



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

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DA LESÃO ESTRIATAL EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS DA LINHAGEM LISTER HOODED INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1**

**BELÉM
2012**

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DA LESÃO ESTRIATAL EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS DA LINHAGEM LISTER HOODED INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1**

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

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Wallace Gomes Leal, PhD

**BELÉM
2012**

IJAIR ROGÉRIO COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO NEUROPATOLÓGICA DA LESÃO ESTRIATAL EM RATOS
MACHOS E FÊMEAS DA LINHAGEM LISTER HOODED INDUZIDA
EXPERIMENTALMENTE POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1**

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

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Wallace Gomes Leal, PhD

Data de aprovação: 30/05/2012

Banca examinadora:

Wallace Gomes Leal – Orientador
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

Manoel da Silva Filho - Membro Titular
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

Réia Silvia Lemos da Costa e Silva Gomes - Membro Titular
Professora Doutora
Universidade Federal do Pará

Carlomagno Pacheco Bahia - Membro Titular
Professor Doutor
Universidade Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao Prof.Dr. Manuel Filho, pelo empenho e precisão na construção de micropipetas utilizadas na injeção da endotelina-I na área anatômica do encéfalo de ratos da linhagem Lister Hooded, escolhida à indução isquemia focal.

Agradeço a Prof^a. Dra. Réia Silvia Lemos, que tem acompanhado toda minha trajetória no ICB e é a principal incentivadora desta qualificação, em nível de mestrado, e, também, por sua amizade e companheirismo nos momentos de dificuldades vividos neste período.

Agradeço a Prof^a. Dr. Ana Leda Brino, do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento (NTPC/UFGA), pela dedicação e carinho demonstrados na doação dos animais experimentais necessários para conclusão deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Rafael Lima, pelos ensinamentos das técnicas utilizadas neste trabalho, pelo exemplo de pesquisador competente e acima de tudo por sua amizade.

Agradeço ao meu amigo Reginaldo Trindade, pela orientação, não apenas em questões acadêmicas, mas também em questões pessoais, sendo ele um exemplo de caráter a ser seguido.

Agradeço ao Prof. Adriano Guimarães, MSc, pela amizade, caráter e exemplo de profissional, que não mediu esforços para realização deste trabalho.

Agradeço ao aluno de iniciação científica Diego Siqueira, pela sua dedicação, amizade e compreensão nos momentos em que precisei dele durante os experimentos laboratoriais.

Agradeço aos funcionários do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas- ICB, mas em especial ao Amarildo Gomes de Melo pelas oportunidades de convívio, aprendizado e auxílio constante.

RESUMO

A resposta inflamatória pode exacerbar o processo lesivo após desordens neurais agudas. O dimorfismo sexual gerado pelas diferentes presenças hormonais existentes entre macho e fêmea têm demonstrado habilidades neuroprotetoras endógenas opostas, apresentando uma melhor preservação da integridade do tecido nervoso na fêmea, putativamente, devido à presença dos hormônios ginógenos. Não existem investigações comparando como essa diferença pode afetar a resposta inflamatória durante o AVE. No presente estudo, investigaram-se as diferenças nos processos inflamatórios agudos do dimorfismo sexual de ratos adultos, de ambos os sexos, submetidos à lesão isquêmica aguda induzida por Endotelina (ET1) no corpo estriado. Seis grupos experimentais foram delineados: Animais machos de 24 horas de sobrevivência (n= 8); machos de 72 horas de sobrevivência de (n=8); machos de 7 dias de sobrevivência (n=8); e fêmeas de 24 horas de sobrevivência (n= 8); fêmeas de 72 horas de sobrevivência de(n=8); fêmeas de 7 dias de sobrevivência. A análise histopatológica geral foi realizada em secções coradas pela violeta de cresila. Macrófagos, astrócitos e neurônios foram identificados por imuno-histoquímica com anticorpos específicos para estas células inflamatórias (ED1, anti-GFAP e Anti-NeuN, respectivamente). Realizou-se contagem de micróglia/macrófagos ativados e corpos neuronais nos grupos experimentais mencionados. Não se notou diferença quantitativa entre os diferentes sexos, contudo houve uma aparente queda na quantidade de macrófagos/micróglia em 3 dias, tanto para os machos quanto para as fêmeas, apresentando alguma diferença na ativação astrocitária mais forte em machos. Os resultados sugerem que as diferenças sexuais na linhagem Lister Hooded, não são suficientes para causar diferenças significativas na preservação do tecido nervoso e em alguns aspectos da resposta inflamatória após a indução de isquemia cerebral por meio de ET1.

PALAVRAS-CHAVE: Lister Hooded, isquemia cerebral, resposta inflamatória

APOIO FINANCEIRO: Capes

ABSTRACT

The inflammatory response may exacerbate the process harmful after acute neural disorders. Sexual dimorphism generated by different hormonal attendance between male and female have demonstrated neuroprotective abilities endogenous opposite, showing a better preservation of the integrity of the nervous tissue in female, putatively due to the presence of gynoid hormones. However, there is no research work comparing how this difference might affect the inflammatory response during stroke. In the present study, we investigated the differences in acute inflammatory processes of sexual dimorphism in adult rats of both sexes subjected to acute ischemic injury induced by endothelin (ET1) in the striatum. Six experimental groups were designed: male animals survival 24 hours (n = 8); male survival of 72 hours (n = 8); male survival of 7 days (n = 8) and female 24 hours survival (n = 8), females 72 hours of survival (n = 8); female seven days of survival. Histopathologic analysis was performed in the general sections stained with violet cresila. Macrophages, astrocytes, and neurons were identified by immunohistochemistry with antibodies specific for these inflammatory cells (ED1, anti-GFAP and Anti-NeuN, respectively). We conducted counts activated microglia / macrophages and neuron bodies mentioned in the experimental groups. No difference was observed quantitatively between different sexes, but there was an apparent decrease in the amount of macrophages / microglia at 3 days but in males and in females, presenting apparently some difference in the activation of astrocytes was stronger in males. The results suggest that sex differences, at least in lineage Lister hooded is not enough to cause significant differences in the preservation of nerve tissue and in some aspects of the inflammatory response after induction of cerebral ischemia by ET1.

KEYWORDS: lister hooded, stroke, inflammatory response

Financial support: Capes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)	12
1.1.1	Efeitos do AVE sobre a integridade estrutural do parênquima cerebral	14
1.1.1.1	Excitotoxicidade	14
1.1.1.2	Estresse Oxidativo e Nitrosativo	15
1.1.1.3	Ruptura da Barreira Hematoencefálica	15
1.1.1.4	Apoptose	16
1.1.1.5	Resposta inflamatória no AVE	17
1.2	HORMÔNIOS ESTERÓIDES SEXUAIS	21
1.2.1	Ação sobre a vasculatura cerebral	21
1.2.2	Influência sobre o fluxo sanguíneo	22
1.2.3	Atuação sobre a funcionalidade da Barreira Hematoencefálica	23
1.2.4	Influência na inflamação cerebrovascular	23
1.3	EPIDEMIOLOGIA DAS DESORDENS NEURONAIS	24
1.4	HIPÓTESE EXPERIMENTAL	25
1.5	OBJETIVOS	27
1.5.1	Geral	27
1.5.2	Específicos	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
2.2	PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS	28
2.3	INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1	29
2.4	PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	29
2.5	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICA	30
2.5.1	Análise histopatológica geral	30
2.6	IMUNO-HISTOQUÍMICA	31
2.7	ANÁLISE QUALITATIVA	32
2.8	ANÁLISE QUANTITATIVA	32
2.8.1	Método de contagem	32
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3	RESULTADOS	33
3.1	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO ISQUÊMICA NO ESTRIATO DE RATOS FÊMEAS E MACHOS, APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-I	33
3.2	DISTRIBUIÇÃO E NÚMERO DE MACRÓFAGOS/MICRÓGLIAS ATIVADOS NA ÁREA DE LESÃO APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-I	35
3.3	DISTRIBUIÇÃO E REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS NO CENTRO E NA REGIÃO PERI-INFARTO DA LESÃO ISQUÊMICA, APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-I	38

3.4	PERDA NEURONAL CAUSADA PELA LESÃO ISQUÊMICA, APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-I	40
4	DISCUSSÃO	41
5	CONCLUSÕES	43
6	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVE	Acidente Vascular Encefálico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-1	Interleucina 1
IL-1ra	Receptor antagonista de interleucina
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
Tnf-R1	TNF- receptor 1
TGF- β	Fator- β de crescimento transformador
IL-8	Interleucina 8
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
BHE	Barreira hematoencefálica
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células glias
INF- γ	Interferon Gama
IGF-I	Insulin – like growth fator
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
Cox-2	Ciclooxigenase-2
MMP	Metaloproteinases de matriz
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
NF-kB	Fator nuclear kappa beta
PEG ₂	Prostaglandina E ₂
TGF- β RNAm	RNA mensageiro para TGF- β

TNF- α RNAm	RNA mensageiro para TNF- α
IL-6 RNAm	RNA mensageiro para IL-6
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
ACM	Artéria cerebral média
HES	Hormônios esteróides sexuais
Cit C	Enzima citocromo C
PARP	Enzima poli(ADP- ribose) polimerase
M/F-I7d	Animais machos e fêmeas após sete dias da lesão isquêmica
M/F-I3d	Animais machos e fêmeas após três dias da lesão isquêmica
M/F-I1d	Animais machos e fêmeas após um dia da lesão isquêmica
ET-1	Endotelina-1
pMOL	Picomol
μ L	Microlitro
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
EET	Ácido epoxieicosatrienóico

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define Acidente Vascular Encefálico (AVE) como o surgimento súbito focal ou global de déficits da função neurológica de duração superior a 24 horas ou que leve à morte, cuja única causa reside na origem vascular (WOLFE, 2000; MARKUS, 2008).

O AVE pode ser devido a um trauma trombolítico em vasos de grande e pequeno calibre; a uma lesão embolítica, com ou sem o conhecimento de fatores cardíacos e/ou arterial; à hiperfusão sistêmica na borda da área de lesão; à trombose venosa a hemorragia com ruptura da parede vascular intracerebral e subaracnóide (BROUNS, DE DEYN, 2009). Durante a hemorragia ocorre o extravasamento seguido do acúmulo de sangue e seus derivados no parênquima neural ou no espaço dural (SEDER, MAYER, 2009). Esta condição patológica ocorre após o rompimento de aneurismas e os fatores predisponentes mais frequentes são: tabagismo, obesidade, diabetes, dislipidemia e hipertensão (PETTY et al., 1999; MARKUS, 2008). Independente da causa que resulta o AVE, o comprometimento vascular atua como causa primária em 85% a 90% da lesão isquêmica (PETTY et al., 1999; MARKUS, 2008).

Modelos experimentais de isquemia cerebral têm sido alvo de muitos trabalhos científicos na busca de consistente avaliação e tratamento dessa patologia (HOSSMANN, 1998; VANUCCI et al., 2001). O padrão de lesão isquêmica em ratos é investigado em Modelos Experimentais (ME) de AVE (VANUCCI et al., 2001) com obtenção de patologia semelhante às encontradas em humanos (ALKAYED et al., 1998), imprevisíveis e de estudos clínicos de difícil interferência (HOSSMANN, 2006; ALKAYED et al., 1998). Os modelos experimentais enfocam a busca da aproximação da lesão real em humanos e o estudo do infarto de grandes dimensões e o modelo mais utilizado é o da oclusão da artéria cerebral média (OACM) em ratos (HOSSMANN, 1998), seguido da especificidade sexual, por parecer influenciar na extensão da lesão (VANUCCI et al., 2001; WISE et al., 2001). Em ratos machos a lesão é maior que em ratos fêmeas (WISE et al., 2001); em ratos fêmeas ovariectomizadas a lesão cerebral é semelhante aos de ratos machos (ALKAYED et al., 1998;). Alguns fatores fisiológicos contribuem para o padrão da lesão isquêmica (VANUCCI et al., 2001; ALKAYED et al., 1998), fato que se estende às fases do

ciclo estral (pró-estro e meta-estro), em fêmeas, possibilitando lesões distintas (CARSWELL, DOMINICZAK, MACRAE, 2000).

Durante o AVE experimental, tanto em machos quanto em fêmeas, um prognóstico de severidade é geralmente observado na área lesionada do cérebro (NAKANISHI, ZHANG, 2009; VAGNEROVA et al., 2008): parte do parênquima cerebral lesionado (núcleo isquêmico) sofre morte imediata, outra parte (penumbra isquêmica) pode ser parcialmente lesionada, mantendo o potencial de recuperação após a lesão isquêmica (Figura 1) (DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008; BROUNS, DE DEYN, 2009; VAGNEROVA, KOERNER, HURN, 2008; WANG et al., 2008). A duração, intensidade e a localização do evento isquêmico têm relação direta com a extensão da área lesionada, em ambos os gêneros (BROUNS, DE DEYN, 2009; VANUCCI et al, 2001; WISE et al, 2001).

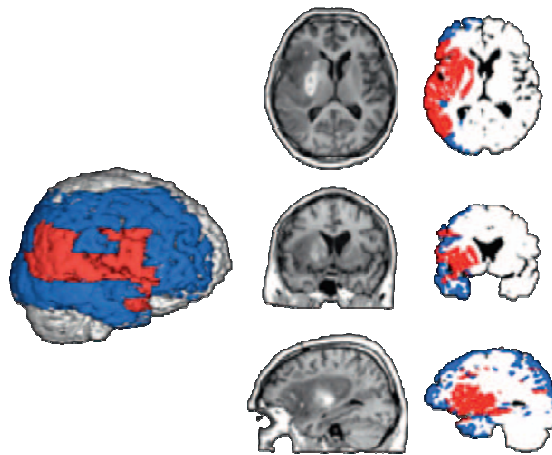


FIGURA 1. Imagens por ressonância magnética (IRM) de um cérebro humano após AVE mostrando o núcleo isquêmico (em vermelho) e penumbra isquêmica (em azul) (WOLFE, 2000).

Em modelos experimentais de AVE em animais vários eventos iônicos, moleculares e genéticos são investigados (HOSSMANN, 2006; MONTANA et al., 2004; HAZELL, 2007): a perda da função da bomba iônica de membrana, a liberação de neurotransmissores excitatórios, a produção de radicais livres de oxigênio e de outras espécies reativas de oxigênio, a ativação de proteínas sinaptossômicas associadas e/ou a expressão de genes.

O AVE provoca mudanças no fluxo de íons que atravessa a membrana celular (BROUNS, DE DEYN, 2009), como nos gradientes dos íons potássio, sódio e cálcio (PARPURA et al., 1994) que provocam um influxo de água, levando ao rápido aumento no volume celular de neurônios e glias, caracterizando o edema excitotóxico (LO, DALKARA, MOSKOWITZ, 2003). Durante o AVE há liberação de neurotransmissores excitatórios (DUAN, SWANSON, 2003), sendo que o glutamato

em áreas isquêmicas induz à transmissão sináptica excitotóxica por ativação do NMDA- N-Metil-D-Aspartato, AMPA- Ácido-amino-3-metil-4-isoxazol-propiónico ou receptores KAINATO (DUAN, SWANSON, 2003) com influxo de íons sódio e cálcio, déficit de ATP e ativação desordenada de enzimas proteases, lípases e nucleases (MONTANA et al., 2004; SZATKOWSKI, BARBOUR, ATTWELL, 1990). As enzimas sinalizam para danos na membrana celular, no material genético e em proteínas estruturais do neurônio (SZATKOWSKI, BARBOUR, ATTWELL, 1990).

Outras vias enzimáticas estão sendo investigadas, pois não se sabe quais atuam durante as condições patológicas no AVE (KIMELBERG et al., 1990; SZATKOWSKI, BARBOUR, ATTWELL, 1990).

1.1.1 Efeitos do AVE sobre a integridade estrutural do parênquima cerebral

Diferenças específicas de sexo à reatividade da circulação têm sido verificadas na circulação periférica e cerebral (SAKUMA et al., 2002; ALKAYED et al., 1998), sendo que o comprometimento vascular, em ambos os gêneros, torna o fluxo sanguíneo deficiente na área lesionada (SEDER, MAYER, 2009; ALKAYED et al., 1998). O volume de oxigênio no local é interrompido e ocasiona vulnerabilidade do tecido cerebral (BROUNS, DE DEYN, 2009). Esse déficit de oxigenação causa declínio na produção de glicose e de ATP, condição que leva ao colapso de vias bioquímicas relacionadas à sobrevivência das células e tecidos (ZHANG, CHOPP, 2009; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008) gerando uma série de eventos relacionados (BROUNS, DE DEYN, 2009; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008): excitotoxicidade, estresse oxidativo e nitrosativo, ruptura da barreira hematoencefálica, resposta inflamatória e apoptose, que culminam na lesão e morte celular (BROUNS, 2009; DOYLE et al., 2008).

1.1.1.1 Excitotoxicidade

A excitotoxicidade progride durante o evento isquêmico por um período de tempo consideravelmente curto (BROUNS, DE DEYN, 2009). Em ambos os gêneros a progressão do evento depende do tipo e severidade da lesão e da concentração do hormônio circulante (ROOF, HALL, 2000). Neste período, neurônios e células gliais perdem suas funções por falhas em suas maquinarias bioenergéticas, em

conseqüência do desequilíbrio iônico resultante (HOSSMANN, 2006; SEDER, MAYER, 2009).

Na rede neuronal afetada verifica-se liberação de neurotransmissor excitatório na fenda sináptica (HAZELL, 2007) com a recaptura desse neurotransmissor comprometido pelo déficit energético instalado no ambiente isquêmico (BROUNS, 2009; HOSSMANN, 2006). O acúmulo de neurotransmissores excitatórios leva à falência das células pós-sinápticas e à morte celular (DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008). Durante o AVE receptores glutamatérgicos de superfície dos neurônios ocasionam a entrada de íons que levam à formação e/ou aparecimento do edema citotóxico, ativação de endonucleases, surgimento de radicais livres e morte celular por mecanismo excitotóxico (BROUNS, DE DEYN, 2009).

1.1.1.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Em condições fisiológicas normais a rede neuronal elimina as substâncias prejudiciais ao funcionamento (DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008), todavia, os radicais livres formados nos eventos isquêmicos atingem concentrações prejudiciais, acumulando-se no ambiente lesionado (BROUNS, DE DEYN, 2009) e podem sofrer influência de hormônios esteróides (MILLER et al., 2005). Um desequilíbrio iônico durante o AVE induz a mitocôndria produzir quantidades elevadas de substâncias reativas derivadas do oxigênio (KNOTT, BOSSY-WETZEL, 2009) e o íon superóxido (O_2^-) liberado no meio isquêmico pode reagir com moléculas de água, formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e liberar a hidroxila (OH^-) (BROUNS, DE DEYN, 2009; KNOTT, BOSSY-WETZEL, 2009). Esses radicais quimicamente instáveis ativam cascatas enzimáticas, danificando as células (HERTZ, 2008; BROUNS, DEYN, 2009). A condição isquêmica favorece a expressão de óxido nítrico sintase (NOS) pelas células inflamatórias da área isquêmica (PARK et al., 2006), com produção do óxido nítrico (NO) que causa estresse oxidativo, lesão no material genético e inibição da cadeia respiratória mitocondrial (KEYNES, GARTHWAITE, 2004) ocasionando grande efeito deletério sobre as células (BROUNS, DE DEYN, 2009).

1.1.1.3 Ruptura da barreira hematoencéflica (BHE)

O NO formado na parede neurovascular, em condições normais, tem efeito vasodilatador e anti-inflamatório (BROUNS, DE DEYN, 2009), mas a elevação da concentração deste óxido durante o AVE provoca danos à integridade celular, comprometendo a permeabilidade vascular local por ativar as MMP-metaloproteínase de matriz extracelular (BROUNS, DE DEYN, 2009). As MMP são enzimas proteolíticas que desempenham sua função na lâmina basal, degradando moléculas que constituem a laminina e fibras colágenas (DEL ZOPPO, HALLENBECK, 2000). A atuação da MMP modifica a adesão entre as células da parede endotelial favorecendo o extravasamento do plasma devido ao aumento da permeabilidade local; bem como, propiciando entrada de leucócitos e, conseqüentemente, de hemácias (LO, 2008; BROUNS, DE DEYN, 2009), cujos efeitos podem ser modulados por hormônios esteróides (PARK et al., 2006; RAZMARA, KRAUSE, DUKLES, 2005; SUNDAY et al., 2006).

1.1.1.4 Apoptose

Os mecanismos moleculares de morte celular (apoptose) não são necessariamente idênticos no cérebro de machos e fêmeas (McCULLOUGH et al., 2005). As primeiras observações clínicas e experimentais relacionadas à diferença sexual na resposta ao AVE foram conferidas aos efeitos dos hormônios gonadais (HOFFMAN; MERCHENTHALER, ZUP, 2006). Estudos “in vivo” e “in vitro” (McCULLOUGH et al., 2005) sugerem que as vias de morte celular na isquemia/AVE diferem no cérebro de machos e fêmeas (DU et al., 2004; McCULLOUGH et al., 2005; RENOLLEAU et al., 2007; YUAN et al., 2009). Em machos, o mecanismo é mediado, em grande parte, pela ativação da oxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e subseqüente ativação da PARP- Poli ADP ribose polimerase (McCULLOUGH et al., 2005). Em fêmeas, essa condição pode se desencadear pela enzima citocromo C (Cito C) e ativação de caspase (McCULLOUGH et al., 2005; LANNG, McCULLOUGH et al., 2008).

A morte celular por apoptose ocorre após os eventos de excitotoxicidade, produção e liberação de radicais livres, desequilíbrio iônico e alterações no DNA mitocondrial (SUGAWARA et al., 2004; BROUNS, DE DEYN, 2009). Esse processo

pode ocorrer por uma via dependente de receptor (uma via extrínseca) e por fatores resultantes de sinalizações internas mitocondriais (via intrínseca) que independem de receptor (DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008).

O AVE modifica mecanismos bioquímicos em regiões internas da mitocôndria, na cadeia respiratória, onde as enzimas que atuam no transporte de elétrons livres são direcionadas ao citoplasma (SUGAWARA et al., 2004). A citocromo C entra em reação com moléculas pró-apoptóticas específicas (Apaf-1) desencadeando a ativação de enzimas caspase-9 (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008) que ativa a enzima caspase-3 (SUGAWARA et al., 2004) notada na estrutura do citoesqueleto celular (VILA, PRZEDBORSKI, 2003) e na ação de endonucleases sobre a molécula de DNA nuclear, consolidando a morte celular (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008).

A morte celular por apoptose é, também, desencadeada por vias bioquímicas dependentes de receptores e seus ligantes (DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008), como receptores tipo Fas/CD-95, TNF-R1 e seus ligantes FAS (FasL) e TNF- α (VILA, PRZEDBORSKI, 2003). A ativação da enzima caspase-8 após a junção entre receptor e ligante, segue vias distintas: ativar caspase-3 e ocasionar mudança na concentração da enzima PARP provocando modificação na produção de NADP e ATP (VILA, PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008) e ativar enzimas desoxirribose nucleases ativadas por caspases (VILA, PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004). Esse desequilíbrio resulta em danos ao material genético celular (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008).

A caspase-8 pode ativar uma via que envolve a proteína bcl, pró-apoptótica (VILA, PRZEDBORSKI, 2003), que em associação com proteínas Bax e Bak ocasionam a formação de poros na membrana mitocondrial e liberação de citocromo C, mediando morte celular por caspase (VILA, PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004).

1.1.1.5 Resposta inflamatória no AVE

Ao acidente vascular encefálico tem sido associada uma ampla gama de condições inflamatórias sistêmicas (DI NAPOLI, 2001; EMSLEY, TYRRELL, 2002) que desencadeiam: inflamação, excitotoxicidade, produção de óxidos nítricos, radicais livres e apoptose (EMSLEY, TYRRELL, 2002). Esses eventos são

influenciados por hormônios (SUNDAY et al., 2006) nas doenças vasculares e na lesão isquêmica cerebral (SANTIZZO, PELLIGRINO, 1999; SANTIZZO, PELLIGRINO et al., 2000) por suprimir a atividade de mediadores inflamatórios (GIBSON et al., 2005; OSPINA et al., 2004; GIBSON et al., 2005; RAZMARA, KRAUSE, DUKLES, 2005; WEN et al., 2004). A intervenção hormonal limita o dano celular no ambiente isquêmico (WEN et al., 2004) e provoca mudanças temporais na sinalização celular, na transdução de sinal, no metabolismo e na regulação e/ou expressão dos genes (TANASESCU et al., 2008). Fármacos têm sido testados nessas vias com o objetivo de minimizar perdas teciduais e/ou déficits neurológicos (ADIBHATLA, HATCHER, 2008).

Durante o evento isquêmico ocorre expressão de genes pró-inflamatórios que codificam fatores de transcrição, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (ADIBHATLA, HATCHER, 2008; TANASESCU et al., 2008). As citocinas induzem inflamação, ativação imunológica, diferenciação e morte celular (ZOPPO, HALLENBECK, 2000), que na circulação sistêmica são produzidas por macrófagos ativados, monócitos, linfócitos, células endoteliais e por muitos outros tipos celulares (TERAI et al., 1996). No sistema nervoso central (CNS) as micróglia ativadas são as responsáveis por essa expressão (EMSLEY, TYRRELL, 2002).

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (fator- α de necrose tumoral), IL-1 β (interleucina-1 β) sinalizam para lesão parenquimatosa (DEL ZOPPO, HALLENBECK, 2000; WANG, TANG, YENARI, 2007). A IL-1 (interleucina-1) possui efeito pró-inflamatório durante o AVE e seus efeitos são neutralizados por IL-1ra (receptor antagonista de IL-10 e IL-1) (ADIBHATLA, HATCHER, 2008). Pacientes com AVE apresentam elevados níveis de IL-1ra nos quatro primeiros dias (BEAMER et al., 1995; ADIBHATLA, HATCHER, 2008; EMSLEY; TYRRELL, 2002). A condição de AVE ativa a expressão do IL-6 mRNA (LODDICK, TURNBULL, ROTHWELL, 1998) e a interleucina-6 (IL-6) atinge níveis elevados nos primeiros dias após o AVE (LODDICK, TURNBULL, ROTHWELL, 1998). A expressão e codificação de citocinas ocorrem no núcleo isquêmico, áreas Peri-infarto e nas áreas adjacentes à lesão isquêmica (BUTTINI et al., 1996; ELKIND et al., 2002). Durante o AVE há codificação de TNF- α RNAm e os efeitos da TNF- α podem ser controlados por administrações de TNF- receptor 1 (stnf-R1) ou anticorpo monoclonal anti-TNF- α (LODDICK, TURNBULL, ROTHWELL, 1998; BUTTINI et al., 1996). O AVE desencadeia a expressão de TGF- β RNAm (BUTTINI et al., 1996). O fator- β de crescimento transformador (TGF- β), interleucina anti-inflamatória, é expressa nas áreas periféricas à lesão isquêmica (SKINNER et al., 2009). Na área de penumbra isquêmica e em períodos de recuperação de doenças do CNS sugere função neuroprotetora (KRUPINSKI et al., 1996).

Durante o AVE a IL-10, interleucina anti-inflamatória (SKINNER et al., 2009), tem sua concentração aumentada e estudos sugerem que as células ao redor da lesão isquêmica são as responsáveis pela secreção desse polipeptídeo (VAN EXEL et al., 2002). A interleucina-8 (IL-8) em níveis elevados no plasma é observada em pacientes com AVE (LOS Y, ZAREMBA, 2001; MENNICKEN et al., 1999) e tem relação com o recrutamento de neutrófilos (LOS Y, ZAREMBA, 2001) localizados nos primeiros momentos do AVE na área de lesão (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; SOUZA RODRIGUES, 2008). Essas células direcionam-se ao parênquima neural durante desordens neurais agudas na medula espinhal e no encéfalo com função fagocitária de remoção de corpos estranhos na área lesionada (GOMES-LEAL, CORKILL, PIKANÇO-DINIZ, 2005; LIMA et al., 2008) alcançando o pico máximo na área lesionada em 24 horas (BOLTON, PERRY, 1998; GOMES-LEAL, CORKILL, PIKANÇO-DINIZ, 2005), liberando citocinas inflamatórias, enzimas proteolíticas e radicais livres prejudiciais ao tecido cerebral lesionado (CHOU et al., 2004). Algumas dessas enzimas proteolíticas degradam componentes da matriz extracelular e da junção neurovascular, aumentando a permeabilidade dos vasos sanguíneos no ambiente isquêmico (STOWE et al., 2009).

A presença dos neutrófilos na área lesionada pelo AVE e a ativação plaquetária dificultam o fluxo sanguíneo (BROUNS, DE DEYN, 2009; DOYLE, SIMON, STENZEL-POORE, 2008), ocasionando mais hipóxia tecidual e ampliando a extensão da lesão isquêmica (DEL ZOPPO, HALLENBECK, 2000). Na condição patológica isquêmica os neutrófilos e outras células inflamatórias ativam mecanismos de liberação de radicais livres e proteases que são lesivos ao parênquima tecidual (AKOPOV, SIMONIAN, GRIGORIAN, 1996).

Durante o AVE o aumento de MCP-1 (Proteína quimioatrativa de monócitos) tem sido associado com a infiltração de monócitos e macrófagos (LOS Y, ZAREMBA, 2001). A CCL-5 (Citosina quimioatrativa de leucócitos) é regulada na expressão normal de células T que através de seu receptor CCR5 promove a ativação e migração de leucócitos ao tecido lesionado (CANOUI-POITRINE et al., 2009).

Outro tipo celular que responde ao evento isquêmico são os linfócitos (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; SOUZA RODRIGUES, 2008). A ativação de linfócitos provoca uma resposta celular que envolve produção de citocinas, expressão de receptores de citocinas e proliferação celular (ABBAS, SEN, 2003). Em situações patológicas do sistema nervoso central (SNC) essas células são evidenciadas (MUKHTAR et al., 2005), pois exercem ações na resposta inflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias e promovendo a quimiotaxia a outros leucócitos (SCHWAB et al., 2001; YLMAZ et al., 2006). O efeito citotóxico provocado pelo

MHC- classe I (complexo principal de histocompatibilidade classe I) está também vinculado aos linfócitos (CABARROCAS et al., 2003). Distintas ativações de células T têm relação com as funções protetoras dos linfócitos, e, essa ativação correlaciona-se com a gravidade da lesão (LINFERT, CHOWDHRY, RABB, 2009).

Durante a evolução temporal da lesão cerebral por AVE, células micróglias respondem aos processos inflamatórios em áreas próximas e distantes do sítio da lesão (CLARK et al., 1993; VAGNEROVA, KOERNER, HURN, 2008). Após o AVE, micróglias são ativadas e acumulam-se na área lesionada (SCHILLING et al., 2005), sendo que a ativação microglial precede e predomina sobre a infiltração de macrófagos. Hormônios esteróides sexuais (HES) influenciam a ativação microglial e em um estudo *in vivo*, após AVE, a ativação microglial foi reduzida e/ou inibida por tratamento com progesterona (SCHILLING et al., 2005; WU et al., 2005).

Considerada a molécula imunoefetora do SNC (ALOISI, 2001) em condições fisiológicas normais (DAVALOS et al., 2005) apresentam morfologia ramificada (RANSOHOFF, PERRY, 2009). Quando há mudanças fisiológicas no meio, elas passam a apresentar morfologia diferente (ZIELASEK, HARTUNG, 1996), caracterizando-as como ativas (KREUTZBERG, 1996; PERRY, 1994; HAWLISCH, KOHL, 2006). Situações de estresse induzem ativação microglial (PERRY, 2007), pois neurônios submetidos a situações de estresse produzem ATP e ADP que ativam mecanismos que sinalizam em receptores específicos da membrana destas células, ativando-as (DAVALOS et al., 2005; RAIVICH, 2005). Na condição de ativada a micróglia possui morfologia ameboide com prolongamentos curtos e grossos e função fagocítica (STREIT, GRAEBER, 1993). Micróglia ativada secreta GDNF- fator neurotrófico derivado de células gliais que desempenha função benéfica à sobrevivência de neurônios (BATCHELOR et al., 2003) e aumenta a expressão de moléculas de membrana da família MHC classes I e II, receptores CD₄ e CD₈ e receptores do complemento (PERRY, ANDERSSON, GORDON, 1993; STOLL, SCHRORETER et al., 2001, JANDER, 1999). Em algumas situações de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas essa célula desempenha papel neurotóxico que contribui para a morte neuronal (BLOCK, HONG, 2005; GIULIAM, VACA, CORPUZ, 1993; GOMES-LEAL, et al 2004b) podendo dificultar a neurogênese endógena nas doenças neurodegenerativas (EKDAHL, KOKAIA, LINDIVALL, 2009). Micróglia ativada secreta GDNF- fator neurotrófico derivado de células gliais que desempenha função benéfica à sobrevivência de neurônios (BATCHELOR et al., 2003).

Na condição de AVE a ativação microglial intensa é no centro e na área de penumbra da lesão isquêmica (MARIOKA, KALEHUA, STREIT, 1993), sendo que a ativação microglial excessiva contribui para o aumento da lesão isquêmica

(HAYAKAWA et al., 2008). A função benéfica ou deletéria da micróglia é dependente do estímulo (BUTOVSKI et al., 2005; SCHWARTZ et al., 2001), dentre estes o LPS e β amiloide, que em experimentos *in vitro*, induzem um função microglial deletéria, por sintetizar excessivamente o fator TNF- α (BUTOVSKI et al., 2005).

Durante o AVE a resposta astrocitária funciona como um marcador da resposta celular (STOLL et al., 1998) e a passagem do estado não ativado ao ativado está associado à forte expressão da GFAP-proteína ácida fibrilar glial (GFAP)(PEKNY, NILSSON, 2005). A GFAP é um marcador de lesão neuronal (HERRMANN, EHRENREICH, 2003) e astrócitos positivamente marcados localizam-se ao redor da área lesionada (LI et al., 1995). A condição de reatividade astrocitária pode diferir em machos e fêmeas (ZHU et al., 2004), sendo o pico da resposta astrocitária entre 24 e 72 horas após o AVE, dependente do ciclo estral (WENG, KRIZ, 2007). Em fêmeas, a reatividade astrocitária parece ser mais intensa (WILHELMSSON et al., 2006); em machos há forte correlação com o aumento da resposta astrocitária e a morte neuronal (HERRMANN, EHRENREICH, 2003).

A ciclooxigenase-2 (Cox-2) mRNA e alguns prostanóides tóxicos e espécies reativas de oxigênio secretadas por micróglia estão presentes na periferia da área onde ocorreu o AVE (DEL ZOPPO et al., 2000). MMP-metaloproteinases de matriz contribuem para a resposta neuroinflamatória (LO, DALKARA, MOSKOWITZ, 2003). MMP-9, na fase aguda do AVE, quando comparado ao MMP-2, em fase de recuperação, estabelecem efeitos nocivos e benéficos (MUN-BRYCE, ROSENBERG, 1998). O MMP-9, em nível elevado, têm associação com a resposta neurológica deficiente; bem como, com o aumento da lesão isquêmica e de processos desencadeadores de hemorragia (MONTANER et al., 2003).

1.2 HORMÔNIOS ESTEROIDES SEXUAIS

1.2.1 Ação sobre a vasculatura cerebral

Fontes conhecidas de hormônios esteróides sexuais circulantes (HES) no organismo são as gônadas, responsáveis pelas diferenças hormonais bem conhecidas entre machos e fêmeas. Os níveis de hormônios endógenos no organismo não são constantes e proporcionam modificações na vasculatura cerebral (PUROHIT, REED, 2002; ALKAYED et al., 2000). Modificações dos níveis hormonais, em fêmeas, são frequentes durante o ciclo menstrual, estral e durante a

gravidez (ANDERSSON et al., 2003). Em machos as modificações ocorrem ao longo do período diurno e com avanço da idade (ANDERSSON et al., 2003).

Os tecidos vasculares cerebrais expressam receptores específicos e enzimas metabólicas para esteroides gonadais (MENDELSON, KARAS, 1999). Receptores de estrógenos, ER- α e ER- β , localizam-se em regiões distintas do cérebro (SAWADA et al., 2000), sendo o ER- β , geralmente, expresso no neocórtex, enquanto o ER- α é expresso no córtex cerebral, após um AVE (DUBAL et al., 1999). ER- α e ER- β são receptores nucleares para o estrógeno (DAN et al., 2003) e expressos em vasos sanguíneos intracerebrais, na parede endotelial dos vasos, membrana celular das células endoteliais e no interior da mitocôndria, colocalizados com a subunidade proteica do complexo IV (DAN et al., 2003, STIRONE et al., 2005).

Há evidências de que alguns tecidos de órgãos não envolvidos na reprodução sintetizam hormônios esteroides sexuais (SIMPSON, 2003), como em vasos sanguíneos cerebrais de ratos, onde a enzima aromatase P450 participa da conversão de testosterona a 17- α estradiol, sugerindo um local de metabolismo de hormônios esteroides (CARSWELL, DOMINICZAK, MACRAE, 2000).

1.2.2 Influência sobre o fluxo sanguíneo

O fluxo sanguíneo sofre influência dos hormônios esteroides sexuais (ALKAYED et al., 2000; AZAD et al., 2003). Durante o ciclo menstrual, gravidez (DIOMEDI et al., 2001; KREJZA et al., 2004) e no tratamento por reposição hormonal (BAIN et al., 2004) há aumento do fluxo sanguíneo (BAIN et al., 2004; SHAW et al., 1984). Diferenças específicas ao sexo na funcionalidade da circulação sanguínea têm sido constatadas tanto na circulação periférica quanto na circulação cerebral (ALKAYED et al., 2001; SAKUMA et al., 2002). No AVE o fluxo sanguíneo é alterado pelo estrógeno (ALKAYED et al., 2001) e modificações são mediadas no endotélio (GEARY, KRAUSE, DUCKLES, 1998) dependentes do óxido nítrico (NO), de alguns prostanoides e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio-EDHF (LIU et al., 2001). Mudanças nos níveis de estrógeno em fases do ciclo estral (DIOMEDI et al., 2001; KREJZA et al., 2004) e em situações pós-ovariectomia, causam modificações do endotélio e nos níveis de NO (LIU et al., 2001). A enzima epóxido hidrolase envolvida no metabolismo do EDHF é suprimida pelo estrógeno (KOERNER et al., 2008), fato que aumenta a concentração do ácido

epoxieicosatrienóico – EET que potencializa a capacidade vasodilatadora, em resposta à oclusão vascular por AVE (KOERNER et al., 2008). A vasodilatação da artéria cerebral média (ACM), em ratas fêmeas, mediadas por EDHF é considerada tênue em relação a ratos machos (GOLDING, KEPLER, 2001), sendo que em fêmeas ovariectomizadas há recuperação da vasodilatação pela reposição do estrógeno (GOLDING, KEPLER, 2001).

1.2.3 Atuação sobre a funcionalidade de barreira hematoencefálica (BHE)

Hormônios esteroides sexuais modificam a regulação da permeabilidade à água (DIETRICH, 2004) e no AVE os hormônios esteroides sexuais parecem influenciar no tamanho do edema cerebral (JONES et al., 2005). A funcionalidade da barreira hematoencefálica (BHE) é influenciada pelos hormônios esteroides sexuais (DIETRICH, 2004) e a reposição hormonal possibilita maior permeabilidade a alguns traçadores no encéfalo e diminui o extravasamento de corantes ao bulbo olfatório e hipocampo, indicando um fechamento da barreira. A permeabilidade em várias áreas do encéfalo, em ratos fêmeas, é aumentada após ovariectomia (BAKE, SORHABJI, 2004; DIETRICH, 2004).

1.2.4 Influência na inflamação cerebrovascular

A atividade hormonal desempenha um efeito potencial nas doenças vasculares e na lesão isquêmica cerebral (JONES et al., 2005) e os hormônios esteroides sexuais (HES) influenciam processos inflamatórios desencadeados no encéfalo (SUNDAY et al., 2006), sendo que a reposição hormonal diminui a adesão de leucócitos nos vasos sanguíneos (SANTIZZO, PELLIGRINO, 1999; SANTIZO et al., 2000). Os esteroides sexuais inibem a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais cerebrais (DIETRICH, 2004; GALEA et al., 2002). A COX-2, proteína que atua no processo inflamatório, induz a formação do mediador inflamatório PEG₂ (OSPINA et al., 2004) e a reposição hormonal suprime a COX-2, conseqüentemente, a produção de PEG₂ nos vasos sanguíneos após o AVE (OSPINA et al., 2004; SUNDAY et al., 2006). Outro mediador inflamatório NOS-

óxido nítrico sintetase é suprimido por HES em vasos sanguíneos após um AVE (PARK et al., 2006; RAZMARA, DUKLES, KRAUSE, 2005).

A via NF-kB está envolvida com a expressão de vários mediadores inflamatórios vasculares (DEATH et al., 2004; GALEA et al., 2002; OSPINA et al., 2004). Os esteroides sexuais atenuam essa via molecular durante o AVE (WEN et al., 2004) e executam funções pró-inflamatórias em vasos sanguíneos cerebrais (RAZMARA et al., 2005). Em animais que receberam tratamentos com HES os efeitos pró-inflamatórios foram mais evidentes (DEATH et al., 2004; RAZMARA; DUKLES, KRAUSE, 2005), pois os HES suprimem a resposta inflamatória e a expressão de NOS no cérebro após um AVE (GIBSON et al., 2005).

Hormônios esteroides sexuais aumentam a produção e/ou a sensibilidade a fatores vasodilatadores (CHRISOBOLIS, SOBEY, 2004; OSPINA et al., 2004), sendo que o óxido nítrico (NO), prostanoídes e EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio) estão envolvidos nesse processo (MOMOI, IKOMI, OHASHI, 2003).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DAS DESORDENS NEURONAIS

Patologias agudas e crônicas do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) afetam um considerável contingente de pessoas em diversas regiões do mundo (LO, DALKARA, MOSKOWITZ, 2003), por isso Investigar para conhecer os mecanismos que desencadeiam os fatores responsáveis pelos déficits adquiridos após o acometimento dessas patologias é de fundamental importância para melhor avaliação clínica e utilização de abordagens terapêuticas adequadas (LO, DALKARA, MOSKOWITZ, 2003).

Essas doenças demandam um custo financeiro ao sistema de saúde pública e deixam sequelas irreversíveis nos indivíduos acometidos, ocasionando incapacidade e invalidez na faixa etária adulta (CARMICHAEL, 2005). O quadro de desordens neuronais coloca o Brasil em sexto lugar em casos, quando comparado a outros países da América Latina (OMS-2003). A morbidade por doenças neuronais e cardíacas supera os casos de óbitos por doenças infecciosas (LOTUFO, BENSENOR, 2007). No EUA e em países da Europa um número elevado de pessoas morre em consequência dessas patologias (TAYLOR et al., 1996). Entre as doenças neuronais agudas mais importantes, destacam-se o acidente vascular

encefálico (MITSIOS et al., 2006), lesão aguda da medula espinhal e o trauma crânio encefálico (GOMES-LEAL, 2004).

Evidências clínicas e epidemiológicas reforçam que o risco ao AVE e as medidas de tratamentos adotadas estão relacionados ao gênero e aspectos fisiológicos (VAGNEROVA, KOERNER, HURN, 2008). O acidente vascular encefálico tem maior incidência nos homens (SUDLOW, WARLOW, 1997) e os acidentes transitórios em homens são estimados em 2,7% na faixa etária de 65-69 anos e 3,6 % entre 75-79 anos (ROSAMOND et al., 2007). Em mulheres os acidentes transitórios assumem valores de 1,6% entre 65-69 anos e de 4,1% nas idades de 75-79 anos (ROSAMOND et al., 2007). Esse padrão sexualmente dimórfico está presente em crianças e estende-se até a idade próxima a menopausa (FULLERTON et al., 2003; GOLOMB et al., 2009).

Estudos sobre a incidência, comprometimento físico e mortalidade (ROSAMOND et al., 2007) enquadram o AVE como a segunda causa de morte no mundo (ROSAMOND et al., 2008; ZHANG, CHOPP, 2009) e a principal complicação orgânica que leva às disfunções físico-neurológicas, frequentemente, graves e permanentes (DOBKIN, 2005; LEGG, LANGHORNE, 2004). Aproximadamente 47% dos afetados por AVE adquirem sequelas motoras (DERUGIN, 2003; DOBKIN, 2005; LEGG, LANGHORNE, 2004; TUREYEN et al., 2005) e passam a depender de cuidados especiais, onerando os gastos hospitalares e de reabilitação (ZHANG, CHOPP, 2009; LEGG, LANGHORNE, 2004; DOBKIN, 2005).

As considerações expostas justificam a importância de abordagens experimentais e clínicas que proporcionem tratamentos mais eficientes aos indivíduos acometidos por desordens neuronais agudas e crônicas.

1.4 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

Evidências clínicas e epidemiológicas reforçam que o risco de acidente vascular encefálico e as medidas de tratamentos adotadas após a lesão isquêmica estão relacionados aos aspectos fisiológicos dos pacientes (VAGNEROVA et al., 2008) e que as diferenças nos padrões da lesão são atribuídos a efeitos diversos, resultantes dos processos iônicos e bioquímicos posteriores à privação de oxigênio no parênquima cerebral (BROUNS, DE DEYN, 2009; DOYLE, SIMON, ZTENZEL-POORE, 2008; HURN, BRASS, 2003).

Diversos modelos experimentais de AVE em ratos (VANUCCI et al, 2001) proporcionam patologia semelhante à encontrada em humanos (ALKAYED et al., 1998) e esses modelos tornam-se mecanismos práticos importantes para avaliar a morte celular, a progressão da lesão, as respostas inflamatórias e os déficits motores resultantes da lesão isquêmica (DOBKIN, 2005; LEGG, LANGHORNE, 2004). Os processos presentes em outros tipos de lesões agudas do SNC são influenciados por características fisiológicas específicas a cada gênero (ALKAYED et al., 2000; ORSHAL, KHALIL, 2004).

Tecidos vasculares cerebrais expressam receptores específicos e enzimas metabólicas (MENDELSON, KARAS, 1999) que parecem mediar os efeitos dos hormônios esteroides na circulação cerebral (DAN et al., 2003). Estudos experimentais e clínicos demonstram que o fluxo sanguíneo aumenta em função da presença de certo hormônio na circulação cerebrovascular (ALKAYED et al., 2000; BAIN et al., 2004), atuando na funcionalidade da barreira hematoencefálica e da rede de capilares cerebrais (DIETRICH, 2004). Essas alterações nos níveis hormonais (BAKE, SORHABJI, 2004) modificam processos inflamatórios nas doenças vasculares e na lesão isquêmica cerebral (SUNDAY et al., 2006) suprimindo a excitotoxicidade (SINGER et al., 1996; SMITH et al., 1987), a apoptose (ALKAYED et al., 2001; ALKAYED et al., 2000), a toxicidade (GOODMAN et al., 1996), a formação de edema (ROOF et al., 1994; ROOF, DUVDEVANI,STEIN, 1993) e a produção de antioxidantes (AYRES et al., 1998; BRUCE-KELLER et al., 2000).

Essa condição cerebrovascular regula outros fatores (GOLLAPUDI, OBLINGER et al., 1999; TORAN-ALLERAND, SINGH, SÉTALÓ, 1996) e a função anti-inflamatória (HUNT et al., 1997; SALEM, HOSSAIN, NOMOTO, 2000) altera o número de micróglia ativa (LEI et al., 2003), modifica a adesão e migração de leucócitos intravasculares no cérebro (SANTIZO et al., 2000) e a reatividade astrocitária após o AVE (WEN et al., 2004). As evidências neuroprotetoras, estendem-se durante uma janela temporal (WEN et al., 2004) dependente do gênero, do tipo celular e do local da lesão isquêmica (CHOI et al., 2004; KELLY, QIU, RONNEKLEIV, 2003; WANG et al., 2006).

Nessa pesquisa induzimos lesão focal isquêmica por injeção de endotelina-1 no corpo estriado de ratos adultos Lister Hooded para investigar a hipótese de que o padrão histopatológico e a resposta inflamatória da lesão isquêmica comportam-se distintamente em machos e fêmeas.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Geral

Investigar, comparativamente, a histopatologia e a resposta inflamatória da lesão focal isquêmica, por injeções de endotelina-1, no corpo estriado de ratos adultos Lister Hooded, machos e fêmeas.

1.5.1.1 Específicos

- ▲ Comparar o padrão histopatológico da lesão focal isquêmica no estriato.
- ▲ Descrever a distribuição e o número de células inflamatórias (micróglia/macrófagos) que migram à área de lesão, após a lesão focal isquêmica.
- ▲ Descrever a reatividade astrocitária e a morte dessas células na periferia e centro da lesão.
- ▲ Avaliar, quantitativamente, a perda neuronal provocada por injeções de endotelina-1.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Lister Hooded, machos e fêmeas adultos, pesando entre 250-350 g. Os animais ficaram alojados em gaiolas contendo 4-5 animais, com água e comida na proporção ideal a cada exemplar. Os procedimentos experimentais foram executados conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará, objetivando reduzir ao máximo o sofrimento e a ansiedade nos animais.

O protocolo delineou a formação de três grupos de animais experimentais, conforme disposição na tabela abaixo:

TABELA 1. Grupos Experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

Grupos	Descrição	Número
M/F-17d	Animais machos e fêmeas que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e a indução de isquemia com ET-1. Com sobrevida de 7d.	8
M/F-13d	Animais machos e fêmeas que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e a indução de isquemia com ET-1. Com sobrevida de 3d.	8
M/F-11d	Animais machos e fêmeas que receberam todos os procedimentos cirúrgicos e a indução de isquemia com ET-1. Com sobrevida de 1d.	8

2.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS

Os animais foram adquiridos com seis meses de antecedência da data prevista para o início das cirurgias, ambientados em gaiolas-padrão e manipulados sobre balança de precisão para acompanhamento do ganho de massa corpórea ideal ao momento da cirurgia.

2.3 INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

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

As coordenadas adotadas a partir do bregma foram: +1,0 mm, anterior; +2,5mm, médio-lateral; e -4,5 mm, dorso-ventral, a partir da superfície cortical. Uma incisão longitudinal feita com bisturi expôs a caixa craniana e no ponto especificado pelas coordenadas estereotáxicas, realizou-se craniotomia com auxílio de broca cirúrgica odontológica de baixa rotação para exposição da superfície cortical.

Com auxílio de uma micropipeta de vidro graduada (Sigma-Aldrich, Hirschmann) foi injetado 80 pMols, diluída em 1 µL de corante azul colanil, de modo a permitir a localização da área de injeção. A micropipeta permaneceu fixa por cinco minutos no parênquima neural para evitar possíveis refluxos.

Após os procedimentos cirúrgicos, os ratos foram observados, em intervalos regulares, visando o monitoramento da recuperação e da evolução dos sintomas causados pelo dano isquêmico, mantidos em gaiolas-padrão individuais durante o tempo de sobrevida de 1, 3 e 7 dias.

2.4 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

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

Os encéfalos foram retirados e pós-fixados por 24 horas em paraformaldeído 4% tamponado. Em seguida, foram crioprotetidos em soluções com concentrações

crescentes de sacarose a 25%, 50%, 100% diluídos em mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05 M- pH 7,2 – 7,4.

Após a crioproteção, os encéfalos foram incluídos em TissueTek® (Sakura) para congelamento a -35°C em câmara de criostato (Microm HE 505E) e, posteriormente, seccionadas por navalhas INOX fixadas em criostato. As secções de 20µm foram montadas em lâminas histológicas gelatinizadas e conservadas em um freezer a -20°C para uso posterior em protocolos de histoquímica e imunohistoquímica.

2.5 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E IMUNOHISTOQUÍMICA

2.5.1 Análise histopatológica geral

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

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

2.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A presença de micróglia/macrófagos ativados foi identificada pela imunomarcagem com anticorpo ED-1 (1:200, Serotec) que reconhece um epítipo na membrana de lisossomos de macrófagos ativados (ROBINSON, WHITE, MASSON, 1986). Corpos neuronais foram marcados com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon-Millipore) que marca um epítipo específico no núcleo de neurônios maduros (MULLEN, BUCK, SMITH, 1992). Astrócitos foram marcados por anti-GFAP (Dako®, Z0334, 1:1000) que marca a proteína acídica fibrilar glial importante na identificação da forma e do movimento de astrócitos (FAHMY, MOFTAH, 2010).

De acordo com trabalho de Gomes-Leal et al.(2002) procedeu-se à retirada das secções aderidas às lâminas microscópicas mantidas ao freezer, colocando-as na estufa (Brasdonto, BrClave) a 40 °C por 20 minutos. Em seguida, as secções foram delimitadas com Pap-PEN (Invitrogen), de modo a concentrar por mais tempo as gotas de soluções por cima delas despejadas; lavadas em PBS, por 3 minutos, para remoção do excesso de TissueTek; imersas em tampão borato (0,2M; ph 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções ficaram 20 minutos à temperatura ambiente, depois lavadas em PBS, por 3 minutos, e submetidas ao tratamento com solução de metanol (QEEL) – peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) na proporção de 1ml de H₂O₂ para cada 100 ml de metanol absoluto, sob agitação constante. Foram lavadas, por 3 vezes, (3 minutos cada) em solução PBS/Tween (Sigma-Aldrich®) e incubadas por 1 hora em soro normal de cavalo a 10% (para ED-1 e NeuN) ou soro normal de cabra (para anti-GFAP) em câmara úmida. Após a incubação em anticorpo primário, as secções foram lavadas por 3 vezes (3 minutos cada) na solução de PBS/Tween® e incubadas por 2 horas no anticorpo secundário biotilado anti-camundongo feito em cavalo (1:100 , ED-1; 1:200, NeuN), ou anti-coelho feito em cabra (1:200, GFAP). Após esse período, 3 lavagens foram realizadas (3 minutos cada) em PBS/Tween® para que as secções fossem incubadas no complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector®, kit ABC Vectastain®) por 2 horas. As secções foram lavadas 4 vezes (3 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas em uma solução contendo 250ml de PB 0,1M (pH 7,2–7,4), juntamente com 125mg de DAB e 130µl de H₂O₂. As secções foram monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação ficasse adequada. Após o término da revelação as secções foram lavadas em PB 0,1M (pH 7,2–7,4), desidratadas em gradientes de álcool /xileno e montadas em Entellan (Merck).

2.7 ANÁLISE QUALITATIVA

As secções de todos os grupos experimentais, marcadas pelos métodos imuno-histoquímicos e histoquímicos foram analisadas em microscópio óptico binocular (Eclipse- E200MV R). As imagens dos campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmara digital (Moticam®-5500- 5Mpixels) acoplada ao microscópio óptico (Nikon®, ECLIPSE 50i).

2.8 ANÁLISE QUANTITATIVA

2.8.1 Método de contagem

Os números de macrófagos ativados (células ED1⁺) e os corpos neuronais (células NeuN⁺) de todos os grupos experimentais foram obtidos utilizando-se um microscópio binocular (Eclipse- E200MV R) com uma gradícula de área 0,0625 mm² acoplada à ocular, com o foco do campo escolhido na objetiva de 40X. Utilizou-se nas contagens três secções por lâmina, todo campo ao redor de lesão por secção e quatro animais para cada grupo experimental.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por análise de variância um critério e teste de correção de Tukey. O nível de significância estipulado foi de $p < 0,05$ (ANOVA, um critério, posthoc Tukey, $p < 0,05$). A construção gráfica e a análise estatística realizada no programa Biostat 5.0.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA LESÃO ISQUÊMICA NO ESTRIATO DE RATOS FÊMEAS E MACHOS, APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1.

Microinjeções de 80 pMols de endotelina-1 no corpo estriado de ratos Lister Hooded adultos jovens, machos e fêmeas, ocasionaram perda tecidual e infiltrações de células na região isquêmica, evidenciada por meio de coloração de violeta de cresila (figura 2). Em machos e fêmeas 1 dia após lesão isquêmica o concentrado de células inflamatórias era visível.

A tendência persistiu no tempo de sobrevivência de 3 dias mostrando uma infiltração mais intensa em fêmeas.

Com 7 dias após a lesão isquêmica o infiltrado de células inflamatórias permaneceu evidente com uma densidade aparentemente muito superior àquela verificada em 24 e 72 horas de lesão, em ambos os sexos.

O tempo de sobrevivência de 7 dias foi aquele em que melhor se observou a diferença dos infiltrados entre ambos os sexos, tendendo a uma maior presença de células inflamatórias no macho.

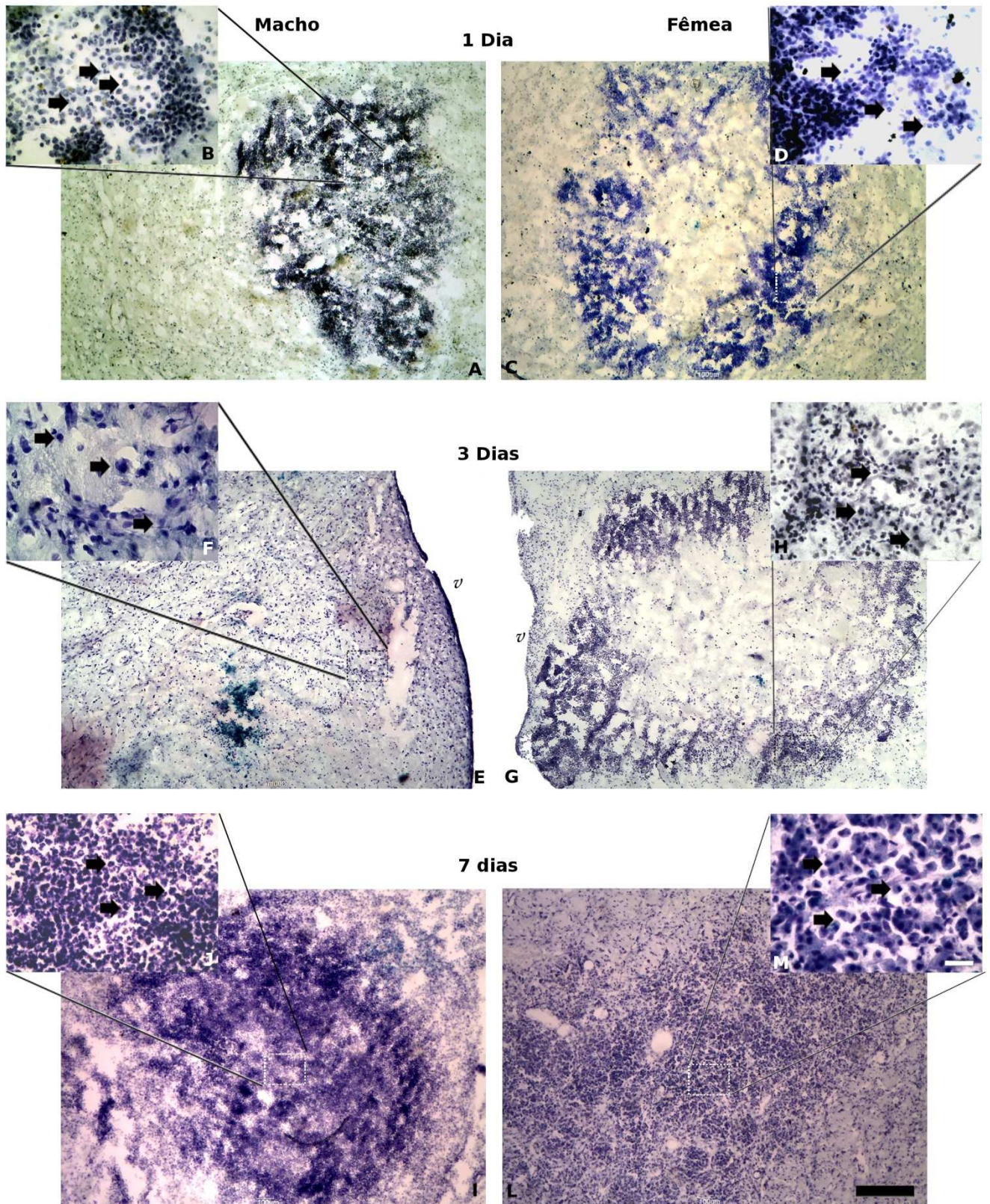


Figura 2. Análise histopatológica em Violeta de cresila da área de lesão e distribuição do número de leucócitos (neutrófilos ou macrófagos) ao redor do centro de lesão focal isquêmica. **À esquerda:** ratos machos isquêmicos; **à direita:** ratos fêmeas isquêmicos. **Linha superior:** 1 dia; **Linha média:** 3 dias; **Linha inferior:** 7 dias. **Setas:** em 1 dia apontam para células polimorfonucleares – neutrófilos; em 3 e 7 dias apontam para a célula inflamatórias – macrófagos ativadas. **Barra de escala:** 300 μm (A, C, E, G, I, L); 50 μm (B, D, F, H, J, M).

3.2 DISTRIBUIÇÃO E NÚMERO DE MACRÓFAGOS/MICRÓGLIAS ATIVADOS NA ÁREA DE LESÃO APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1.

A ativação microglial/macrofágica revelada pela imuno-histoquímica para ED-1 permitiu a verificação da distribuição e número de células ED-1⁺ na área focal isquêmica em ambos os gêneros (figura 3).

A especificidade do marcador mostrou que em todos os grupos experimentais a distribuição microglial/macrofágica concentrou-se no centro e na região peri-infarto da lesão isquêmica. Verificou-se que em 24 horas a ativação das células não apresentou muita diferença entre machos e fêmeas; em 72 horas o número de macrófagos/micróglia ativados foi maior em fêmeas. Essa observação não se estendeu ao tempo de 7 dias, pois a ativação microglial foi se assemelhava ao tempo de 24 horas após lesão isquêmica.

A verificação de gênero mostrou que em fêmeas o número de macrófagos/micróglia ativados foi mais elevado no tempo de 72 horas; o que não se verificou nos machos, onde a progressão no número de macrófagos/micróglia não pareceu significativa (Gráfico 1).

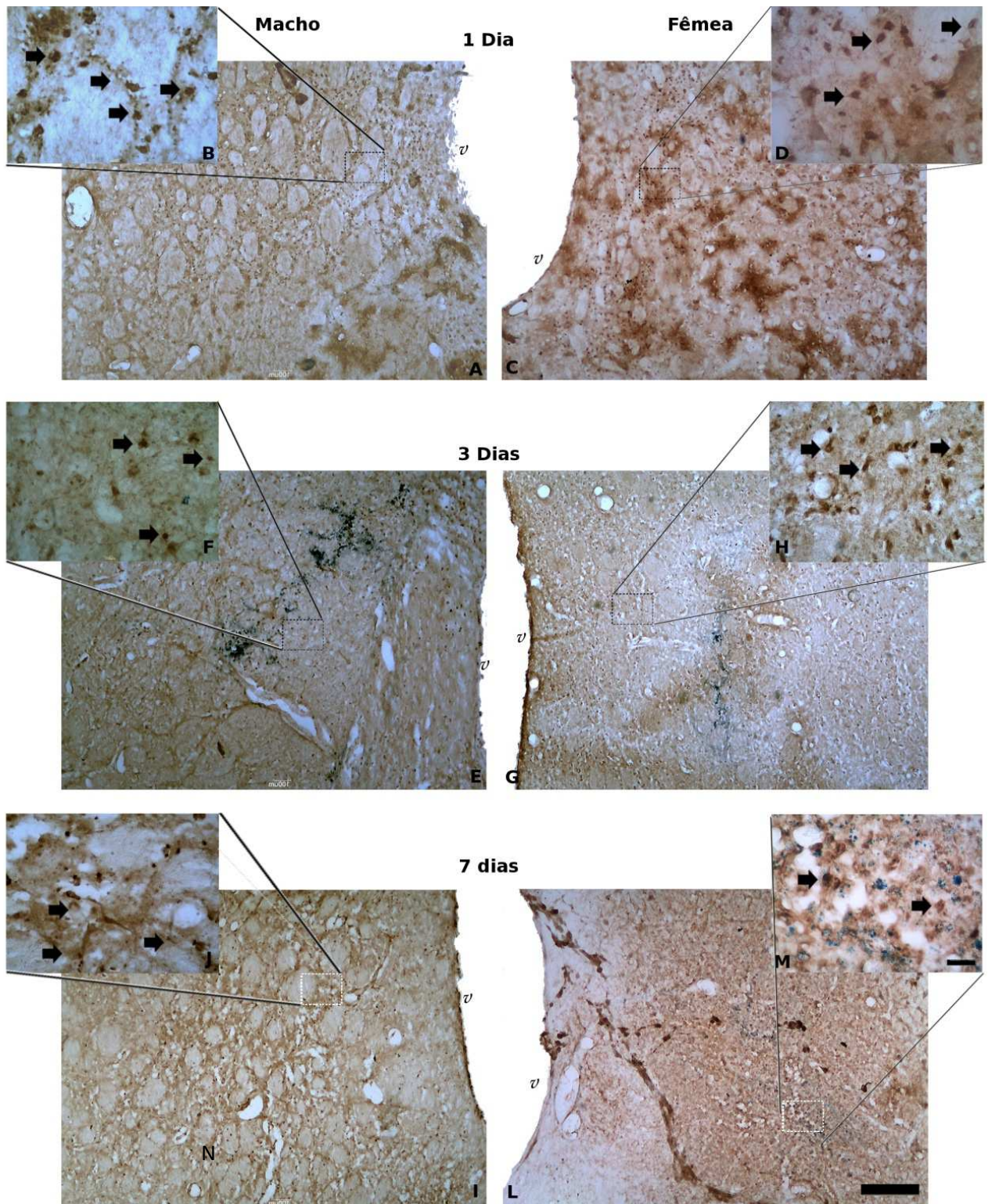


Figura 3. Ativação e quantificação microglial na área de lesão focal isquêmica. **À esquerda:** ratos machos isquêmicos; **à direita:** ratos fêmeas isquêmicos. **Linha superior:** 1 dia; **Linha média:** 3 dias; **Linha inferior:** 7 dias. **Setas** apontam para células ED1+ – Macrófagos ativados. **Barra de escala:** 300 μm (A, C, E, G, I, L); 50 μm (B, D, F, H, J, M).

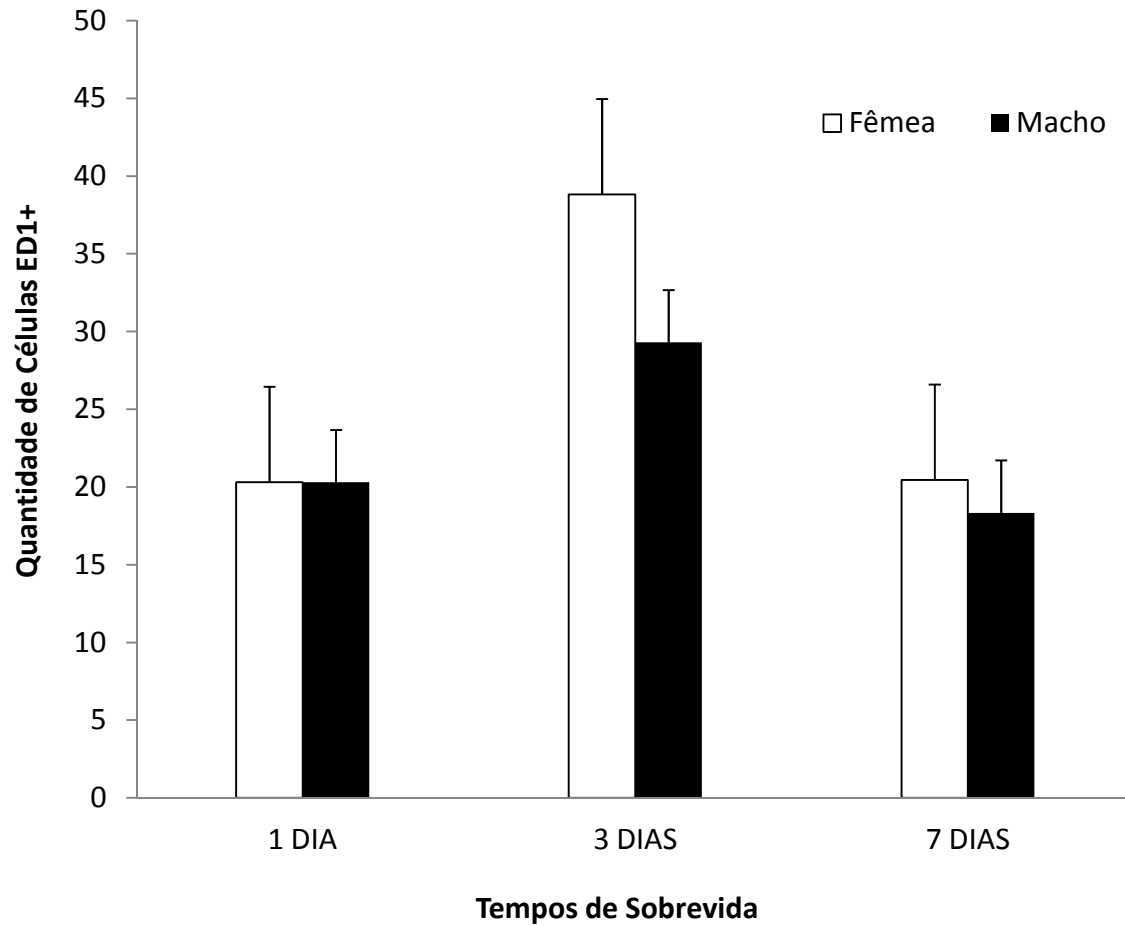


Gráfico 1. Quantificação de células ED1⁺ imunomarcadas na área de lesão focal isquêmica em 1, 3 e 7 dias após lesão, comparando machos e fêmeas.

3.3 DISTRIBUIÇÃO E REATIVIDADE DE ASTRÓCITOS NO CENTRO E NA REGIÃO PERI-INFARTO DA LESÃO ISQUÊMICA APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-I.

A avaliação da reatividade astrocitária no estriato isquêmico de ratos machos e fêmeas foi analisada por imuno-histoquímica com o anticorpo anti-GFAP. Esse procedimento mostrou que a distribuição das células GFAP+ foi mais evidente na região peri-infarto.

Em ratos machos a reatividade astrocitária foi mais intensa no intervalo de tempo de 1 e 7 dias após lesão isquêmica, quando comparado às fêmeas nessa mesma janela temporal. No intervalo de tempo de 72 horas após o evento isquêmico o padrão de reatividade astrocitária foi similar entre os gêneros.

Em ratos machos a reatividade astrocitária não se evidenciou de forma progressiva e no intervalo de 72 horas após o evento isquêmico houve nítida diminuição da reatividade. Em fêmeas esse resultado não foi evidenciado, mas uma nítida diminuição da reatividade astrocitária aos tempos de sobrevivência após lesão isquêmica.

Em ratos machos o aumento da reatividade astrocitária expôs um corpo celular maior, com ramificações curtas e espessas, características morfológicas de ativação astrocitária, condição fracamente evidenciada nas fêmeas. A característica morfológica alterada próximo do centro de lesão indica menor reatividade dessas células nessa área (Figura 4).

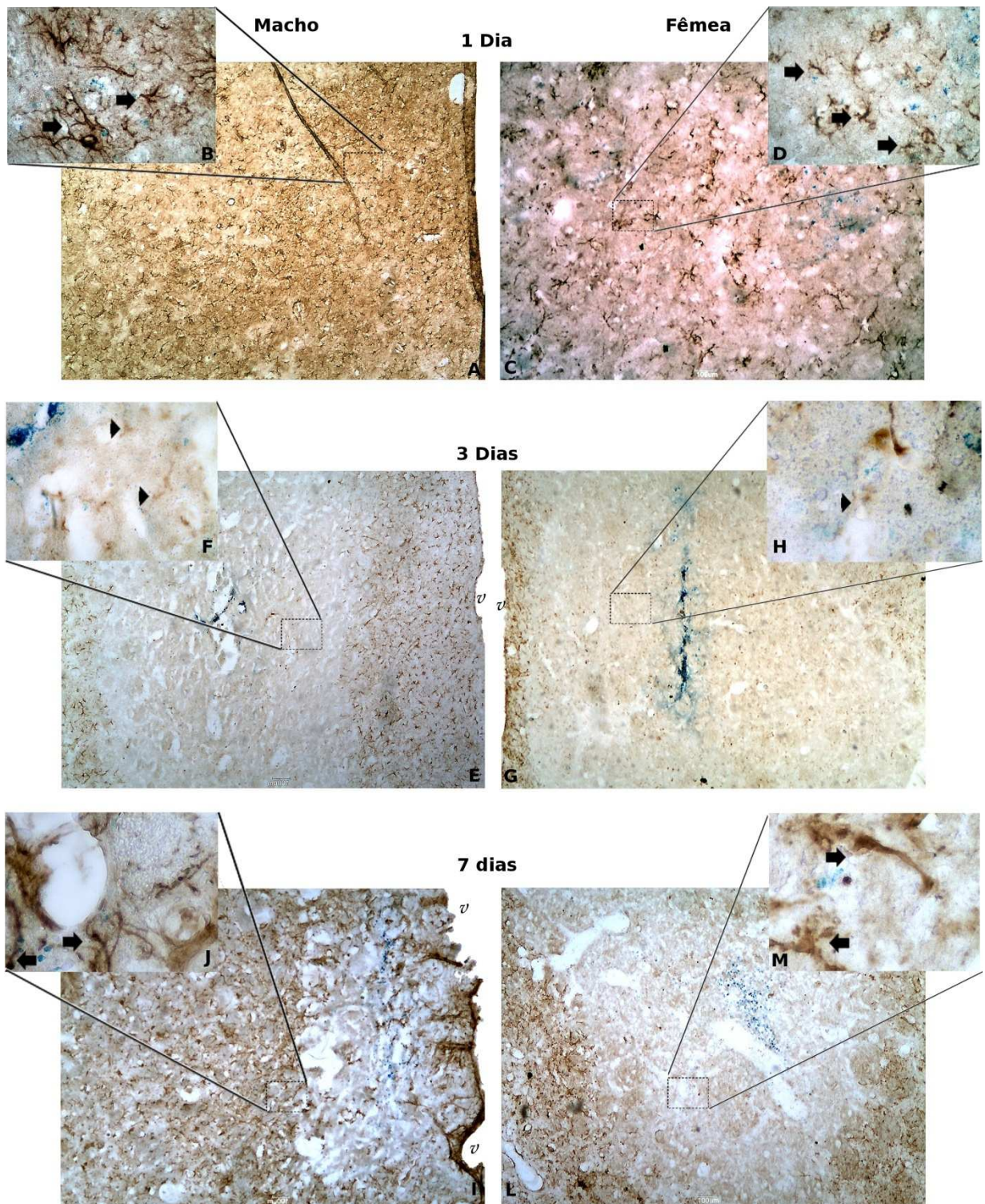


Figura 4. Distribuição e reatividade de astrócitos após lesão focal isquêmica. **À esquerda:** ratos machos isquêmicos; **à direita:** ratos fêmeas isquêmicos. **Linha superior:** 1 dia; **linha média:** 3 dias; **Linha inferior:** 7 dias. **Setas** apontam para células apresentando intensa astrocitose. **Pontas de setas** apontando para astrócitos com baixa reatividade. **Barra de escala:** 300 μ m (A, C, E, G, I, L); 50 μ m (B, D, F, H, J, M).

3.4 PERDA NEURONAL CAUSADA PELA LESÃO ISQUÊMICA, APÓS MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1

A imunomarcção com NeuN mostrou que houve perda neuronal nos grupos experimentais de machos e fêmeas em todos os tempos de sobrevivência, sendo que a análise quantitativa das células marcadas (NeuN⁺) mostrou uma perda de corpos neuronais nos tempos de sobrevivência de 1 e 7 dias, mas em ratos machos essa perda foi maior. No intervalo de três dias após a injeção o número de células NeuN⁺ revelou a maior perda de corpos neuronais em fêmea.

Isoladamente nas fêmeas a perda neuronal teve um padrão similar nos tempos de 1 e 3 dias após lesão, mas no período de 7 dias a diminuição no número de células NeuN⁺ revela maior perda neuronal. Em machos a evolução da perda neuronal pareceu ser similar nos tempos de 1 e 7 dias, mas claramente diferente no intervalo de 3 dias (Figura 5).

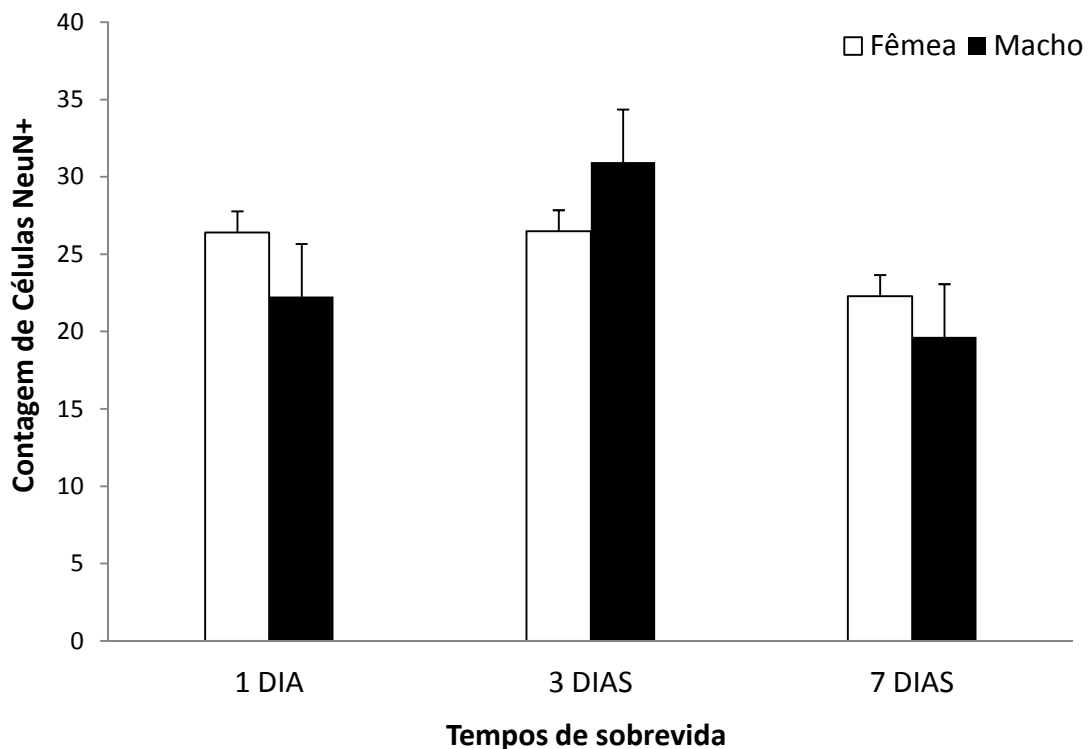


Gráfico 2. Quantificação de células NeuN⁺ imunomarcadas na área de lesão focal isquêmica em 1, 3 e 7 dias após lesão. Comparação entre machos e fêmeas.

4 DISCUSSÃO

Na presente pesquisa o modelo de isquemia adotado possibilitou a indução de lesão focal isquêmica no corpo estriado de ratos da linhagem Lister Hooded, machos e fêmeas. Após um, três e sete dias do estabelecimento da lesão foram investigados: o padrão de lesão, a infiltração e distribuição de células inflamatórias e a perda neuronal na região lesionada.

Em todos os grupos experimentais foram verificadas diferenças na perda neuronal, na reatividade astrocitária e no número de células inflamatórias, micróglia e/ou macrófagos ativados, com células distribuindo-se no centro e ao redor da lesão. Apesar dos mecanismos de reposta celular ainda não serem, totalmente, bem estabelecidos sabe-se que após um evento isquêmico há ação fisiologicamente diferente, de certos compostos específicos, e a ativação de vias bioquímicas podem promover respostas distintas.

Os infiltrados de células inflamatórias foram efetivos nos três tempos de sobrevivência e essa atividade celular condiz com os resultados obtidos em trabalhos anteriores de Dos Santos et al. (2007), Vagnerova et al. (2008), Zhang et al. (2003) que relataram intensa migração dessas células para região lesionada e a influência sobre elas de mecanismos moleculares relacionados com o dimorfismo sexual. Hoffman et al. (2006) sugerem que esses efeitos são conferidos aos hormônios gonadais.

A perda neuronal verificada nos gêneros está de acordo com os trabalhos de Du et al. (2004), McCullough et al. (2005), Renolleau et al. (2007) que sugerem a participação de vias bioquímicas sinalizando a ativação do mecanismo de morte celular. Essas vias são dependentes da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), da enzima poli(ADP)ribose polimerase (PARP), da citocromo C e da ativação de caspases (LANNG, McCULLOUGH, 2008; McCULLOUGH et al., 2005). Em estudos realizados por Du et al. (2004) a inibição de nNOS protegeu neurônios em machos, mas não teve efeito em fêmeas após acidente vascular encefálico (AVE). O nível de PARP em ratos machos após AVE é elevado quando comparado com fêmeas intactas de mesma idade (BRANN et al., 2007; MABLEY et al., 2005). Em trabalhos de Andrabi et al. (2006) com ratos machos e fêmeas PARP^{-/-} a diminuição da lesão após AVE foi menor nos machos, reforçando a participação da PARP no mecanismo de morte celular nesse gênero. Em fêmeas esse mecanismo parece ser ativado após a formação de um complexo de transição entre a citocromo

C (Cito C) e um substrato, com a posterior ativação de enzimas caspases (DU et al., 2004). Essas considerações podem justificar o padrão de lesão e a perda neuronal em machos e fêmeas após a lesão estriatal.

Algumas áreas no encéfalo são mais tolerantes aos traumas (ZHANG et al., 2003; LIEB et al., 1995; DU et al., 2004) e em um AVE a perda neuronal e as respostas celulares ao processo de inflamação progridem durante a injúria cerebral, em regiões próximas e/ou distantes da lesão (VAGNEROVA et al., 2008; SCHILLING et al., 2003). A ativação microglial é evidente nesse processo inflamatório (SCHILLING et al., 2005; SCHILLING et al., 2003), sendo que nesse estudo as células microgliais distribuíram-se ao redor e no centro da lesão, com diferenças no número de células ativadas em 1, 3 e 7 dias após o evento isquêmico, em ambos os gêneros, de acordo com os resultados de Jiang et al. (2005), que relataram a ativação dessas células como sendo influenciadas pelo dimorfismo sexual.

A resposta astrocitária é um marcador da resposta celular ao AVE (STOLL et al., 1998), sendo que a passagem do estado não ativado ao ativo está associado com a forte expressão da GFAP-proteína acídica fibrilar glial (GFAP) (PEKNY, NILSSON, 2005). Durante o AVE a GFAP é um marcador de lesão neuronal (HERRMANN, EHRENREICH, 2003) e nesse estudo reatividade astrocitária foi observada em todos os grupos experimentais nos tempos de 1, 3 e 7 dias após a lesão. A reatividade astrocitária não ocorreu de forma progressiva, sendo observada diminuição da reatividade astrocitária após 3 dias da lesão isquêmica nos machos e em 3 e 7 dias nas fêmeas. Essas diferenças podem ser justificadas pela influência que os hormônios esteroides têm sobre a ativação dessas células.

Herrmann et al. (2003) relataram que em ratos machos há forte correlação dos níveis de testosterona com o aumento da resposta astrocitária e a morte neuronal, justificando neste grupo a morfologia característica de ativação dessas células após AVE. Em fêmeas essas diferenças estão relacionadas às fases do ciclo estral em que a mesma se encontra durante o evento isquêmico (ZHU et al., 2004; WENG, KRIZ, 2007).

5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi investigado se o dimorfismo sexual pode influenciar o padrão de lesão, a perda neuronal e as respostas das células inflamatórias após acidente vascular encefálico (AVE), induzido por microinjeções de endotelina-1, no estriado de ratos, machos e fêmeas da linhagem Lister Hooded.

Os resultados revelaram diferenças na perda neuronal, na infiltração, distribuição e ativação das células inflamatórias no centro e na região peri-infarto nos tempos de sobrevivência 1, 3 e 7 após a indução da lesão. O padrão de perda neuronal, a migração e ativação celular verificados podem ser atribuídas a marcados efeitos da diferença sexual sobre a resposta celular após indução isquêmica, sendo que o aumento e/ou a diminuição dessas respostas podem ter um significado funcional diferente em machos e fêmeas, sem refletir, diretamente, a extensão da lesão isquêmica.

O AVE é uma patologia sexualmente dismórfica observada em humanos de todas as idades e os modelos experimentais de isquemia realizados em animais proporcionaram um padrão de lesão semelhante, sendo possível a investigação das respostas celulares ao evento isquêmico. Hormônios esteroides sexuais originados em gônadas e/ou localmente influenciam essas respostas.

Diversos trabalhos divulgados na literatura sugerem que os mecanismos envolvidos no processo de morte celular, após AVE, são ativados por vias bioquímicas distintas em machos e fêmeas. Esses eventos são responsáveis pela morte e/ou sequelas motoras em ambos os gêneros. O entendimento dos mecanismos sexo-específicos relacionados com a lesão isquêmica cerebral tornam-se importantes na busca do desenvolvimento de terapias mais efetivas para essa patologia.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; SEN, R. The activation of lymphocytes is in their carma, **Immunity**, v. 18, n. 6, p. 721-722, jun. 2003.
- ADIBHATLA, R. M.; HATCHER, J. F. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders, **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 49, n. , p. 241-268, 2008.
- AKOPOV, S. E.; SIMONIAN, N. A.; GRIGORIAN, G. S. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 27, n. 10, p. 1739-1743, out. 1996.
- ALKAYED, N. J.; GOTO, S.; SUGO, N.; JOH, H. D.; KLAUS, J.; CRAIN, B. J.; BERNARD, O.; TRAYSTMAN, R. J.; HURN, P. D. Estrogen and bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 19, p. 7543-7550, out. 2001.
- ALKAYED, N. J.; HARUKUNI, I.; KIMES, A. S.; LONDON, E. D.; TRAYSTMAN, R. J.; HURN, P. D. Gender-linked brain injury in experimental stroke, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 29, n. 1, p. 159-165; discussion 166-159-165; discussion 166, jan. 1998.
- ALKAYED, N. J.; MURPHY, S. J.; TRAYSTMAN, R. J.; HURN, P. D.; MILLER, V. M. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 31, n. 1, p. 161-168, jan. 2000.
- ANDERSSON, A.; CARLSEN, E.; PETERSEN, J. H.; SKAKKEBAEK, N. E. Variation in levels of serum inhibin b, testosterone, estradiol, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and sex hormone-binding globulin in monthly samples from healthy men during a 17-month period: possible effects of seasons, **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 932-937, fev. 2003.
- AYRES, S.; ABPLANALP, W.; LIU, J. H.; SUBBIAH, M. T. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17beta on lipid peroxidation and dna damage, **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 6 Pt 1, p. E1002-1008-E1002-1008, jun. 1998.
- AZAD, N.; PITALE, S.; BARNES, W. E.; FRIEDMAN, N. Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men, **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 7, p. 3064-3068, Jul. 2003.
- BAIN, C. A. L.; WALTERS, M. R.; LEES, K. R.; LUMSDEN, M. A. The effect of hrt on cerebral haemodynamics and cerebral vasomotor reactivity in post-menopausal women, **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 19, n. 10, p. 2411-2414, out. 2004.
- BAKE, S.; SOHRABJI, F. 17beta-estradiol differentially regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats, **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5471-5475, Dec. 2004.
- BATCHELOR, P. E.; LIBERATORE, G. T.; PORRITT, M. J.; DONNAN, G. A.; HOWELLS, D. W. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-

derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum, **The European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 3462-3468, out. 2000.

BEAMER, N. B.; COULL, B. M.; CLARK, W. M.; HAZEL, J. S.; SILBERGER, J. R. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke, **Annals of Neurology**, v. 37, n. 6, p. 800-805, jun. 1995.

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

BOLTON, S. J.; PERRY, V. H. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats, **Experimental Neurology**, v. 154, n. 1, p. 231-240, Nov. 1998.

BRANN, D. W.; DHANDAPANI, K.; WAKADE, C.; MAHESH, V. B.; KHAN, M. M. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications, **Steroids**, v. 72, n. 5, p. 381-405, May. 2007.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke, **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 111, n. 6, p. 483-495, Jul. 2009.

BRUCE-KELLER, A. J.; KEELING, J. L.; KELLER, J. N.; HUANG, F. F.; CAMONDOLA, S.; MATTSON, M. P. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation, **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3646-3656, out. 2000.

BUTOVSKY, O.; TALPALAR, A. E.; BEN-YAAKOV, K.; 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, **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 29, n. 3, p. 381-393, Jul. 2005.

BUTTINI, M.; APPEL, K.; SAUTER, A.; GEBICKE-HAERTER, P. J.; BODDEKE, H. W. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat, **Neuroscience**, v. 71, n. 1, p. 1-16, Mar. 1996.

CABARROCAS, J.; BAUER, J.; PIAGGIO, E.; LIBLAU, R.; LASSMANN, H. Effective and selective immune surveillance of the brain by mhc class i-restricted cytotoxic t lymphocytes, **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1174-1182, May. 2003.

CANOUI-POITRINE, F.; LUC, G.; MALLAT, Z.; MACHEZ, E.; BINGHAM, A.; FERRIERES, J.; RUIDAVETS, J. -.; MONTAYE, M.; YARNELL, J.; HAAS, B.; ARVEILER, D.; MORANGE, P.; KEE, F.; EVANS, A.; AMOUYEL, P.; DUCIMETIERE, P.; EMPANA, J. -. Systemic chemokine levels, coronary heart disease, and ischemic stroke events, **Neurology**, v. , n. , , Aug. 2011.

CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose, **NeuroRx: the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 2, n. 3, p. 396-409, Jul. 2005.

CARSWELL, H. V.; DOMINICZAK, A. F.; MACRAE, I. M. Estrogen status affects sensitivity to focal cerebral ischemia in stroke-prone spontaneously hypertensive

- rats, **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 278, n. 1, p. H290-294-H290-294, jan. 2000.
- CHOI, Y. C.; LEE, J. H.; HONG, K. W.; LEE, K. S. 17 beta-estradiol prevents focal cerebral ischemic damages via activation of akt and creb in association with reduced pten phosphorylation in rats, **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 5, p. 547-557, out. 2004.
- CHOU, W.; CHOI, D.; ZHANG, H.; MU, D.; MCMAHON, T.; KHARAZIA, V. N.; LOWELL, C. A.; FERRIERO, D. M.; MESSING, R. O. Neutrophil protein kinase c delta as a mediator of stroke-reperfusion injury, **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 1, p. 49-56, Jul. 2004.
- CHRISOBOLIS, S.; SOBEY, C. G. Influence of gender on k+-induced cerebral vasodilatation, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 35, n. 3, p. 747-752, Mar. 2004.
- CLARK, R. K.; LEE, E. V.; FISH, C. J.; WHITE, R. F.; PRICE, W. J.; JONAK, Z. L.; FEUERSTEIN, G. Z.; BARONE, F. C. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study, **Brain Research Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 565-572, 1993.
- DAN, P.; CHEUNG, J. C. Y.; SCRIVEN, D. R. L.; MOORE, E. D. W. Epitope-dependent localization of estrogen receptor-alpha, but not -beta, in en face arterial endothelium, **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 4, p. H1295-1306-H1295-1306, abr. 2003.
- DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J. V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R.; DUSTIN, M. L.; GAN, W. Atp mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo, **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 752-758, jun. 2005.
- DEATH, A. K.; MCGRATH, K. C. Y.; SADER, M. A.; NAKHLA, S.; JESSUP, W.; HANDELSMAN, D. J.; CELERMAJER, D. S. Dihydrotestosterone promotes vascular cell adhesion molecule-1 expression in male human endothelial cells via a nuclear factor-kappab-dependent pathway, **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1889-1897, abr. 2004.
- DEL ZOPPO, G.; GINIS, I.; HALLENBECK, J. M.; IADECOLA, C.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and inos in brain response to ischemia, **Brain Pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 10, n. 1, p. 95-112, jan. 2000.
- DEL ZOPPO, G. J.; HALLENBECK, J. M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke, **Thrombosis Research**, v. 98, n. 3, p. 73-81, May. 2000.
- DERUGIN, N.; WENDLAND, M.; MURAMATSU, K.; ROBERTS, T. P.; GREGORY, G.; FERRIERO, D. M.; VEXLER, Z. S. Evolution of brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 31, n. 7, p. 1752-1761, Jul. 2000.
- DI NAPOLI, M. Early inflammatory response in ischemic stroke, **Thrombosis Research**, v. 103, n. 3, p. 261-264, Aug. 2001.

- DIETRICH, J. Endothelial cells of the blood-brain barrier: a target for glucocorticoids and estrogens?, **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 9, n. , p. 684-693, jan. 2004.
- DIOMEDI, M.; CUPINI, L. M.; RIZZATO, B.; FERRANTE, F.; GIACOMINI, P.; SILVESTRINI, M. Influence of physiologic oscillation of estrogens on cerebral hemodynamics, **Journal of the Neurological Sciences**, v. 185, n. 1, p. 49-53, Mar. 2001.
- DOBKIN, B. H. Clinical practice. rehabilitation after stroke, **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p. 1677-1684, abr. 2005.
- 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 Research**, v. 1172, n. , p. 130-144, out. 2007.
- DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage, **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 310-318, set. 2008.
- DU, L.; BAYIR, H.; LAI, Y.; ZHANG, X.; KOCHANNEK, P. M.; WATKINS, S. C.; GRAHAM, S. H.; CLARK, R. S. B. Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 37, p. 38563-38570, set. 2004.
- DUAN, S.; ANDERSON, C. M.; KEUNG, E. C.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; SWANSON, R. A. P2x7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1320-1328, fev. 2003.
- DUBAL, D. B.; SHUGHRUE, P. J.; WILSON, M. E.; MERCHENTHALER, I.; WISE, P. M. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 15, p. 6385-6393, Aug. 1999.
- EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia, **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1021-1029, fev. 2009.
- ELKIND, M. S.; CHENG, J.; BODEN-ALBALA, B.; RUNDEK, T.; THOMAS, J.; CHEN, H.; RABBANI, L. E.; SACCO, R. L. Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 33, n. 1, p. 31-37, jan. 2002.
- EMSLEY, H. C. A.; TYRRELL, P. J. Inflammation and infection in clinical stroke, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, n. 12, p. 1399-1419, Dec. 2002.
- Gehan H. Fahmy and Marie Z. Moftah. FGF-2 in astroglial cells during vertebrate spinal cord recovery. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, n. 129, v. 4, 2010.

FULLERTON, H. J.; WU, Y. W.; ZHAO, S.; JOHNSTON, S. C. Risk of stroke in children: ethnic and gender disparities, **Neurology**, v. 61, n. 2, p. 189-194, Jul. 2003.

GALEA, E.; SANTIZO, R.; FEINSTEIN, D. L.; ADAMSOM, P.; GREENWOOD, J.; KOENIG, H. M.; PELLIGRINO, D. A. Estrogen inhibits nf kappa b-dependent inflammation in brain endothelium without interfering with i kappa b degradation, **Neuroreport**, v. 13, n. 11, p. 1469-1472, Aug. 2002.

GEARY, G. G.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Estrogen reduces myogenic tone through a nitric oxide-dependent mechanism in rat cerebral arteries, **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 1 Pt 2, p. H292-300, Jul. 1998.

GIBSON, C. L.; CONSTANTIN, D.; PRIOR, M. J. W.; BATH, P. M. W.; MURPHY, S. P. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia, **Experimental Neurology**, v. 193, n. 2, p. 522-530, jun. 2005.

GIULIAN, D.; VACA, K.; CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 29-37, jan. 1993.

GOLDING, E. M.; KEPLER, T. E. Role of estrogen in modulating edhf-mediated dilations in the female rat middle cerebral artery, **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2417-2423-H2417-2423, jun. 2001.

GOLLAPUDI, L.; OBLINGER, M. M. Estrogen and ngf synergistically protect terminally differentiated, eralpha-transfected pc12 cells from apoptosis, **Journal of Neuroscience Research**, v. 56, n. 5, p. 471-481, jun. 1999.

GOLOMB, M. R.; FULLERTON, H. J.; NOWAK-GOTTL, U.; DEVEBER, G. Male predominance in childhood ischemic stroke: findings from the international pediatric stroke study, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 40, n. 1, p. 52-57, jan. 2009.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury, **Experimental Neurology**, v. 190, n. 2, p. 456-467, Dec. 2004a.

GOMES-LEAL, W.; CORKILL, D. J.; FREIRE, M. A.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; PERRY, V. H. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury, **Experimental Neurology**, v. 190, n. 2, p. 456-467, Dec. 2004b.

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

GOODMAN, Y.; BRUCE, A. J.; CHENG, B.; MATTSON, M. P. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons, **Journal of Neurochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1836-1844, May. 1996.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; NOZAKO, M.; HAZEKAWA, M.; MISHIMA, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Delayed

treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 39, n. 3, p. 951-958, Mar. 2008.

HAZELL, A. S. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies, **Neurochemistry International**, v. 50, n. 7-8, p. 941-953, jun. 2007.

HERRMANN, M.; EHRENREICH, H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring, **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 21, n. 3-4, p. 177-190, 2003.

HERTZ, L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective, **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 289-309, set. 2008.

HOFFMAN, G. E.; MERCHENTHALER, I.; ZUP, S. L. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease, **Endocrine**, v. 29, n. 2, p. 217-231, abr. 2006.

HOSSMANN, K. Pathophysiology and therapy of experimental stroke, **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 7-8, p. 1057-1083, Nov. 2006.

HOSSMANN, K. A. Experimental models for the investigation of brain ischemia, **Cardiovascular Research**, v. 39, n. 1, p. 106-120, Jul. 1998.

HUNT, J. S.; MILLER, L.; ROBY, K. F.; HUANG, J.; PLATT, J. S.; DEBROT, B. L. Female steroid hormones regulate production of pro-inflammatory molecules in uterine leukocytes, **Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, n. 2, p. 87-99, Nov. 1997.

HURN, P. D.; BRASS, L. M. Estrogen and stroke: a balanced analysis, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 34, n. 2, p. 338-341, fev. 2003.

JONES, N. C.; CONSTANTIN, D.; PRIOR, M. J.; MORRIS, P. G.; MARSDEN, C. A.; MURPHY, S. The neuroprotective effect of progesterone after traumatic brain injury in male mice is independent of both the inflammatory response and growth factor expression. *European Journal Neuroscience*; v. 21, n. 6, p. 1547-1554, mar. 2005.

KARASZEWSKI, B.; WARDLAW, J. M.; MARSHALL, I.; CVORO, V.; WARTOLOWSKA, K.; HAGA, K.; ARMITAGE, P. A.; BASTIN, M. E.; DENNIS, M. S. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke, **Brain: a Journal of Neurology**, v. 132, n. Pt 4, p. 955-964, abr. 2009.

KELLY, M. J.; QIU, J.; RØNNEKLEIV, O. K. Estrogen modulation of g-protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1007, n. , p. 6-16, Dec. 2003.

KEYNES, R. G.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury, **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 2, p. 179-191, Mar. 2004.

KIMELBERG, H. K.; GODERIE, S. K.; HIGMAN, S.; PANG, S.; WANIEWSKI, R. A. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 1583-1591, May. 1990.

- KNOTT, A. B.; BOSSY-WETZEL, E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 3, p. 541-554, Mar. 2009.
- KOERNER, I. P.; ZHANG, W.; CHENG, J.; PARKER, S.; HURN, P. D.; ALKAYED, N. J. Soluble epoxide hydrolase: regulation by estrogen and role in the inflammatory response to cerebral ischemia, **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, v. 13, n. , p. 2833-2841, 2008.
- KREJZA, J.; MARIAK, Z.; NOWACKA, A.; MELHEM, E. R.; BABIKIAN, V. L. Influence of 17-beta-estradiol on cerebrovascular impedance during menstrual cycle in women, **Journal of the Neurological Sciences**, v. 221, n. 1-2, p. 61-67, jun. 2004.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the cns, **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 8, p. 312-318, Aug. 1996.
- KRUPINSKI, J.; KUMAR, P.; KUMAR, S.; KALUZA, J. Increased expression of tgf-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 27, n. 5, p. 852-857, May. 1996.
- LANG, J. T.; MCCULLOUGH, L. D. Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant?, **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. , p. 33-33, 2008.
- LEGG, L.; LANGHORNE, P. Rehabilitation therapy services for stroke patients living at home: systematic review of randomised trials, **Lancet**, v. 363, n. 9406, p. 352-356, jan. 2004.
- LEI, D.; LONG, J. M.; HENGEMIHLE, J.; O'NEILL, J.; MANAYE, K. F.; INGRAM, D. K.; MOUTON, P. R. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice, **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 659-666, 2003.
- LI, Y.; CHOPP, M.; ZHANG, Z. G.; ZHANG, R. L. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kda heat shock protein, **Journal of the Neurological Sciences**, v. 128, n. 2, p. 134-142, fev. 1995.
- LIEB, K.; ANDRAE, J.; REISERT, I.; PILGRIM, C. Neurotoxicity of dopamine and protective effects of the nmda receptor antagonist ap-5 differ between male and female dopaminergic neurons, **Experimental Neurology**, v. 134, n. 2, p. 222-229, Aug. 1995.
- LIMA, R. R.; GUIMARAES-SILVA, J.; OLIVEIRA, J. L.; COSTA, A. M. R.; SOUZA-RODRIGUES, R. D.; DOS SANTOS, C. D.; PICANÇO-DINIZ, C. W.; GOMES-LEAL, W. Diffuse axonal damage, myelin impairment, astrogliosis and inflammatory response following microinjections of nmda into the rat striatum, **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 24-35, fev. 2008.
- LINFERT, D.; CHOWDHRY, T.; RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury, **Transplantation Reviews (Orlando, Fla.)**, v. 23, n. 1, p. 1-10, jan. 2009.
- LIU, M. Y.; HATTORI, Y.; FUKAO, M.; SATO, A.; SAKUMA, I.; KANNO, M. Alterations in edhf-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle, **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 5, p. 1035-1046, Mar. 2001.

- LO, E. H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke, **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 497-500, May. 2008.
- LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke, **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 399-415, May. 2003.
- LODDICK, S. A.; TURNBULL, A. V.; ROTHWELL, N. J. Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 176-179, fev. 1998.
- LOSJ, J.; ZAREMBA, J. Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 32, n. 11, p. 2695-2696, Nov. 2001.
- LOTUFO, P. A.; BENSENOR, I. M. Improving who steps stroke in brazil, **Lancet Neurology**, v. 6, n. 5, p. 387-8; author reply 388, May. 2007.
- MABLEY, J. G.; HORVÁTH, E. M.; MURTHY, K. G. K.; ZSENGELLÉR, Z.; VASLIN, A.; BENKO, R.; KOLLAI, M.; SZABÓ, C. Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(adp-ribose) polymerase activation, **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 812-820, Nov. 2005.
- MARKUS, H. Stroke: causes and clinical features, **Medicine**, v. 36, n. 11, p. 586-591, Nov. 2008.
- MCCULLOUGH, L. D.; ZENG, Z.; BLIZZARD, K. K.; DEBCHOUDHURY, I.; HURN, P. D. Ischemic nitric oxide and poly (adp-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 502-512, abr. 2005.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system, **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, jun. 1999.
- MENNICKEN, F.; MAKI, R.; DE SOUZA, E. B.; QUIRION, R. Chemokines and chemokine receptors in the cns: a possible role in neuroinflammation and patterning, **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 73-78, fev. 1999.
- MILLER, N. R.; JOVER, T.; COHEN, H. W.; ZUKIN, R. S.; ETGEN, A. M. Estrogen can act via estrogen receptor alpha and beta to protect hippocampal neurons against global ischemia-induced cell death, **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 3070-3079, Jul. 2005.
- MITSIOS N, GAFFNEY J, KUMAR P, KRUPINSKI J, KUMAR S, SLEVIN M. Pathophysiology of acute ischaemic stroke: an analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets. **Pathobiology**, v. 73, n. 4, p. 159-175. 2006
- MOMOI, H.; IKOMI, F.; OHHASHI, T. Estrogen-induced augmentation of endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in isolated rat cerebral small arteries, **The Japanese Journal of Physiology**, v. 53, n. 3, p. 193-203, jun. 2003.

MONTANA, V.; NI, Y.; SUNJARA, V.; HUA, X.; PARPURA, V. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes, **The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 2633-2642, Mar. 2004.

MONTANER, J.; MOLINA, C. A.; MONASTERIO, J.; ABILLEIRA, S.; ARENILLAS, J. F.; RIBÓ, M.; QUINTANA, M.; ALVAREZ-SABÍN, J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke, **Circulation**, v. 107, n. 4, p. 598-603, fev. 2003.

MORIOKA, T.; KALEHUA, A. N.; STREIT, W. J. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain, **The Journal of Comparative Neurology**, v. 327, n. 1, p. 123-132, jan. 1993.

MUKHTAR, M.; ACHEAMPONG, E.; PARVEEN, Z.; POMERANTZ, R. J. T-cells and excitotoxicity: hiv-1 and other neurodegenerative disorders, **Neuromolecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 265-273, 2005.

MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. Neun, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates, **Development (Cambridge, England)**, v. 116, n. 1, p. 201-211, set. 1992.

MUN-BRYCE, S.; ROSENBERG, G. A. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 18, n. 11, p. 1163-1172, Nov. 1998.

NAKANISHI, N.; TU S.; SHIN, Y.; CUI, J.; KUROKAWA, T.; ZHANG, D.; CHEN, H. S.; TONG, G.; LIPTON, S. A. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor. **J Neurosci.**, v. 29, n. 16, p. 5260-5265, abr. 2009.

ORSHAL, J. M.; KHALIL, R. A. Gender, sex hormones, and vascular tone, **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 2, p. R233-249-R233-249, fev. 2004.

OSPINA, J. A.; BREVIG, H. N.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Estrogen suppresses il-1beta-mediated induction of cox-2 pathway in rat cerebral blood vessels, **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 5, p. H2010-2019-H2010-2019, May. 2004.

PARK, E.; CHO, S.; FRYS, K. A.; GLICKSTEIN, S. B.; ZHOU, P.; ANRATHER, J.; ROSS, M. E.; IADECOLA, C. Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 392-401, Mar. 2006.

PARPURA, V.; BASARSKY, T. A.; LIU, F.; JEFTINIJA, K.; JEFTINIJA, S.; HAYDON, P. G. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling, **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 744-747, jun. 1994.

PEKKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis, **Glia**, v. 50, n. 4, p. 427-434, jun. 2005.

PERRY, V.; ANDERSSON, P.; GORDON, S. Macrophages and inflammation in the central nervous system, **Trends in Neurosciences**, v. 16, n. 7, p. 268-273, Jul. 1993.

PERRY, V. H. Stress primes microglia to the presence of systemic inflammation: implications for environmental influences on the brain, **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 1, p. 45-46, jan. 2007.

PERSSON, M. G.; HEDQVIST, P.; GUSTAFSSON, L. E. Nerve-induced tachykinin-mediated vasodilation in skeletal muscle is dependent on nitric oxide formation, **European Journal of Pharmacology**, v. 205, n. 3, p. 295-301, Dec. 1991.

PETTY, G. W.; BROWN, R D, JR; WHISNANT, J. P.; SICKS, J. D.; O'FALLON, W. M.; WIEBERS, D. O. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 30, n. 12, p. 2513-2516, Dec. 1999.

PUROHIT, A.; REED, M. J. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women, **Steroids**, v. 67, n. 12, p. 979-983, Nov. 2002.

RAIVICH, G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia, **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 11, p. 571-573, Nov. 2005.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses, **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. , p. 119-145, 2009.

RAZMARA, A.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Testosterone augments endotoxin-mediated cerebrovascular inflammation in male rats, **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p. H1843-1850-H1843-1850, Nov. 2005.

RENOLLEAU, S.; FAU, S.; GOYENVALLE, C.; JOLY, L.; CHAUVIER, D.; JACOTOT, E.; MARIANI, J.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Specific caspase inhibitor q-vd-oph prevents neonatal stroke in p7 rat: a role for gender, **Journal of Neurochemistry**, v. 100, n. 4, p. 1062-1071, fev. 2007.

ROBINSON, A. P.; WHITE, T. M.; MASON, D. W. Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies mrc ox-41 and mrc ox-42, the latter recognizing complement receptor type 3, **Immunology**, v. 57, n. 2, p. 239-247, fev. 1986.

ROOF, R. L.; DUVDEVANI, R.; BRASWELL, L.; STEIN, D. G. Progesterone facilitates cognitive recovery and reduces secondary neuronal loss caused by cortical contusion injury in male rats, **Experimental Neurology**, v. 129, n. 1, p. 64-69, set. 1994.

ROOF, R. L.; DUVDEVANI, R.; STEIN, D. G. Gender influences outcome of brain injury: progesterone plays a protective role, **Brain Research**, v. 607, n. 1-2, p. 333-336, abr. 1993.

ROOF, R. L.; HALL, E. D. Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats, **Journal of Neurotrauma**, v. 17, n. 12, p. 1155-1169, Dec. 2000.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FRIDAY, G.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LLOYD-JONES, D.; MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; MOY, C.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C. J.; ROGER, V.; RUMSFELD, J.; SORLIE, P.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WASSERTHIEL-SMOLLER, S.; HONG, Y. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the american heart association statistics

committee and stroke statistics subcommittee, **Circulation**, v. 115, n. 5, p. e69-171-e69-171, fev. 2007.

SAKUMA, I.; LIU, M.; SATO, A.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; KITABATAKE, A.; HATTORI, Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen, **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 48-54, jan. 2002.

SALEM, M. L.; HOSSAIN, M. S.; NOMOTO, K. Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of tnf-alpha and ifn-gamma, **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 121, n. 3, p. 235-245, Mar. 2000.

SANTIZO, R.; PELLIGRINO, D. A. Estrogen reduces leukocyte adhesion in the cerebral circulation of female rats, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, n. 10, p. 1061-1065, out. 1999.

SANTIZO, R. A.; ANDERSON, S.; YE, S.; KOENIG, H. M.; PELLIGRINO, D. A. Effects of estrogen on leukocyte adhesion after transient forebrain ischemia, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 31, n. 9, p. 2231-2235, set. 2000.

SAWADA, M.; ALKAYED, N. J.; GOTO, S.; CRAIN, B. J.; TRAYSTMAN, R. J.; SHAVITZ, A.; NELSON, R. J.; HURN, P. D. Estrogen receptor antagonist ic182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 1, p. 112-118, jan. 2000.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; MÜLLER, M.; STRECKER, J. K.; RINGELSTEIN, E. B.; KIEFER, R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice, **Experimental Neurology**, v. 196, n. 2, p. 290-297, Dec. 2005.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; HUITINGA, I.; STOLL, G. Cd8+ phagocytes in focal ischemia of the rat brain: predominant origin from hematogenous macrophages and targeting to areas of pannecrosis, **Acta Neuropathol**, v. 101, n. 5, p. 440-448, May. 2001.

SCHWAB, J. M.; NGUYEN, T. D.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H. J. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (il-16) expression confined to infiltrating granulocytes, cd8+ t-lymphocytes and activated microglia/macrophages, **Journal of Neuroimmunology**, v. 114, n. 1-2, p. 232-241, Mar. 2001.

SEDER, D. B.; MAYER, S. A. Critical care management of subarachnoid hemorrhage and ischemic stroke, **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, n. 1, p. 103-122, viii-ix-103-122, viii-ix, Mar. 2009.

SHAW, T. G.; MORTEL, K. F.; MEYER, J. S.; ROGERS, R. L.; HARDENBERG, J.; CUTAIA, M. M. Cerebral blood flow changes in benign aging and cerebrovascular disease, **Neurology**, v. 34, n. 7, p. 855-862, Jul. 1984.

SIMPSON, E. R. Sources of estrogen and their importance, **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3-5, p. 225-230, set. 2003.

SINGER, C. A.; ROGERS, K. L.; STRICKLAND, T. M.; DORSA, D. M. Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity, **Neuroscience Letters**, v. 212, n. 1, p. 13-16, Jul. 1996.

SKINNER, R.; GEORGIU, R.; THORNTON, P.; ROTHWELL, N. Psychoneuroimmunology of stroke, **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 359-379, May. 2009.

SMITH, S. S.; WATERHOUSE, B. D.; CHAPIN, J. K.; WOODWARD, D. J. Progesterone alters gaba and glutamate responsiveness: a possible mechanism for its anxiolytic action, **Brain Research**, v. 400, n. 2, p. 353-359, jan. 1987.

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

STIRONE, C.; BOROUJERDI, A.; DUCKLES, S. P.; KRAUSE, D. N. Estrogen receptor activation of phosphoinositide-3 kinase, akt, and nitric oxide signaling in cerebral blood vessels: rapid and long-term effects, **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 105-113, jan. 2005.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the cns, **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 3, p. 233-247, jun. 1999a.

STOLL, G.; JANDER, S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the cns, **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 3, p. 233-247, jun. 1999b.

STOWE, A. M.; ADAIR-KIRK, T. L.; GONZALES, E. R.; PEREZ, R. S.; SHAH, A. R.; PARK, T. S.; GIDDAY, J. M. Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion, **Neurobiology of Disease**, v. 35, n. 1, p. 82-90, Jul. 2009.

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

SUDLOW, C. L.; WARLOW, C. P. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. international stroke incidence collaboration, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 28, n. 3, p. 491-499, Mar. 1997.

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G. W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C. M.; CHAN, P. H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia, **NeuroRx: the Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 1, n. 1, p. 17-25, jan. 2004.

SUNDAY, L.; TRAN, M. M.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Estrogen and progestagens differentially modulate vascular proinflammatory factors, **American**

Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, v. 291, n. 2, p. E261-267-E261-267, Aug. 2006.

SZATKOWSKI, M.; BARBOUR, B.; ATTWELL, D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake, **Nature**, v. 348, n. 6300, p. 443-446, Nov. 1990.

TANASESCU, C.; JURCUT, C.; JURCUT, R.; GINGHINA, C. Vascular disease in rheumatoid arthritis: from subclinical lesions to cardiovascular risk, **European Journal of Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 348-354, Jul. 2009.

TAYLOR, T. N.; DAVIS, P. H.; TORNER, J. C.; HOLMES, J.; MEYER, J. W.; JACOBSON, M. F. Lifetime cost of stroke in the united states, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 27, n. 9, p. 1459-1466, set. 1996.

TERAI, K.; MATSUO, A.; MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Enhancement of immunoreactivity for nf-kappa b in human cerebral infarctions, **Brain Research**, v. 739, n. 1-2, p. 343-349, Nov. 1996.

TORAN-ALLERAND, C. D.; SINGH, M.; SÉTÁLÓ, G, JR Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story, **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 97-121, abr. 1999.

TÜREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K. A.; DEMPSEY, R. J. Ideal suture diameter is critical for consistent middle cerebral artery occlusion in mice, **Neurosurgery**, v. 56, n. 1 Suppl, p. 196-200; discussion 196-200-196-200; discussion 196-200, jan. 2005.

VAGNEROVA, K.; KOERNER, I. P.; HURN, P. D. Gender and the injured brain, **Anesthesia and Analgesia**, v. 107, n. 1, p. 201-214, Jul. 2008.

VAN EXEL, E.; GUSSEKLOO, J.; DE CRAEN, A. J. M.; BOOTSMA-VAN DER WIEL, A.; FRÖLICH, M.; WESTENDORP, R. G. J. Inflammation and stroke: the leiden 85-plus study, **Stroke; a Journal of Cerebral Circulation**, v. 33, n. 4, p. 1135-1138, abr. 2002.

VANNUCCI, S. J.; WILLING, L. B.; GOTO, S.; ALKAYED, N. J.; BRUCKLACHER, R. M.; WOOD, T. L.; TOWFIGHI, J.; HURN, P. D.; SIMPSON, I. A. Experimental stroke in the female diabetic, db/db, mouse, **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 21, n. 1, p. 52-60, jan. 2001.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases, **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 5, p. 365-375, May. 2003.

WANG, J. J.; RABIZADEH, S.; TASINATO, A.; SPERANDIO, S.; YE, X.; GREEN, M.; ASSA-MUNT, N.; SPENCER, D.; BREDESEN, D. E. Dimerization-dependent block of the proapoptotic effect of p75(ntr), **Journal of Neuroscience Research**, v. 60, n. 5, p. 587-593, jun. 2000.

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

WANG, R.; ZHANG, Q.; HAN, D.; XU, J.; LÜ, Q.; ZHANG, G. Inhibition of mlk3-mkk4/7-jnk1/2 pathway by akt1 in exogenous estrogen-induced neuroprotection

against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats, **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 6, p. 1543-1554, Dec. 2006.

WEAVER, C E, JR; PARK-CHUNG, M.; GIBBS, T. T.; FARB, D. H. 17beta-estradiol protects against nmda-induced excitotoxicity by direct inhibition of nmda receptors, **Brain Research**, v. 761, n. 2, p. 338-341, Jul. 1997.

WEN, Y.; YANG, S.; LIU, R.; PEREZ, E.; YI, K. D.; KOULEN, P.; SIMPKINS, J. W. Estrogen attenuates nuclear factor-kappa b activation induced by transient cerebral ischemia, **Brain Research**, v. 1008, n. 2, p. 147-154, May. 2004.

WENG, Y. C.; KRIZ, J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia, **Experimental Neurology**, v. 204, n. 1, p. 433-442, Mar. 2007.

WILHELMSSON, U.; BUSHONG, E. A.; PRICE, D. L.; SMARR, B. L.; PHUNG, V.; TERADA, M.; ELLISMAN, M. H.; PEKONY, M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 46, p. 17513-17518, Nov. 2006.

WISE, P. M.; DUBAL, D. B.; WILSON, M. E.; RAU, S. W.; BÖTTNER, M.; ROSEWELL, K. L. Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies, **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 37, n. 1-3, p. 313-319, Nov. 2001.

WOLFE, C. D. A. The impact of stroke, **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 275-286, jan. 2000.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T. V.; STOKES, K. Y.; GRANGER, D. N. Role of t lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke, **Circulation**, v. 113, n. 17, p. 2105-2112, May. 2006.

YUAN, M.; SIEGEL, C.; ZENG, Z.; LI, J.; LIU, F.; MCCULLOUGH, L. D. Sex differences in the response to activation of the poly (adp-ribose) polymerase pathway after experimental stroke, **Experimental Neurology**, v. 217, n. 1, p. 210-218, May. 2009.

ZHANG, L.; LI, P.; FENG, X.; BARKER, J. L.; SMITH, S. V.; RUBINOW, D. R. Sex-related differences in neuronal cell survival and signaling in rats, **Neuroscience Letters**, v. 337, n. 2, p. 65-68, fev. 2003.

ZHANG, Z. G.; CHOPP, M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic, **Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 491-500, May. 2009.

ZHU, Y. S.; PFAFF, D. W. Dna binding of hypothalamic nuclear proteins on estrogen response element and preproenkephalin promoter: modification by estrogen, **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 5, p. 454-466, Nov. 1995.

ZIELASEK, J.; HARTUNG, H. P. Molecular mechanisms of microglial activation, **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, n. 2, p. 191-122, 1996.