatamente após a lesão inicial (FIGURA 5.)

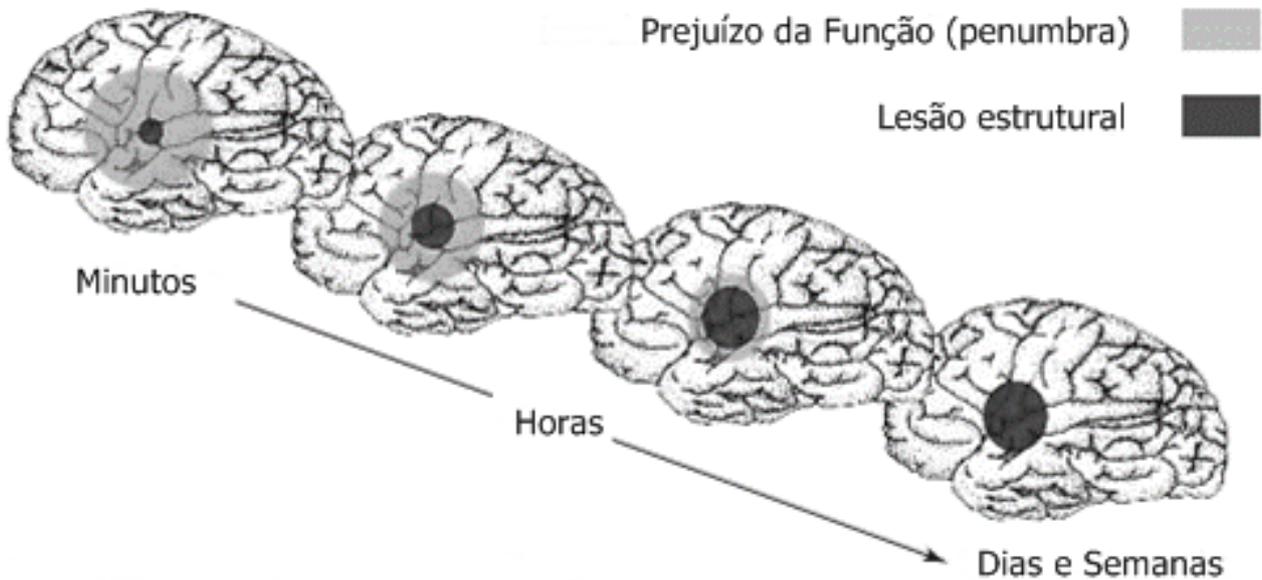


Figura 5. Representação esquemática do avanço da neurodegeneração na zona de penumbra. Com o avanço da isquemia a lesão inicial se expande em direção à área de penumbra isquêmica agravando os déficits energéticos e induzindo morte celular por necrose e apoptose. Adaptado de (DIRNAGL *et al*, 1999).

A excitotoxicidade é um dos componentes mais importantes na promoção da degeneração secundária. O termo foi proposto originalmente por Olney (1990) para se referir à propriedade do glutamato e seus agonistas em causar morte neuronal. Os mecanismos básicos de ação excitotóxica foram estabelecidos ainda na década de 70 (OLNEY *et al.*, 1974). A liberação do glutamato causa intumescimento (edema) agudo de corpo celular e dendritos em cerca de 30 minutos, seguido por degeneração de organelas intracelulares e picnose nuclear. Na

fase final do processo degenerativo, ocorrem necrose e fagocitose dos detritos celulares por macrófagos (CHOI, 1992; MELDRUM, 2000; OLNEY, 1990).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de vertebrados (MELDRUM, 2000), agindo em três tipos principais de receptores ionotrópicos: N-Metil-D-Aspartato (NMDA), Kainato e α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-ácido isoxazolpropiónico (AMPA). Neurônios glutamatérgicos perfazem cerca de 80% da população total de neurônios excitatórios do córtex cerebral (SOMOGYI et al., 1998), indicando a importância deste aminoácido excitatório para a fisiologia do Sistema Nervoso Central. As concentrações de glutamato, tanto no meio extracelular como na fenda sináptica, são rigorosamente controladas por mecanismos envolvendo enzimas e proteínas transportadoras em neurônios e células gliais (DANBOLT, 2001). Em algumas condições patológicas, tais como o estado epiléptico, isquemia e lesão traumática do encéfalo, estes mecanismos são ineficazes em manter as concentrações fisiológicas de glutamato no tecido nervoso e os níveis podem elevar-se, excessiva e perigosamente, induzindo morte celular por excitotoxicidade (CHOI, 1988; 1994; MELDRUM, 2000).

Apesar do seu papel neuropatológico, o glutamato é imprescindível em processos fisiológicos neurais como aprendizado e aquisição de novas memórias, o que pode ser comprovado pelo seu grande uso nas sinapses químicas do hipocampo e do cerebelo. A sua concentração na fenda sináptica precisa ser continuamente controlada, por pelo menos cinco variedades de ATPases no SNC de mamíferos. Duas destas enzimas são presentes nas células gliais e o restante em neurônios (MELDRUM, 1994). As concentrações das ATPases são várias vezes maiores que aquelas dos receptores AMPA e NMDA possibilitando, uma remoção rápida, contínua e segura de aminoácidos excitatórios, o que previne a

excitotoxicidade (SEAL e AMARA, 1999). As áreas de maior densidade sináptica química são mais suscetíveis à isquemia, o que evidencia claramente o potencial deletério da disfunção glutamatérgica em uma desordem neural aguda (PULSINELLI, BRIERLEY e PLUM, 1982).

Neurônios corticais em cultura, expostos a concentrações patológicas de glutamato ou seus agonistas (NMDA, por exemplo), apresentam dois padrões lesivos diferentes: uma fase inicial, caracterizada por edema neuronal intenso (minutos após exposição à toxina) e uma fase tardia, caracterizada por morte neuronal, que ocorre horas após a exposição ao neurotóxico. Foi demonstrado que o primeiro componente é dependente da presença de Na^+ e Cl^- no meio de cultura e que seus efeitos também ocorrem pela ação de agentes despolarizantes, como o K^+ (CHOI, 1992; ROTHMAN e OLNEY, 1986). Este primeiro componente é reversível, à medida que a maior parte das células pode recuperar o equilíbrio osmótico sem chegar à segunda fase.

A segunda fase dos efeitos neurotóxicos do glutamato induz morte neuronal tardia e é dependente de Ca^{++} (CHOI, 1985), pois o influxo excessivo de Ca^{++} inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares que resultam em lesão tecidual (CHOI, 1992). Estes eventos podem envolver ativação de enzimas proteolíticas (catepsinas, calpaínas, fosfolipases, endonucleases) que degradam as proteínas do citoesqueleto (por exemplo, actina e espectrina) e/ou proteínas da matriz extracelular como a laminina (LO, DALKARA E MOSKOWITZ, 2003; WANG et al., 2007).

A formação excessiva de radicais livres durante alterações patológicas do SNC como o AVE, é um mecanismo fundamental de degeneração secundária de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas (LEWEN et al., 2000; LO, DALKARA

E MOSKOWITZ, 2003; LOVE, 1999). Os mecanismos de excitotoxicidade, disfunção iônica e estresse oxidativo parecem agir em consonância durante o desenrolar do processo neuropatológico (ATLANTE et al., 2001; LEWEN et al., 2000; LO, DALKARA E MOSKOWITZ, 2003; LOVE, 1999). Moléculas reativas derivadas de oxigênio podem induzir peroxidação lipídica, formação de radicais livres e alterações na conformação da funcionalidade da membrana celular, o que provoca edema intracelular e promove liberação de glutamato (AGRAWAL et al., 2000; LEWEN et al., 2000). Acredita-se que o NO pode reagir com o ânion superóxido para produzir peroxinitrito, o que leva a formação de radicais livres potentes como o radical hidroxila (LIPTON e STAMLER, 1994). Estes autores acreditam que a produção de NO é um passo importante nos mecanismos de neurotoxicidade do glutamato.

Muitas doenças do SNC envolvem inflamação e esta pode ser a causa de dano tecidual como ocorre na esclerose múltipla, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, lesão do encéfalo e medula espinhal, além de AVE (ESIRI, 2007; LUCAS, ROTHWELL e GIBSON, 2006), mas pode possuir efeitos benéficos (SCHWARTZ, BUTOVSKY E KIPNIS., 2006; SCHWARTZ e YOLE, 2006).

O papel da resposta inflamatória durante doenças do SNC ainda é controverso, mas existem evidências que demonstram que a resposta inflamatória possui tantos efeitos deletérios (BANATI et al., 1993; BLIGHT, 1994; GIULIAN, VACA e CORPUZ, 1993; GIULIAN, VACA e NOONAN, 1990; GOMES-LEAL et al., 2005; MONJE, TODA e PALMER, 2003; POPOVICH et al., 1999), quanto benéficos, relacionados principalmente a produção de fatores tróficos e fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento derivado de fibroblastos (BDNF), nas fases

iniciais da inflamação (BUTOVSKY et al., 2005; KNOLLER et al., 2005; LAZAROV-SPIEGLER et al., 1996; RAPALINO et al., 1998).

Após lesão neural aguda, experimental ou em seres humanos, ocorre uma resposta inflamatória caracterizada por recrutamento de neutrófilos e linfócitos em uma fase inicial e intensa ativação microglial/macrofágica em fases mais tardias (ARUMUGAM, GRANGER E MATTSON, 2005; WANG et al., 2007).

Foi demonstrado que o tratamento com a minociclina, uma tetraciclina de quarta geração, reduz a morte tardia de oligodendrócitos, impede lesão axonal retrógrada e melhora o prognóstico neurológico de ratos submetidos à lesão aguda da medula espinhal (LEE et al., 2003; STIRLING et al., 2004). A minociclina também possui efeito neuroprotetor em modelos de isquemia focal no cérebro de ratos (YRJANHEIKKI et al., 1999).

Foi demonstrado experimentalmente, que o uso de altas doses de metilprednisolona, um antiinflamatório esteróide, melhora a capacidade de recuperação motora e diminui a área de lesão em ratos submetidos à lesão aguda da medula espinhal (BRACKEN, 2001; BRACKEN e HOLFORD, 2002).

Com relação ao AVE, a única abordagem terapêutica aprovada pela FDA para uso em humanos, é a lise do trombo pela aplicação, até 3h após o evento, do ativador de plasminogênio tecidual recombinante ou tPA (DEWAR et al, 1999). A aplicação tardia desta substância (mais de 3h após o AVE) pode induzir transformação hemorrágica, o que agrava demasiadamente o prognóstico neurológico e um aumento considerável da área isquêmica para a penumbra (LO,DALKARA E MOSKOWITZ , 2003). Inúmeras abordagens terapêuticas possíveis para o AVE estão sendo testadas em modelos experimentais, entre as quais o uso de inibidores de estresse oxidativo, antagonistas de receptores

glutamatérgicos, inibidores de metaloproteinases, de moléculas de adesão celular, hipotermia, inibidores da NOS imunológica (NOSi), agonistas de GABA, fatores neurotróficos, e inibidores de caspase (SMITH, 2005). Se aplicadas individualmente, estas abordagens não apresentam sucesso para indução de neuroproteção, o que sugere que abordagens múltiplas, utilizando os efeitos sinérgicos de diversas abordagens terapêuticas individuais, podem mais facilmente lograr êxito em promover neuroproteção (LO, DALKARA E MOSKOWITZ, 2003).

1.4 MODELO DE INDUÇÃO ISQUÊMICA EXPERIMENTAL COM USO DE ENDOTELINA-1

Doenças neurodegenerativas agudas possuem elevados índices de incidência em diversos países do mundo, incluindo o Brasil. Pesquisas translacionais, onde os resultados experimentais podem gerar ensaios clínicos, são as principais fontes de novas abordagens terapêuticas para as doenças neurodegenerativas agudas e crônicas. Na neuropatologia experimental clássica, sempre se privilegiou o estudo dos mecanismos de lesão do corpo celular das células afetadas. Apesar deste fato, não existe registro de trabalhos na literatura que tenham investigado de forma sistemática a neuropatologia da substância cinzenta através de modelos experimentais isquêmicos e excitotóxicos. O objetivo principal do presente projeto é contribuir para remediar este problema, utilizando uma técnica de lesão isquêmica focal, dirigida a um alvo específico. Este projeto apresenta-se em nítido contraste a outros estudos anteriores utilizando técnicas tradicionais de oclusão vascular (cauterização, êmbolo da artéria cerebral média), que possuem características difusas devido ao fato de que todo o trajeto vascular é afetado,

aumentando sobremaneira as áreas de penumbra no tecido nervoso (MERGENTHALER,DIRNAGL e MEISEL ,2004).

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo com 21 aminoácidos, derivado de células do endotélio vascular que atua sobre a musculatura lisa vascular promovendo um poderoso efeito vasoconstritor (HENRY, 1999; HUNLEY e KON, 2001). Fisiologicamente, pouco é conhecido sobre o papel da ET-1, mas acredita-se que esteja envolvida na sinalização para proliferação celular, formação de elementos constituintes da fibrose tecidual, modulação do tônus vascular (pressão arterial) e resposta inflamatória (HUNLEY e KON, 2001; MOTTE et al., 2006).

A síntese de ET-1 ocorre em diferentes órgãos, incluindo: coração, pulmão, cérebro e algumas células imunes, sendo a principal fonte deste peptídeo, o endotélio vascular. A ET-1 é a isoforma que apresenta maior importância clínica (MOTTE,MCENTEE E NAEIJE, 2006). Os efeitos vasoconstritores da ET-1 são antagonizados pela ação vasodilatadora de prostaciclina e, principalmente, do NO (HUNLEY e KON, 2001; MOTTE,MCENTEE E NAEIJE, 2006).

O potente efeito constritor da ET-1, no tecido nervoso, induz infarto local e déficits neurológicos (GUPTA et al., 2005). Microinjeções de ET-1 no parênquima nervoso são, portanto, modelos experimentais confiáveis e reproduzíveis de isquemia focal transitória (FUXE et al., 1989; AGNATI et al., 1991; HUGHES et al., 2003).

1.5 HIPÓTESE E O PARADIGMA EXPERIMENTAL

Neste estudo, investigaram-se os padrões de comprometimento histopatológico dos diversos componentes da substância cinzenta em um modelo previamente estabelecido de isquemia experimental. Induziu-se isquemia focal através de microinjeções de endotelina-1, o qual se demonstrou recentemente induzir cerca de 60% de redução do fluxo sanguíneo após injeção de cerca de 10 pMoles desta substância no córtex e regiões subcorticais de ratos adultos (HUGHES et al., 2003). Além disso, foi demonstrado previamente que a endotelina-1 contribui para a lesão isquêmica por seu potente efeito vasoconstritor, culminando em uma série de eventos patológicos, entre os quais a liberação de aminoácidos excitatórios como o glutamato, apesar de o peptídeo não ser considerado neurotóxico em sua essência (DURUKAN e TATLISUMAK, 2007)

Inexistem estudos que tenham investigado de forma sistemática, utilizando padrões lesivos comparáveis, o padrão de degeneração de diferentes regiões corticais do SNC submetidos a uma mesma situação patológica. Investigamos a hipótese de que, dependendo da área cortical, se granular, agranular ou de associação, os padrões neuropatológicos apresentam características peculiares, relacionadas ao padrão diferencial de circuitos neurais daquela região específica e aos aspectos diferenciais dos mecanismos envolvidos.

Neste estudo, demos ênfase à avaliação histopatológica da lesão neural em seus diversos componentes, tais como ativação microglial, marcação de macrófagos e astrócitos. Investigamos sistematicamente, o papel da resposta inflamatória utilizando diversas técnicas imunohistoquímicas e histológicas. As técnicas imunohistoquímicas utilizadas e os modelos experimentais propostos foram testados e implementados em estudos anteriores de nosso grupo, ou de nossos

colaboradores (DOS SANTOS et al, 2007; GOMES-LEAL et al., 2002 , 2004 e 2005; HUGHES et al., 2003; SOUZA –RODRIGUES et al, 2008).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Comparar o padrão de degeneração isquêmica em três regiões corticais, citoarquiteticamente distintas, de ratos adultos: córtex somestésico, córtex motor e córtex associativo.

1.6.2 Objetivos Específicos

1.6.2.1 Estabelecer o padrão temporal de evolução da lesão isquêmica em diferentes áreas corticais;

1.6.2.2 Investigar se lesões isquêmicas localizadas em áreas corticais com estrutura citoarquitetônica distinta resultam na mesma seqüência de eventos patológicos;

1.6.2.3 Investigar quantitativamente o padrão de perda neuronal, microgliose e astrocitose em diferentes áreas corticais após isquemia focal induzida por microinjeções de endotelina-1;

1.6.2.4 Estabelecer a base dos eventos neuropatológicos para estudos futuros que visem a implementação de procedimentos terapêuticos e/ou neuroprotetores.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Considerações Gerais Sobre O Modelo Experimental Utilizado

Em estudos prévios de membros de nosso laboratório, determinamos o modelo experimental utilizado na presente investigação (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al., 2012). Usamos os efeitos vaso constritores da endotelina-1 para induzir isquemia focal em ratos de acordo com modelo experimental estabelecido por Hughes et al. (2003) e adaptado por nosso grupo (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008; FRANCO et al., 2012) .

2.2 Procedimentos Cirúrgicos e Método de Injeção de Endotelina-1

De forma resumida, ratos adultos machos da linhagem *Wistar* ($n=5$ por tempo de sobrevivência/grupo experimental, sendo 3 animais controle), perfazendo um total de 72 animais, com peso aproximado entre 270-300 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, foram utilizados no presente estudo. Os animais foram profundamente anestesiados com injeção intra-peritoneal de uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, Konig, 72 mg/kg, i.p.) e Cloridrato de Xilazina (Kenzol®, Konig, 9 mg/kg, i.p.). Os reflexos corneano e de retirada da pata foram testados antes de os mesmos serem posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil). A estereotaxia foi implementada somente quando estes reflexos forem abolidos pela anestesia. Uma manta térmica foi utilizada para manter a temperatura corpórea do animal durante o procedimento cirúrgico. A referida temperatura foi monitorada com um pequeno termômetro clínico retal. Todas as coordenadas estereotáxicas foram obtidas de **Paxinos, 1982**, assim descritas:

	DORSO- VENTRAL	ANTERO- POSTERIOR	MÉDIO- LATERAL
CORTEX MOTOR	+0,3	+1,7	+2.6
CORTEX SOMESTÉSICO	+0,3	+1,3	+4,5
CORTEX ASSOCIATIVO	+0,3	+1,7	+1,0

Figura 6. Tabela de descrição das coordenadas estereotáxicas utilizadas.

Após o estabelecimento da área de injeção, uma pequena abertura foi feita no crânio do animal, com auxílio de uma broca odontológica esférica estéril. Para a injeção do neurotóxico, a dura-máter foi removida do campo cirúrgico e uma micropipeta de vidro com ponta de 10-20 μm foi posicionada de acordo com as coordenadas estereotáxicas supracitadas, sendo que injetou-se, por pressão, a quantidade de 1 μl contendo 80 μmol de endotelina-1 no parênquima neural. Após a injeção, a micropipeta foi mantida estacionária por mais cinco minutos, antes de ser lentamente retirada do sítio de injeção para minimizar o refluxo do material. Nos animais controle, injetou-se o mesmo volume do diluente respeitando a mesma metodologia anteriormente descrita. A fim de marcar a área de lesão, uma pequena quantidade do corante azul de colanil foi adicionada tanto à solução contendo o neurotóxico como à solução controle. Este corante não induz alterações teciduais, pois possui efeito inócua ao tecido nervoso. Após a cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida à vontade durante os tempos de sobrevivência de 24h (1 dia), 72h (3 dias) e 168h (7 dias). 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-048-12.

2.3 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os animais foram perfundidos após os tempos de sobrevida relacionados. Foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, König, 72 mg/kg, i.p.) e Cloridrato de Xilazina (Kenzol®, König, 9 mg/kg, i.p.). Após a abolição dos reflexos de retirada da pata e corneano, foram perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com 500 ml de solução tampão fosfato salina 0,04 M heparinizada (1 ml de heparina para 1 litro de solução tampão) seguida de 500 ml de Paraformaldeído a 4% (VETEC). Os encéfalos foram retirados após craniotomia, pós-fixados durante 24 horas com a mesma solução e crioprotetidos, em gradientes de solução crioprotetora segundo o seguinte protocolo: crioprotetora a 25 % (30 minutos), a 50 % (4-6h), a 100 % (24-48h); em seguida, foram embebidos em *Tissue tek*, congelados em câmara de criostato com efeito Peltier (- 55 °C) e seccionados coronalmente em criostato (Microm® / modelo HM-505-E), em espessuras de 20 e 50 µm. As lâminas, montadas com 3 secções cada a 20 µm e 2 secções a 50 µm foram congeladas a -20° C até o processamento histológico adequado. De cada animal foram obtidas 4 lâminas com secção de 50 µm, intercaladas por outras 5 lâminas com secções de 20 µm sendo obtida inicialmente uma secção de 50 µm, indicando o início da área coletada, seguida das 5 lâminas com secções de 20 µm, e novamente obtendo-se uma de 50 µm sequencialmente, encerrando-se a coleta com

a última lâmina de 50 μm perfazendo toda a extensão rostro-caudal da lesão, sendo identificada pela presença do corante azul de colanil..

Todas as secções foram montadas, durante a microtomia, diretamente em lâminas previamente gelatinizadas e acondicionadas em estojo plástico. Para aumento da aderência das secções, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 h antes de qualquer outro procedimento histológico.

2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

2.4.1 Visualização da Area de Lesão

Para a visualização da área de lesão, utilizou-se a técnica de coloração pela violeta de cresila em secções com espessura de 50 μm . A zona de injeção de endotelina-1 pôde ser reconhecida pela presença do corante azul de colanil injetado com este peptídeo, ou pelo palor, ausência de corpos neuronais e/ou necrose tecidual induzidos pelo processo isquêmico ou excitotóxico.

2.4.2 Estudos Imunohistoquímicos

Com intuito de avaliarmos a participação glial e de células da resposta inflamatória aguda, realizou-se uma série de estudos imunohistoquímicos, utilizando os seguintes anticorpos:

Anti-ED1 (Serotec, 1:500): este anticorpo reconhece um epítopo na membrana de lisossomas no citoplasma de macrófagos/microglia ativados (DIJKSTRA et al., 1985);

Anti-GFAP (Dako, 1:1000): para o estudo de astrócitos, utilizar-se-á o anticorpo anti- proteína ácida fibrilar glial (do inglês, *glial fibrillary acid protein*, GFAP), um marcador clássico para estas células (GOMES-LEAL et al., 2004).

Anti-Iba1 (WAKO, 1:1000): este anticorpo reconhece uma proteína quelante de Ca^{++} presente no citoplasma microglial (ITO et al., 1998).

Nestes estudos, a reação imunoistoquímica foi realizada usando diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (marcando em marrom), protocolou-se de rotina em nosso laboratório (GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL et al. 2004,2005).

2.5 ANÁLISE QUALITATIVA

Todas as secções coradas pelos diferentes métodos histológicos e reações imunoistoquímicas foram inspecionadas em microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E200). Imagens de secções com campos mais ilustrativos, obtidas de animais perfundidos em todos os tempos de sobrevivência após a injeção de endotelina-1 e animais controle, foram obtidas com o uso de uma câmera digital (MOTICAM 2500) acoplada ao fotomicroscópio NIKON 50i.

2.6 ANÁLISE QUANTITATIVA

O número de macrófagos/microglia ativados e astrócitos foram contados com uso de uma gradícula de área de 0,0625 mm² acoplada à ocular de um microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E200) em objetiva de 40X. As contagens

foram realizadas nas regiões de maior densidade de células de acordo com o seguinte critério: 3 secções/animal/imunoistoquímica/tempo, no qual avaliou-se a área de lesão, sendo utilizados 4 campos /hemisfério para avaliar micróglia ativada (ANTI ED-1). As médias das contagens e os valores de erro padrão foram obtidos e plotados em função do tempo e distância.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com critério de correção a posteriori de Tukey para fazer a avaliação das diferenças entre os grupos controle e isquêmico, por tempo de sobrevivência, em cada análise imunoistoquímica. 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), utilizando o software GRAPHPAD PRISM® 6.0.

3.RESULTADOS

3.1. A INJEÇÃO DE ENDOTELINA 1 INDUZ PERDA TECIDUAL EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS

Os animais controle, injetados com solução salina estéril, não apresentaram resposta inflamatória, edema e perda de corpos celulares evidentes em todos os tempos de sobrevivência e em todas as áreas analisadas (Figura 7 A-D-G, Figura 8 A-D-G e Figura 9 A-D-G). Contudo, os animais do grupo isquêmico, que receberam ET-1, apresentaram infiltrado inflamatório e perda tecidual já observáveis ao primeiro dia (Figura 7 B-C, E-F, H-I), com aumento ao terceiro (Figura 8 B-C, E-F, H-I) e certa diminuição ao sétimo dia pós indução isquêmica (Figura 9 B-C, E-F, H-I) em todas as áreas analisadas. Houve perda tecidual progressiva nos tempos avaliados após a injeção de ET-1, em comparação aos animais controle (Figuras 7-9). Este evento patológico foi mais significativo no córtex somestésico, seguido pelos córtices motor e associativo (Figuras 7-9). Esta última região cortical, apresentou os menores danos teciduais, o que sugere ser menos suscetível ao processo isquêmico.

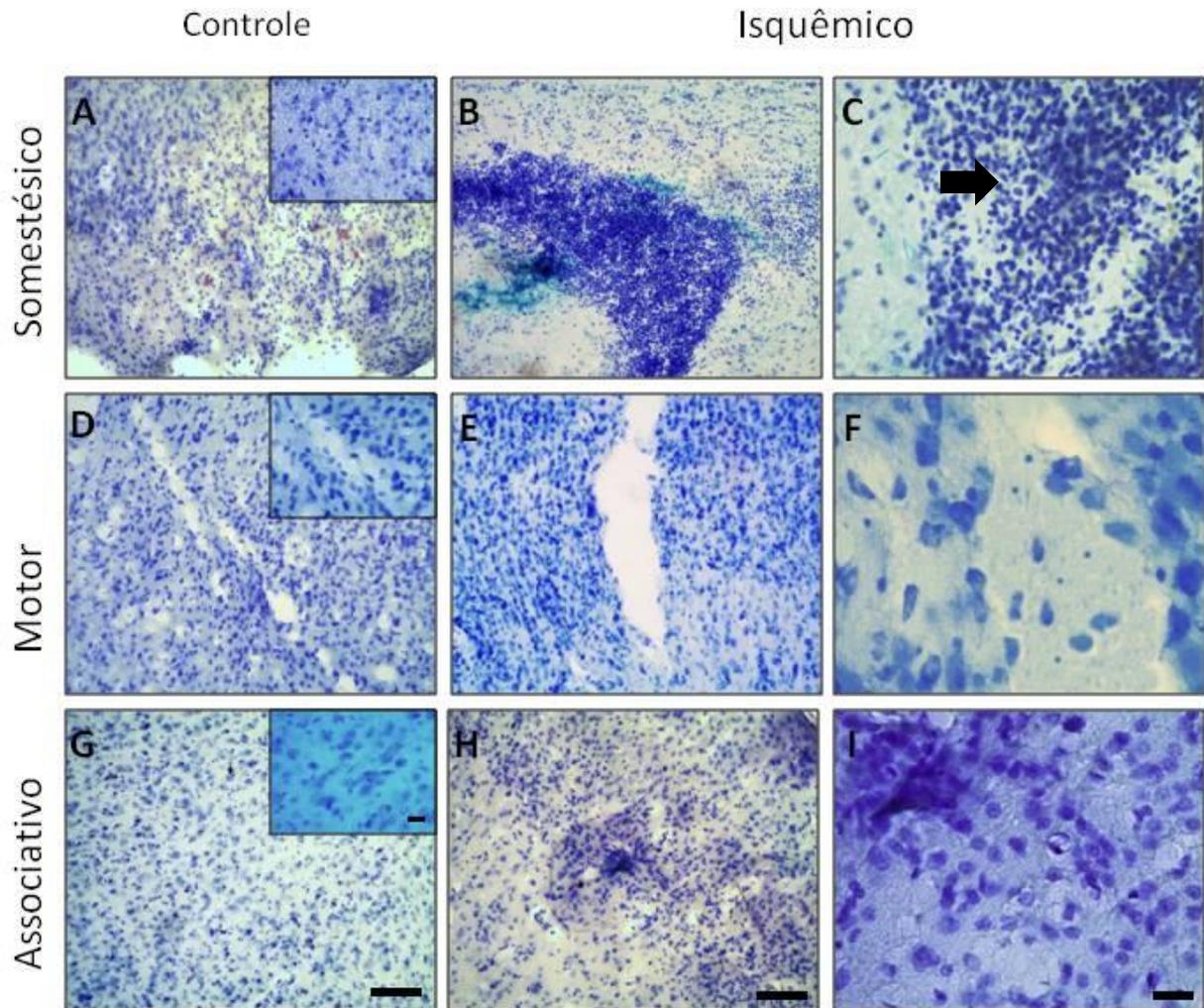


Figura 7. Análise histopatológica revelada pela coloração com violeta de cresila, 1 dia após a indução isquêmica. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), e associativo (H-I). Notar intenso infiltrado inflamatório no córtex somestésico (seta em C). Escalas: A,D,G (100 μ m); B, E, H (100 μ m); C,F,I (20 μ m).

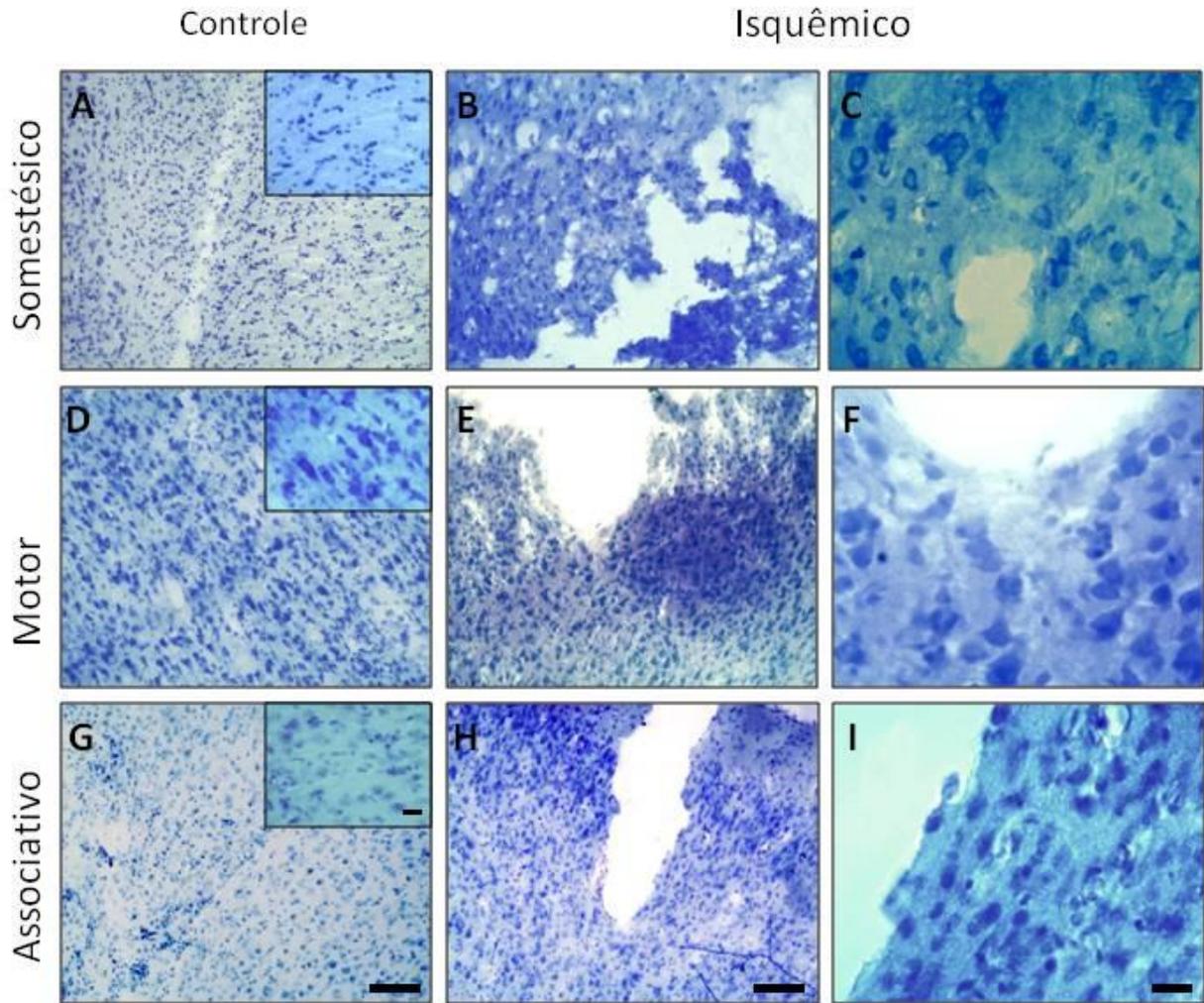


Figura 8. Análise histopatológica revelada pela coloração com violeta de cresila, 3 dias. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), e associativo (H-I). A, D, G: escala de 100 μm . B, E, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm

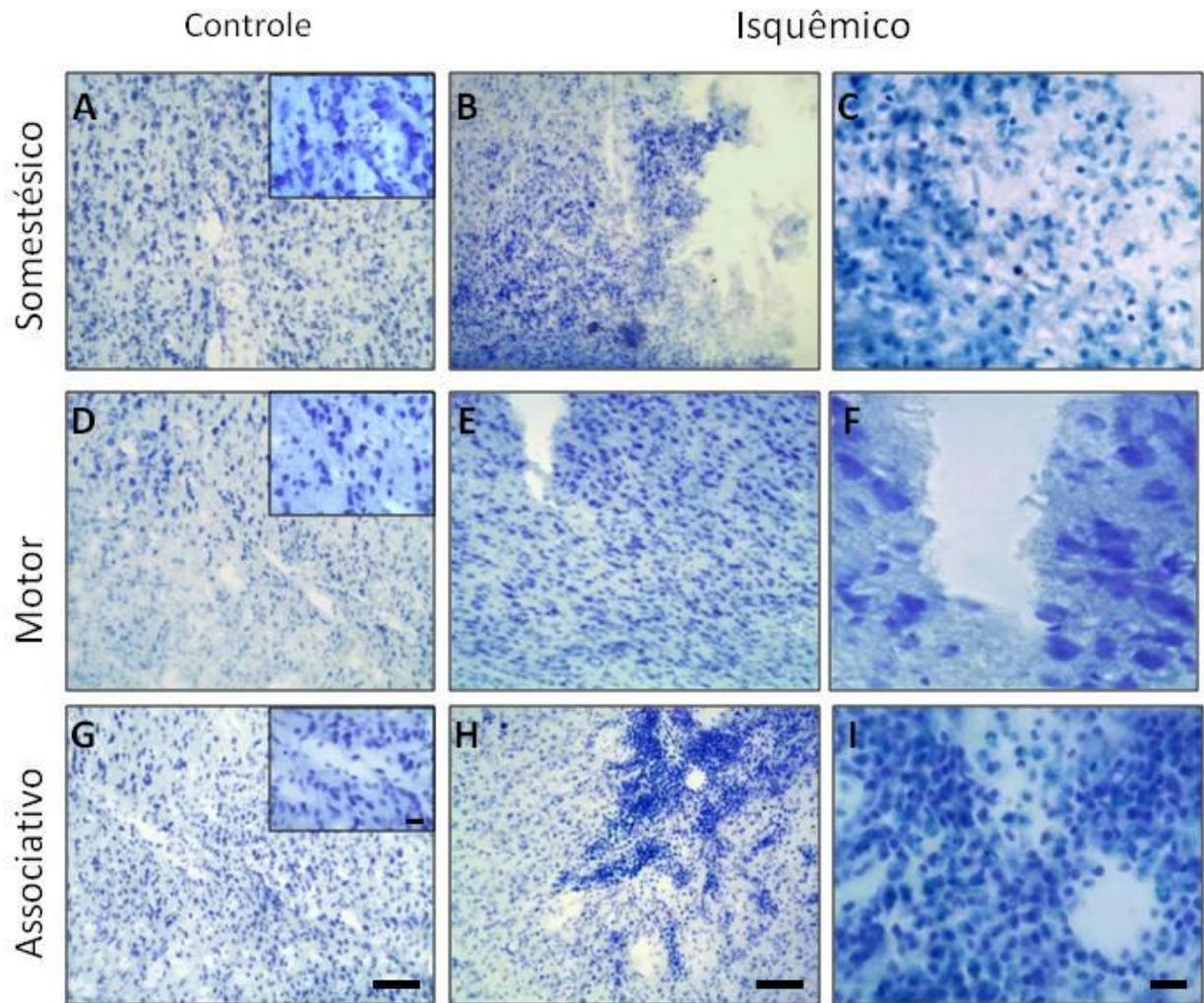


Figura 9. Análise histopatológica revelada pela coloração com violeta de cresila, 7 dias. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), e associativo (H-I). A, D,G,B,E,H: escala de 100 μm . C,F,I: escala de 20 μm

3.2 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM UM PADRÃO DIFERENCIAL DE ATIVAÇÃO MICROGLIAL EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS

A análise da ativação microglial foi realizada através das imunistoquímicas para Iba1, cujo anticorpo reconhece uma proteína quelante de Ca^{++} presente no citoplasma microglial (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 vascular) e macrófaga (fagocítica, residente e também a derivada de monócitos sanguíneos) (THORED et al., 2009). Nos animais controle, observou-se predominância do padrão ramificado, nos três tempos analisados e nas três áreas corticais investigadas (Figuras 10-12 A, D, G). Nos animais isquêmicos houve ativação microglial gradual e progressiva (microgliose) nos tempos de 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico (Figuras 10, 11 e 12), com pico aos 3 dias pós-isquemia (Figura 11). O padrão morfológico variou de acordo com o período e a região avaliada. Ao 1º dia, células microgliais ativadas foram observadas na região isquêmica de todas as regiões corticais (Figura 10). Ao 3º dia, observou-se uma predominância dos tipos amebóide e fagocítico (células arredondadas) (Figura 11), o que foi mantido ao 7º (Figura 12). Comparativamente, a intensidade da ativação microglial foi maior no córtex somestésico, seguido pelo córtex motor e córtex de associação (Figuras 11-12). Este padrão de reatividade microglial observado nas células Iba1+ foi similar ao observado pelas células ED1+ (marcador de microglia/macrófago ativados) (Figuras 13, 15 e 17) e confirmado por análise quantitativa (Figuras 14, 16 e 18).

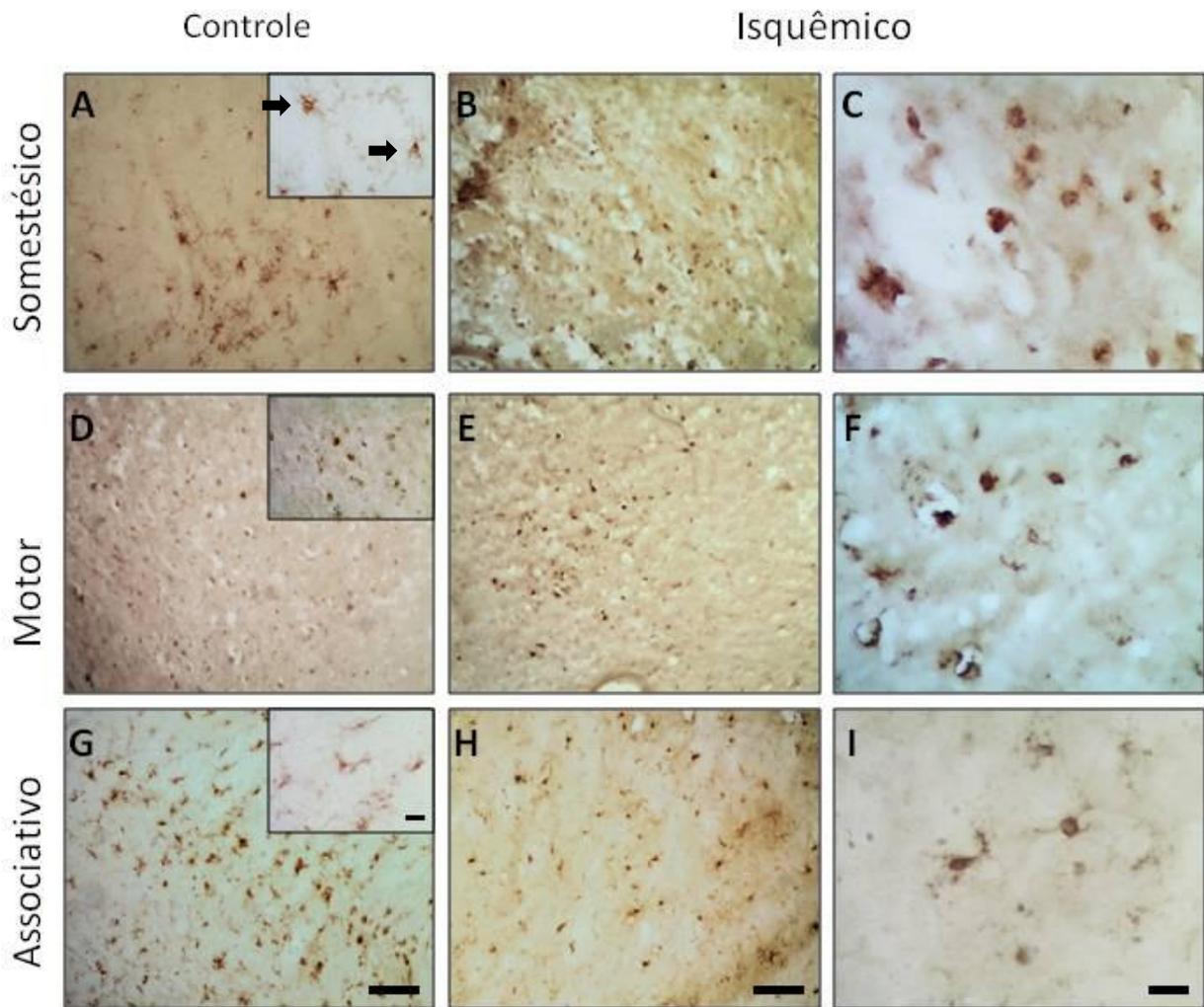


Figura 10. Análise imunohistoquímica para Iba1 em diferentes áreas corticais. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 1 dia após a indução isquêmica. Notar micróglia ramificada (seta em A). A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

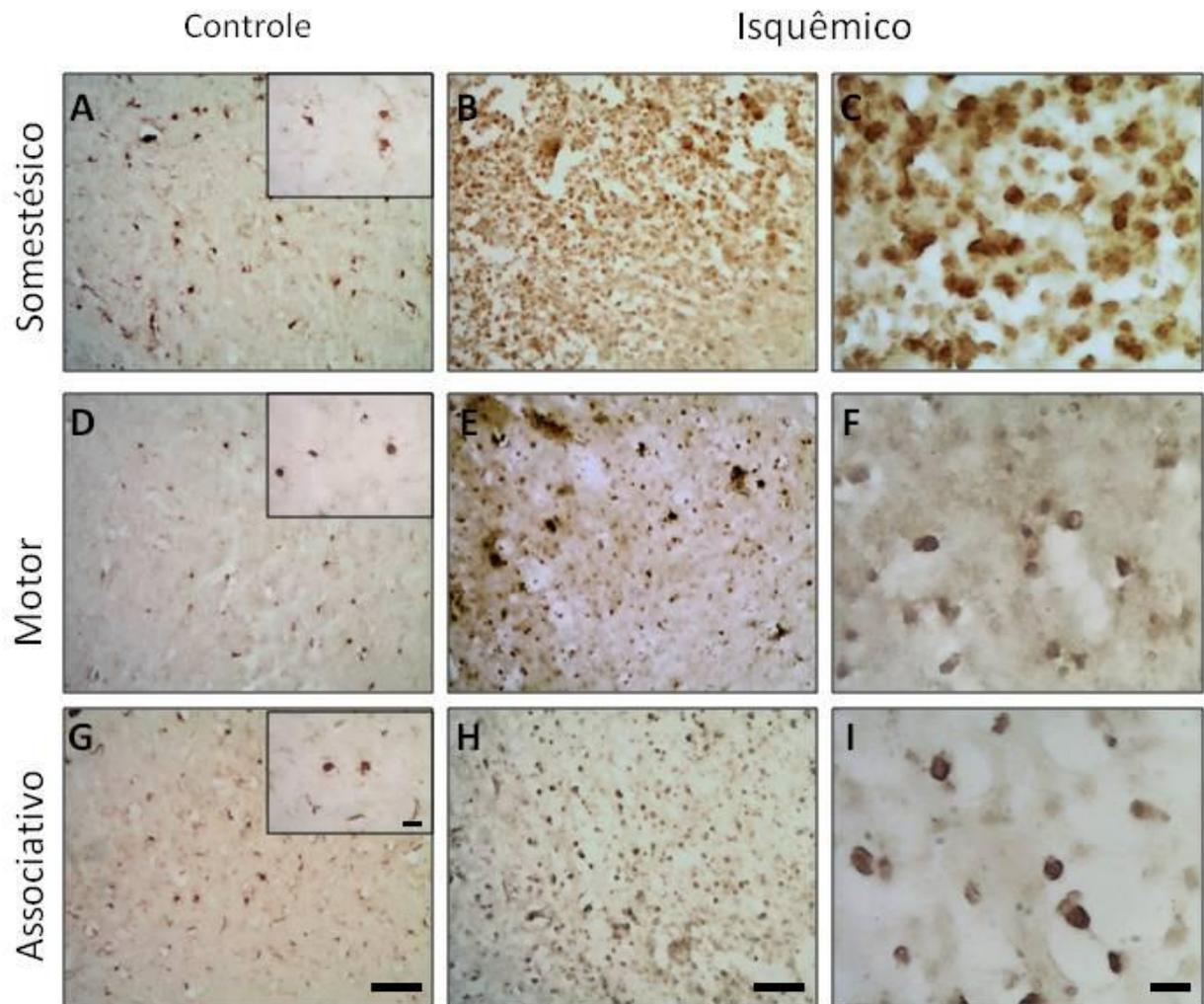


Figura 11. Análise imunistoquímica para Iba1 no córtex. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 3 dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

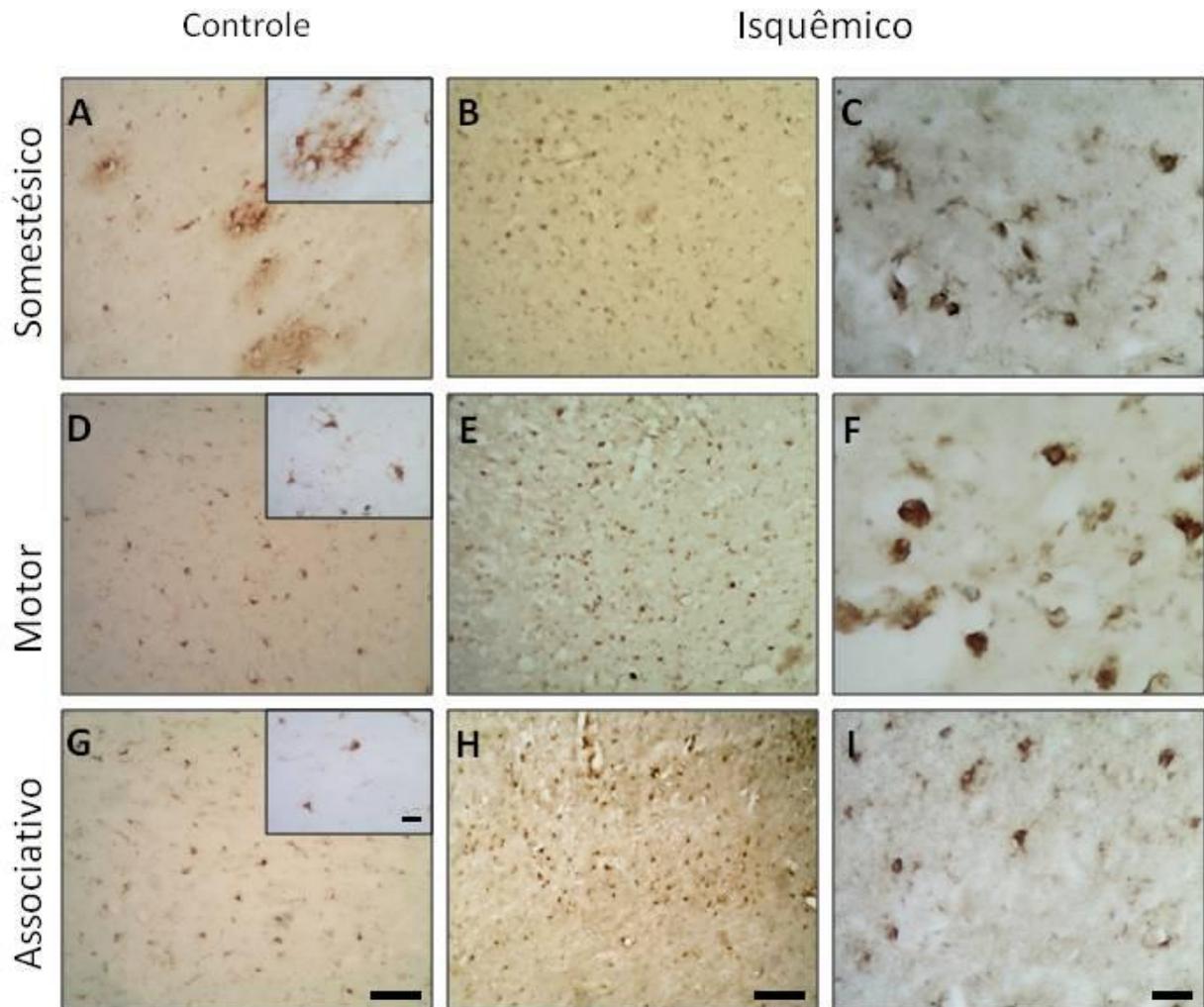


Figura 12. Análise imunoistoquímica para Iba1 em diferentes regiões corticais. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 7 dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μ m. C, F, I: escala de 20 μ m.

Conforme especificado anteriormente, a ativação microglial também foi avaliada utilizando o anticorpo ED-1, que marca os macrófagos ativados derivados da micróglia residente e de monócitos derivados do sangue (DIJKSTRA et al. 1985). No primeiro dia após a lesão isquêmica, observamos um aumento de células ED-1 positivas em todas as regiões analisadas, com predomínio no córtex somestésico (Figura 13 B-C), seguido pelo motor (Figura 13 E-F) e pelo associativo (Figura 13 H-I). Este resultado foi confirmado pela análise quantitativa do número de células ED1+ (Figura 14). Ao terceiro dia após a indução isquêmica, observou-se o pico máximo de ativação microglial nas três áreas corticais, principalmente na região somestésica ($112,4 \pm 5,02$ células/campo), seguida pela área motora ($91,4 \pm 3,2$) e com valores menores para a área associativa ($77,3 \pm 7,1$) (Figuras 15-16). Ao sétimo dia, houve uma diminuição da ativação microglial, mas o número de células ED1+ continuou elevado em relação ao animais controle ($64,3 \pm 4,3$ motor, $87 \pm 4,1$ somestésico, $46,3 \pm 8,9$ associativo) (Figuras 17-18). A ativação microglial ainda foi mais intensa na área somestésica, neste tempo de sobrevivência (Figuras 17), como confirmado por análise quantitativa (Figura 18).

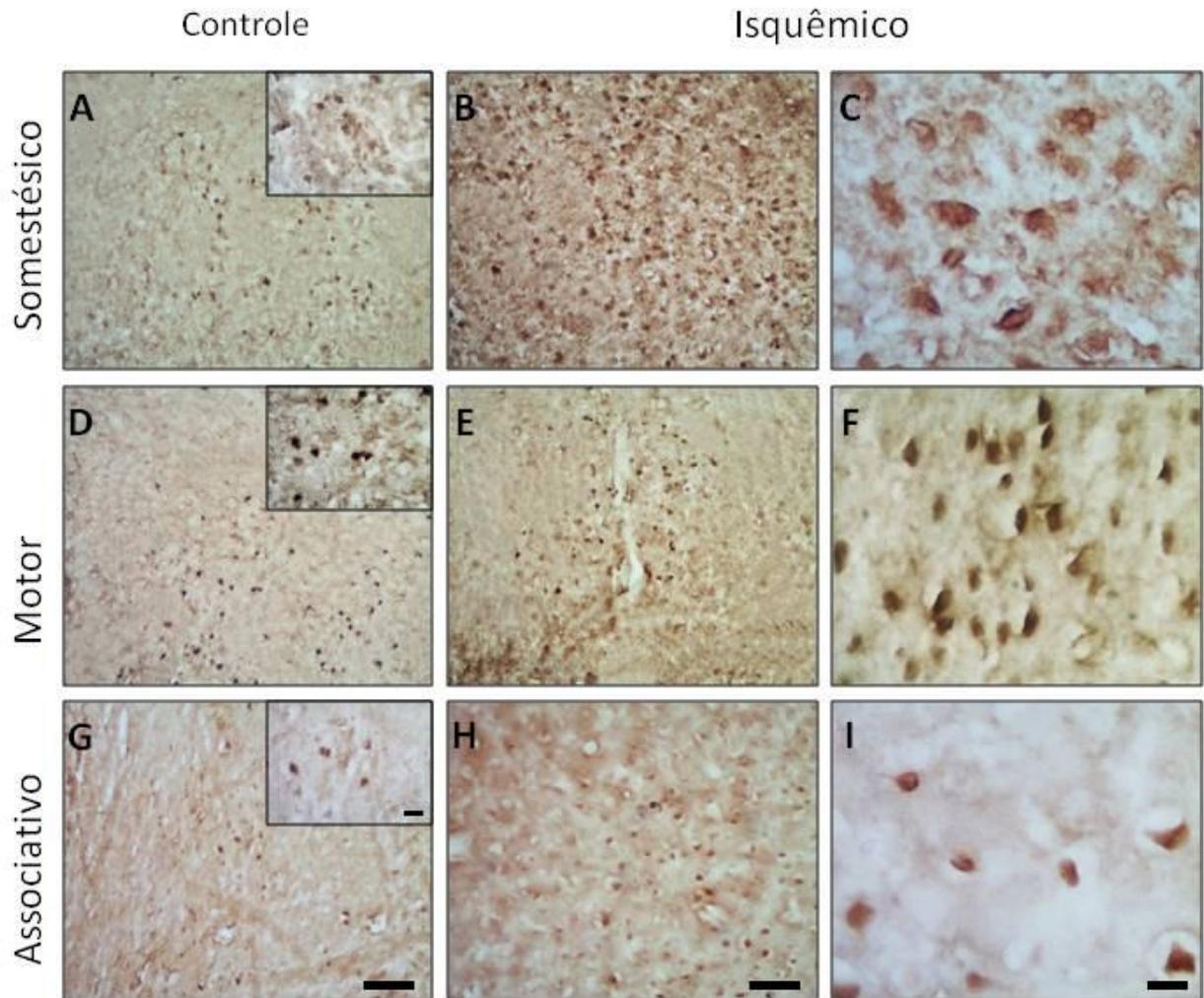


Figura 13 – Análise imunoistoquímica para ED1 no córtex ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 1 dia após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

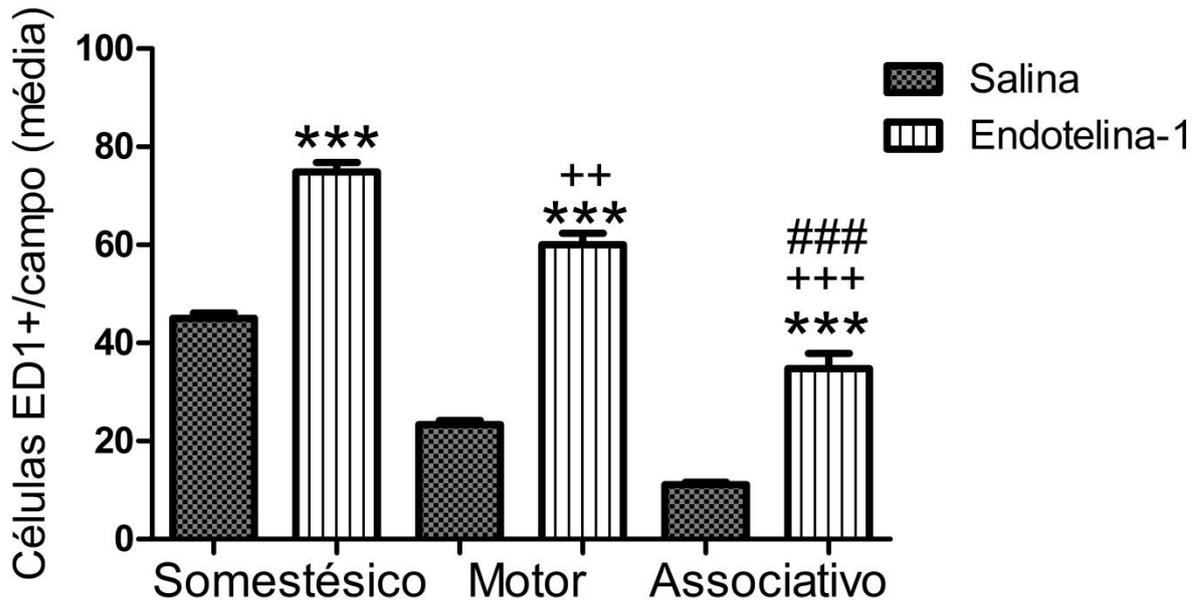


Figura 14 – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células ED1+ no córtex ipsilateral em 1 dia por área. Representação com média e erro padrão, com $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (+) representando diferença estatística em comparação ao somestésico, (#) representando diferença estatística em comparação ao motor.

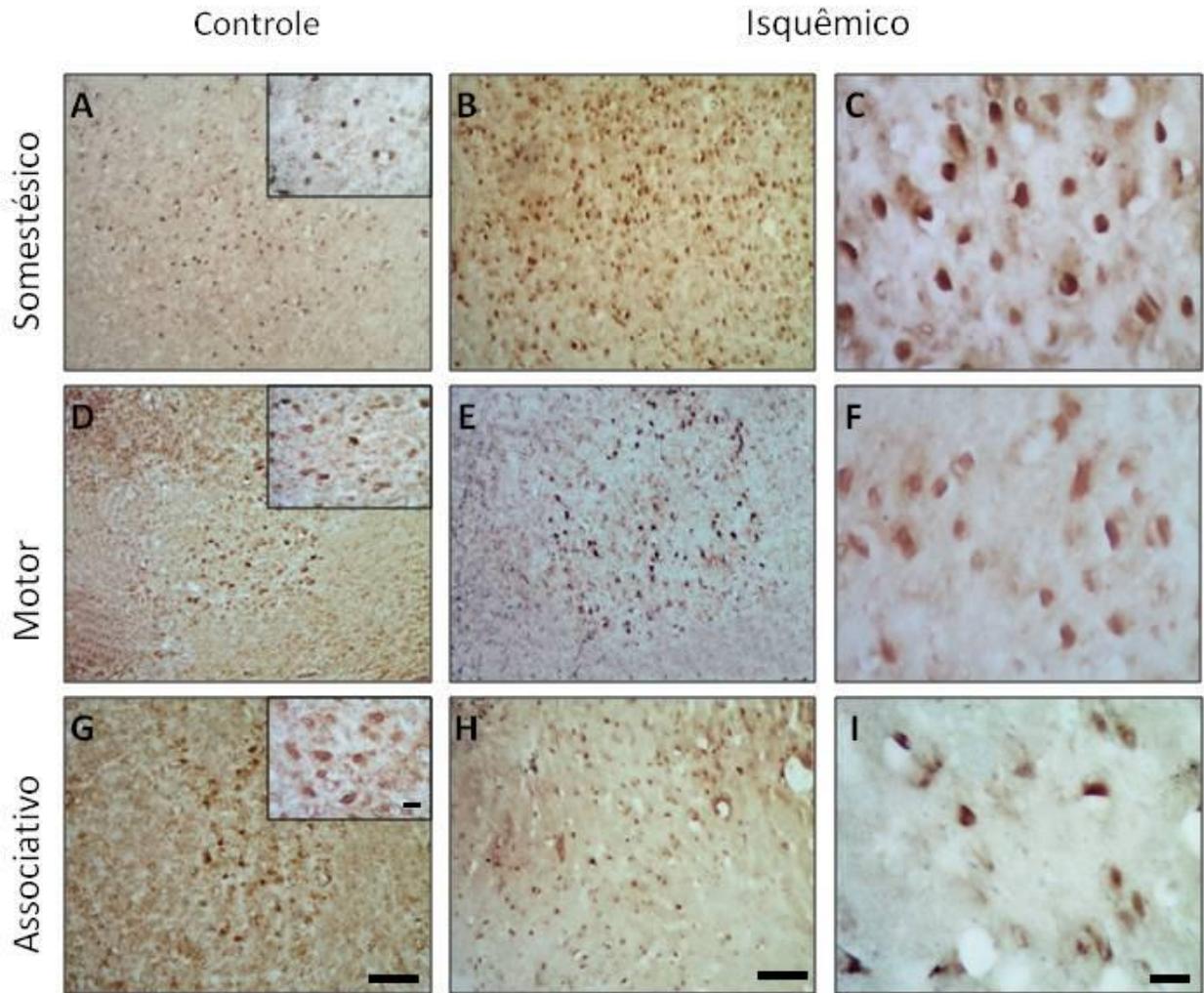


Figura 15 – Análise imunoistoquímica para ED1 no córtex ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 3 dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

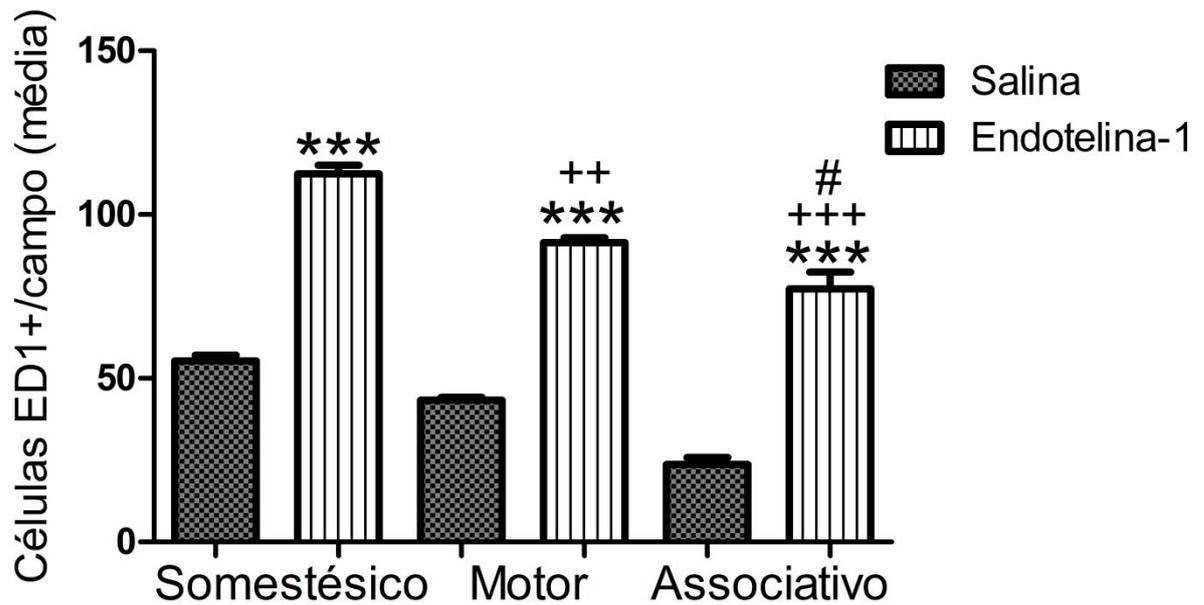


Figura 16 – Gráfico representativo da análise quantitativa do número de células ED1+ no córtex ipsilateral em 3 dias por área . Representação com média e erro padrão, com $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. (*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (+) representando diferença estatística em comparação ao somestésico, (#) representando diferença estatística em comparação ao motor.

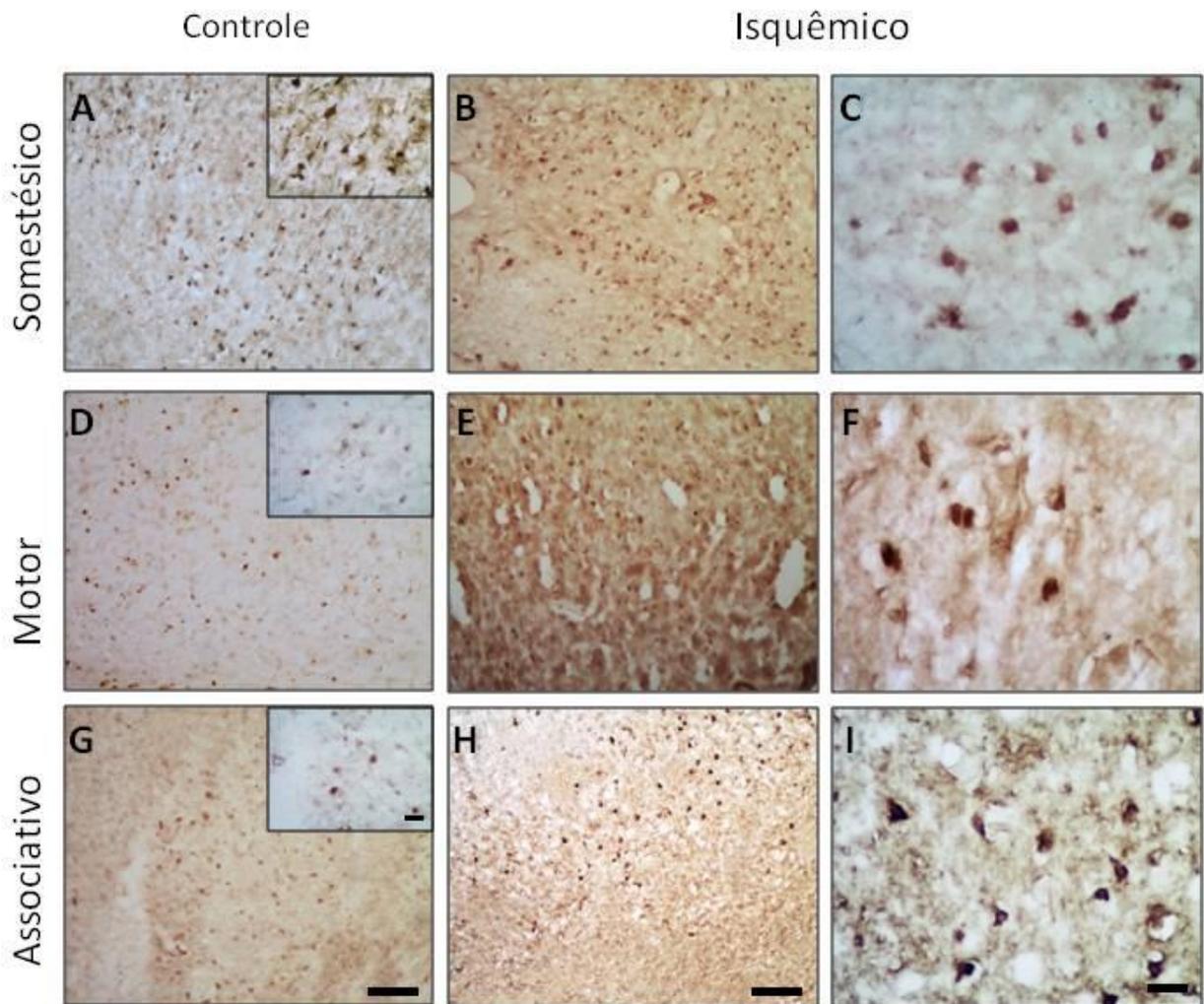


Figura 17 – Análise imunoistoquímica para ED1 no córtex ipsilateral. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) sete dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μ m. C, F, I: escala de 20 μ m.

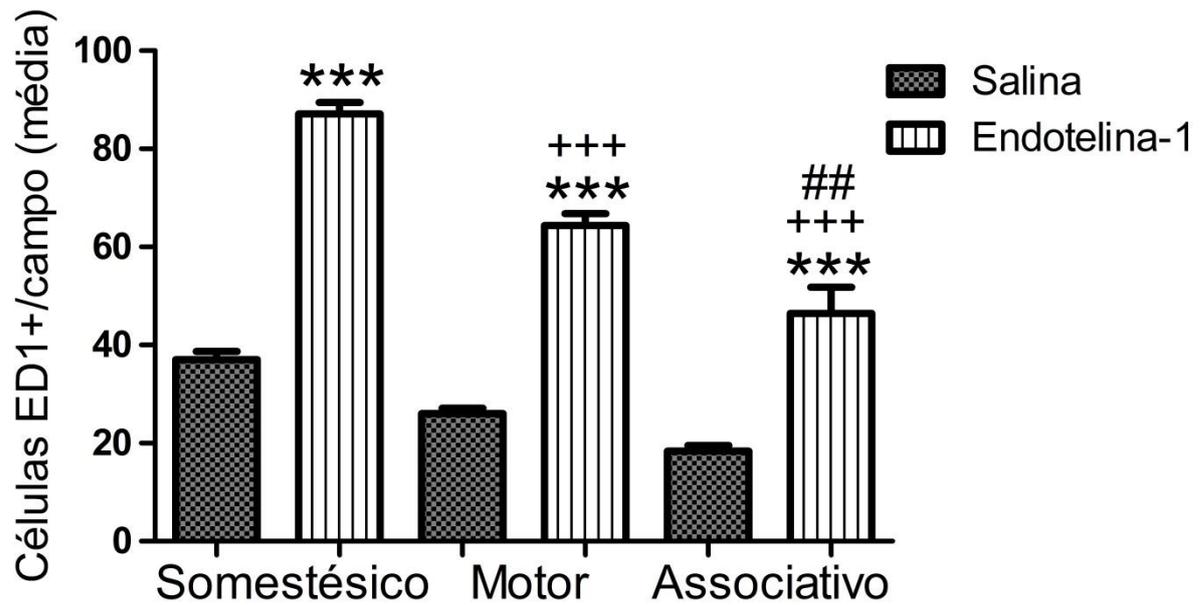


Figura 18 – Análise quantitativa do número de células ED1+ em diferentes áreas corticais 7 dias após a indução isquêmica. O número de células ED1+ foi maior no córtex somestésico, seguido pelas áreas motora e associativa. (*) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (+) representando diferença estatística em comparação ao grupo controle, (+) representando diferença estatística em comparação ao somestésico, (#) representando diferença estatística em comparação ao motor.

3.3 MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1 INDUZEM ASTROCITOSE PROGRESSIVA NEOCORTICAL

A ativação astrocitária foi analisada pela imunistoquímica para GFAP, um marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL et al., 2004). No grupo controle, os astrócitos apresentaram-se com morfologia ramificada e diminuto volume de corpo celular, em todos os tempos avaliados (Figuras 19-21 A-D-G). Nos animais isquêmicos, houve um aumento gradual e progressivo da astrocitose, com células apresentando um aumento do volume de corpo celular, diminuição dos ramos com aumento concomitante da sua espessura a partir de 1 dia após a indução isquêmica, principalmente no córtex somestésico (Figura 19 B-C, E-F, H-I). A astrocitose aumentou bastante ao 3º dia (Figura 20 B-E-H, C-F-I), com intensidade maior nos córtices somestésico (Figura 20 B-C) e motor (Figura 20 E-F), mas com menor intensidade no córtex associativo (Figura 20H-I). Ao sétimo dia, o padrão foi parecido ao observado ao terceiro dia pós indução isquêmico (Figura 21), com a diferença que houve maior morte astrocitária.

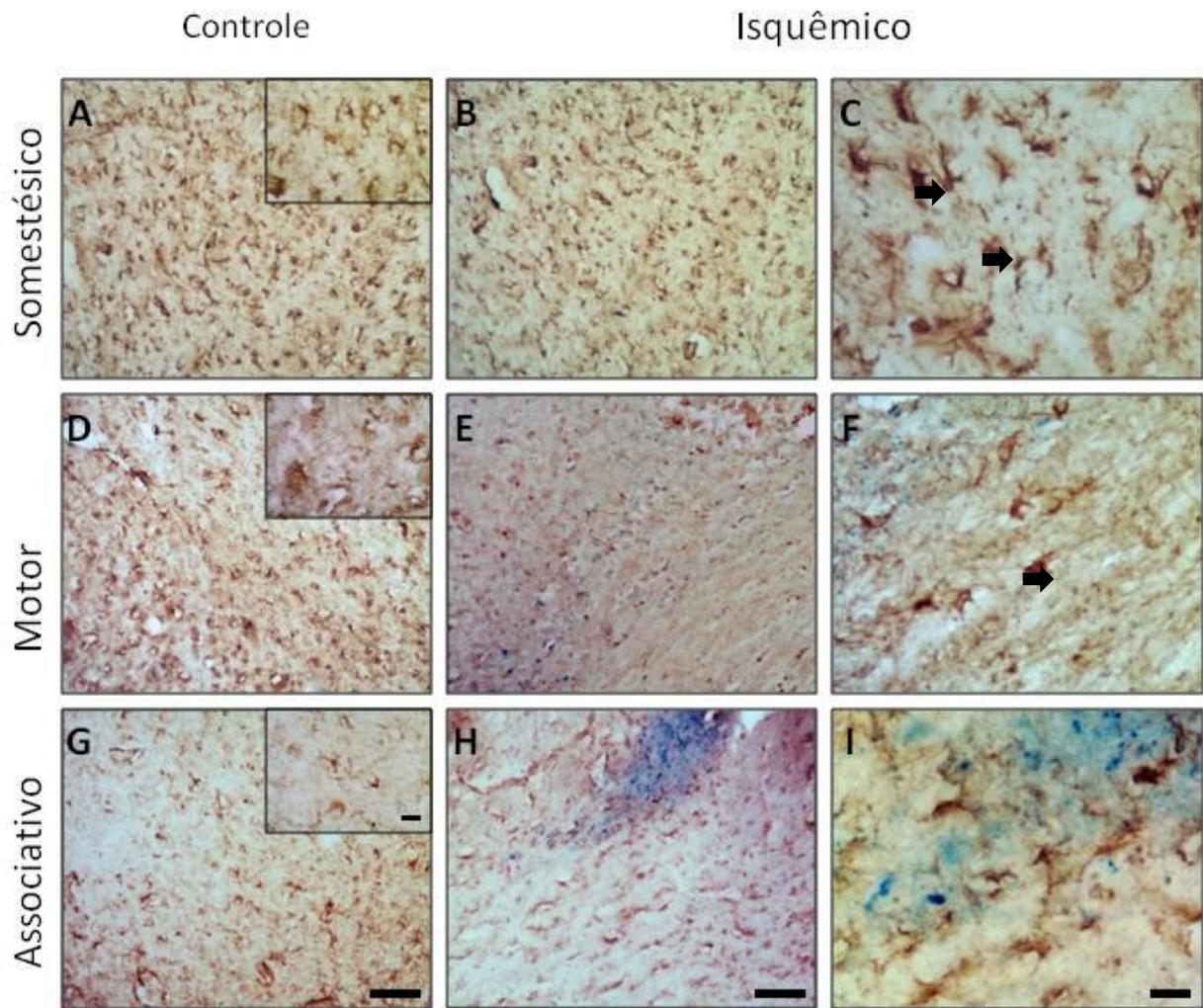


Figura 19 - Análise imunoistoquímica para GFAP no córtex. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 1 dia após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

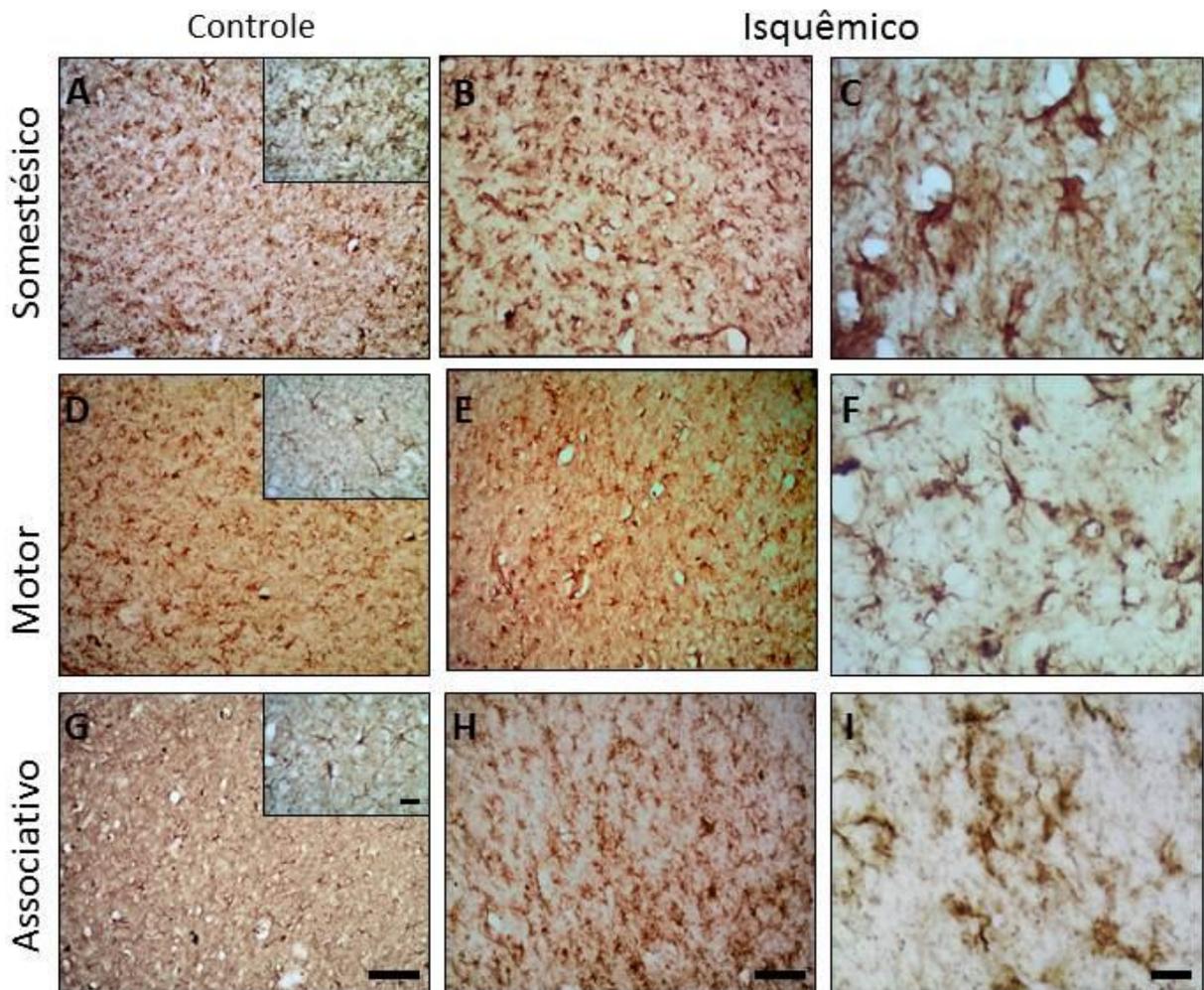


Figura 20 - Análise imunohistoquímica para GFAP no córtex. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 3 dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

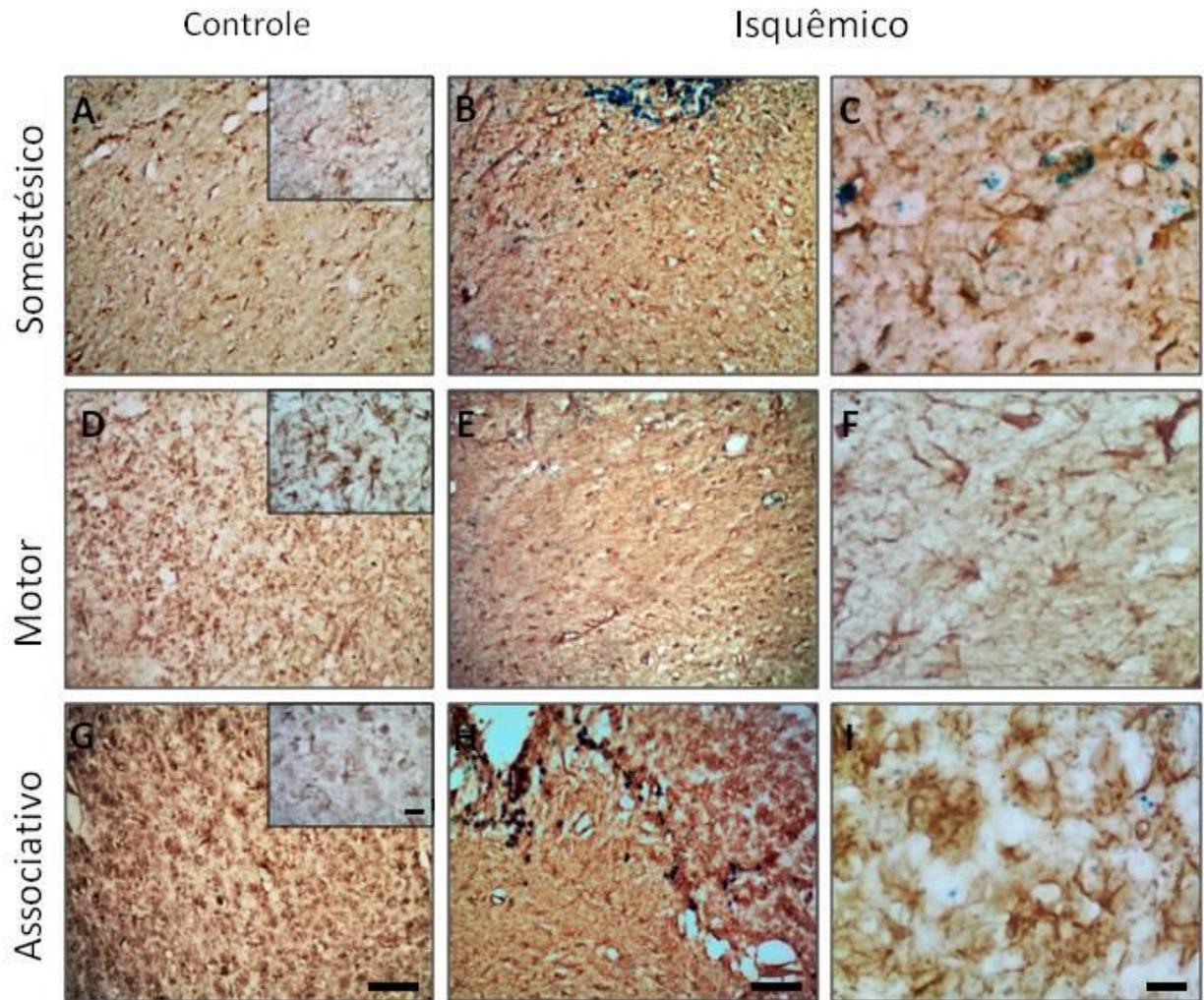


Figura 21 - Análise imunoistoquímica para GFAP no córtex. Animais controle injetados com solução salina estéril (A-D-G) ou isquêmicos injetados com ET-1 no córtex motor (E-F), somestésico (B-C), associativo (H-I) 7 dias após a indução isquêmica. A, B, D, E, G, H: escala de 100 μm . C, F, I: escala de 20 μm .

4. DISCUSSÃO

4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE O MODELO EXPERIMENTAL

Nessa investigação, o modelo escolhido para indução da lesão isquêmica foi a injeção estereotáxica de endotelina-1. GUPTA et al. (2005) 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, 1989; HUGHES et al, 2003). A diminuição do fluxo sanguíneo pela injeção cortical de ET-1 tem sido usada para produzir lesões isquêmicas focais em diferentes áreas corticais incluindo, córtex (FRANCO et al, 2012), estriado (SOUZA-RODRIGUES et al., 2008), tronco encefálico (DOS SANTOS et al., 2007) e cápsula interna (FROST et al., 2006). O modelo da ET-1 possui a facilidade de não ser tão invasivo como outros modelos frequentemente utilizados para a indução de AVE experimental, incluindo o método do filamento (ZHAO et al., 1994). Neste modelo, um delgado filamento é inserido na origem da carótida interna até encontrar o ponto de bifurcação da artéria cerebral média. O filamento é mantido entre 1 e 2 horas, com reperfusão subsequente. Os dados estabelecidos são severos e difusos, atingindo o território de vascularização da artéria cerebral média, incluindo porção lateral do estriado e regiões do córtex frontoparietal, e de acordo com o território de vascularização do vaso afetado, o córtex frontal e pré frontal (MORIOKA et al., 1993; ZHAO et al., 1994).

Estes modelos de oclusão temporária, permanente ou diminuição do fluxo sanguíneo da artéria cerebral média produzem áreas grandes e bem definidas de infarto com importante diminuição do fluxo sanguíneo, no entanto, requerem intervenções cirúrgicas extensas com grande conhecimento de anatomia topográfica

e técnica cirúrgica apurada para expor esta artéria e ocluir o vaso, o que pode levar a complicações trans e pós-operatórias relacionadas primariamente ao ato cirúrgico apenas relevantes para os animais. Desta forma, modelos que se utilizam de oclusão da artéria cerebral média não se mostraram aplicáveis à nossa investigação, por buscarmos avaliar áreas restritas de lesão primária, o que tornou-se possível com a injeção de ET-1 diretamente no córtex, com pouco ou nenhum comprometimento celular ou tecidual nas áreas circunvizinhas ou mais distantes do local da injeção.

A característica focal do modelo utilizando ET-1 é importante para estudos onde se quer avaliar o comprometimento de uma área mais circunscrita, como no nosso estudo. Com este modelo é possível produzir infartos restritos à cápsula interna (FROST et al., 2006) ou a núcleos específicos do tronco encefálico, como implementado em um estudo prévio em nosso laboratório (DOS SANTOS et al., 2007).

4.2. O CÓRTEX SOMESTÉSICO É MAIS AFETADO PELO PROCESSO ISQUÊMICO QUANDO COMPARADO AOS CÓRTICES MOTOR E DE ASSOCIAÇÃO

Nesta tese, investigamos a hipótese de que a evolução neuropatológica poderia ser diferente em diferentes áreas corticais submetidas a uma lesão isquêmica focal de mesma intensidade. Os resultados parecem confirmar esta hipótese, considerando que o padrão de perda tecidual, microgliose e astrocitose foram mais intensos nos córtices somestésico e motor, em relação à área de associação. Os resultados sugerem que as áreas corticais primárias, incluindo o córtex somestésico primário (SI) e as áreas motoras são mais vulneráveis ao

processo isquêmico, do que áreas de associação. Comparativamente, o córtex somestésico foi mais afetado do que as duas outras áreas investigadas. A explicação deste fato não é conhecida, mas os mecanismos subjacentes poderiam estar relacionados os diferentes padrões de aferência e eferência, a diferentes padrões metabólicos e/ou à distribuição seletiva de receptores glutamatérgicos entre as diferentes áreas corticais.

É possível que a organização intrínseca das diferentes áreas corticais, sensoriais primárias, motoras ou de associação as tornem diferencialmente susceptível ao AVE. Devido à imensa diversidade de funções do neocórtex, diferentes áreas neocorticais possuem padrões diferenciais de demanda metabólica, o que certamente influencia os padrões de reposta à lesão isquêmica, uma doença caracterizada por déficit metabólico severo (IADECOLA & ANRATHER, 2011).

Existem evidências de que o córtex parietal, onde fica localizado o giro pós-central que contém áreas somestésicas, é preferencialmente susceptível a eventos isquêmicos em ratos (TAKITA et al., 2004). Além disso, alguns estudos eletrofisiológicos sugerem que pacientes que tiveram parada cardíaca possuem maiores padrões lesivos nas regiões conectadas por maior número de aferências talâmicas, incluindo o córtex somestésico (MUTHUSWAMY et al., 2002; BAUER et al., 2003). Estudos também sugerem que o efeito da hipóxia é mais intenso no cérebro de neonatos em regiões primárias e em áreas motoras (MARTIN et al., 1997). Os autores sugerem que os níveis de citocromo oxidase podem ser maiores nas regiões mais vulneráveis. O córtex somestésico é preferencialmente uma área de grande demanda metabólica, onde a coloração para citocromo oxidase marca os campos de barris (FREIRE et al., 2004).

Estudos recentes em humanos confirmam uma variação de vulnerabilidade à hipóxia para diferentes regiões encefálicas (PAYABVASH et al,2011).

A maior vulnerabilidade das áreas primárias ao processo isquêmico não é correlacionado com a sua maior complexidade morfofuncional. Diversos estudos sugerem que os padrões de circuitos neurais são mais complexos nas áreas de associação do que nas áreas primárias (ELSTON et al, 2003,2007,2011). Isso é válido para diferentes áreas corticais, bem como para áreas hierarquicamente superiores dentro de uma mesma região, como no córtex visual (ELSTON et al, 2003,2007,2011).

Uma possibilidade é que as áreas de associação, por serem áreas críticas para a integração da percepção e dos aspectos mais complexos da cognição, poderiam possuir mecanismos mais efetivos de reparo endógeno que as tornariam mais resistentes às condições patológicas ou que sejam mais adaptadas a eventos isquêmicos, talvez por conseguirem manter as condições mínimas funcionais com um consumo metabólico relativamente menor.

Os mecanismos moleculares e celulares que contribuem para uma maior suscetibilidade das áreas primárias sensoriais e motoras e uma maior resistência do córtex associativo a eventos isquêmicos podem incluir padrões diferenciais da distribuição de receptores glutamatérgicos e níveis diferentes de quelantes de Ca^{++} para diferentes áreas corticais. Talvez haja níveis maiores de quelantes de Ca^{++} em neurônios do córtex associativo em comparação aos neurônios dos córtices somestésico e motor. Em apoio a esta hipótese, alguns estudos sugerem que a resistência de algumas áreas neocorticais a eventos isquêmicos pode ser influenciada pela densidade de receptores glutamatérgicos

(DOS ANJOS et al., 2009) e que neurônios com maiores concentrações de quelante de Ca^{++} são mais resistentes à isquemia (FRAHN,HAUPT e WITTE , 2004).

Estas hipóteses devem ser testadas em estudos futuros, onde, utilizando técnicas de biologia molecular e imageamento, os mecanismos intrínsecos metabólicos e de reparo celular possam ser comparados em diferentes áreas corticais.

4.3 O SIGNIFICADO DA MICROGLIOSE MAIS INTENSA NAS AREAS SOMESTÉSICA E MOTORA EM RELAÇÃO À ÁREA ASSOCIATIVA

Neste estudo, microinjeções corticais de ET-1 induziram intensa ativação microglial com pico máximo de ativação em 3 dias após a indução isquêmica, reduzindo posteriormente, mas mantendo-se elevado em relação aos animais controle, nas três áreas pesquisadas. A microgliose foi mais intensa nas áreas somestésica e motora quando comparadas ao córtex de associação. A reação microglial é um reflexo da intensidade da lesão isquêmica. O padrão de ativação microglial observado está de acordo com o previamente relatado, de que a perda tecidual foi mais intensa nas áreas somestésica e motora. No geral, alguns estudos sugerem que o córtex cerebral seja mais sensível à neuroinflamação do que regiões não corticais, como os núcleos da base (LIRAZ-SALTSMAN et al., 2011). Nosso estudo sugere que a resposta microglial é diferencialmente controlada em diferentes áreas corticais, o que é influenciado pela intensidade da lesão.

As células microgliais apresentam um papel controverso após desordens neurais agudas e podem contribuir tanto para reparo tecidual ou mesmo exacerbar o processo lesivo (GOMES LEAL et al, 2012), dependendo do fenótipo

apresentado no momento da ativação. A intensa ativação microglial é fisiologicamente relacionada a eventos fagocitóticos, que são importantes para a remoção de resquícios de células mortas por necrose e apoptose (WANG ET AL et al, 2007). Este papel fagocítico das células microgliais é benéfico e contribui para a resolução do processo inflamatório, contribuindo para regeneração e neuroproteção (LUCAS, ROTHWELL e GIBSON, 2006).

Em estudos prévios do nosso grupo, utilizando o modelo de oclusão da artéria cerebral média, mostrou-se que as células microgliais são ativadas até 6 semanas após o evento isquêmico tanto no corpo estriado como na zona subventricular (THORED et al, 2009). Neste estudo, relatou-se que as células microgliais da zona subventricular liberam IGF-1, um fator pró-neurogênico. Neste caso, a microglia moderadamente ativada pode interagir com neuroblastos, contribuindo para a sobrevivência dos mesmos no ambiente isquêmico (THORED et al., 2009). Outros estudos mostraram que as células microgliais podem ser benéficas após a isquemia, seja fagocitando células polimorfonucleares (NEUMAN et al., 2008) ou mesmo secretando fatores tróficos e citocinas anti-inflamatórias no ambiente isquêmico (LALANCETTE-HERBERT et al., 2007). Recentemente, demonstrou-se que fenótipos do tipo M1 (pró-inflamatório, lesivo) e M2 (anti-inflamatório, neuroprotetor) são encontrados em microglia após isquemia experimental (HU et al., 2012).

Está bem estabelecido que a microgliose pode contribuir para perda tecidual (YRJANHEIKKI et al., 1999; FRANCO et al, 2012). O bloqueio microglial com anti-inflamatórios tais como a minociclina, indometacina ou ibuprofeno induz neuroproteção em ratos adultos após oclusão da artéria cerebral média (YRJANHEIKKI et al., 1999; HOEHN et al, 2005). O tratamento com minociclina

reduz ativação microglial, o que é concomitante com a diminuição da atividade de ciclo-oxigenases e redução de até 65% da área de infarto isquêmico cortical (YRJANHEIKKI et al., 1999; PARK et al, 2005). Em um estudo prévio do nosso laboratório, o tratamento com minociclina na primeira semana após lesão do córtex motor de ratos induz conspícua neuroproteção, diminuição de apoptose e recuperação funcional em relação aos animais tratados com solução salina (FRANCO et al., 2012).

Estudos futuros devem investigar a influência do bloqueio microglial no processo lesivo após isquemia focal, com a finalidade de instituir uma terapêutica adequada em uma janela temporal pós isquemia que favoreça a maior preservação possível da área de penumbra com conseqüente limitação dos possíveis déficits funcionais . Estas abordagens poderão proteger as áreas corticais mais afetadas pelo processo isquêmico, como áreas sensoriais e motoras. Os mecanismos subjacentes a susceptibilidade de certas regiões corticais ao processo isquêmico devem ser investigados em estudos futuros.

4.4. PADRÕES DIFERENCIAIS DE ASTROCITOSE EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS SUBMETIDAS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL

Assim como para a microgliose, a astrocitose foi mais intensa nas áreas sensoriais e motoras, em comparação ao córtex de associação. Acreditamos que este fato esteja relacionado aos padrões lesivos, ou seja, mais astrócitos são ativados quanto maior for a lesão. Deste fato, infere-se que a maior susceptibilidade da área somestésica ao processo isquêmico influencia diretamente em um padrão mais intenso de ativação astrocítica.

A astrocitose, assim como a microgliose, é uma resposta geral a processos lesivos, com consequências benéficas e/ou prejudiciais (RANSON , 2003; BUFFO, ROLANDO e CERUTI , 2010). Os astrócitos são células gliais envolvidas na manutenção da homeostase do sistema nervoso central, não sendo apenas necessárias para o tecido nervoso em condições fisiológicas de trabalho, mas também e principalmente em muitas condições patológicas, incluindo acidente vascular encefálico e trauma raqui-medular. Os astrócitos podem ser lesivos, contribuindo para mecanismos de depressão alastrante ou envio de sinais pro-apoptóticos (DURUKAN,2007). Além disso, estas células gliais podem inibir a regeneração através da participação na formação da cicatriz glial (BRADBURY e CARTER, 2011). Astrócitos são importantes fontes de proteoglicanas, os quais constituem-se em uma barreira química para a regeneração axonal (BUFFO, ROLANDO e CERUTI, 2010; BRADBURY e CARTER, 2011). Após lesão, essas células gliais podem liberar seu conteúdo intrínseco de glutamato contribuindo para a exacerbação do dano primário (OLNEY,1990). A turgescência astrocitária observada em algumas situações é uma resposta inicial à isquemia, a qual pode induzir a uma liberação adicional de glutamato, redução do espaço extracelular e alterações das concentrações iônicas, consideradas como eventos primários de excitotoxicidade (OLNEY,1990). Além disso, astrócitos reativos produzem e liberam mediadores inflamatórios, tais como as citocinas e as quimiocinas, os quais podem exacerbar o processo inflamatório, contribuindo para lesão neural (ASCHNER, 1998).

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 estimulam a

neurogênese e regeneração na fase crônica após a lesão (RANSON , 2003; DURUKAN e TATLISUMAK ,2007). Astrócitos são importantes captadores de glutamato, reguladores de íons potássio, e participam na eliminação de radicais livres, o que pode induzir considerável neuroproteção após isquemia e outras doenças do SNC (RANSON , 2003; DURUKAN e TATLISUMAK,2007).

Novos estudos que visem investigar abordagens neuroprotetoras devem considerar a sequência de eventos que ocorrem nos tempos de sobrevida mencionados, ou seja, pico máximo do processo inflamatório com microgliose e astrocitose em 3 dias e manutenção em 7 dias, com perda tecidual relevante nas áreas com maior suscetibilidade ao processo isquêmico.

5. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos nos permitiram concluir que:

- a. Microinjeções de ET-1 em diferentes áreas corticais induzem isquemia focal, concomitante com ativação microglial progressiva, astrocitose e perda tecidual 3 e 7 dias após a indução isquêmica
- b. Uma lesão isquêmica de mesma intensidade induz padrões de perda tecidual e inflamatórios diferentes, dependendo da área cortical, sendo que o córtex somestésico foi a área mais afetada, seguida pelo córtex motor e pelo córtex associativo.
- c. Os padrões diferenciais de lesão cortical sugerem que os mecanismos inflamatórios e de morte celular podem diferir de uma região cortical para outra, o que influencia diretamente nos padrões de microgliose e astrocitose
- d. O estabelecimento da evolução espacial e temporal destes eventos neuropatológicos é a base para estudos futuros, nos quais a resposta inflamatória deverá ser modulada com intuito de minimizar estas alterações teciduais.

REFERÊNCIAS

- AGNATI, L. F.; ZOLI, M.; KUROSAWA, M.; BENFENATI, F.; BIAGINI, G.; ZINI, I.; HALLSTROM, A.; UNGERSTEDT, U.; TOFFANO, G. e FUXE, K. A new model of focal brain ischemia based on the intracerebral injection of endothelin-1. **Ital J NeuroSci**, v. 12, n. 3 Suppl 11, p. 49-53, 1991.
- AGRAWAL, S. K.; NASHMI, R. e FEHLINGS, M. G. Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. **Neuroscience**, v. 99, n. 1, p. 179-188, 2000.
- ALBERTS, M. J.; LATCHAW, R. E.; JAGODA, A.; WECHSLER, L. R.; CROCCO, T.; GEORGE, M. G.; CONNOLLY, E. S.; MANCINI, B.; PRUDHOMME, S.; GRESS, D.; JENSEN, M. E.; BASS, R.; RUFF, R.; FOELL, K.; ARMONDA, R. A.; EMR, M.; WARREN, M.; BARANSKI, J. e WALKER, M. D. Revised and updated recommendations for the establishment of primary stroke centers: a summary statement from the brain attack coalition. **Stroke**, v. 42, n. 9, p. 2651-2665, 2011.
- ARUMUGAM, T. V.; GRANGER, D. N. e MATTSON, M. P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Med**, v. 7, n. 3, p. 229-242, 2005.
- ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. **Neurotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 269-281, 1998.
- ATLANTE, A.; CALISSANO, P.; BOBBA, A.; GIANNATTASIO, S.; MARRA, E. e PASSARELLA, S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. **FEBS Lett**, v. 497, n. 1, p. 1-5, 2001.
- BANATI, R. B.; GEHRMANN, J.; SCHUBERT, P. e KREUTZBERG, G. W. Cytotoxicity of microglia. **Glia**, v. 7, n. 1, p. 111-118, 1993.

BAUER E, FUNK GC, GENDO A, KRAMER L, ZAUNER C, STERZ F, SCHNEIDER B, MADL C. Electrophysiological assessment of the afferent sensory pathway in cardiac arrest survivors. **Eur J Clin Invest**. 2003 Apr;33(4):283-7.

BEAR, MF; CONNORS, BW; PARADISO, MA. **A estrutura do sistema nervoso**. In: BEAR, MF; CONNORS, BW; PARADISO, MA. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, p 167-204;2008.

BLIGHT, A. R. Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. **Neuroscience**, v. 60, n. 1, p. 263-273, 1994.

BRACKEN, M. B. e HOLFORD, T. R. Neurological and functional status 1 year after acute spinal cord injury: estimates of functional recovery in National Acute Spinal Cord Injury Study II from results modeled in National Acute Spinal Cord Injury Study III. **J Neurosurg**, v. 96, n. 3 Suppl, p. 259-266, 2002.

BRACKEN, M. B. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 26, n. 24 Suppl, p. S47-54, 2001.

BRADBURY, E. J. e CARTER, L. M. Manipulating the glial scar: chondroitinase ABC as a therapy for spinal cord injury. **Brain Res Bull**, v. 84, n. 4-5, p. 306-316, 2011.

BUFFO, A.; ROLANDO, C. e CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochem Pharmacol**, v. 79, n. 2, p. 77-89, 2010.

BUTOVSKY, O.; TALPALAR, A. E.; BEN-YAAKOV, K. e SCHWARTZ, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol Cell Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 381-393, 2005.

CHOI, D. W. Calcium and excitotoxic neuronal injury. **Ann N Y AcadSci**, v. 747, n. p. 162-171, 1994.

CHOI, D. W. Excitotoxic cell death. **JNeurobiol**, v. 23, n. 9, p. 1261-1276, 1992.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v. 1, n. 8, p. 623-634, 1988.

CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. **NeurosciLett**, v. 58, n. 3, p. 293-297, 1985.

COSTA, R., “Ambientes Virtuais na Reabilitação Cognitiva de Pacientes Neurológicos e Psiquiátricos”, Tese D.Sc, **CoppeSistemas-UFRJ**, Rio de Janeiro, 2000.

CRAGG, B. G. The density of synapses and neurones in the motor and visual areas of the cerebral cortex. **JAnat**, v. 101, n. Pt 4, p. 639-654, 1967.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **ProgNeurobiol**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DE KEYSER, J.; SULTER, G.; LANGEDIJK, M.; ELTING, J. W. e VAN DER NAALT, J. Management of acute ischaemic stroke. **ActaClinBelg**, v. 54, n. 5, p. 302-305, 1999.

DEFELIPE, J. The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. **FrontNeuroanat**, v. 5, n. p. 29, 2011.

DEFELIPE, J.; BALLESTEROS-YANEZ, I.; INDA, M. C. e MUNOZ, A. Double-bouquet cells in the monkey and human cerebral cortex with special reference to areas 17 and 18. **ProgBrain Res**, v. 154, n. p. 15-32, 2006.

DEFELIPE, J.; MANGER, P.; CASAGRANDE, V. e KAAS, J. H. Specializations of the granular prefrontal cortex of primates: implications for cognitive processing. **Anat Rec A DiscovMol Cell EvolBiol**, v. 288, n. 1, p. 26-35, 2006.

DEFELIPE, J. Pyramidal cells in prefrontal cortex of primates: marked differences in neuronal structure among species. **Front Neuroanat**, v. 5, n. p. 2, 2011.

DEWAR, D.; YAM, P. e MCCULLOCH, J. Drug development for stroke: importance of protecting cerebral white matter. **Eur J Pharmacol**, v. 375, n. 1-3, p. 41-50, 1999.

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. **AdvExp Med Biol**, v. 186, p. 409-419, 1985

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

DOSANJOS S, MARTINEZ-VILLAYANDRE B, MONTORI S, REGUEIRO-PURRIÃJOS MM, GONZALO-ORDEN JM, FERNÃNDEZ-LOPEZ A. Transient global ischemia in rat brain promotes different NMDA receptor regulation depending on the brain structure studied. **Neurochem Int**.54(3-4):180-5, 2009.

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

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

ELSTON, G. N. Cortex, cognition and the cell: new insights into the pyramidal neuron and prefrontal function. **Cereb Cortex**, v. 13, n. 11, p. 1124-1138, 2003

ELSTON, G. N. Cortical heterogeneity: implications for visual processing and polysensory integration. **J Neurocytol**, v. 31, n. 3-5, p. 317-335, 2002.

ELSTON, G. N.; BENAVIDES-PICCIONE, R.; ELSTON, A.; MANGER, P. R. e DEFELIPE, J. Pyramidal cells in prefrontal cortex of primates: marked differences in neuronal structure among species. **Front Neuroanat**, v. 5, n. p. 2, 2011.

ELSTON, G. N.; BENAVIDES-PICCIONE, R.; ELSTON, A.; ZIETSCH, B.; ESIRI, M. M. The interplay between inflammation and neurodegeneration in CNS disease. **JNeuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 4-16, 2007.

FRAHM C, HAUPT C, WITTE OW. GABA neurons survive focal ischemic injury. **Neuroscience**.127(2):341-6,2004.

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.

FREIRE, M. A.; GOMES-LEAL, W.; CARVALHO, W. A.; GUIMARAES, J. S.; FRANCA, J. G.; PICANCO-DINIZ, C. W. e PEREIRA, A., JR. A morphometric study of the progressive changes on NADPH diaphorase activity in the developing rat's barrel field. **Neurosci Res**, v. 50, n. 1, p. 55-66, 2004.

FROST, S. B.; BARBAY, S.; MUMERT, M. L.; STOWE, A. M. e NUDO, R. J. An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. **Behav Brain Res**, v. 169, n. 2, p. 206-211, 2006.

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

GILMAN, S. Pharmacologic management of ischemic stroke: relevance to stem cell therapy. **ExpNeurol**, v. 199, n. 1, p. 28-36, 2006.

GINSBERG, M. D.; BELAYEV, L.; ZHAO, W.; HUH, P. W. e BUSTO, R. The acute ischemic penumbra: topography, life span, and therapeutic response. **Acta Neurochir Suppl**, v. 73, n. p. 45-50, 1999.

GIULIAN, D.; VACA, K. e CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. **JNeurosci**, v. 13, n. 1, p. 29-37, 1993.

GIULIAN, D.; VACA, K. e NOONAN, C. A. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1593-1596, 1990.

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.

GREEN, A.; ODERGREN, T. e ASHWOOD, T. Animal models of stroke: do they have value for discovering neuroprotective agents? **Trends PharmacolSci**, v. 24, n. 8, p. 402-408, 2003.

GUIMARAES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; DE MOURA, L. S.; CARVALHO, R. N., JR.; LAMEIRA, O. e GOMES-LEAL, W. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment

and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, n. p. 918174, 2012.

GUPTA, Y. K.; BRIYAL, S.; SHARMA, U.; JAGANNATHAN, N. R. e GULATI, A. Effect of endothelin antagonist (TAK-044) on cerebral ischemic volume, oxidative stress markers and neurobehavioral parameters in the middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. **Life Sci**, v. 77, n. 1, p. 15-27, 2005.

HOEHN, B. D.; PALMER, T. D. e STEINBERG, G. K. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. **Stroke**, v. 36, n. 12, p. 2718-2724, 2005.

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

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 NeuropatholExpNeurol**, v. 62, n. 12, p. 1276-1286, 2003.

HUNLEY, T. E. e KON, V. Update on endothelins - biology and clinical implications. **PediatrNephrol**, v. 16, n. 9, p. 752-762, 2001.

IADECOLA, C. e ANRATHER, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nat Med**, v. 17, n. 7, p. 796-808, 2011.

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.

KNOLLER, N.; AUERBACH, G.; FULGA, V.; ZELIG, G.; ATTIAS, J.; BAKIMER, R.; MARDER, J. B.; YOLES, E.; BELKIN, M.; SCHWARTZ, M. e HADANI, M. Clinical

experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. **J Neurosurg Spine**, v. 3, n. 3, p. 173-181, 2005.

KRAUS, J. F. e MCARTHUR, D. L. Epidemiologic aspects of brain injury. **NeuroClin**, v. 14, n. 2, p. 435-450, 1996.

KRAUS, J. F.; BLACK, M. A.; HESSOL, N.; LEY, P.; ROKAW, W.; SULLIVAN, C.; BOWERS, S.; KNOWLTON, S. e MARSHALL, L. The incidence of acute brain injury and serious impairment in a defined population. **Am J Epidemiol**, v. 119, n. 2, p. 186-201, 1984.

LALANCETTE-HEBERT; M.GOWING; G.SIMARD A;WENG, Y; C.KRIZ, J.

Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. **Journal of Neuroscience**. 27: 2596-605.2007.

LAZAROV-SPIEGLER, O.; SOLOMON, A. S.; ZEEV-BRANN, A. B.; HIRSCHBERG, D. L.; LAVIE, V. e SCHWARTZ, M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. **FASEB J**, v. 10, n. 11, p. 1296-1302, 1996.

LEE, S. M.; YUNE, T. Y.; KIM, S. J.; PARK, D. W.; LEE, Y. K.; KIM, Y. C.; OH, Y. J.; MARKELONIS, G. J. e OH, T. H. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. **J Neurotrauma**, v. 20, n. 10, p. 1017-1027, 2003.

LEES, K. R. e DAWSON, J. Advances in emerging therapies 2006. **Stroke**, v. 38, n. 2, p. 219-221, 2007.

LENT, R.; AZEVEDO, F. A.; ANDRADE-MORAES, C. H. e PINTO, A. V. How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. **Eur J Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2012.

LEWEN, A.; MATZ, P. e CHAN, P. H. Free radical pathways in CNS injury. **JNeurotrauma**, v. 17, n. 10, p. 871-890, 2000.

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

LIPTON, S. A. e STAMLER, J. S. Actions of redox-related congeners of nitric oxide at the NMDA receptor. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1229-1233, 1994.

LIRAZ-ZALTSMAN S, ALEXANDROVICH AG, TREMBOVLER V, FISHBEIN I, YAKA R, SHOHAMI E, BIEGON A. Regional sensitivity to neuroinflammation: in vivo and in vitro studies. **Synapse**. 65(7):634-42. 2011.

LO, E.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M.A.. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature reviews neuroscience** 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, n. 1, p. 3-4, 2005a

LOTUFO, P. A. Why Brazil does not have an epidemic of chronic diseases: some answers from cardiovascular diseases. **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 2, p. 47-48, 2005b

LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol**, v. 9, n. 1, p. 119-131, 1999.

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.

MARCOUX, F. W.; MORAWETZ, R. B.; CROWELL, R. M.; DEGIROLAMI, U. e HALSEY, J. H., JR. Differential regional vulnerability in transient focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 13, n. 3, p. 339-346, 1982.

MARTIN LJ, BRAMBRINK A, KOEHLER RC, TRAYSTMAN RJ. Primary sensory and forebrain motor systems in the newborn brain are preferentially damaged by hypoxia-ischemia. **J Comp Neurol**. 377(2):262-85, 1997.

MEAIRS, S.; WAHLGREN, N.; DIRNAGL, U.; LINDVALL, O.; ROTHWELL, P.; BARON, J. C.; HOSSMANN, K.; ENGELHARDT, B.; FERRO, J.; MCCULLOCH, J.; KASTE, M.; ENDRES, M.; KOISTINAHO, J.; PLANAS, A.; VIVIEN, D.; DIJKHUIZEN, R.; CZLONKOWSKA, A.; HAGEN, A.; EVANS, A.; DE LIBERO, G.; NAGY, Z.; RASTENYTE, D.; REESS, J.; DAVALOS, A.; LENZI, G. L.; AMARENCO, P. e HENNERICI, M. Stroke research priorities for the next decade--A representative view of the European scientific community. **Cerebrovasc Dis**, v. 22, n. 2-3, p. 75-82, 2006.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-1015S, 2000.

MELDRUM, B. S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology**, v. 44, n. 11 Suppl 8, p. S14-23, 1994.

MERGENTHALER, P.; DIRNAGL, U. e MEISEL, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. **Metab Brain Dis**, v. 19, n. 3-4, p. 151-167, 2004. HENRY, P. J. Endothelin receptor distribution and function in the airways. **ClinExpPharmacolPhysiol**, v. 26, n. 2, p. 162-167, 1999.

MONJE, M. L.; TODA, H. e PALMER, T. D. Inflammatory blockades restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1760-1765, 2003.

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.

- MOTTE, S.; MCENTEE, K. e NAEIJE, R. Endothelin receptor antagonists. **Pharmacol Ther**, v. 110, n. 3, p. 386-414, 2006
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R. e SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992
- MUTHUSWAMY J, KIMURA T, DING MC, GEOCADIN R, HANLEY DF, THAKOR NV. Vulnerability of the thalamic somatosensory pathway after prolonged global hypoxic-ischemic injury. **Neuroscience**.;115(3):917-29. 2002
- NETTER, Frank H. Atlas de anatomia humana. 4ª ed. Porto Alegre, RS : **Artmed**, 2009
- OLNEY, J. W. Excitotoxicity: an overview. **Can Dis Wkly Rep**, v. 16 Suppl 1E, n. p. 47-57; discussion 57-48, 1990.
- NEUMANN, J.; SAUERZWEIG, S.; RONICKE, R.; GUNZER, F.; DINKEL, K.; ULLRICH, O.; GUNZER, M. e REYMANN, K. G. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. **J Neurosci**, v. 28, n. 23, p. 5965-5975, 2008.
- OLNEY, J. W.; RHEE, V. e HO, O. L. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. **Brain Res**, v. 77, n. 3, p. 507-512, 1974.
- PARK, E. M.; CHO, B. P.; VOLPE, B. T.; CRUZ, M. O.; JOH, T. H. e CHO, S. Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression. **Neuroscience**, v. 132, n. 3, p. 625-631, 2005.
- PAYABVASH, S.; SOUZA, L. C.; WANG, Y.; SCHAEFER, P. W.; FURIE, K. L.; HALPERN, E. F.; GONZALEZ, R. G. e LEV, M. H. Regional ischemic vulnerability of the brain to hypoperfusion: the need for location specific computed tomography perfusion thresholds in acute stroke patients. **Stroke**, v. 42, n. 5, p. 1255-1260, 2011.
- PETTY, M. A. e WETTSTEIN, J. G. White matter ischaemia. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 31, n. 1, p. 58-64, 1999.

POPOVICH, P. G.; GUAN, Z.; WEI, P.; HUITINGA, I.; VAN ROOIJEN, N. e STOKES, B. T. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. **ExpNeurol**, v. 158, n. 2, p. 351-365, 1999.

PRASS, K.; ROYL, G.; LINDAUER, U.; FREYER, D.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; STOCKLER-IPSIROGLU, G.; WALLIMANN, T. e PRILLER, J. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 27, n. 3, p. 452-459, 2007.

PULSINELLI, W. A.; BRIERLEY, J. B. e PLUM, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. **Ann Neurol**, v. 11, n. 5, p. 491-498, 1982.

RAKIC,P. Radial versus tangencial migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex.**Proc Natl Acad Sci**.92 p 11323-11327,1995.

RANSON, D. Epilepsy and trauma. **J Law Med**, v. 10, n. 3, p. 265-266, 2003.

RAPALINO, O.; LAZAROV-SPIEGLER, O.; AGRANOV, E.; VELAN, G. J.; YOLES, E.; FRAIDAKIS, M.; SOLOMON, A.; GEPSTEIN, R.; KATZ, A.; BELKIN, M.; HADANI, M. e SCHWARTZ, M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 814-821, 1998.

ROTHMAN, S. M. e OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage.**AnnNeurol**, v. 19, n. 2, p. 105-111, 1986.

SCHWARTZ, M. e YOLES, E. Immune-based therapy for spinal cord repair: autologous macrophages and beyond. **J Neurotrauma**, v. 23, n. 3-4, p. 360-370, 2006.

SCHWARTZ, M.; BUTOVSKY, O. e KIPNIS, J. Does inflammation in an autoimmune disease differ from inflammation in neurodegenerative diseases? Possible implications for therapy. **JNeuroimmunePharmacol**, v. 1, n. 1, p. 4-10, 2006.

SEAL, R. P. e AMARA, S. G. Excitatory amino acid transporters: a family in flux. **Annu Rev PharmacolToxicol**, v. 39, n. p. 431-456, 1999.

SESHADRI, S.; BEISER, A.; KELLY-HAYES, M.; KASE, C. S.; AU, R.; KANNEL, W. B. e WOLF, P. A. The lifetime risk of stroke: estimates from the Framingham Study. **Stroke**, v. 37, n. 2, p. 345-350, 2006.

SMITH, J. Pharmacological risks following stroke. **PhysTher**, v. 85, n. 1, p. 81-82, 2005.

SOMOGYI, P.; TAMAS, G.; LUJAN, R. e BUHL, E. H. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 113-135, 1998

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.

STIRLING, D. P.; KHODARAHMI, K.; LIU, J.; MCPHAIL, L. T.; MCBRIDE, C. B.; STEEVES, J. D.; RAMER, M. S. e TETZLAFF, W. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2182-2190, 2004.

TAKITA, M.; PUKA-SUNDEVALL, M.; MIYAKAWA, A. e HAGBERG, H. In vivo calcium imaging of cerebral cortex in hypoxia-ischemia followed by developmental stage-specific injury in rats. **Neurosci Res**, v. 48, n. 2, p. 169-173, 2004.

WALTON, N. M.; SUTTER, B. M.; LAYWELL, E. D.; LEVKOFF, L. H.; KEARNS, S. M.; MARSHALL, G. P., 2ND; SCHEFFLER, B. e STEINDLER, D. A. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. **Glia**, v. 54, n. 8, p. 815-825, 2006.

WANG, Q.; TANG, X. N. e YENARI, M. A. The inflammatory response in stroke. **J Neuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 53-68, 2007.

WANG, Y.; BRZOZOWSKA-PRECHTL, A. e KARTEN, H. J. Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 28, p. 12676-12681, 2010.

YANEZ, I. B.; MUNOZ, A.; CONTRERAS, J.; GONZALEZ, J.; RODRIGUEZ-VEIGA, E. e DEFELIPE, J. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. **J Comp Neurol**, v. 486, n. 4, p. 344-360, 2005.

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

YUSUF, S. Two decades of progress in preventing vascular disease. **Lancet**, v. 360, n. 9326, p. 2-3, 2002.

ZHAO, Q.; MEMEZAWA, H.; SMITH, M. L. e SIESJO, B. K. Hyperthermia complicates middle cerebral artery occlusion induced by an intraluminal filament. **Brain Res**, v. 649, n. 1-2, p. 253-259, 1994.

ANEXO I – 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 a 200 ml de água destilada (solução A). Acrescentar 114g fosfato de sódio dodecahidratado em 800ml de H₂O_d (solução B). Misturar as duas soluções e ajustar o pH para 7.2-7.4, se necessário com pérolas de Hidróxido de Sódio.

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 H₂O_d. 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 H₂O_d previamente aquecida a 60⁰C. Misturar a solução de paraformaldeído (fria) com 500 ml de tampão fosfato 0.2M e corrigir o pH para 7.2-7.4 quando necessário. O paraformaldeído deve ser preparado no dia do experimento para melhores resultados.

3. SOLUÇÃO CRIOPROTETORA

3.1. Solução Crioprotetoral

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

3.2. Solução CrioprotetoralI

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 secções espessas previamente a análise imunoistoquímica.

4.1. Preparo da Solução de Violeta de Cresila

Dissolver 0.25g de acetato de violeta de cresila em 100 ml de H₂Od. Ajustar o pH para 3.3 com ácido acético quando necessário.

4.2. Coloração Para Violeta de Cresila (secções de 50µm)

Deixar as secções nas seguintes soluções:

- a. solução H₂Od /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 do mesmo retiradas do banho maria, resfriadas por 20 minutos, ainda dentro da solução de tampão borato.

5.3 Imunoistoquímica Para ED1, GFAP, IBA-1.

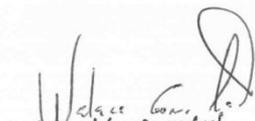
- a. Lavagem em tampão fosfato salina por 3 min, sob agitação constante;
- b. Imersão em metanol +peróxido de hidrogênio a 1% (2,5ml de H₂O₂/250ml de metanol) por 20 minutos;
- c. Demarcação das secções com caneta hidrofóbica;
- d. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 3 minutos;
- e. Bloqueio em soro normal do animal que produziu o anticorpo secundário por 1 hora. No caso do anticorpo ED1, o soro normal de cavalo a 10%. No caso dos anticorpos GFAP e IBA-1 o soro normal de cabra a 10 % foi utilizado;

- f. 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, por 6 horas. As diluições usadas são: ED1 (1:500, Serotec), GFAP (1:2000, Dako), IBA-1 (1:1000, Wako).
- g. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 5 minutos;
- h. Exposição ao anticorpo secundário, por duas horas, nas seguintes diluições: para o anticorpo ED1, utilizou-se o anticorpo secundário biotilado anti-cavalo feito em camundongo (1:100, Vector). Para os anticorpos anti GFAP, IBA-1 utilizou-se o anticorpo secundário biotilado feito em cabra anti coelho (5:1000, Vector).
- i. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 3 vezes de 5 minutos;
- j. Incubação no complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC, Vector) por 2h (uma gota da solução A + uma gota da solução B em 5ml de tampão fosfato salina, preparado com 40 minutos de antecedência);
- k. Lavagem em tampão fosfato salina Tween - 4 vezes de 5 minutos;
- l. Reação em diamino benzidina (DAB) para revelação da peroxidase do antígeno. Alíquotas de DAB (125 mg para 5ml de água destilada) foram descongeladas e diluídas em 250 ml de tampão fosfato 0.1M em uma cubeta reservada especialmente para este fim, visto ser o DAB considerado cancerígeno e para não haver contaminação cruzada com as outras cubas. Precauções extras foram tomadas, tais como a utilização de equipamentos de proteção individual do tipo gorro de proteção, óculos e máscaras descartáveis, além de a reação ser totalmente executada na capela. Antes do início da mesma, acrescentou-se à solução de DAB 130 μ l de H_2O_2 . As secções montadas em lâminas dispostas em uma cesta

histológica foram imersas na solução de DAB/H₂O₂ e monitoradas com auxílio de um microscópio até que o padrão da reação fosse satisfatório. Em seguida, as secções foram desidratadas em baterias de álcool de concentração crescente e cobertas por lamínula com auxílio de Entelan (Merck) e guardadas em caixa plástica própria para visualização posterior.

PARECER CEPAE**comitê de ética em pesquisa
com animais de experimentação****PARECER BIO048-12****Projeto: NEUROATOLOGIA DOS PADRÕES DEGENERATIVOS DA
SUBSTÂNCIA CINZENTA EM DIFERENTES ÁREAS CORTICAIS DE RATOS
ADULTOS SUBMETIDOS À LESÃO ISQUÊMICA FOCAL****Coordenador:** Prof. Dr. Wallace Gomes Leal**Área Temática:** Biologia**Vigência:** 02/2011 a 02/2013**Nº no CEPAE-UFPA: BIO048-12**

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 e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 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.


Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente do CEPAE-UFPA