



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

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

MODULAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO CELULAR E NEUROPROTEÇÃO
INDUZIDAS POR TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA ESTRIATAL EM RATOS ADULTOS

BELÉM-PARÁ

2016

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

MODULAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO CELULAR E NEUROPROTEÇÃO
INDUZIDAS POR TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA ESTRIATAL EM RATOS ADULTOS

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos.

Área de Concentração: Neurociências

BELÉM-PARÁ

2016

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

Lopes, Rosana Telma Santos

Modulação da neuroinflamação celular e neuroproteção induzidas por tratamento com betacariofileno em um modelo experimental de isquemia estriatal em ratos adultos / Rosana Telma Santos Lopes ; Orientador, Wallace Gomes Leal ; Co-orientador, Enio Maurício Nery dos Santos. - 2016.

95 f. : il.

Inclui bibliografia

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

1. Acidente vascular encefálico. 2. Sesquiterpenos. 3. Agentes neuroprotetores. I. Leal, Wallace Gomes. II. Santos, Enio Maurício Nery dos, co-orientador. III. Título.

CDD – 22 ed. 616.81

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

MODULAÇÃO DA NEUROINFLAMAÇÃO CELULAR E NEUROPROTEÇÃO
INDUZIDAS POR TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA ESTRIATAL EM RATOS ADULTOS

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof. Dr. Wallace Gomes Leal e co-orientação do Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos.

Área de Concentração: Neurociências

Aprovação:.

BANCA JULGADORA DE DEFESA

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

Prof. Dr. Enio Maurício Nery dos Santos (ICB-UFPA) – Co-orientador

Profª. Dra. Márcia Cristina Freitas da Silva (ICB-UFPA) – Membro Titular

Prof. Dra. Lucídia Santiago (ICB-UFPA) – Membro Titular

Profª. Dra. Vânia Castro Corrêa (ICB-UFPA) – Membro Titular

Prof. Dr. Ademir Ferreira da Silva Junior (UEPA) – Membro Suplente

BELÉM-PARÁ

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Terezinha e Paulo Lopes.
Aos meus grandes amores Gabriel e Alexandre.
Esta conquista tão sonhada é nossa.

“Minhas experiências com a ciência conduziram-me a Deus. Desafiam a ciência a provar a existência de Deus. Mas precisamos realmente acender uma vela para ver o sol?”
WERNHER VON BRAUN

AGRADECIMENTOS

A Deus, principal motivador que me estimulou a seguir confiante nestes longos cinco anos de doutorado e foi providente em todos os momentos;

Ao orientador e amigo, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, por oportunizar o desenvolvimento desta tese e confiar no meu potencial de pesquisadora na instigante neurociências. Pelo esforço e por se alegrar comigo ao alcançarmos os resultados esperados; por todos os ensinamentos repassados desde o mestrado, meu muito obrigada.

Ao meu co-orientador e padrinho Prof. Dr. Enio Santos, que me acolheu enquanto aluna de doutorado passados dois anos de projeto e me instruiu em momentos decisivos desde a qualificação desta tese.

Aos membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE). Aos professores e alunos de doutorado do laboratório, em especial Celice Cordeiro, amiga e parceira em experimentos agendados aos feriados e finais de semana. Aos alunos de mestrado e alunos de iniciação científica.

Ao meu marido e por vezes aluno, Alexandre Afonso, por ter me auxiliado no desenvolvimento de alguns experimentos devido às limitações impostas pela gravidez ao final do doutorado. Muito obrigada por ter se empenhado em aprender a montar lâminas e tratar imagens para que tudo fosse cumprido como uma vitória da nossa família.

Aos alunos Josué, Janderson, Mayara e Lucianna que me acompanharam tantas vezes no laboratório em experimentos que confiavam tanto quanto eu que poderiam dar certo.

Ao apoio financeiro do órgão de fomento CNPQ pelo incentivo à pesquisa no Estado do Pará e sem o qual não haveria material necessário aos experimentos desse estudo.

Às solícitas D. Socorro e Vitória que me atendiam sempre bem e agilizaram com brevidade a todas as minhas solicitações junto à secretaria da pós-graduação. Estendo este mesmo agradecimento ao Prof. Dr. Anderson Herculano pela paciência em avaliar a todas as solicitações em tempo hábil e pela imensa compreensão de sempre.

E desde já à banca que se dispôs a avaliar este trabalho.

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) resulta de redução permanente ou transitória do fluxo sanguíneo para áreas encefálicas. Pode ser classificado como hemorrágico ou isquêmico. Sendo que o último é responsável por cerca de 87% dos casos. Esta desordem aguda é a segunda maior causa de mortalidade e incapacidade no mundo e a principal causa de mortes no Brasil. Desde que o AVE isquêmico em pacientes usualmente resulta de oclusão trombótica ou embólica na maior artéria cerebral, mais frequentemente da artéria cerebral média (MCA), modelos de isquemia cerebral experimental foram desenvolvidos para simular a doença humana. Neste estudo, investigou-se os efeitos do sesquiterpeno betacariofileno, encontrado em cerca de 40% do extrato puro de copaiba, após oclusão de MCA (MCAO) induzida por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) em ratos adultos. Analisou-se qualitativamente a área de lesão (através da técnica de Nissl) e por imunohistoquímica para neurônios maduros (NeuN), ativação microglial/macrofágica (ED1) e astrócitos (GFAP). Quantificou-se o número de células NeuN+ e GFAP+ no estriado isquêmico nos tempos de sobrevida investigados. Foi observado que o tratamento com betacariofileno reduziu a ativação microglial nos animais tratados em comparação aos animais controle. O número de células NeuN+ permaneceu maior em animais tratados com betacariofileno 3 e 7 dias após a MCAO. O tratamento com betacariofileno mostrou-se significativamente eficaz na redução da reatividade astrocitária 7 dias após-MCAO. Estes resultados sugerem que o tratamento com betacariofileno inibe satisfatoriamente a ativação microglial/macrofágica e reduz a reatividade astrocitária concomitante com indução de neuroproteção após MCAO. Considerando-se que o betacariofileno é um extrato dietético natural com comprovados fatores anticarcinogênico, anti-inflamatório e antimicrobiano utilizado em tratamentos de doenças humanas não neurais, e por possuir baixo teor de toxicidade, o seu uso como agente neuroprotetor poderá minimizar a lesão e danos neurológicos subsequentes após AVE em humanos.

PALAVRAS-CHAVE: Acidente Vascular Encefálico. Betacariofileno. Inibição microglial. Inibição astrocitária. Neuroproteção.

APOIO FINANCEIRO: CNPQ

ABSTRACT

Stroke results from the transitory or permanent reduction of cerebral blood flow. It can be classified as hemorrhagic or ischemic. Ischemic stroke is responsible for around 87% of all cases. This acute neural disorder is the second cause of mortality and disability around the world and the main cause of death in Brazil. Since ischemic stroke in patients usually results from a thrombotic or embolic occlusion of the middle cerebral artery (MCA), experimental models of ischemia have been developed to mimic human stroke. There are no neuroprotective drugs available for human stroke. It follows that research on development of alternative neuroprotective drugs are of important clinical relevance. In this study, we investigated the effects of betacaryophyllene, the main sesquiterpene present in about 40% of the copaiba oil-resin composition, on microglial activation, astrocytic reactivity and neuronal preservation following experimental MCAO in adult rats. Animals were submitted to experimental stroke by microinjections of endothelin-1 (ET-1) and treated (i.p) with betacaryophyllene (N=4) or vehicle control (N=4) and perfused at 3 days or 7 days post-MCAO. Gross histopathology was performed using cresyl violet staining. Immunohistochemistry was used to assess neuronal loss (anti-NeuN), microglial activation (anti-ED1) and astrocytosis (anti-GFAP). Numbers of NeuN+ and GFAP+ cells were quantified in the ischemic striatum. Betacaryophyllene treatment reduced microglial activation, increased neuronal preservation and decreased astrocytic reactivity at 7 days post-MCAO. These results suggest that betacaryophyllene modulates neuroinflammation and is neuroprotective following experimental striatal. Considering that betacaryophyllene is a natural dietetic extract already used in non-neural human diseases with anti-inflammatory, anti-microbial and anti-carcinogenic properties, its use as a neuroprotective agent is a promising future therapy for human stroke.

KEY-WORDS: Stroke. Betacaryophyllene. Microglial Inhibition. Astrocytes reaction. Neuroprotection.

FINNANCIAL SUPPORT: CNPQ

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	16
1.2.1. Excitotoxicidade	19
1.2.2. Estresse Oxidativo e Nitrosativo	21
1.2.3. A Ruptura da Barreira Hematoencefálica	22
1.2.4. A Resposta Inflamatória	23
1.2.4.1. Citocinas	24
1.2.4.2. Quimiocinas	25
1.2.4.3. Moléculas de Adesão Celular	26
1.2.4.4. Resposta inflamatória celular	26
<i>a. Neutrófilos</i>	27
<i>b. Linfócitos</i>	28
<i>c. Microglia</i>	29
<i>d. Astrócitos</i>	31
1.2.5. Apoptose	32
1.2.6 Neurogênese versus neuroinflamação	34
1.3 TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	37
1.3.1 Betacariofileno (β-cariofileno)	38
1.4 PROBLEMA E HIPÓTESE EXPERIMENTAL	41
1.5. OBJETIVOS	42
1.5.1. Geral	42

	10
1.5.2. Específicos	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA	44
2.3. TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO	45
2.4. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	45
2.5. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	46
2.6. ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA	48
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3. RESULTADOS	50
3.1 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES CARACTERÍSTICOS DE LESÃO ISQUÊMICA	50
3.2 MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZEM PERDA NEURONAL	50
3.3 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO INDUZ NEUROPROTEÇÃO APÓS MCAO	52
3.4 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO DIMINUE A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MCAO	55
3.5 MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZEM ASTROGLIOSE E BETACARIOFILENO REDUZ A INDUÇÃO DA REATIVIDADE ASTROCITÁRIA APÓS MCAO	57
4. DISCUSSÃO	61
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
4.2 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO INDUZ NEUROPROTEÇÃO EM TEMPOS AGUDOS APÓS MCAO	63

4.3 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO É UM MÉTODO EFICAZ PARA INIBIR A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA	64
4.4 BETACARIOFILENO INIBE A ASTROCITOSE INDUZIDA APÓS MCAO	66
5. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

LISTA DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1: Diagrama da anatomia cerebrovascular e MCAO em ratos.	16
FIGURA 2: Evolução do infarto em cérebro de camundongos 90 minutos após MCAO.	16
FIGURA 3: Desenho esquemático dos efeitos fisiopatológicos pós-AVENC isquêmico.	17
FIGURA 4: Liberação de glutamato em atividade sináptica e após evento isquêmico	19
FIGURA 5: Padrão de distribuição de células microgliais/macrofágicas contra e ipsilateral após MCAO	27
FIGURA 6: Estrutura química do sesquiterpeno encontrado em óleo de copaíba	34
FIGURA 7: Análise quantitativa de células ED1+, NeuN+, GFAP+ na região estriatal	41
FIGURA 8: Padrão de lesão evidenciado com coloração tecidual de violeta de cresila	43
FIGURA 9: Perda de neuronal 3 dias após MCAO	45
FIGURA 10: Perda de neuronal 7 dias após MCAO	46
FIGURA 11: Quantificação de células NeuN+ no centro e penumbra isquêmica do estriado de animais tratados e animais controle.	47
FIGURA 12: Ativação microglial/macrofágica após indução da isquemia.	48
FIGURA 13: Reatividade astrocitária pós-MCAO.	49
FIGURA 14: Betacariofileno reduz a indução da reatividade astrocitária 7 dias pós-MCAO.	50
FIGURA 15: Quantificação de células GFAP+ no centro e penumbra isquêmica do estriado de animais tratados e animais controle.	51
TABELA 1: Delineamento dos grupos experimentais avaliados segundo critério de agrupamento e número de animais por grupo.	37

1.INTRODUÇÃO

1.1 O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA

O acidente vascular encefálico (AVE) é a alteração neurológica produzida pela falência localizada do suprimento sanguíneo, de caráter transitório ou permanente (MEHTA e VEMUGANTI, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; DOYLE *et al.*, 2008). Estatísticas indicam ser uma das maiores causas de morte e a primeira em incapacidade dentre todas as demais doenças no mundo, resultando em torno de 6.000.000 de mortes anualmente (STINEAR, 2016, WOODRUFF *et al.*, 2011; JIN *et al.*, 2013) e representando 87% das doenças cerebrovasculares (ARSENE *et al.*, 2011). No Brasil, segundo dados revelados pelo o Ministério da Saúde, em 2012, foram registradas cerca de 68 mil mortes por AVE naquele ano. A doença representa a primeira causa de morte e incapacidade no país, o que gera grande impacto econômico e social, ocupando a sexta posição entre os países com maior índice de morte por doença cerebrovascular (LOTUFO, 2005; LOTUFO e BENSENOR, 2009). Em 2013, estimou-se 2.231.000 pessoas com AVE e 568.000 com incapacidade grave (BENSENOR, 2015). No Brasil, óbitos pela doença cerebrovascular superaram em números absolutos os causados pela doença coronariana. Esse padrão resulta da maior proporção da doença cerebrovascular em moradores das regiões Norte e Nordeste do País e em mulheres e pela hipertensão arterial ter maior impacto na doença cerebrovascular do que na coronariana (LOTUFO e BENSENOR, 2013).

De acordo com a *American Heart Association* (AHA) (2014), de 2000 a 2010 a taxa de mortalidade por AVE aproximou-se de 35,8% e o atual número de mortes diminuiu para 22,8%. A cada ano, cerca de 795.000 americanos sofrem de um novo ou recorrente evento de AVE. Isto significa que a cada 40 segundos, um caso de AVE acontece em toda

a América. Levando a óbito mais de 137.000 pessoas pós-AVE ao ano, resultando em 1 morte a cada 4 minutos. Quanto ao percentual de eventos por sexo e raça, estimou-se que 40% dos casos acometeram homens e 60% mulheres (AHA,2014). No Brasil as estatísticas demonstram nítida diferença entre brancos, pardos e negros, com carga mais elevada entre negros de ambos os gêneros, seguida pelos pardos (LOTUFO e BENSENOR, 2013).

O AVE é responsável por 5,7 milhões de mortes, de um total de 58 milhões de mortes por ano em todo o mundo, representando 10% dos óbitos (LIMA *et al.*, 2015). Projeções sugerem que, sem intervenção, o número de mortes por AVE aumentará para 7,8 milhões em 2030. Mesmo com essa alta taxa de mortalidade em países menos desenvolvidos, a exemplo do Brasil, ainda existem poucas informações sobre a prevalência de doenças neurológicas (BENSENOR *et al.*, 2015).

O AVE pode ser classificado em hemorrágico ou isquêmico (LO *et al.*, 2003). O AVE isquêmico é responsável por cerca de 87% dos acidentes vasculares encefálicos onde a oclusão dos vasos cerebrais pode ocorrer devido a uma trombose local ou embolia, onde aproximadamente 80% destes é resultado por oclusão da maior artéria cerebral, a artéria cerebral média e seus ramos, gerando isquemia e consequente lesão com redução ou perda total de função neural da área lesionada (LOPES *et al.*, 2016, OLIVEIRA *et al.*, 2014; DOYLE *et al.*, 2008), as demais causas de AVE dividem-se em 10% hemorragia intracerebral e 3% AVE hemorrágico subaracnóide (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em 2010, os americanos pagaram cerca de 73,7 bilhões de dólares em tratamentos medicamentosos e reabilitação física (AHA, 2011). Nos Estados Unidos, o gasto estimado, de 2005 a 2050, incluindo hospitalização, reabilitação e medicamentos é superior a 1,5 trilhão de dólares (BROWN *et al.*, 2006). No primeiro ano de tratamento, o custo fica acima dos 25 mil dólares por paciente (MAHLER *et al.*, 2008). Em países da Europa, a hospitalização dos sobreviventes pode representar quase 4 mil Euros (EPSTEIN *et al.*,

2008). Variações nos valores investidos dependem do tipo de política de saúde adotada (SEKIMOTO *et al.*, 2008), da gravidade do quadro clínico e dos serviços disponibilizados ou requeridos, além do tempo decorrido entre início do evento isquêmico e socorro ao paciente (FLYNN *et al.*, 2008; MAHLER *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas dos efeitos do AVE são variadas dependendo da região cerebral afetada. O sinal mais comum, o qual ocorre com maior frequência na fase adulta, é a fraqueza repentina ou dormência da face, braço e/ou perna, geralmente em um lado do corpo. Outros sinais frequentes incluem: confusão mental, alteração cognitiva, dificuldade para falar ou compreender, engolir, enxergar com um ou ambos os olhos e caminhar; distúrbios auditivos; tontura, perda de equilíbrio e/ou coordenação; dor de cabeça intensa, sem causa conhecida; diminuição ou perda de consciência. Uma lesão muito grave pode causar morte súbita.

A reabilitação é uma parte crítica da recuperação para muitos dos sobreviventes de AVE. Os efeitos podem levar a mudanças, reaprendizado e redefinição de como viverão. Além do mais, a reabilitação não reverte os efeitos de um AVE, objetivando apenas promover fortalecimento, capacidade e confiança de que poderão continuar suas atividades mesmo com as seqüelas da doença (AHA, 2014). Levando-se em consideração que a maior parte dos indivíduos acometidos tenha idade superior a 65 anos, e que a expectativa de vida continua crescendo em todo o mundo, o número absoluto de pessoas com AVE poderá aumentar ainda mais no futuro (LAKHAN *et al.*, 2009).

Dentre os principais fatores de risco que levam ao acometimento de AVE, segundo a AHA (2011), encontram-se: tabagismo, obesidade, dislipidemias, estresse, sedentarismo, diabetes, doenças cardiovasculares e pressão sanguínea elevada. Além destes, o Ministério da Saúde do Brasil (2013) apontou alguns grupos de risco: idade, sexo masculino, negros,

histórico familiar de ocorrência de AVE e/ou acidente isquêmico transitório, condições genéticas como anemia falciforme, uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal pós-menopausa, alcoolismo, uso de cocaína e anfetaminas, além das enfermidades tropicais endêmicas como a Doença de Chagas e a Malária.

Infelizmente, terapias atuais utilizadas no AVE para humanos são muito limitadas. Sendo somente o tratamento com ativador tecidual de plasminogênio recombinante, um agente trombolítico, aprovado e que demonstra resultados de melhoria funcional em pacientes pós- AVE. Entretanto, este só é eficaz se administrado dentro de 3 horas após o início dos sintomas, sendo indicado aos pacientes diagnosticados com AVE hemorrágico. Conseqüentemente, somente 5 a 10% dos pacientes podem receber esta terapia (CEULEMANS *et al.*, 2010; CANDELARIO-JALIL, 2009).

A busca contínua por novas terapias que possam ser incorporadas à rotina clínica permanecem, apesar de cerca de 1000 estratégias terapêuticas já terem sido testadas em modelos experimentais e aproximadamente apenas um décimo destas ter chegado ao estágio de triagem clínica e a maioria destes esforços falhou (STINEAR, 2016; LAKHAN *et al.*, 2009).

Diante do contexto epidemiológico e da indisponibilidade de estratégias terapêuticas eficazes, faz-se cada vez mais necessário a compreensão dos eventos fisiopatológicos desta afecção para posterior criação de estratégias que possam contribuir como uma fonte de tratamento ao AVE isquêmico, sendo o tipo que mais acomete a população mundial. Após o entendimento da fisiopatologia do acidente vascular encefálico, propõe-se a utilização de um substrato natural, betacariofileno (β -cariofileno),

como potencial tratamento pós-AVE experimental, pela análise da sua possível propriedade anti-inflamatória com efeito benéfico sobre a neuroproteção.

1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

O AVE isquêmico resulta de redução permanente ou transitória do fluxo sanguíneo cerebral (QUAN *et al.*, 2014; DIRNAGL *et al.*, 1999), podendo ocasionar em uma lesão focal (isquemia focal), caracterizado pela redução do fluxo sanguíneo cerebral em uma região distinta do encéfalo, ou ainda, global (isquemia global) induzido geralmente pela redução do fluxo sanguíneo afetando o encéfalo inteiro. Na isquemia cerebral, uma artéria ou veia é mecanicamente ocluída por embolia ou resulta de tromboembolismo cerebral (BACIGALUPPI *et al.*, 2010), na maioria das vezes, em humanos, ocorre AVE na área de perfusão pela artéria cerebral média (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2010).

Desde que o acidente vascular encefálico isquêmico em pacientes usualmente resulta de oclusão trombótica ou embólica na maior artéria cerebral, mais frequentemente na artéria cerebral média (MCA), modelos de isquemia cerebral experimental tem sido desenvolvido para mimetizar o acidente vascular encefálico (LIU e McCULLOUGH, 2011), como pode-se observar uma imagem de encéfalo pós- oclusão da artéria cerebral média (MCAO) abaixo, nas figuras 1 e 2.

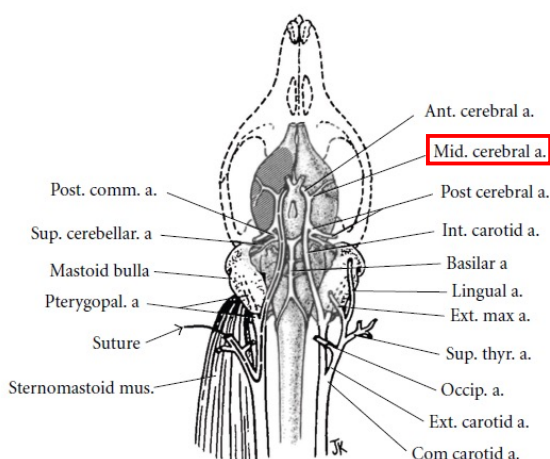


Figura 1: Diagrama da anatomia cerebrovascular e MCAO em ratos. Fonte: LONGA et al., 1989. Mid.cerebral a.: artéria cerebral média

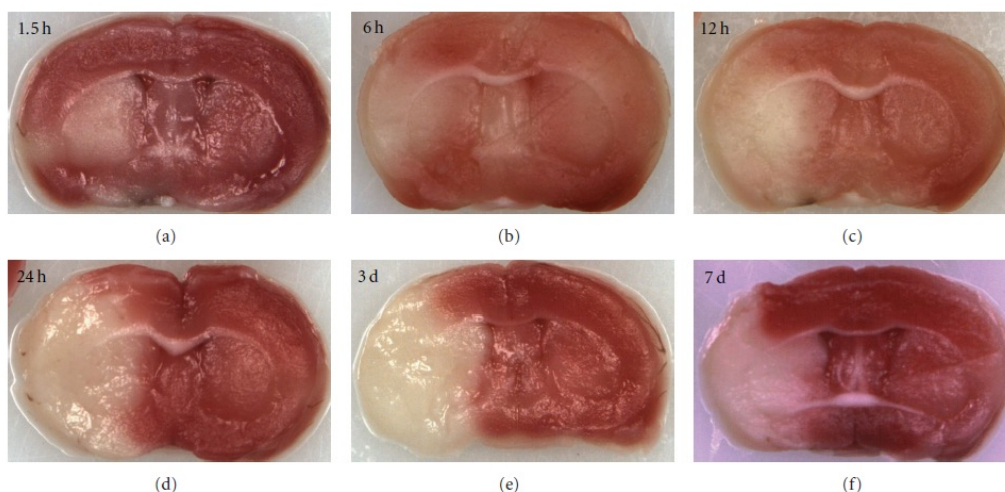


Figura 2: Evolução do infarto em cérebro de camundongos 90 minutos após MCAO. Fonte: LIU e McCULLOUGH, 2011.

A isquemia é consequência da interrupção de fluxo sanguíneo, oxigênio, glicose e energia à área de lesão, seguido de uma série de eventos bioquímicos patológicos conhecidos como “cascata isquêmica”, incluindo excitotoxicidade induzida por glutamato, influxo de cálcio, resposta celular inflamatória, ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), edema e morte celular por necrose e apoptose (GU *et al.*, 2014; XING *et al.*, 2012; ELTZSCHIG e ECKLE, 2011). A figura 3 representa resumidamente os efeitos fisiopatológicos do AVE isquêmico.

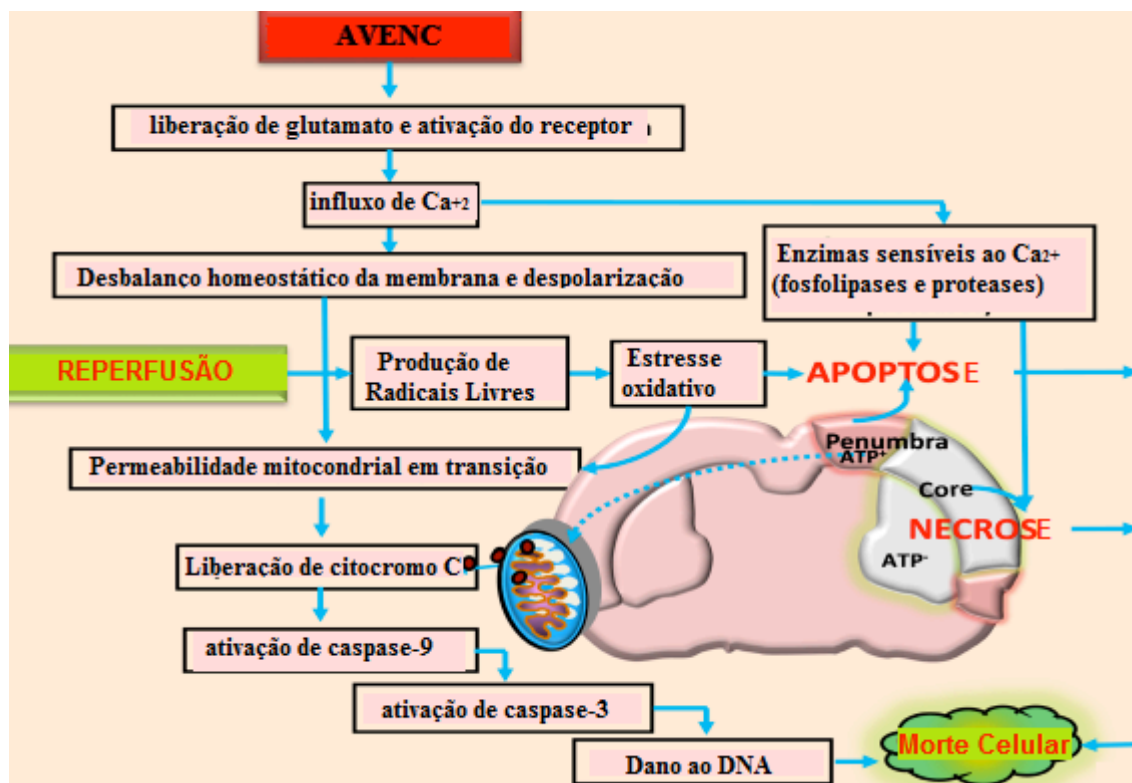


Figura 3: Desenho esquemático dos efeitos fisiopatológicos pós-AVE isquêmico. *Core*, centro de lesão. Adaptado de MEHTA e VEMUGANTI, 2014.

Desse modo, se a condição isquêmica persiste por um período de tempo prolongado, a morte neuronal primária aparece rapidamente nas áreas do centro e é acompanhada pela morte secundária na penumbra isquêmica que envolve lentamente subsequente ativação de múltiplas vias de morte celular (BACIGALUPPI *et al.*, 2010), seja por mecanismo de excitotoxicidade causando morte neuronal por hipóxia que resulta em necrose (DOYLE *et al.*, 2008), presença de radicais livres durante o período de reperfusion (BROUNS e DE DEYN, 2009), inflamação (WANG e JIN, 2014; HUANG *et al.*, 2006) e apoptose (MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

A seguir são apresentados os principais mecanismos celulares envolvidos com a fisiopatologia do AVE.

1.2.1 Excitotoxicidade

Em condições fisiológicas, o neurotransmissor glutamato é o principal responsável pela mediação das transmissões sinápticas excitatórias (CURTIS *et al.*, 1959) através da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos, como o NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico) ou cainato (LAI *et al.*, 2014; WON *et al.*, 2002). A ativação desses receptores leva ao aumento da permeabilidade da membrana celular aos íons sódio, potássio e cálcio (ARUNDINE e TYMIANSKI, 2004). As sinapses excitatórias, incluindo as mediadas pelo glutamato, são essenciais para o processamento normal de informações, crescimento neuronal e orientação axonal, desenvolvimento e maturação do encéfalo e para a plasticidade neuronal na saúde e na doença (LAI *et al.*, 2014; WON *et al.*, 2002).

Na isquemia encefálica, a privação de oxigênio e glicose provoca um aumento de glutamato na membrana pré-sináptica através da intensa despolarização de membrana após lesão isquêmica (WON *et al.*, 2002). O aumento nos níveis de glutamato ativa seus receptores, o que induz aumento das concentrações intracelulares de íons, principalmente cálcio e sódio (WOODRUFF *et al.*, 2011; MARTIN e WANG, 2010).

O íon cálcio normalmente tem o papel de regular alguns processos celulares, como funções enzimáticas, crescimento celular e diferenciação. Além disso, o cálcio também é responsável pela liberação de neurotransmissores, regulação da excitabilidade das células, além de regular a plasticidade sináptica no sistema nervoso (PIVOVAROVA e ANDREWS, 2010). O cálcio extracelular pode se integrar ao espaço intracelular principalmente através de canais iônicos dependentes de voltagem ou receptores ionotrópicos de alguns neurotransmissores, como NMDA (MEHTA *et al.*, 2007).

Quando há o aumento nos níveis do glutamato, há um aumento do influxo do cálcio para o meio intracelular, por causa da ativação prolongada dos receptores ionotrópicos e por alterações nos mesmos, induzidas pela própria lesão (Figura 4). O acúmulo excessivo de cálcio dentro da célula desencadeia uma série de cascatas neurotóxicas, que podem aumentar a morte celular, como ativação de enzimas, como as calpaínas e outras proteases, cinases, sintase de óxido nítrico, calcineurinas e endonucleases. Esses componentes são determinantes para processos fisiopatológicos posteriores, como a morte celular programada (apoptose) (ARUNDINE e TYMIANSKI, 2004).

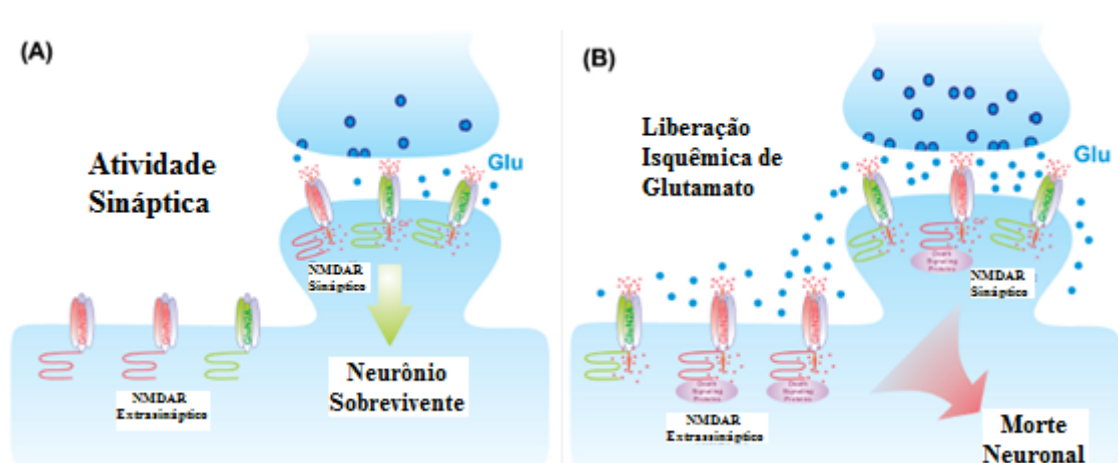


Figura 4: Liberação de glutamato em atividade sináptica (A) e após evento isquêmico (B) provocando aumento concomitante de influxo iônico, principalmente cálcio, após AVE e ativação de maior quantidade de receptores glutamatérgicos. Adaptado de LAI *et al.*, 2014.

A elevação excessiva da concentração de sódio no meio intracelular também pode ser prejudicial às células neuronais em ambiente isquêmico. A entrada de sódio provoca um influxo secundário de íon cloreto e água no ambiente intracelular, o que causa edema de organelas citoplasmáticas, incluindo as mitocôndrias, e condensação da cromatina nuclear, provocando lesão irreversível e morte celular após lesão isquêmica. O acúmulo de

sódio e a lesão celular causada por ele pode aumentar a reação inflamatória, causando extensão da lesão por indução de morte celular (WOODRUFF *et al.*, 2011; WON *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 1987).

1.2.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Cerca de um a três por cento do oxigênio consumido pelo organismo humano em condições normais é transformado em radicais livres, os quais irão produzir pequenas lesões, por si só são insignificantes, mas que ao longo dos anos acumulam-se substituindo os parênquimas normais por tecido cicatricial (SPITELLER e AFZAL, 2014). O equilíbrio entre a concentração de agentes oxidantes e antioxidantes é mantido em situações fisiológicas, degradando a demanda de radicais livres (LAI *et al.*, 2014; CARDOSO, 2010), isso porque os neurônios, assim como todas as células do corpo são submetidos a níveis basais de estresse oxidativo e nitrosativo constantemente, mas que não são capazes de gerar nenhum dano. No entanto, os radicais livres possuem por natureza a característica de moléculas altamente reativas que podem interagir com DNA, proteínas e lipídios causando graus variados de dano e disfunção (MEHTA e VEMUGANTI, 2014; WOODRUFF *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo é induzido após a isquemia cerebral por diversas vias da cascata isquêmica, especialmente pela inflamação e reperfusão, aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (KIM *et al.*, 2014; BARTON, 2013; CEULEMANS *et al.*, 2010). A perda da polaridade da membrana celular leva ao influxo de íons cálcio e sódio na célula. Este acúmulo iônico induz a mitocôndria produzir quantidades prejudiciais de ROS (KNOTT *et al.*, 2008). A liberação de superóxido (O_2^-) da mitocôndria para o

citoplasma leva à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxidril(OH⁻). Estes radicais ativam cascatas enzimáticas que destroem macromoléculas na célula e a levam à morte (HERTZ, 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). Paralelamente, no citoplasma, o íon cálcio promove a produção de óxido nítrico (NO) que, em níveis elevados, também tem efeito deletério (BROUNS & DE DEYN, 2009).

1.2.3 A Ruptura da BHE

A BHE é um importante componente da rede de comunicação que conecta o sistema nervoso central e os tecidos periféricos, além disso funciona como uma interface que limita e regula a troca de substâncias entre sangue e o sistema nervoso central (BANKS, 2010). A impermeabilidade da BHE é o resultado de uma série de características únicas, que acrescenta dificuldade às moléculas tentando penetrar nesta barreira. Esta propriedade é baseada na existência de uma permeabilidade muito restrita do endotélio, além de enzimas degradantes presentes em grande número no interior do endotélio de modo que, com exceção de água, gases como oxigênio e o dióxido de carbono e determinadas moléculas lipossolúveis muito pequenas podem passar de forma íntegra (ROJAS et al., 2011; BANKS, 2010). Além das funções de permeabilidade seletiva, a BHE possui aspectos importantes como funções neuroimunes, incluindo a secreção de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (LO, 2008).

Em processos fisiológicos, o transportador de íons na microvasculatura das células endoteliais controla o fluxo de íons através da BHE. O transporte de outras moléculas ocorre via transportadores específicos ou endocitose, enquanto que a difusão celular é cuidadosamente regulada (DEL ZOPPO e HALLENBECK, 2000). Em condições patológicas, incluindo AVE, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e dor

inflamatória, ocorre um desequilíbrio à integridade da BHE, com conseqüente desequilíbrio da homeostase de íons e função transportadora. No AVE, a BHE perde a regulação de íons, submetendo-se à difusão passiva de água, o que resulta em edema cerebral (BROWN e DAVIS, 2002), exposição do parênquima para constituintes intravascular, diminuição do fluido cerebral e conversão hemorrágica. As metaloproteinases de matriz (MMPs do inglês, *matrix metaloproteinases*) são os maiores componentes da BHE, em particular as MMP-9 após a isquemia (MUKHERJEE e SWARNAKAR, 2014; LUDEWIG et al., 2013; YANG et al., 2013). A MMP é uma enzima proteolítica que degrada a laminina e fibras colágenas da lâmina basal. Esta protease prejudica a coesão entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade local e favorece o extravasamento de plasma, infiltração de células imunes circulantes para o encéfalo, exacerbando o edema e eventual entrada de hemácias provocando hemorragias, (KIM *et al.*, 2014; DEL ZOPPO e HALLENBECK, 2000; LO, 2008; BROUNS e DE DEYN, 2009).

1.2.4 A Resposta Inflamatória

Por muito tempo acreditou-se que o SNC, em particular o encéfalo, era um órgão isolado de influências do sistema imune periférico (o chamado privilégio imunológico). A escassa rede de drenagem linfática, a falta de células apresentadoras profissionais de antígenos como as células dendríticas, além do filtro imposto pela BHE (ROJAS, 2011; BARKER & WIDNER, 2004) e a suposta ausência do complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I, do inglês: *Major Histocompatibility Complex*) (BOULANGER & SHATZ, 2004) sugeriam o isolamento anatômico e fisiológico do SNC e sistema imune. Hoje, contudo, sabe-se que moléculas e células do sistema imune têm trânsito de entrada e

saída do encéfalo e medula espinhal tanto em condições normais quanto patológicas (KRIZ e LALANCETTE-HEBERT, 2009; GALEA *et al.*, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento da resposta inflamatória à isquemia inicia pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas – interleucina-1 (IL-1, do inglês: *interleukin-1*), fator- α de necrose tumoral (TNF- α , do inglês: *tumor necrosis factor alpha*), interleucina-10 (IL-10, do inglês: *interleukin-10*) e o fator-beta de crescimento transformador (TGF-beta, do inglês: *transforming growth factor beta*); e quimiocinas – destaque para a proteína-1 quimiotática de monócito (MCP-1, do inglês: *monocyte chemotactic protein 1*) (GELDERBLOM *et al.*, 2009). Estes mediadores inflamatórios modulam a ativação de células imunes e induzem a expressão de moléculas de adesão na parede endotelial, entre as quais seletinas, integrinas e imunoglobulinas.

1.2.4.1 Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis que causam modificações comportamentais nas células-alvo (COTA & MIDWINTER, 2009; TWYXCROSS & AICKELIN, 2009), como mudanças morfológicas, expressão de moléculas de adesão, produção de radicais livres e liberação de mais citocinas (ASCHNER, 1998; CHAVARRIA e ALCOCER-VARELA, 2004; WANG *et al.*, 2007). Entre as células-alvo estão células do sistema imune (por exemplo, microglia e linfócitos), astrócitos e neurônios. As citocinas podem ser agrupadas em moléculas pró-inflamatórias e antiinflamatórias.

Entre as citocinas pró-inflamatórias estão a IL-1 e o TNF- α (WANG *et al.*, 2007). A concentração de ambos os tipos de citocinas modula a intensidade da lesão. Estas moléculas são importantes para a ativação de células imunes periféricas e residentes e

contribuem para a expressão de moléculas de adesão celular e NO (ASCHNER, 1998; CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004).

Em contrapartida, citocinas como a IL-10 e TGF- β possuem ação antiinflamatória (URRA et al, 2014; WANG *et al.*, 2007). A IL-10 inibe a atuação pró-inflamatória da IL-1 e TNF- α (WANG *et al.*, 2007). A principal fonte de IL-10 são leucócitos mononucleares como os monócitos/macrófagos (URRA et al, 2014; BEMEUR *et al.*, 2007). Contudo, em condições patológicas graves estas células manifestam fenótipo prejudicial.

Outra citocina antiinflamatória é o TGF- β (SKINNER *et al.*, 2009), liberado por células mononucleares periféricas e residentes (microglia e astrócitos) (URRA et al., 2014). O TGF- β possui uma ação sinérgica à IL-10 (WANG *et al.*, 2007).

1.2.4.2 Quimiocinas

As quimiocinas são uma família de citocinas de baixo peso molecular responsáveis pela comunicação e recrutamento seletivo de leucócitos (WANG *et al.*, 2007). Estas moléculas podem afetar a permeabilidade da BHE e são consideradas pró-inflamatórias (BEMEUR *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007).

Microglia, astrócitos e leucócitos em migração também podem expressar quimiocinas em situações isquêmicas (LOPES *et al.* 2016; STOLL *et al.*, 1998; BLOCK e HONG, 2005). Nestas circunstâncias a MCP-1 pode ser liberada, através da indução por TNF- α (CHAVARRIA e ALCOCER-VARELA, 2004; WANG *et al.*, 2007).

A sinalização de citocinas e quimiocinas altera o comportamento celular e induz a expressão de moléculas de adesão na superfície de células residentes e leucócitos que favorecem o contato celular e a migração aos sítios de lesão (OHIRA, 2011).

1.2.4.3 Moléculas de Adesão Celular

A expressão de três grupos de moléculas de adesão celular dá suporte à migração trans-endotelial de leucócitos para o parênquima neural: selectinas, integrinas e imunoglobulinas (WANG *et al.*, 2007; WITTCHEN, 2009). Para tanto, estas moléculas medeiam os seguintes eventos: rolamento, adesão e transmigração (STOLL *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2007; WITTCHEN, 2009).

Stoll *et al.* (1998) descrevem que estes eventos ocorrem por interações entre ligantes e receptores específicos comumente presentes na superfície de leucócitos e do endotélio. Leucócitos circulantes eventualmente tocam a parede vascular que, pela crescente concentração de quimiocinas e citocinas, proporcionam uma fraca adesão à parede endotelial pela selectina-L (CD62L), propiciando o rolamento (STOLL *et al.*, 1998). A selectina-P (CD62P), então, medeia a migração de monócitos e alguns linfócitos aumentando a adesão destes leucócitos ao endotélio (LIU *et al.*, 2004; SCHYMEINSKY *et al.*, 2007).

A adesão celular é requisito básico para a migração, que é mediada, principalmente, por integrinas. Estas moléculas de adesão são expressas nos leucócitos que interagem com imunoglobulinas da parede vascular e favorecem a transmigração (STOLL *et al.*, 1998).

Diferentes células imunes participam da resposta celular à inflamação. Neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, microglia e astrócitos respondem ao processo inflamatório em diferentes escalas temporais (DOLL *et al.*, 2014).

1.2.4.4 Resposta inflamatória celular

A neuroinflamação pós-AVE é um fenômeno complexo que envolve múltiplos tipos de células residentes e invasoras do parênquima neural, estas variam em grau de

diferenciação ou ativação e cada uma expressa uma especificidade de receptores, moléculas de adesão e outros marcadores que com o passar do tempo caracterizam as mudanças em um ambiente inicialmente neurotóxico a até finalmente, neuroprotetor (CEULEMANS *et al.*, 2010).

Neurônios, micróglia, astrócitos e células endoteliais cerebrovasculares são as primeiras afetadas pelas condições isquêmicas e suas respostas à crescente morte celular é iniciar o recrutamento de leucócitos em tecidos vizinhos – primeiramente neutrófilos, seguido por monócitos e macrófagos e finalmente células T (DOS SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; LAKHAN *et al.*, 2009; CEULEMANS *et al.*, 2010).

As células microgliais/macrófagos ativados dominam a cena lesiva nos tempos de sobrevida mais tardios após desordens neurais agudas, incluindo AVE, trauma cerebral e da medula espinhal (KIM *et al.*, 2014; CLARK *et al.*, 1993; MORIOKA *et al.*, 1993). Descreveremos as evidências experimentais de que os componentes celulares da resposta inflamatória participam do processo lesivo após desordens neurais agudas, principalmente AVE.

Neutrófilos

Os neutrófilos são recrutados para o parênquima neural após desordens neurais agudas, incluindo lesão aguda da medula espinhal (SCHNELL *et al.*, 1999; GOMES-LEAL *et al.*, 2005) e do cérebro (DOS SANTOS *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008). Estas células possuem um importante papel fagocitário, o que é importante para a remoção de detritos teciduais após desordens neurais (VILLARREAL *et al.*, 2001). O pico máximo de recrutamento de neutrófilos em tecidos não neurais, como

a pele, ocorre em torno de 6h, mas no SNC é de 24 após lesão (KATO *et al.*, 1996; BOLTON & PERRY, 1998; GOMES-LEAL *et al.*, 2005). Trinta minutos após a lesão isquêmica, neutrófilos começam a ser recrutados ao sítio de lesão (KATO *et al.*, 1996; HIROSE *et al.*, 2000). O acúmulo de neutrófilos no sítio isquêmico permanece por no mínimo 15 dias e é considerado prejudicial ao tecido pela quantidade de radicais livres, enzimas proteolíticas e citocinas inflamatórias liberadas por estes granulócitos (HIROSE *et al.*, 2000; CHOU *et al.*, 2004), esta contribuição para a neuroinflamação pela liberação de moléculas pró-inflamatórias e fatores citotóxicos, como proteases, desencadeiam na ruptura da BHE (CEULEMANS *et al.*, 2010).

Linfócitos

A migração e o acúmulo de linfócitos nos tecidos são mediados por seletinas e integrinas (JAESCHKE & SMITH, 1997; STEEBER *et al.*, 1998). Em condições normais, linfócitos são raramente encontrados no SNC (MATYSZAK & PERRY, 1996). Contudo, em situações patológicas, estas células podem ser encontradas no tecido nervoso após lesões (POPOVICH *et al.*, 1997; ARUMUGAM *et al.*, 2005; MUKHTAR *et al.*, 2005). Em condições patológicas, estudos recentes relatam um papel controverso dos linfócitos no tecido nervoso. Em lesões isquêmicas eles podem ser substancialmente prejudiciais, exercendo um papel importante na resposta inflamatória (YILMAZ *et al.*, 2006) pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) e por promover quimiotaxia para outros leucócitos (SCHWAB *et al.*, 2001), além do efeito citotóxico mediado pelo MHC classe I (CABARROCAS *et al.*, 2003).

Os linfócitos T e não B são atraídos pelo ambiente inflamatório do centro e penumbra isquêmicos e atuam de acordo com a expressão fenotípica deste tipo celular.

Enquanto as células T citotóxicas do tipo Th1 atacam e matam tanto células saudáveis quanto lesionadas, aumentando a inflamação pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, células Th2 e T regulatórias (Treg) liberam mediadores anti-inflamatórios no sítio de lesão em tentativa neuroprotetora (CELEUMANS et al., 2010)

Desta forma, os linfócitos exercem papel controverso na modulação da resposta inflamatória no SNC.

Microglia

A micróglia representa de 5-20% do total da população glial e a chave da modulação das respostas imunes no encéfalo. O mecanismo de ativação microglial não está completamente estabelecido, mas trabalhos recentes demonstraram que neurônios submetidos a condições de estresse podem liberar ATP e ADP que podem sinalizar em receptores específicos na membrana de astrócitos e microglia para que ocorra ativação microglial (DAVALOS *et al.*, 2005; FETLER & AMIGORENA, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005; RAIVICH, 2005). Sabe-se atualmente que após isquemia encefálica, a micróglia residente inicia sua ativação 2 horas após a lesão, podendo-se observar macrófagos não-residentes ativados 10 horas após o início da isquemia. De 22 a 46 horas, estas células distribuem-se uniformemente por toda a lesão, mantendo um pico máximo de ativação e proliferação 7 dias após o início do AVE (STOLL et al., 1998).

Durante o processo de ativação microglial estas células passam de uma morfologia ramificada, com pequenos corpos celulares, para uma morfologia amebóide, onde as células apresentam ramos curtos e grossos e, finalmente, a uma morfologia arredondada fagocítica de macrófagos ativados (LOPES, 2011; GRAEBER *et al.*, 1988; STREIT *et al.*, 1989; STREIT & GRAEBER, 1993), ambos os tipos celulares derivam de células

mielóides primitivas, ocasionando na expressam comum de muitos marcadores, como CD11b, F4/80, Iba-1 e outros (TAYLOR e SANSING, 2013). Nestas circunstâncias, a microglia ativada aumenta o poder de síntese de diversas substâncias e aumenta a expressão de diversas moléculas de membrana, incluindo moléculas MHC, classes I e II, receptores CD4 e CD8, e receptores do complemento (PERRY & GORDON, 1987; PERRY, 1994; SCHROETER *et al.*, 1994; SCHROETER *et al.*, 1997; JANDER *et al.*, 1998; PERRY, 1998; SCHROETER *et al.*, 1999; STOLL & JANDER, 1999; SCHROETER *et al.*, 2001).

O significado destas alterações morfofuncionais foi primeiramente estudado *in vitro*, onde sugeriu-se um papel neurotóxico para a microglia (GIULIAN *et al.*, 1990; BANATI *et al.*, 1993). *In vitro*, células microgliais liberam fatores neurotóxicos incluindo ácido quinolínico e NO que podem contribuir para a morte neuronal (GIULIAN *et al.*, 1990; BANATI *et al.*, 1993). Sugeriu-se que eventos similares ocorrem em doenças neurodegenerativas agudas e crônicas (GIULIAN *et al.*, 1990; GEHRMANN *et al.*, 1995; GIULIAN *et al.*, 1995; GIULIAN *et al.*, 1996; STOLL *et al.*, 1998; ELIASSON *et al.*, 1999; BAL-PRICE & BROWN, 2001; GOMES-LEAL *et al.*, 2004; STREIT *et al.*, 2004; BLOCK & HONG, 2005).

Em modelos experimentais de isquemia cerebral, relatou-se intensa ativação microglial no centro do infarto e na penumbra isquêmica (LOPES, 2011; MORIOKA *et al.*, 1993) (figura 5). Inúmeros estudos sugerem que a ativação microglial excessiva contribui para a ampliação do processo lesivo após isquemia (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; LAMPL *et al.*, 2007; HAYAKAWA *et al.*, 2008). Além da atuação benéfica como fagócitos, células microgliais ativadas poderiam liberar neurotoxinas, como óxido nítrico (NO), aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- e IL-1) que poderiam contribuir para a morte neuronal (LIPTON, 1999; SUGAWARA *et al.*,

2004). Existem evidências experimentais que uma ativação microglial descontrolada poderia dificultar a neurogênese endógena que ocorre durante doenças neurodegenerativas (EKDAHL *et al.*, 2003; MONJE *et al.*, 2003).

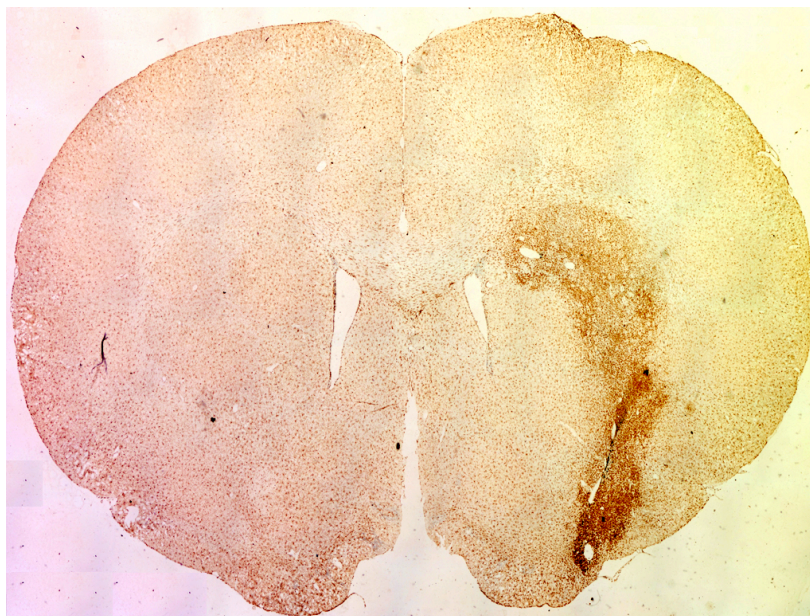


Figura 5: Padrão de distribuição homogênea de células microgliais/macrofágicas no lado contralateral à lesão, células isoladas e extremamente ramificadas e o lado ipsilateral à lesão em animais sem tratamento, 8 dias após a MCAO, mostrando intensa marcação Iba1+ no centro da lesão (lado direito da imagem) e com morfologia predominantemente de células arredondadas e ameboides. O padrão de ativação microglial delimita exatamente a área correspondente ao padrão de lesão por MCAO (Fonte: LOPES, 2011).

Diversos estudos tem-se mostrado focados no bloqueio da ativação de células microgliais como potenciais terapêuticas pós-AVE.

Astrócitos

Os astrócitos são células multifuncionais do SNC. Além de papel fundamental na homeostase do SNC e contribuir para o processamento de informações em condições

fisiológicas, eles são capazes de responder a qualquer insulto neste sistema (CORDEIRO DE SOUZA, 2011).

Os astrócitos normalmente fornecem energia, fatores neurotróficos e neurogênicos, precursores de neurotransmissores e agentes anti-oxidantes para a defesa dos neurônios. Assim como as micróglia, os astrócitos também se proliferam e diferenciam-se na resposta ao AVE e iniciam a produção de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos que contribuem com a perda da integridade da BHE (CELEUMANS et al., 2010).

A reação astrocitária às lesões, chamada de astrogliose, faz com que essas células deixem seu estado de repouso e se tornem ativadas, tornando-se hipertrofiadas, com seus filamentos expressando proteínas como nestina, vimentina e proteína de glia fibrilar (GFAP), além da ativação da proliferação celular (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Durante a astrogliose, os astrócitos reativos continuam se dividindo e migram para a área de lesão, formando a cicatriz glial, e lançam uma série de fatores mediadores da resposta inflamatória tecidual (BUFFO *et al.*, 2010).

Uma expressiva resposta astrocitária inicia no centro da lesão de 4 horas a 1 dia após a lesão e o pico de ativação destas células é evidenciado de 4 dias até 28 dias no parênquima isquêmico (LAKHAN *et al.*, 2009; NOWICKA *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2000). Estas células gliais reativas possuem papéis neurotóxicos que poderiam ser inibidos através da inibição ou modulação da resposta inflamatória pós-AVE.

1.2.5 Apoptose

A morte celular pode ser classificada basicamente em dois tipos: necrose e morte celular programada. A morte necrótica só ocorre em situações patológicas, causadas por estímulos extrínsecos às células. Já a morte celular programada - conhecida como

apoptose, por causa de sua morfologia – envolve processos fisiológicos ordenados, que eliminam células dos tecidos durante o desenvolvimento normal (LIPTON, 1999). Na isquemia encefálica, os dois tipos de morte podem ser observados. A necrose é o tipo de morte predominante no centro isquêmico, enquanto que a apoptose é mais encontrada na região de penumbra isquêmica (MOSKOWITZ *et al*, 2010).

Após isquemia encefálica, o processo de morte celular programada é desencadeado por vários fatores relacionados à lesão, como a produção de radicais livres, deficiências nos fatores de crescimento e neurotrofinas, dano ao DNA celular e lançamento de citocromo c após lesão mitocondrial (MEHTA *et al*, 2007; LIU *et al*, 1996). Outros eventos fisiopatológicos, como a excitotoxicidade induzida pelo excesso de glutamato no meio extracelular e a falta de regulação do cálcio afetam, também, os sinais para morte celular (ARUNDINE e TYMIANSKY, 2003). Em geral, há duas vias de ativação de apoptose: a via intrínseca e a via extrínseca (WOODRUFF *et al*, 2011).

Em suma, sabe-se que, tanto os mecanismos dependentes de receptor (via extrínseca), quanto os não dependentes de receptor (via intrínseca), promovem a ativação das caspases após lesão isquêmica (DIRNAGL *et al*, 1999). Além disso, os neurônios são particularmente susceptíveis à morte celular mediada por caspase, o que torna a morte celular programada um importante processo fisiopatológico durante a isquemia encefálica, levando a perda celular importante, mesmo depois da lesão aguda (DIRNAGL *et al*, 1999; ENDRES *et al*, 1998).

A fim de se minimizar os danos provocados pela morte celular em doenças neurodegenerativas, tem-se apostado na intensificação da neuroproteção por meio da redução da neuroinflamação.

1.2.6 Neurogênese versus neuroinflamação

Dentre inúmeras células e moléculas que estão intimamente relacionadas ao processo de regulação da neurogênese, encontram-se a microglia e astrócitos (ver Microglia e Astrócitos no subitem 1.2.4.4), que devido aos seus papéis duais (prejudicial ou benéfico) no processo inflamatório no SNC, tem se tornado alvo de uma série de estudos, a fim de demonstrar que o papel benéfico se sobressai ao papel maléfico ou vice-versa.

A ativação microglial tem sido considerada prejudicial para neurônios, mas o estado inflamatório não está somente associado com as conseqüências neurotóxicas, mas também com efeitos neuroprotetores, tais como fagocitose de neurônios mortos e remoção e limpeza de restos celulares no SNC (POLAZZI e MONTI, 2010).

Os estágios de ativação da microglia são regulados por uma série de moléculas. Existe um leque de evidências experimentais indicando que a microglia, dependendo do seu estágio de ativação e fenótipo funcional, pode ser prejudicial (neurotóxico) ou benéfica (neuroprotetor) para a neurogênese adulta em cérebros intactos ou lesionados (ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 2002). Além do mais, a microglia pode atuar nas diferentes fases da formação, maturação e integração funcional de novos neurônios (EKDAHL *et al.*, 2009). A contribuição final da microglia ativada para o nicho pró- ou antineurogênico dependerá do grau de ativação e um balanço entre citocinas pró- e antiinflamatórias produzidas como consequência desse processo de ativação (MONJE *et al.*, 2003).

Há estudos que evidenciam o papel benéfico da microglia, demonstrando sua importância durante o envelhecimento do cérebro, bem como na inflamação aguda, através da fagocitose para a manutenção do nicho neurogênico tanto em situações fisiológicas

quanto patológicas (SIERRA *et al.*, 2010; POLAZZI e MONTI, 2010) e o estabelecimento da neuroproteção através da produção de moléculas neurotróficas e antiapoptóticas, como IGF-1 (LALANCETTE-HEBERT *et al.*, 2007), quimiocinas e citocinas, como IL-4 (NEUMANN *et al.*, 2006) e regulação da liberação de glutamato (LOPEZ-REDONDO *et al.*, 2000). Em casos de lesão, há proliferação e ativação excessiva de células microgliais, o que possivelmente estão relacionadas a um mecanismo de reparo e restauração da homeostase no microambiente lesionado, além do mais, a ativação promove a liberação de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento em diferentes tipos de lesão (STREIT *et al.*, 1998).

Uma interpretação alternativa, entretanto, é que a atividade dessas células é na maior parte benéfica, tornando-se destrutiva somente quando elas escapam do controle da normalidade imposta a elas (SCHWARTZ *et al.*, 2006). A modulação microglial é uma abordagem apropriada, na qual os efeitos prejudiciais devem ser inibidos, enquanto que os efeitos benéficos maximizados.

A face prejudicial da micróglia parece está intimamente relacionada ao seu padrão de ativação e exacerbação da resposta inflamatória, podendo levar, em casos de doenças neurodegenerativas (JIN *et al.*, 2010) ao aumento e propagação da morte neuronal à penumbra isquêmica induzindo dano secundário (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), limitando a sobrevivência de células precursoras neurais pós-isquemia (HOEHN *et al.*, 2005) pela liberação de citocinas citotóxicas, como TNF- α (LIU *et al.*, 2005) e IL-6 (MONJE *et al.*, 2003) e espécies reativas do oxigênio (SMIRKIN *et al.*, 2010), bem como a produção excessiva de agentes pró-inflamatórios, como as enzimas cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (TEELING *et al.*, 2010) e estudos relacionados com a inibição dessas enzimas tem promovido o bloqueio da ativação microglial e aparente aumento da neurogênese em

modelos de lesão isquêmica experimental (KLUSKA *et al.*, 2005; MONJE *et al.*, 2003; BASTOS *et al.*, 2008).

Em estudos prévios de nosso grupo, encontramos evidências experimentais que a diminuição da ativação microglial é benéfica para as ações das células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas 24h após isquemia do córtex motor (FRANCO, 2009), no estriado (CARDOSO, 2010) e em modelos experimentais de oclusão da artéria cerebral média (LOPES, 2011). Já investigamos, também, as ações terapêuticas após inibição microglial com a minociclina, uma tetraciclina sintética conhecida inibidora microglial (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; CARDOSO, 2010) com extrato puro de copaíba (GUIMARÃES-SANTOS *et al.*, 2012) e com o anti-inflamatório não esteroide, indometacina, demonstrando potencial terapêutico neuroprotetor e neurogênico a partir do bloqueio da ativação microglial (LOPES, 2011).

Neste sentido, faz-se extremamente necessário modular o estado de reatividade microglial, posto que é um fator preponderante após desordens neuronais agudas e crônicas (LIU & HONG, 2003; LAI e TODD, 2006; NEUMANN *et al.*, 2009). Esta célula é atualmente considerada alvo para intervenção terapêutica (ROCK & PETERSON, 2006; BLOCK & HONG, 2007).

A reação astrocitária às lesões, chamada de astrogliose, faz com que essas células deixem seu estado de repouso e se tornem ativadas, tornando-se hipertrofiadas, com seus filamentos expressando proteínas como nestina, vimentina e proteína de glia fibrilar (GFAP), além da ativação da proliferação celular (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Durante a astrogliose, os astrócitos reativos continuam se dividindo e migram para a área de lesão, formando a cicatriz glial, e lançam uma série de fatores mediadores da resposta inflamatória tecidual (BUFFO *et al.*, 2010). É evidente que o conhecimento da dinâmica da

resposta dos astrócitos às lesões nervosas é essencial para o estudo da neuropatologia e para a avaliação dos danos neurais. Sendo assim, a astrogliose pode ser um importante alvo terapêutico para a regeneração da matriz extracelular após lesão (CORDEIRO DE SOUZA, 2011; BUFFO *et al.*, 2010).

Em condições patológicas, onde os astrócitos possuem a morfologia reativa, podem aumentar a concentração de ácido quinolínico, IL-1 e NO, fatores que podem contribuir para a cronicidade e gravidade da lesão. A astrocitose intensa é um achado experimental frequente após lesões agudas no SNC (CORDEIRO DE SOUZA, 2011; GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL *et al.*, 2004). O padrão de astrocitose difere entre as substâncias branca e cinzenta (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Nestes estudos, ocorre um aumento de reatividade para GFAP, sem, necessariamente, haver alterações quantitativas no número de astrócitos (CORDEIRO DE SOUZA, 2011). A astrogliose está associada ao bloqueio da neurogênese, assim como a atividade microglial, uma vez que os astrócitos reativos tendem a produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que intensificam a morte celular.

Entretanto, mais pesquisas são necessárias para associar a contribuição das microglias a outros tipos de células inflamatórias residentes ou infiltradas e para determinar a natureza das citocinas efetoras e outros mediadores inflamatórios envolvidos, assim como cada um de seus marcadores moleculares e celulares nas cascatas neurogênicas. Cada pesquisa poderá, indubitavelmente, ajudar no desenvolvimento de novas estratégias objetivando a proteção do potencial neurogênico (SIERRA *et al.*, 2014).

1.3 TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Atualmente, o ativador tecidual de plasminogênio (tPA) é o único que a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou como terapia farmacológica para AVE isquêmico

agudo (LIU *et al.*, 2014). Baseado na Cooperativa Europeia de Estudo com Acidente Vascular Encefálico (ECASS III) (CARPENTER *et al.*, 2011), o tPA foi aprovado como terapia trombolítica de AVE isquêmico agudo para um grupo seletivo de pacientes quando se inicia a terapia dentro das 4,5 horas do início do AVE (LIU *et al.*, 2014). Entretanto, o tratamento com tPA é limitado por uma janela temporal, bem como por um elevado risco de hemorragia intracraniana. Conseqüentemente, somente de 4 – 7% dos pacientes nos EUA que sofreram um AVE recebem trombólise com tPA (KATZAN *et al.*, 2004).

Terapias restauradoras farmacológicas e baseadas em células são vias promissoras para o tratamento do AVE (CHEN *et al.*, 2014). Indubitavelmente, fazendo-se necessária a utilização de terapias mais eficazes e que ampliem a janela temporal no tratamento do AVE isquêmico sem que estas ofereçam riscos secundários ao paciente.

Produtos naturais têm desenvolvido um papel importante na área médica, o qual tem sido bem reconhecido (KOEHN e CARTER, 2005). O interesse em produtos naturais começou desde o advento de novas drogas análogas sintéticas. Recentemente, o estudo de produtos naturais ganhou importância considerável na área médica devido os seus efeitos significativos (SAIN *et al.*, 2014) e alguns demonstram-se potenciais terapêuticos, como o betacariofileno.

1.3.1 Betacariofileno (β -cariofileno)

Compostos naturais tem sido amplamente estudado como potenciais agentes neuroprotetores por conta de suas propriedades características tais como facilidade em se ligar em múltiplos sítios alvos, eficácia demonstrada em pouco tempo de teste e baixos níveis de citotoxicidade. Atualmente, fitoterápicos tem sido considerados interessantes devido seu potencial terapêutico benéficos em numerosas doenças crônicas (OJHA *et al.*,

2016), em especial o uso de fitocanabinóides, a exemplo do betacariofileno, como terapia potencial contra doenças neurodegenerativas (FERREIRA, 2014).

O β -cariofileno é um sesquiterpeno natural bicíclico (figura 6), isolado de óleo da folha e do caule do cravo, óleo da folha de canela e frações de óleo de pinho, além de diversas especiarias, tais como o óleo da copaíba (GUIMARÃES-SANTOS *et al.*, 2012) e plantas alimentares. Desde a década de 1930, este substrato vem sendo utilizado como condimento e ingrediente principal em fragrâncias (CHANG *et al.*, 2013) e foi aprovado pela FDA para a consumo por conta da sua baixa toxicidade.

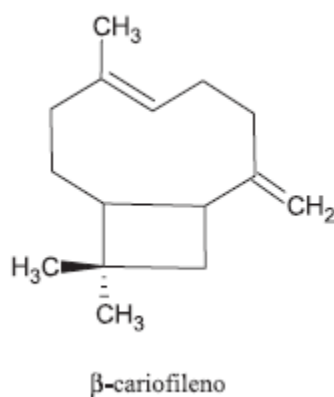


Figura 6: Estrutura química do sesquiterpeno encontrado em óleo de copaíba (PINTO e VEIGA JUNIOR, 2005).

Este componente é conhecido por ser antimicrobiano, antioxidante, anticarcinogênico e por possuir uma propriedade de elevada penetração na pele (SAIN *et al.*, 2014). Estudos comprovam que seu efeito como dietético canabinóide gerou efeito anti-inflamatório por bloqueio de receptores canabinóides tipo 2 (CB2), além de inibir vias pró-inflamatórias, incluindo o complexo de receptores “*toll-like*”, CD14/TLR4/MD2, o qual normalmente leva a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (GERTSCH *et al.*, 2008).

As plantas contendo β -cariofileno tem sido conhecidas pelo efeito benéfico na neurodegeneração e neuroinflamação e tem sido apontado com efeito neuroprotetor. Este fitocanabinóide não-psicoativo possui favoráveis propriedades psicoquímica e farmacocinética para a penetração no encéfalo (OJHA *et al.*, 2016).

Por tudo isso, há uma hipótese que o β -cariofileno poderia gerar proteção ao tecido nervoso contra a lesão isquêmica cerebral, através da sua ação anti-inflamatória. Entretanto a utilização e comprovação deste substrato natural como fator benéfico neuroprotetor em modelos experimentais de AVE ainda não foi muito bem explorado.

1.4. PROBLEMA E HIPÓTESE EXPERIMENTAL

Alguns modelos experimentais de isquemia cerebral têm sido desenvolvidos a fim de mimetizar as condições humanas de acidente vascular encefálico. Isto tem sugerido que mais de 80% de todos os AVE resultam de danos isquêmicos na área de irrigação da artéria cerebral média. Em meados da década de 1990, a endotelina-1 (ET-1) foi usada para induzir isquemia pela aplicação diretamente na superfície adjacente da MCA após a craniotomia. Depois este modelo foi modificado pelo uso de injeção estereotáxica de E-1 sobre a MCA para produzir isquemia cerebral focal. As principais vantagens deste modelo incluem a habilidade para produzir lentamente, além do controle da constrição gerada pela dosagem da ET-1, sem necessidade de manipular os vasos extracranianos de suprimento sanguíneo encefálico, bem como a taxa de reperfusão gradual que muito se aproxima da reperfusão que ocorre em lesões isquêmicas humanas (ANSARI *et al.*, 2013).

O tecido isquêmico, contendo uma resposta inflamatória intensa, constitui-se em um ambiente não permissivo à sobrevivência das novas células, impedindo que a maior parte das mesmas se adapte, sobrevivam e sejam integradas aos circuitos neurais pré-existentes (EKDAHL *et al.*, 2009).

Discutiu-se anteriormente que a resposta inflamatória mediada pela micróglia e por astrócitos pode evoluir com perfil deletério pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e produtos citotóxicos que induzem à morte neuronal e prejuízo à neurogênese endógena em casos de ativação exacerbada (TAYLOR e SANSING, 2013; EKDAHL *et al.*, 2009). Estudos prévios demonstraram o papel fundamental de bloqueadores da inflamação na modulação da neurogênese e neuroproteção após modelos experimentais de doenças do SNC (GUIMARAES-SANTOS, 2012; MONJE *et al.*, 2003; EKDAHL *et al.*, 2003; HOEHN *et al.*, 2005; KLUSKA *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2008; CARDOSO, 2010; LOPES, 2011). Existe grande controvérsia sobre o papel microglial e astrocitário sobre a

neurogênese endógena após AVE, com alguns trabalhos sugerindo que a microglia é benéfica (THORED *et al.*, 2009) enquanto que outros sugerem que a microglia é prejudicial (HOEHN, 2005; LIU, 2007). Nesta tese, induzimos isquemia estriatal utilizando-se um modelo de oclusão da artéria cerebral média (adaptado de MOYANOVA *et al.*, 2007) em ratos adultos para investigação dos efeitos do bloqueio microglial/macrofágico e astrocitário com um substrato natural bloqueador de receptores canabinóide 2, betacariofileno, com base na hipótese de que a modulação da inflamação pode gerar neuroproteção e aumento da sobrevivência e migração celular, através da amplificação de possível neurogênese endógena adulta, a ser investigada posteriormente.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Geral

Investigar os efeitos do tratamento com betacariofileno sobre a inflamação celular e preservação neuronal em diferentes tempos de sobrevivência após lesão isquêmica estriatal induzida por microinjeções de endotelina-1 (ET-1) em ratos adultos.

1.5.2. Específicos

- Investigar os efeitos do tratamento com betacariofileno sobre a perda neuronal, 3 e 7 dias após oclusão da artéria cerebral média;
- Validar os efeitos do betacariofileno como potencial inibidor da ativação microglial/macrofágica em tempos agudos pós-AVE experimental;
- Analisar os efeitos do betacariofileno sobre o bloqueio da reatividade astrocitária no modelo experimental;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados dezesseis ratos Wistar, machos adultos, pesando de 250 a 300g. Todos os procedimentos experimentais, incluindo a manipulação de animais foram realizados conforme as normas internacionais sugeridas pelo *National Institute of Health and Society for Neuroscience* e segundo aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE – UFPA), segundo protocolo nº 137-13 / 2013.

Os animais foram divididos nos grupos experimentais conforme a tabela abaixo:

TABELA 1: Delineamento dos grupos experimentais avaliados segundo critério de agrupamento e número de animais por grupo.

GRUPOS	DESCRIÇÃO	NÚMERO
G1	Animais isquêmicos tratados com veículo* e perfundidos em 3 dias	4
G2	Animais isquêmicos tratados com betacariofileno e perfundidos em 3 dias	4
G3	Animais isquêmicos tratados com veículo* e perfundidos em 7 dias	4
G4	Animais isquêmicos tratados com betacariofileno e perfundidos em 7 dias	4
	*veículo: solução Tween a 5%	Total 16

2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA

O modelo de oclusão da artéria cerebral média (MCAO) foi induzido com microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) (Sigma, Brasil), segundo protocolo adaptado de MOYANOVA *et al.*, 2007, em uma região do estriado ventral próxima ao córtex piriforme, onde fica um ramo importante da artéria cerebral média. O modelo experimental de isquemia focal é utilizado rotineiramente em nosso laboratório (DOS SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010) e possui vantagens e facilidades técnicas em relação aos modelos tradicionais de isquemia experimental que consistem no clampeamento de artérias cerebrais através de cirurgia complexa (ZHAO *et al.*, 1994).

Antes mesmo que qualquer procedimento cirúrgico fosse iniciado, os animais foram anestesiados com Cloridato de Cetamina (72 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (9 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Depois de verificada a remissão dos reflexos de retirada da pata e corneano, fez-se tricotomia e assepsia no campo cirúrgico. Os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (Insight®, EFF-336) fazendo-se o registro das coordenadas estereotáxicas seguintes, tomando o bregma como ponto de referência: +2,5mm, lateral; +1,2mm, anterior; e, -4mm, ventral, a partir da superfície cortical, a fim de injetar a ET-1 para indução de lesão isquêmica focal por MCAO.

Após a identificação estereotáxica da área a ser injetada com ET-1, ao microscópio cirúrgico, efetuou-se um orifício na calota craniana com o auxílio de uma broca, e posteriormente, as meninges foram removidas para propiciar a visualização do córtex cerebral. Depois de realizado o orifício prévio, introduziu-se uma micropipeta de vidro, com ponta de 10-20µm e graduações de 1µl (Sigma, Brasil), para injeção de 80 pMol de

ET-1 diluídos em 1µl de solução salina estéril diretamente na porção lateral do estriado ventral, em uma região próximo à passagem de ramos da artéria cerebral média, localizados no córtex piriforme. Uma pequena quantidade de azul colanil foi adicionada à solução injetada para a identificação mais precisa do sítio de injeção.

Após a injeção, a micropipeta permaneceu estacionária por 5 minutos no parênquima estriatal para facilitar a difusão de ET-1. Após este período, a mesma foi lentamente removida para evitar refluxo da solução de ET-1, e em seguida, fechou-se a incisão com uma sutura disposta sagitalmente.

Posteriormente à cirurgia, os animais foram mantidos com água e comida à vontade durante os tempos de sobrevivência de 3 e 7 dias.

2.3. TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO

Para o bloqueio inflamatório com betacariofileno, utilizamos o protocolo adaptado de CHANG *et al* (2013) e GERTSCH *et al* (2008). Os animais experimentais dos grupos 3 e 5 (n=4/grupo) receberam injeções intraperitoneais (5mg/Kg, *i.p*) de betacariofileno (Sigma-Aldrich), duas vezes ao dia, por 3 ou 7 dias, começando 24 horas após a MCAO. Os grupos 1, 2 e 4 (n=4/grupo) receberam injeções intraperitoneais do mesmo volume de tween a 5%, obedecendo-se as mesmas estratégias em relação a horários, intervalos de tempo e volumes da solução.

2.4. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após os tempos de sobrevivência especificados, os animais foram anestesiados como previamente descrito e perfundidos através do ventrículo esquerdo com 250 a 300 ml de

solução salina tamponada (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) e heparinizada, seguida de 250 a 300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Após a retirada dos encéfalos com auxílio de tesoura e alveolótomo, os mesmos foram pós-fixados durante 24 horas no mesmo fixador utilizado na perfusão e crioprotetidos em concentrações crescentes de sacarose diluída em uma mistura de glicerina com PB 0,05M (pH 7,2 – 7,4).

Após a crioproteção, os encéfalos foram imersos em gel (*tissue tek*) para confecção dos blocos de corte e cortados em criostato (Carl Zeiss, Mícron, HM505E, Alemanha), com o qual foram feitas secções coronais de 20µm e 50µm de espessura contendo a região estriatal com a lesão isquêmica. As secções foram diretamente montadas em lâminas gelatinizadas a partir do criostato e conservadas em *freezer* a -20°C para posterior utilização. Os cortes foram utilizados para marcação imunohistoquímica (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

2.5. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

O procedimento de imunohistoquímica foi realizado em secções coronais de 20 µm. Para avaliarmos os padrões de perda neuronal e inflamação após isquemia estriatal, utilizando-se os seguintes anticorpos:

- a. **anti-NeuN** (1:100, Chemicon): Marcador de neurônios maduros. Reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios diferenciados (MULLEN *et al.*, 1992);
- b. **anti-ED1** (1:500, Serotec): marcador para micróglia/macrófagos ativados, o qual identifica um epítipo na membrana de lisossomas no citoplasma de micróglia/macrófagos ativados (DIJKSTRA *et al.* 1985);

c. **anti-GFAP** (1:1000, Dako®, Z0334) – marcador de astrócitos. A proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês, glial fibrillar acid protein) está envolvida em vários processos funcionais das células, não totalmente conhecidos (FAHMY e MOFTAH, 2010). Provavelmente é responsável pelo controle da forma e do movimento dos astrócitos. Pode, também, desempenhar um papel significativo na interação dos astrócitos com as outras células do SNC. Por isso, o anticorpo anti-GFAP é um método preciso na identificação dessas células (FAHMY e MOFTAH, 2010);

O protocolo de imunohistoquímica utilizado foi previamente usado por Gomes-Leal, 2002 e Gomes-Leal *et al.*, 2004, 2005. As lâminas montadas foram retiradas do *freezer* e secas na estufa por 30 minutos à 37 °C. Em seguida, lavadas em PBS (tampão fosfato salina) sob agitação constante por 5 minutos, imersas em tampão borato (0,2M; pH 9,0; ácido bórico da Nuclear®) em temperatura constante de 65°C por 20 minutos e resfriadas, na mesma solução, em temperatura ambiente, durante o mesmo período de tempo. Este procedimento foi feito para garantir uma intensidade melhor da imunohistoquímica (GOMES-LEAL, 2002; GOMES-LEAL *et al.*, 2004, 2005). Em seguida, as secções foram lavadas novamente em PBS por 5 minutos e imersas em solução de álcool metílico e peróxido de hidrogênio (Merck®) (1ml de peróxido de hidrogênio/100ml de metanol), inibindo-se, assim, a peroxidase endógena das células do tecido analisado. A partir daí foi iniciado o processo imunohistoquímico propriamente dito, no qual as secções novamente lavadas em PBS, dessa vez com solução de PBS/Tween® (5 minutos) foram incubadas em soro normal de cabra (anti-GFAP) ou soro normal de cavalo (para marcação com anti-NeuN e anti-ED1), ambos em diluição de 10%, durante 1 hora. Após este período, as secções foram incubadas em anticorpo primário, durante uma noite, de acordo com a diluição previamente mencionada.

No dia seguinte, as secções foram novamente lavadas (PBS/Tween, 5 minutos) e incubadas em anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em cabra (1:200; GFAP), anti-camundongo feito em cavalo (1:100; NeuN, anti- ED1) por 2 horas. Faltando 1 hora para o término da incubação no anticorpo secundário, foi preparada a solução de ABC (avidina-biotina-peroxidase - kit ABC dos laboratórios Vector®) e esta ficou em repouso até sua utilização. Após nova lavagem, as secções foram incubadas no ABC por mais 2 horas. Em seguida, quatro novas lavagens (PBS/Tween, 5 minutos) foram feitas para posterior revelação. O cromógeno utilizado foi o DAB (diaminobenzidina – Sigma-Aldrich). Na sequência, as secções foram lavadas em PB 0,1M, desidratadas, diafanizadas e montadas entre lâmina e lamínula.

2.6. ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA

Para análise qualitativa, as secções, marcadas pelos diferentes métodos histológicos, foram inspecionadas em microscópio óptico (Nikon® – ECLIPSE 50i) e as imagens foram captadas por câmera fotográfica (Moticam® – 5500 – 5 MPixels) acoplada a microscópio óptico (Nikon® – ECLIPSE 50i).

A análise quantitativa para a investigação dos padrões de reatividade astrocitária e perda neuronal, consistirão na contagem do número de astrócitos (células GFAP+) e corpos neuronais (células NeuN+) de todos os grupos experimentais, utilizando objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm^2 acoplada a ocular de um microscópio óptico (Nikon® – ECLIPSE 50i). Foram utilizados nas contagens 3 secções por animal e 16 campos por secção, todos na região estriatal (Figura 7), e, no mínimo, 3 animais para cada grupo experimental.

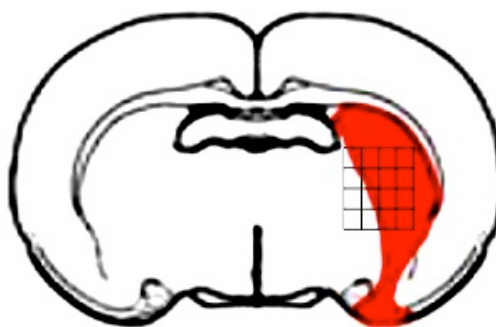


Figura 7: Análise quantitativa de células NeuN+ e GFAP+ na região estriatal: contagem de 16 campos por secção na área de penumbra e centro isquêmico após MCAO. Fonte: Imagem adaptada de ENGEL *et al.*, 2011.

Fez-se apenas análise qualitativa para as células ED1+ a fim de tornar possível a validação da atividade antiinflamatória do betacariofileno em lesão isquêmica aguda pós MCAO.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias, desvios padrão e erros padrão foram obtidos para todas as contagens. A comparação entre grupos foi realizada por análise de variância um critério e teste de correção de Tukey. O nível de significância estipulado foi de $p < 0,05$. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa *GraphPad* (Prism 7.0 para windows).

3. RESULTADOS

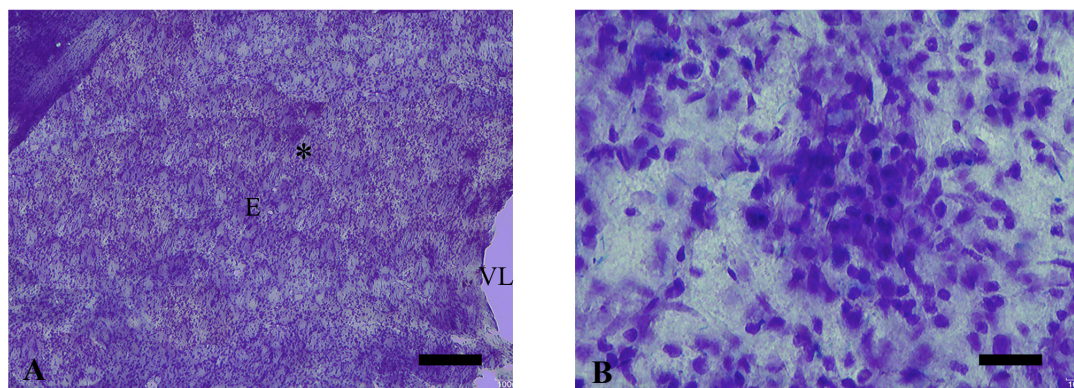
3.1 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES CARACTERÍSTICOS DE LESÃO ISQUÊMICA

Após a indução isquêmica por microinjeção de 80pMol de ET-1, sobre um ramo da artéria cerebral média, os animais foram avaliados a fim de se averiguar possíveis déficits motores. Observou-se que todos os animais apresentaram desvio ipsilateral do tronco, estáticos na posição de decúbito ventral, além de retração da pata contralateral para junto do corpo. Verificou-se a movimentação circular do animal para o mesmo lado da lesão isquêmica, isto é, o deslocamento em círculos para a esquerda. A partir desses achados confirma-se a eficiência da indução isquêmica.

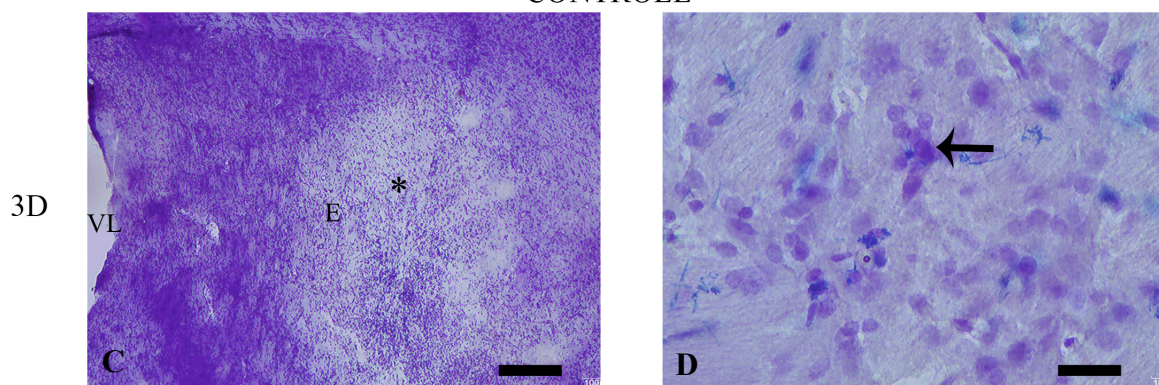
3.2 MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZEM PERDA NEURONAL

A perda neuronal foi avaliada segundo resultados obtidos da imunistoquímica para NeuN, marcador específico de pericários neuronais maduros. Observou-se, portanto, intensa perda neuronal no estriado após a indução isquêmica com microinjeções de ET-1. E isto foi claramente reconhecido pelo notável desaparecimento de corpos neuronais no centro isquêmico em grupos experimentais controle e tratados comparados ao estriado não isquêmico (Figuras 8).

CONTRALATERAL



CONTROLE



BETACARIOFILENO

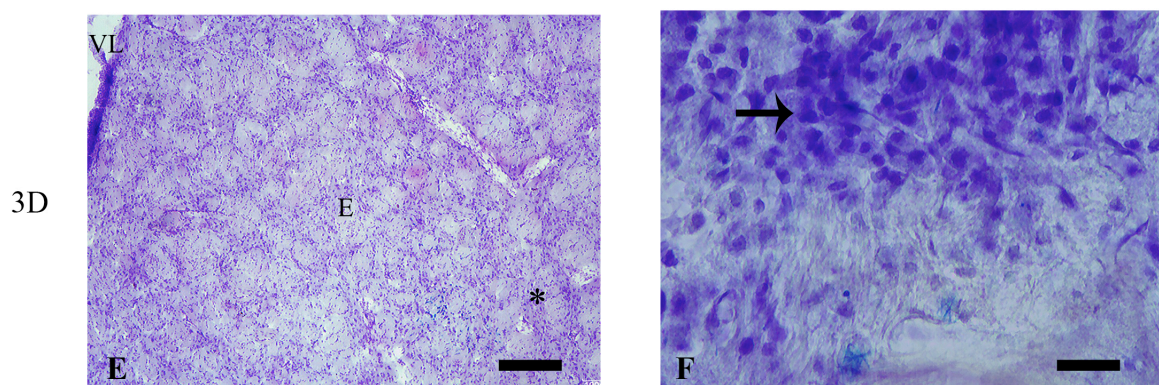


Figura 8: Padrão de lesão evidenciado com coloração tecidual de violeta de cresila. Redução da marcação de corpos celulares após MCAO em todos os grupos independente de

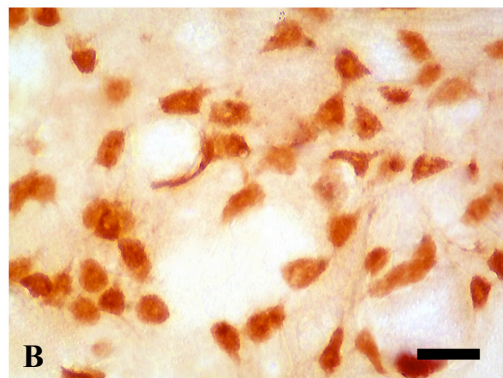
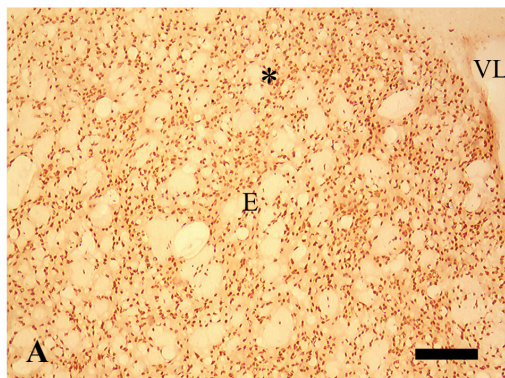
tratamento (C-F) em comparação com o estriado não isquêmico (A e B). Betacariofileno provavelmente induziu neuroproteção em relação ao grupo controle, 3 dias após a lesão isquêmica. Animais controle, tratados com veículo, estriado não isquêmicos contralateral (A-B) e extensa lesão isquêmica evidenciada através de palor tecidual em estriado ipsilateral 3 dias (C-D) após a MCAO em animais controle. Animais tratados com betacariofileno 3 dias (E-F) após a indução isquêmica. As setas apontam para os pericários neuronais.* Centro de lesão magnificação na foto seguinte (com exceção do estriado contralateral que representa apenas o local escolhido para a magnificação na foto seguinte). VL (Ventrículo lateral). E (Estriado) Escala: 400 um (A, C, E); 40um (B, D, F)

3.3 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO INDUZ NEUROPROTEÇÃO APÓS MCAO

O tratamento com betacariofileno induziu redução significativa da área isquêmica, quando comparado com os animais isquêmicos que receberam somente veículo. Os animais do grupo tratado apresentaram mais células NeuN+ que os animais controle em relação aos tempos de sobrevivência avaliados. Foi verificado, portanto, aumento significativo do número de neurônios em animais tratados com betacariofileno 3 ($P = 0,0003$) e 7 dias após a MCAO ($P < 0,0001$) (Figuras 9 a 11).

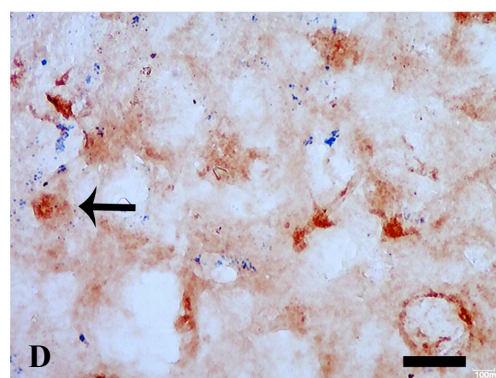
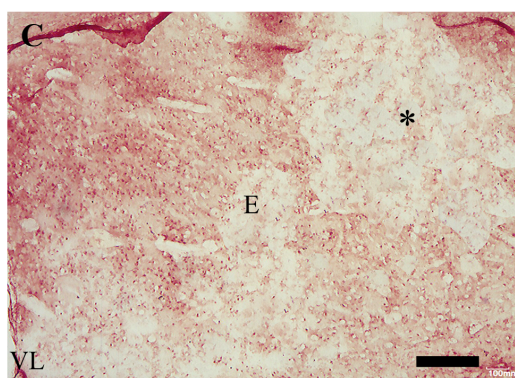
Os animais do grupo G1 (isquêmicos tratados com veículo) apresentaram menos células NeuN+ (controle - média de $\pm 34,8$) que G2 (tratados com betacariofileno - média $\pm 52,2$) após 3 dias de MCAO. O mesmo resultado se repetiu 7 dias após MCAO, onde foi verificado aumento significativo do número de neurônios em G3 (controle - média de $\pm 20,9$) do que os animais do grupo G4 (tratados com betacariofileno - média $\pm 62,6$) após a MCAO.

CONTRALATERAL



CONTROLE

3D



BETACARIOFILENO

3D

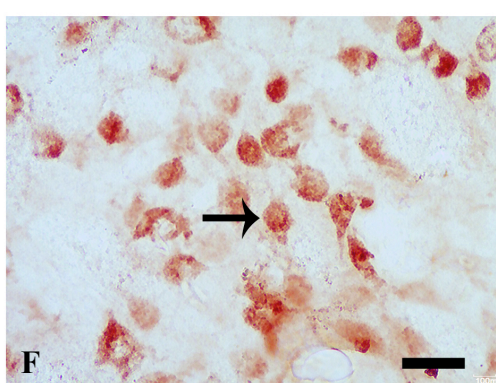
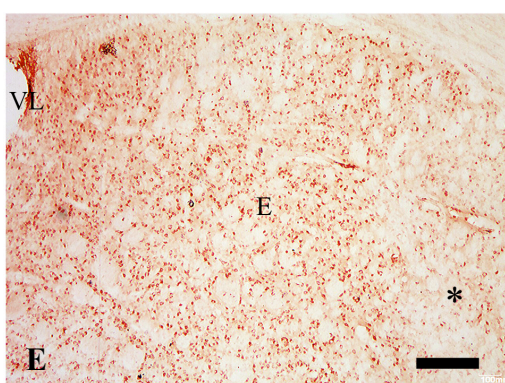


Figura 9: Perda neuronal após MCAO em todos os grupos independente de condição de tratamento (C-F) em comparação com o estriado contralateral (A e B). Betacariefileno preservou

maior número de neurônios em relação ao grupo controle, 3 dias após a lesão isquêmica. Animais controle, estriado contralateral (A-B) e estriado ipsilateral controle 3 dias (C-D) após a MCAO. Animais tratados com betacariofileno 3 dias (E-F) após a indução isquêmica. As setas apontam para células NeuN+.* Centro de lesão (com exceção do lado contralateral que representa apenas o local escolhido para a magnificação na foto seguinte). VL (Ventrículo lateral). E (Estriado) Escala: 400 um (A, C, E); 40um (B, D, F)

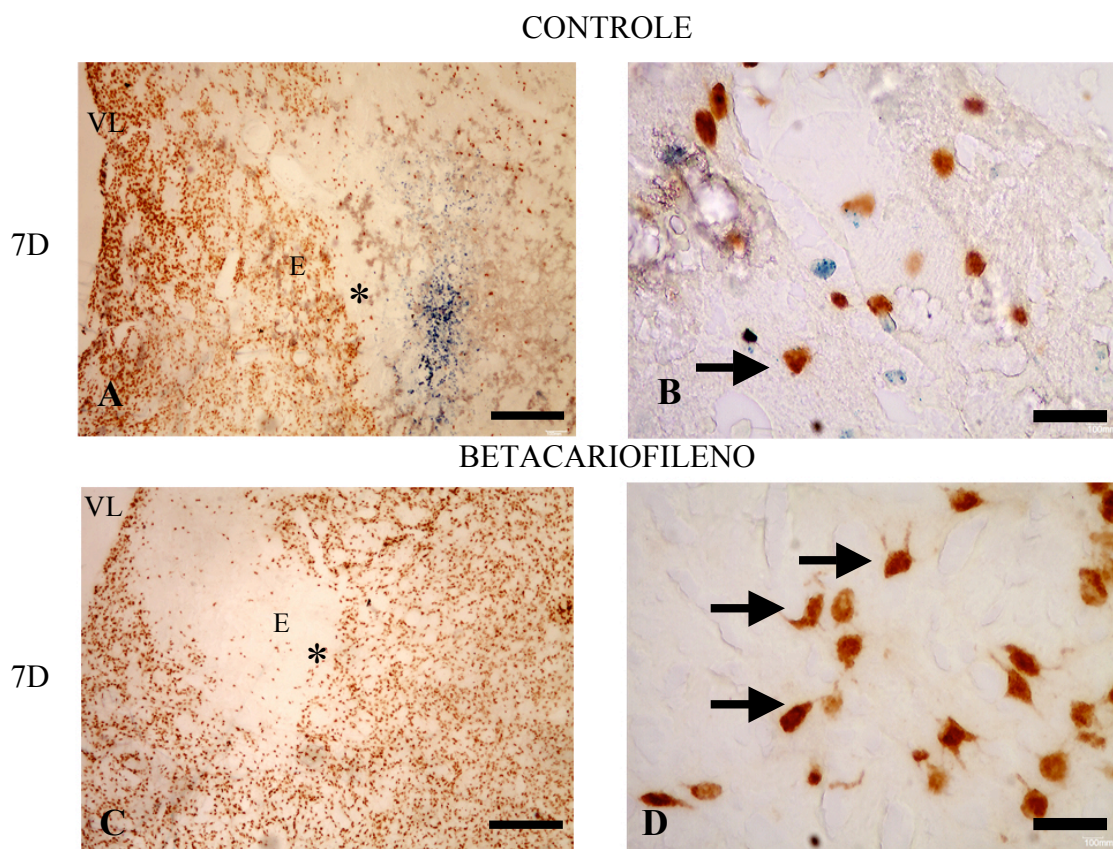


Figura 10: Perda de neurônio expressiva em animais controle 7 dias após- MCAO (A-B). Maior intensidade de marcação neuronal em animais tratados com betacarifileno 7 dias após a lesão (C e D). Betacarifileno preservou maior número de neurônios em relação ao grupo controle, 7 dias após a lesão isquêmica. Animais controle, estriado ipsilateral (A-B) 7 dias após a MCAO. Animais tratados com betacarifileno 7 dias (C-D) após a indução isquêmica. As setas apontam para células NeuN+.* Centro de lesão (representa apenas o local escolhido para a magnificação na foto seguinte). VL (Ventrículo lateral). E (Estriado) Escala: 400 um (A, C); 40um (B, D)

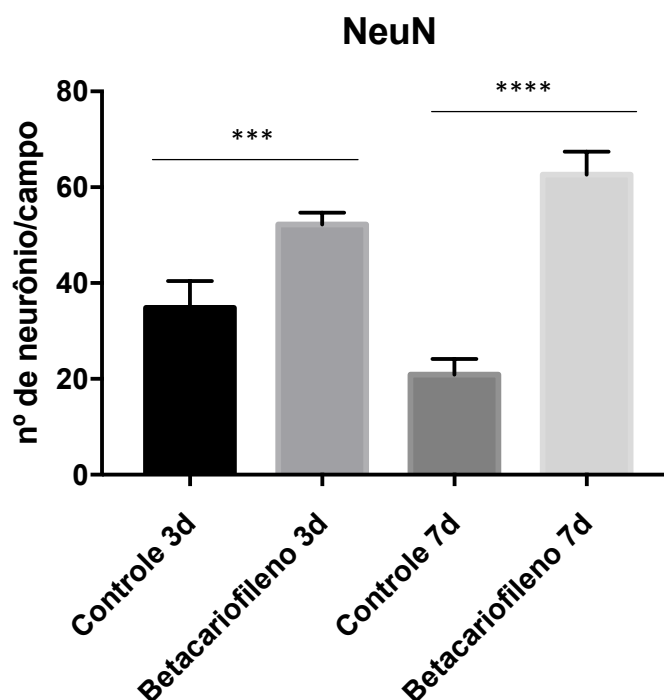


Figura 11: Quantificação de células NeuN+ no centro e penumbra isquêmica do estriado de animais tratados e animais controle. Betacariofileno preservou maior número de neurônios em relação ao grupo controle, 3 e 7 dias após MCAO. Redução no número de células em animais controle de 3 a 7 dias. *** $P=0,0003$ e **** $P<0,0001$.

3.4 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO DIMINUI A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MCAO

A fim de validar o efeito anti-inflamatório do betacariofileno fez-se análise qualitativa das células ED1+. Verificamos, portanto, que após a MCAO, pode-se evidenciar qualitativamente a presença de intensa ativação microglial/macrofágica, no centro da lesão (Figura 12A, C), demonstrando a resposta inflamatória em decorrência da isquemia. Porém, o que se percebe é que o sesquiterpeno utilizado, betacariofileno,

mostrou-se aparente inibidor da ativação microglial/macrofágica quando comparado ao grupo controle (Figura 12B, D).

As células microgliais/macrofágicas ativadas apresentaram-se arredondadas no centro isquêmico, representado o estágio máximo de ativação morfológica microglial, no entanto, percebe-se a presença de padrões amebóides/ramificados em animais tratados com betacariofileno.

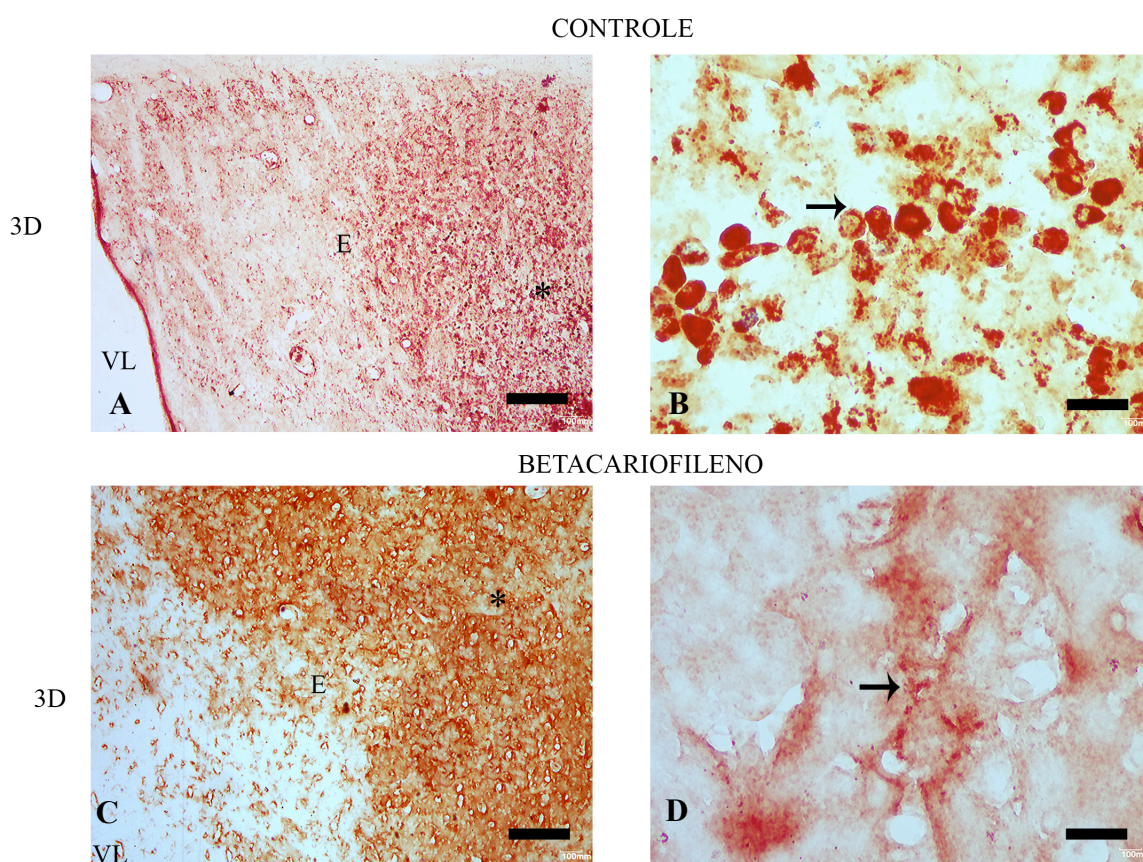


Figura 12: Ativação microglial/macrofágica após indução da isquemia no centro isquêmico (A,C). Provável redução aparente no número de células microgliais/macrofágicas ativadas após tratamento com betacariofileno em comparação com grupos controle, tratados apenas com veículo (B, D). Os dados qualitativos revelaram a possível redução de células estriatais ED1+, em animais tratados com betacariofileno de 3 dias de sobrevivência após MCAO. As setas apontam para as células ED1+ e seu padrão morfológico de micróglia/macrófago arredondado, típicos de ativação (B) no

controle ou com provável inibição em padrão ramificado (D) nos animais tratados. * Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado). Escala: 400 um (A, C); 40um (B, D).

3.5 MICROINJEÇÕES DE ET-1 INDUZEM ASTROGLIOSE E BETACARIOFILENO REDUZ A INDUÇÃO DA REATIVIDADE ASTROCITÁRIA APÓS MCAO

A reatividade astrocitária foi analisada pela imunistoquímica para GFAP, um marcador clássico de astrócitos (GOMES-LEAL *et al.*, 2004). Nos estriados isquêmicos, houve um aumento da astrogliose comparados ao hemisfério contralateral não isquêmico, apresentando células com aumento do volume de corpo celular, encurtamento dos ramos e hipertrofia concomitante da sua espessura a partir de 3 dias após a indução isquêmica (Figura 13 e 14). A astrogliose aparentemente mostrou-se maior nos animais controle perfundidos 3 dias após a lesão do que nos animais tratados com betacariofileno no mesmo tempo de sobrevivência (Figura 13), entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0,06$) (Figura 15). No tempo de sobrevivência de 7 dias após a lesão, observou-se reduzido número de astrócitos no estriado do animal tratado com betacariofileno (média de $\pm 16,5$) em comparação com os animais controle (Figura 15) (média de $\pm 31,9$) com significância estatística ($P < 0,0001$).

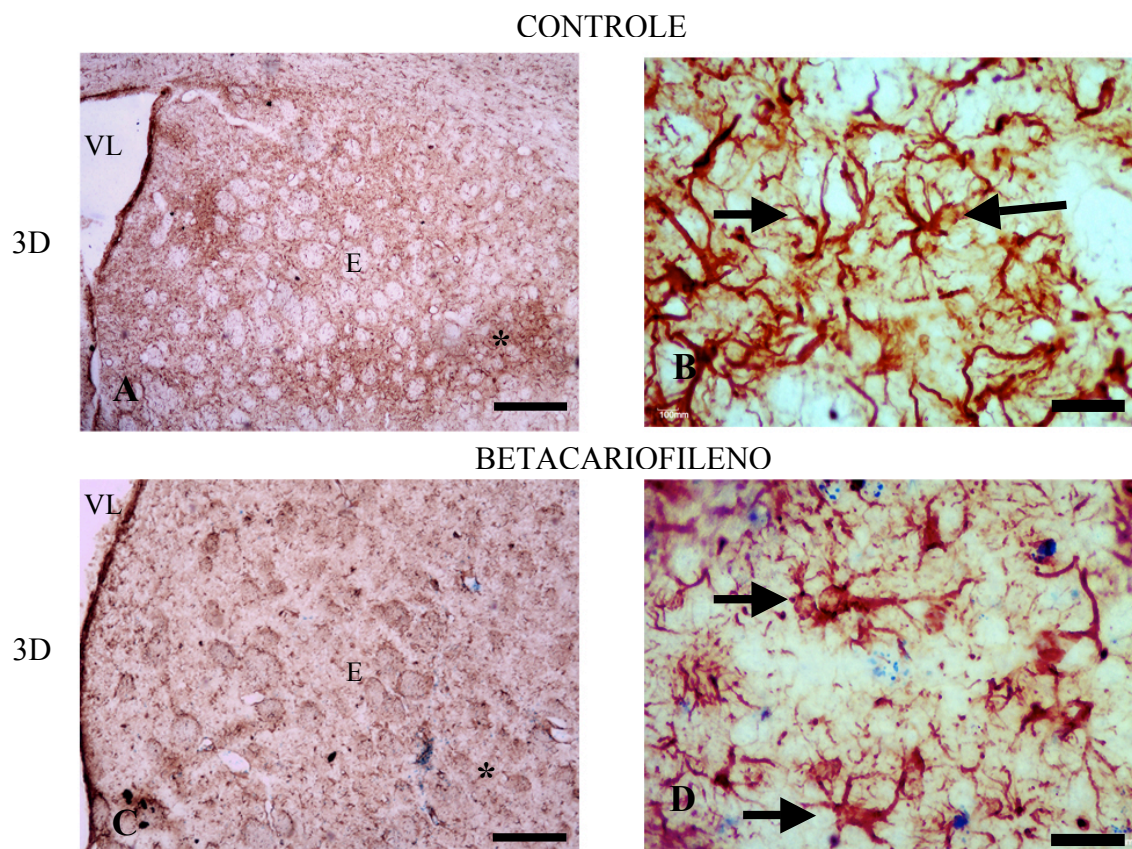


Figura 13: Reatividade astrocitária pós-MCAO. Aumento da astrogliose em animais isquêmicos com e sem tratamento com betacariofileno, apresentando células com aumento do volume de corpo celular, encurtamento dos ramos e hipertrofia concomitante da sua espessura a partir de 3 dias após a indução isquêmica (A,C). Os dados qualitativos revelaram a possível redução de células estriatais GFAP+ em animais tratados com betacariofileno em comparação ao controle (B e D), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. As setas apontam para as células GFAP+ e seu padrão morfológico de astrócito tipicamente reativo (B) no controle ou nos animais tratados (D). * Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado). Escala: 400 um (A, C); 40um (B, D).

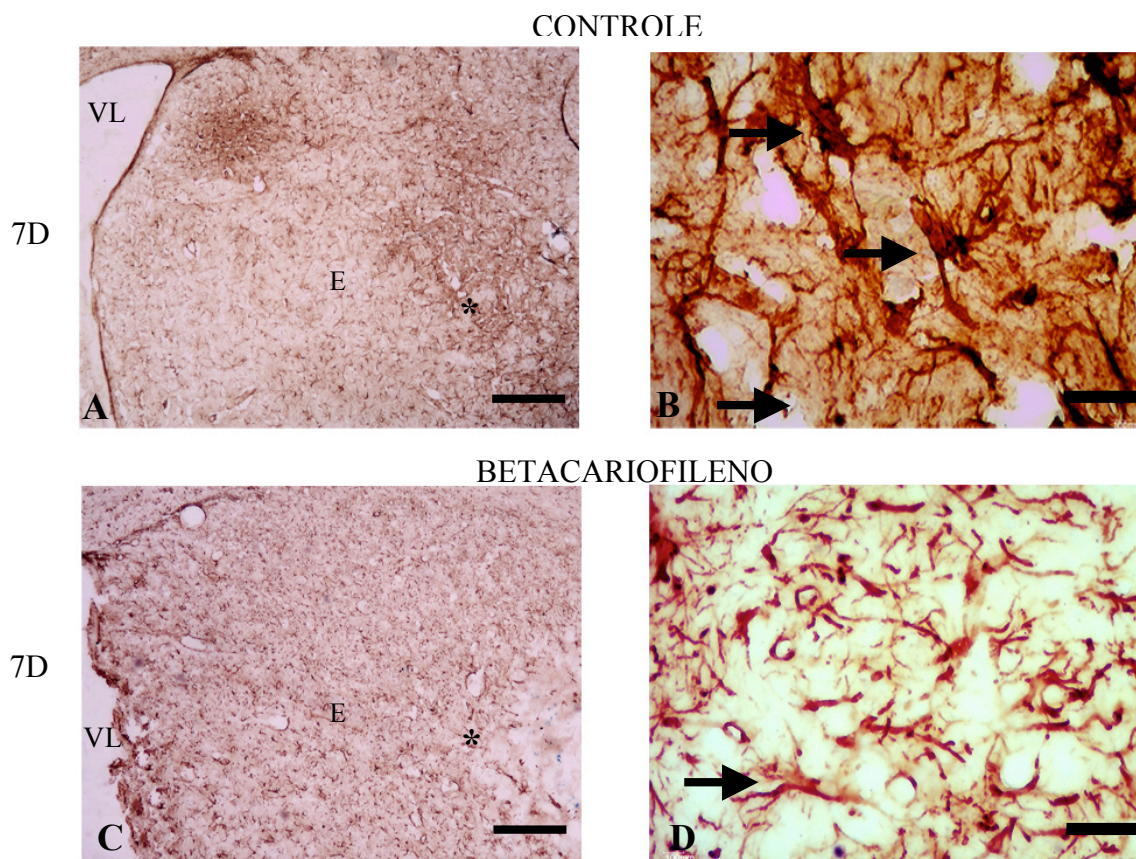


Figura 14: Betacarifileno reduz a indução da reatividade astrocitária 7 dias pós-MCAO. Tratamento com betacarifileno em comparação com grupo controle (B, D). Os dados qualitativos revelaram redução das células estriatais reativas GFAP+, em animais tratados com betacarifileno de 7 dias de sobrevida após MCAO. As setas apontam para as células GFAP+ e seu padrão morfológico de astrócito reativo (B) no controle ou com provável inibição em padrão pouco ramificado e reduzido (D) nos animais tratados. * Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado). Escala: 400 um (A, C); 40um (B, D).

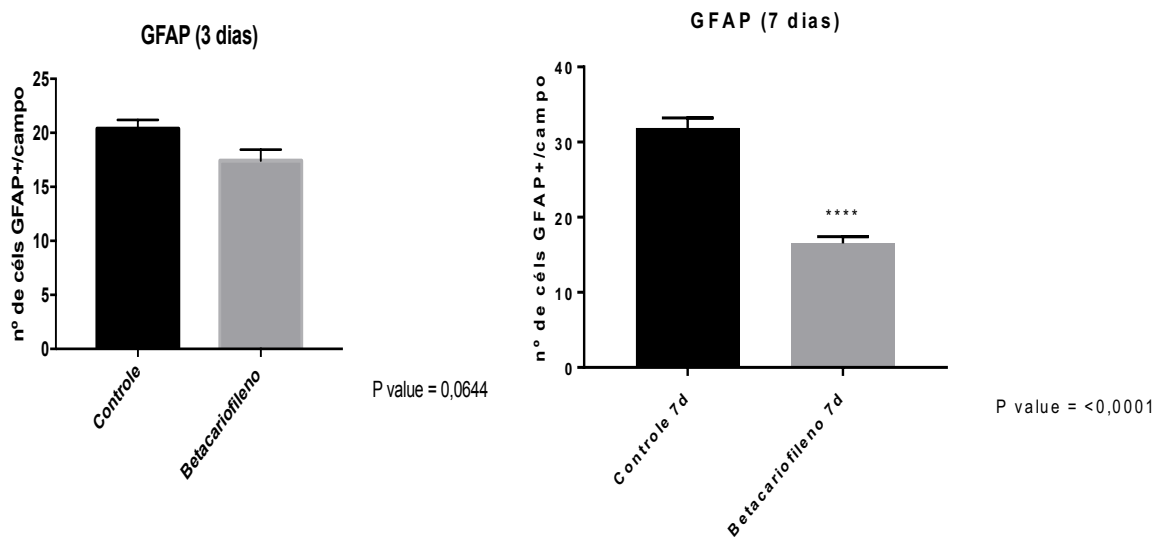


Figura 15: Quantificação de células GFAP+ no centro e penumbra isquêmica do estriado de animais tratados e animais controle. Betacariorfileno reduziu significativamente o número de astrócitos em relação ao grupo controle 7 dias após MCAO. Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos de sobrevivência 3 dias após a lesão. Redução no número de células em animais tratados com betacariorfileno 7 dias após MCAO. ****P<0,0001.

4 DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesta tese, induziu-se MCAO por microinjeções de ET-1 em uma região ventral do estriado, próximo a um ramo da artéria cerebral média localizado no córtex piriforme (MOYANOVA *et al.*, 2007). Após MCAO, houve intensa ativação microglial em 3 dias, aumento de reatividade astrocitária e perda neuronal entre 3 e 7 dias. O tratamento com betacariofileno diminuiu a ativação microglial e astrocitária e induziu preservação de corpos neuronais nos tempos de sobrevida investigados.

Diversas evidências indicam o envolvimento da cascata inflamatória na patogênese da lesão isquêmica cerebral. A reação inflamatória, acionada pela isquemia no sistema nervoso central, caracteriza-se pelo influxo de leucócitos, incluindo polimorfonucleares seguidos pelos monócitos, e pela ativação de micróglia e astrócitos. Para tanto, é necessário a expressão de moléculas de adesão específicas, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias. As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos e, no SNC, são produzidas e secretadas pela microglia e pelos astrócitos (CHANG *et al.*, 2013, LOPES *et al.*, 2016).

O modelo de MCAO é o que melhor simula a doença humana, considerando a alta incidência de obstrução desta artéria em pacientes (LOPES *et al.*, 2016, ENGEL *et al.*, 2011; HENSHALL *et al.*, 1999). A utilização da ET-1 como indutor da lesão isquêmica é tecnicamente mais simples que o modelo com utilização de microfilamento, que necessita de um complexo processo cirúrgico (SHARKEY e BUTCHER, 1995; WINDLE *et al.*, 2006; MOYANOVA *et al.*, 2007), tornando-se, por tudo isso, um modelo facilmente

reprodutível, o que possibilita melhor entendimento da fisiopatologia dos AVEs isquêmicos (SHARKEY e BUTCHER, 1995; WINDLE *et al.*, 2006; MOYANOVA *et al.*, 2007).

Dentre diversas estratégias terapêuticas avaliadas para o tratamento de AVEs isquêmicos, os fitoterápicos estão bastante presentes. Neste trabalho investigamos o efeito neuroprotetor e anti-inflamatório do betacariofileno, composto que faz parte da dieta de muitas pessoas através da ingestão de especiarias, como pimenta do reino, canela e copaíba (FERREIRA, 2014).

Betacariofileno (*trans*-4,11,11-trimethyl-8-methylenebicyclo[7,2,0]undec-4-ene), encontrado em várias plantas, é um sesquiterpeno de baixa toxicidade (CHANG *et al.*, 2013). Este é o principal componente do óleo-resina de copaíba, extraído do tronco de várias espécies de árvores do gênero *Copaifera* da família *Leguminosae*. As propriedades farmacológicas deste óleo incluem: ação diurética, laxante, antitética, antisséptica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitumoral (GUIMARÃES *et al.*, 2012, FERREIRA, 2014, ANDRADE-SILVA *et al.*, 2016, LOU *et al.*, 2016). O composto betacariofileno isolado tem sido associado à atividade anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica (OJHA *et al.*, 2016).

O betacariofileno possui característica lipofílica, o que facilita a sua entrada nas células. Vários constituintes de óleos essenciais possuem diferentes atividades biológicas no SNC, o que sugere que sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (YAMAGUCHI e GARCIA, 2012). O betacariofileno é um fitocanabinóide, que atua seletivamente sobre o receptor canabinóide-2 (CB2), e seu efeito analgésico na dor neuropática foi demonstrado em camundongos (KLAUKE *et al.*, 2014).

4.2 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO INDUZ NEUROPROTEÇÃO EM TEMPOS AGUDOS APÓS MCAO

O tratamento com betacariofileno induziu neuroproteção nos primeiros dias após MCAO, tal como foi constatado recentemente por LOU *et al.* (2016), utilizando modelo experimental de isquemia cerebral focal, demonstraram que o pré-tratamento betacariofileno promove um papel neuroprotetor 24 horas após lesão, justificando o efeito protetor neural à propriedade anti-oxidante do sesquiterpeno, que provavelmente estaria associada à prevenção de AVEs isquêmicos.

Um estudo associando o tratamento com betacariofileno aplicado a modelos experimentais de doenças neurodegenerativas demonstrou a atividade neuroprotetora deste sesquiterpeno contra as neurotoxinas MPP+, AB42 e 3-NP, que induzem *in vitro* mecanismos moleculares similares aos observados *in vivo* nas doenças de Parkinson, Alzheimer e Huntington, respectivamente (FERREIRA, 2014).

Trabalhos em nosso laboratório constataram que alguns fármacos que atuam como anti-inflamatórios, como a minociclina induz neuroproteção em diversos modelos experimentais de desordens neurais, incluindo AVE (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010; SILVA, 2011), lesão aguda da medula espinhal (STIRLING *et al.*, 2004; CORDEIRO DE SOUZA, 2011) e epilepsia (YANG *et al.*, 2010; FERREIRA, 2011). Outros inibidores microgliais, como o PJ34, induzem proteção neuronal após isquemia hipocampal (HAMBY *et al.*, 2007), reduzindo a perda neuronal no hipocampo em até 84%, em um modelo de isquemia global.

O estudo publicado em 2013 por CHANG *et al.*, demonstrou que apenas uma simples injeção intraperitoneal de betacariofileno (10mg/kg) reduziu significativamente o

volume de infarto cortical em 67% imediatamente após MCAO em ratos. Verificaram ainda que os déficits neurológicos causados pela MCAO foram também reduzidos significativamente pelo uso de betacariofileno. Neste mesmo estudo, comprovaram que o betacariofileno é capaz de inibir a expressão de óxido nítrico sintetase, interleucina (IL)-1 β , IL-6 e ciclooxigenase 2 na célula microglial, reduzindo também o nível de óxido nítrico e prostaglandina E₂.

Todos esses achados sugerem que o betacariofileno possui uma atividade neuroprotetora potente e essa neuroproteção pode ser parcialmente explicada pela modulação de mediadores e células inflamatórias.

4.3 O TRATAMENTO COM BETACARIOFILENO É UM MÉTODO EFICAZ PARA INIBIR A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA

Neste estudo, o betacariofileno diminuiu qualitativamente o número de células ED1+ no estriado isquêmico 3 dias após a indução de lesão isquêmica. No entanto, neste estudo, não foi realizada análise quantitativa da diminuição do número total de células microgliais, avaliado pela imunistoquímica para CD11b, um marcador geral de micróglia. Neste trabalho, utilizando a imunistoquímica para o anticorpo anti-ED1, observamos que o betacariofileno diminuiu a ativação microglial qualitativamente, o que alcança o resultado esperado quanto à validação do efeito antiinflamatório do betacariofileno.

Estudos prévios de nosso grupo e de outros autores mostraram que outros anti-inflamatórios e/ou antibióticos, principalmente a indometacina e a minociclina, diminuem a ativação microglial em várias doenças do SNC, incluindo AVE (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010; SILVA,

2011, LOPES *et al.*, 2016), lesão aguda da medula espinhal (STIRLING *et al.*, 2004; CORDEIRO DE SOUZA, 2011) e epilepsia (YANG *et al.*, 2010; MAGNO, 2011). Os mecanismos pelos quais a indometacina e a minociclina inibem as células microgлияis não são totalmente estabelecidos, tal como a utilização do betacariofileno. Sabe-se que anti-inflamatórios inibem enzimas pró-inflamatórias, incluindo as cicloxigenases (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; HOEHN *et al.*, 2005).

Recentemente, um projeto desenvolvido em nosso laboratório por GUIMARÃES *et al.* (2012) investigou os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores do óleo de copaíba na lesão aguda induzida por NMDA no córtex motor de ratos adultos. Os autores observaram que o tratamento com o óleo de copaíba, cujo principal componente é o betacariofileno, reduziu o recrutamento dos neutrófilos e a ativação microglial no local da lesão, o que corrobora com os dados qualitativos encontrados nesta tese ao avaliar o efeito inibitório de macrófagos/microglia 3 dias após MCAO.

Os mecanismos pelos quais o óleo de copaíba exerce seus efeitos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas os estudos sugerem que a atenuação do recrutamento de neutrófilos e a inibição de macrófagos ocorra por mecanismo envolvendo o receptor canabinóide do tipo 2 (GUIMARÃES *et al.*, 2012). Há evidências do efeito anti-inflamatório resultante da ativação do receptor canabinóide 2 (CB2) em modelos de doenças inflamatórias clinicamente relevantes (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2016, OJHA *et al.*, 2016). A ativação do receptor CB2 parece exercer efeitos benéficos em doenças associadas à inflamação, estresse oxidativo e morte celular, pois evita ou diminui a ativação da microglia. Em um modelo animal de doença de Alzheimer a ativação da microglia foi completamente inibida pela administração de um agonista seletivo do receptor canabinóide CB2 (RAMIREZ *et al.*, 2005). A presença de receptores CB2 na microglia no cérebro de

paciente portador de Alzheimer sugere que o CB2 pode proporcionar um novo alvo para uma variedade de neuropatias (ASHTON E GLASS, 2007). Desta forma, compostos agonistas seletivos do receptor CB2, como é o caso do betacariofileno, contituem alternativas interessantes de tratamento nos processos neurodegenerativos, tal como eventos pós-isquêmicos associados ao AVE.

4.4 BETACARIOFILENO INIBE A ASTROCITOSE INDUZIDA APÓS MCAO

Assim como a microglia, a atividade astrocitária parece ser inicialmente lesiva e tardiamente protetora. É evidente, portanto, que o conhecimento da dinâmica da resposta dos astrócitos às lesões nervosas é essencial para o estudo da neuropatologia e para a avaliação dos danos neurais.

Nesta investigação foi encontrado aumento progressivo da reação astrocitária (astrocitose) após lesão isquêmica a partir do 3º dia pós-isquemia, sendo encontrado ao 7º dia astrócitos com padrões reativos, hipertróficos.

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

Os astrócitos também podem inibir a regeneração através da participação na formação da cicatriz glial. Por outro lado, os astrócitos são importantes liberadores de agentes antioxidantes de defesa e na secreção de fatores de crescimento, o que

provavelmente fornece neuroproteção em fase aguda, bem como a promoção neurogênese e regeneração na fase crônica após a lesão (ANDERSON et al. 2010).

Após isquemia focal permanente, os sinais de morte astrocitária foram relatados antes dos neurônios apresentarem sinais de danos irreversíveis (GRACIA et al. 1993; LIU et al. 1999). Os resultados recentes demonstram que o metabolismo intermediário, tanto neuronal quanto astrocitário, são alterados de maneira semelhantemente em 30 minutos após isquemia focal (HABERG et al. 2001).

Em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, não utilizamos parâmetros quantitativos que permitissem detectar uma diminuição da população de astrócitos (SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008), entretanto a análise qualitativa sugeriu um aumento de reatividade da imunistoquímica para GFAP, além de características morfométricas que revelam um corpo celular maior e exibem processos mais espessos e longos. O que corrobora com os resultados obtidos pelo presente projeto de tese, cujo modelo experimental induziu aumento quantitativo do número de astrócitos reativos em animais isquêmicos sem tratamento e observou-se o efeito do betacariofileno com fator antiinflamatório associado à redução da astrocitose.

OJHA *et al.* (2016) estudaram o efeito do betacariofileno sobre a indução de ativação de células gliais no estriado de ratos, em modelo experimental de doença de Parkinson e constataram que o tratamento com betacariofileno diminuiu significativamente o número de astrócitos e micróglia ativados quando comparado com animais tratados apenas com veículo. Tal resultado comprova que o efeito inibidor astrocítico constatado nesta tese está de acordo com o encontrado na literatura atual.

Após lesão, essas células gliais podem liberar seu conteúdo de glutamato contribuindo para a exacerbação do dano primário (GOMES-LEAL *et al.* 2004). A ativação astrocitária descrita aqui (de 3 até 7 dias) permite uma visão divergente a relatada em outros estudos que prever a astrocitose como uma reação benéfica à uma lesão tecidual (LI *et al.* 2005), embora astrocitose excessiva e a sua cicatriz glial venham a prejudicar a regeneração axonal em fases crônicas após desordens agudas (GALTREY e FAWCETT, 2007), além do mais, perceptivelmente, a redução do número de astrócitos reativos pode estar correlacionada ao maior efeito neuroprotetor do betacariofileno.

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

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

Nesta tese pode-se constatar que a reatividade astrocitária é perceptivelmente inibida pelo betacariofileno 7 dias após MCAO. Acredita-se que, embora tenha sido observado apenas aparente e não significativa diferença estatística quanto ao número de astrócitos entre animais tratados com betacariofileno no tempo de 3 dias, isto reflete o que a literatura já relata sobre o pico de atividade astrocitária após lesões e esse efeito não parece ser em consequência de uma disfunção astrocitária, visto que há um aumento de

GFAP desde 4 até 21 dias pós-isquemia (BRUHN *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2005; TORP *et al.*, 1995).

É necessário estudo mais aprofundado para que se possa correlacionar com exatidão a redução da reatividade astrocitária ao tratamento neuroprotetor com betacariofileno.

5. CONCLUSÃO

- O tratamento com betacariofileno possivelmente induz neuroproteção 3 e 7 dias após MCAO;
- O tratamento com betacariofileno inibide a atividade microglial nos primeiros 3 dias após MCAO induzida por microinjeções de ET-1;
- O tratamento com betacariofileno é um eficaz inibidor da astrogliose nos primeiros dias após MCAO induzida por microinjeções de ET-1;
- Os efeitos neuroprotetores do betacariofileno são uma abordagem promissora que pode contribuir para a recuperação funcional após AVE experimental e em humanos.

REFERÊNCIAS

ABDIPRANOTO, A; WU, S., STAYTE, S. e VISSSEL B., **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets** v. 7,n.2, p. 187-210, 2008.

ALVAREZ-BUYLLA, A. e GARCÍA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 629-634, 2002.

AMERICAN HEART ASSOCIATION: Heart Disease and Stroke Statistics – 2011 Update. Dallas, Texas: **American Heart Association**; 2014.

AMERICAN HEART ASSOCIATION: Heart Disease and Stroke Statistics – 2011 Update. Dallas, Texas: **American Heart Association**; 2011.

ANDRADE-SILVA M, CORREA LB, CANDÉA AL, CAVALHER-MACHADO SC, BARBOSA HS, ROSAS EC, HENRIQUES MG. The cannabinoid 2 receptor agonist b-caryophyllene modulates the inflammatory reaction induced by *Mycobacterium bovis* BCG by inhibiting neutrophil migration. **Inflamm Res**. 2016

ANSARI, S.; AZARI, H.; MCCONNELL, D. J.; AFZAL, A. e MOCCO, J. Intraluminal Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) Model for Ischemic Stroke with Laser Doppler Flowmetry Guidance in Mice. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. n. 51, p. 2879, 2011.

ARSENE D, VASILESCU F, TOADER C, BALAN A, POPA C, ARDELEANU C. Clinico-pathological correlations in fatal ischemic stroke. An immunohistochemical study of human brain penumbra. **Rom J Morphol Embryol**, v. 52:29–38. 2011.

ARUMUGAM, T.V.; GRANGER, D.N. & MATTSON, M.P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Medicine**, v.7, n.3, p.229-242. 2005.

ARUNDINE, M. e TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 6, p. 657-668, 2004.

ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. **Neurotoxicology**, v.19, n.2, p.269-281, Apr. 1998.

ASHTON JC, GLASS M. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. **Current neuropharmacology**.;5(2):73-80.

BACIGALUPPI, M.; COMI, G. e HERMANN, D. M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. **The Open Neurology Journal**, v. 4, n. p. 34-38, 2010.

BAL-PRICE, A. & BROWN, G.C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v.21, n.17, p.6480-6491, Sep 1. 2001.

BANATI, R.B.; GEHRMANN, J.; SCHUBERT, P. & KREUTZBERG, G.W. Cytotoxicity of microglia. **Glia**, v.7, n.1, p.111-118, Jan. 1993.

BANKS, W. A. Mouse Models of Neurological Disorders: A View From the Blood-brain Barrier. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1802, n. 10, p. 881-888, 2010.

BARKER, R.A. & WIDNER, H. Immune problems in central nervous system cell therapy. **NeuroRx**, v.1, n.4, p.472-481, Oct. 2004.

BARTON, M. Mechanisms and therapy of atherosclerosis and its clinical complications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 149-153, 2013.

BASTOS, G. N.; MORIYA, T.; INUI, F.; KATURA, T. e NAKAHATA, N. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 454-462, 2008.

BEMEUR, C.; STE-MARIE, L. & MONTGOMERY, J. Increased oxidative stress during hyperglycemic cerebral ischemia. **Neurochemistry International**, v.50, n.7-8, p.890-904, Jun. 2007.

BLOCK, M.L. & HONG, J.S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Progress in Neurobiology**, v.76, n.2, p.77-98, Jun. 2005. _____. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. **Biochemical Society Transactions**, v.35, n.Pt 5, p.1127-1132, Nov. 2007.

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

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.

BOULANGER, L.M. & SHATZ, C.J. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v.5, n.7, p.521-531, Jul. 2004.

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.

BROWN, D.L.; BODEN-ALBALA, B.; LANGA, K.M.; LISABETH, L.D.; FAIR, M.; SMITH, M.A.; SACCO, R.L. & MORGENSTERN, L.B. Projected costs of ischemic stroke in the United States. **Neurology**, v.67, n.8, p.1390-1395, Oct 24. 2006. 72

BROWN, R. C. e DAVIS, T. P. Calcium Modulation of Adherens and Tight Junction Function: A Potential Mechanism for Blood-Brain Barrier Disruption After Stroke. **Stroke**, v. 33, n. 6, p. 1706-1711, 2002.

BRUCE-KELLER, A. J.; KELLER, J. N. e MORRISON, C. D. Obesity and Vulnerability of the CNS. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 5, p. 395-400, 2009.

BUFFO, A; ROLANDO, C; CERUTI, S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. **Biochemical Pharmacology** 2010; 79: 77-89;

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.

CAMERON HA, MCKAY RD Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. **J Comp Neurol** 435:406–417, 2001.

CANDELARIO-JALIL, E. A role for cyclooxygenase-1 in β -amyloid-induced neuroinflammation. **Aging**, v. 1, n. 4, p. 350-353, 2009.

CARDOSO, M.M. et al. Bloqueio microglial e transplante endovenoso de células da Fração de Células Tronco da Medula Óssea em Ratos Submetidos à Isquemia Focal do Córtex Motor.

CARDOSO, M.M. et al. Bloqueio microglial e transplante endovenoso de células da Fração de Células Tronco da Medula Óssea em Ratos Submetidos à Isquemia Focal do Córtex Motor. Dissertação de Mestrado (UFPA), 2010.

CARPENTER, C. R.; KEIM, S. M.; MILNE, W. K.; MEURER, W. J.; BARSAN, W. G. e the best evidence in emergency medicine investigator, g. Thrombolytic therapy for acute ischemic stroke beyond three hours. **The Journal of emergency medicine**, v. 40, n. 1, p. 82-92, 2011.

CEULEMANS, A.-G.; ZGAVC, T.; KOOIJMAN, R.; HACHIMI-IDRISSI, S.; SARRE, S. e MICHOTTE, Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. p. 74-74, 2010.

CHANG, H.-J.; KIM, J.-M.; LEE, J.-C.; KIM, W.-K. e CHUN, H. S. Protective Effect of β -Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene, Against Cerebral Ischemic Injury. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 6, p. 471-480, 2013.

CHAVARRIA, A. & ALCOCER-VARELA, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? **Autoimmunity Reviews**, v.3, n.4, p.251-260, Jun. 2004.

CHEN, Y.-J.; WALLACE, B. K.; YUEN, N.; JENKINS, D. P.; WULFF, H. e O'DONNELL, M. E. Blood-Brain Barrier KCa3.1 Channels: Evidence for a Role in Brain Na Uptake and Edema in Ischemic Stroke. **Stroke**, v. n. p. 2014.

CHOI, D. W.; MAULUCCIGEDDE, M. e KRIEGSTEIN, A. R. GLUTAMATE NEUROTOXICITY IN CORTICAL CELL-CULTURE. **Journal of Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 357-368, 1987.

CHOU, W.H.; CHOI, D.S.; ZHANG, H.; MU, D.; MCMAHON, T.; KHARAZIA, V.N.; LOWELL, C.A.; FERRIERO, D.M. & MESSING, R.O. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.1, p.49-56, Jul. 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.

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.

CORDEIRO DE SOUZA, C. et al. Tratamento Com Minociclina E Células Mononucleares Da Medula Óssea Após Transecção Completa Da Medula Espinhal De Ratos Adultos. Dissertação de Mestrado (UFPA), 2011.

COTA, A.M. & MIDWINTER, M.J. The immune system. **Anaesthesia And Intensive Care Medicine**, v.10:5, n.Physiology, p.215-217. 2009. 73

CURTIS, D. R.; PHILLIS, J. W. e WATKINS, J. C. Chemical Excitation of Spinal Neurones. **Nature**, v. 183, n. 4661, p. 611-612, 1959.

DAVALOS, D.; GRUTZENDLER, J.; YANG, G.; KIM, J.V.; ZUO, Y.; JUNG, S.; LITTMAN, D.R.; DUSTIN, M.L. & GAN, W.B. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nature Neuroscience**, v.8, n.6, p.752-758, Jun. 2005.

DE OLIVEIRA, J. L.; CRISPIN, P.; DUARTE, E. C.; MARLOCH, G. D.; GARGIONI, R.; TRENTIN, A. G. e ALVAREZ-SILVA, M. Histopathology of motor cortex in an experimental focal ischemic stroke in mouse model. **J Chem Neuroanat**, v. 57-58, n. p. 1-9, 2014.

DEL ZOPPO, G. J. e HALLENBECK, J. M. Advances in the Vascular Pathophysiology of Ischemic Stroke. **Thrombosis Research**, v. 98, n. 3, p. 73-81, 2000.

DIJKSTRA, C. D.; DÖPP, E. A.; JOLING, P. e KRAAL, G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. **Immunology**, v. 54, n. 3, p. 589-599, 1985.

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

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M. e ALVAREZ-BUYLLA, A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11619-11624, 1999.

DOLL, D. N.; BARR, T. L. e SIMPKINS, J. W. Cytokines: Their Role in Stroke and Potential Use as Biomarkers and Therapeutic Targets. **Aging and Disease**, v. 5, n. 5, p. 294-306, 2014.

DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-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, p.130-144, Oct 3. 2007.

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

DREW, P. D. e CHAVIS, J. A. Female sex steroids: effects upon microglial cell activation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 111, n. 1-2, p. 77-85, 2000.

EKDAHL, C.T.; CLAASEN, J.H.; BONDE, S.; KOKAIA, Z. & LINDVALL, O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.23, p.13632-13637, Nov 11. 2003.

ELIASSON, M.J.; HUANG, Z.; FERRANTE, R.J.; SASAMATA, M.; MOLLIVER, M.E.; SNYDER, S.H. & MOSKOWITZ, M.A. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. **The Journal of Neuroscience**, v.19, n.14, p.5910-5918, Jul 15. 1999.

ELTZSCHIG, H. K. e ECKLE, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 10.1038/nm.2507, 2011.

ENDRES, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z.; NAKAMURA, T.; HUANG, P.; MOSKOWITZ, M. A. e LIAO, J. K. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8880-8885, 1998.

ENGEL, O.; KOLODZIEJ, S.; DIRNAGL, U. e PRINZ, V. Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. n. 47, p. 2423, 2011.

EPSTEIN, D.; MASON, A. & MANCA, A. The hospital costs of care for stroke in nine European countries. **Health Economics**, v.17, n.1 Suppl, p.S21-31, Jan. 2008.

FAHMY, GH; MOFTAH, MZ. FGF-2 in astroglial cells during vertebrate spinal cord recovery. **Frontiers in Cellular Neuroscience**.10.3389 / fncel. 2010.00129; 2010

FERREIRA, D. A. S. Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. **Tese de Doutorado**, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia. 2014.

FETLER, L. & AMIGORENA, S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. **Science**, v.309, n.5733, p.392-393, Jul 15. 2005.

FLYNN, R.W.; MACWALTER, R.S. & DONEY, A.S. The cost of cerebral ischaemia. **Neuropharmacology**, v.55, n.3, p.250-256, Sep. 2008.

GAGE, F. H. Mammalian Neural Stem Cells. **Science** v.25: **287** (5457), 1433-1438. 2000.

GAGE, F. H.; COATES, P. W.; PALMER, T. D.; KUHN, H. G.; FISHER, L. J.; SUHONEN, J. O.; PETERSON, D. A.; SUHR, S. T. e RAY, J. Survival and differentiation

of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 25, p. 11879-11883, 1995.

GALEA, I.; BECHMANN, I. & PERRY, V.H. What is immune privilege (not)? **Trends in Immunology**, v.28, n.1, p.12-18, Jan. 2007.

GARRISON, F. H. Ramón y Cajal. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 5, n. 6, p. 482-508, 1929.

GEHRMANN, J.; BANATI, R.B.; WIESSNER, C.; HOSSMANN, K.A. & KREUTZBERG, G.W. Reactive microglia in cerebral ischaemia: an early mediator of tissue damage? **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.21, n.4, p.277-289, Aug. 1995.

GELDERBLOM, M.; LEYPOLDT, F.; STEINBACH, K.; BEHRENS, D.; CHOE, C.-U.; SILER, D. A.; ARUMUGAM, T. V.; ORTHEY, E.; GERLOFF, C.; TOLOSA, E. e MAGNUS, T. Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. **Stroke**, v. 40, n. 5, p. 1849-1857, 2009.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M. e ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GIBSON, C. L. Cerebral ischemic stroke: is gender important? **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 33, n. 9, p. 1355-1361, 2013.

GIULIAN, D. & VACA, K. Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system. **Stroke**, v.24, n.12 Suppl, p.I84-90, Dec. 1993

GIULIAN, D.; HAVERKAMP, L.J.; LI, J.; KARSHIN, W.L.; YU, J.; TOM, D.; LI, X. & KIRKPATRICK, J.B. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. **Neurochemistry International**, v.27, n.1, p.119-137, Jul. 1995.

GIULIAN, D.; HAVERKAMP, L.J.; YU, J.H.; KARSHIN, W.; TOM, D.; LI, J.; KIRKPATRICK, J.; KUO, L.M. & ROHER, A.E. Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. **The Journal of Neuroscience**, v.16, n.19, p.6021-6037, Oct 1. 1996.

GIULIAN, D.; VACA, K. & NOONAN, C.A. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. **Science**, v.250, n.4987, p.1593-1596, Dec 14. 1990.

GOLDMAN, S. A. e NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 8, p. 2390-2394, 1983.

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

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

GOMES-LEAL, W.; SILVA, G.J.; OLIVEIRA, R.B. & PICANCO-DINIZ, C.W. Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. **Anatomy and Embryology (Berl)**, v.205, n.4, p.291-300, Jul. 2002.

GOULD, E.; REEVES, A. J.; FALLAH, M.; TANAPAT, P.; GROSS, C. G. e FUCHS, E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 9, p. 5263-5267, 1999.

GRAEBER, M.B.; STREIT, W.J. & KREUTZBERG, G.W. Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. **Journal of Neuroscience Research**, v.21, n.1, p.18-24, Sep. 1988.

GU, Y.; CHEN, J. e SHEN, J. Herbal Medicines for Ischemic Stroke: Combating Inflammation as Therapeutic Targets. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 9, n. 3, p. 313-339, 2014.

GUIMARAES-SANTOS A, SANTOS DS, SANTOS IR, LIMA RR, PEREIRA A, DE MOURA LS, et al. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evid- Based Compl Alt**. 2012.

GUIMARÃES-SANTOS, A.; SANTOS, D. S.; SANTOS, I. R.; LIMA, R. R.; PEREIRA, A.; DE MOURA, L. S.; CARVALHO, R. N.; LAMEIRA, O. e GOMES-LEAL, W. Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2012, n. p. 918174, 2012.

HAYAKAWA, K.; MISHIMA, K.; NOZAKO, M.; HAZEKAWA, M.; MISHIMA, S.; FUJIOKA, M.; ORITO, K.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K. & FUJIWARA, M. Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. **Stroke**, v.39, n.3, p.951-958, Mar. 2008.

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

HIROSE, K.; OKAJIMA, K.; TAOKA, Y.; UCHIBA, M.; TAGAMI, H.; NAKANO, K.; HOSSMANN, K.A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. **Cellular & Molecular Neurobiology**, v.26, n.7-8, p.1057-1083, Oct-Nov. 2006.

HOEHN, B. D.; PALMER, T. D. e STEINBERG, G. K. Neurogenesis in Rats After Focal Cerebral Ischemia is Enhanced by Indomethacin. **Stroke**, v. 36, n. 12, p. 2718-2724, 2005.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M. e TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology**, v. 66, n. 3, p. 232-245,

HYUN-JOO CHANG, JI-MYUNG KIM, JAE-CHUL LEE, WON-KI KIM, AND HYANG SOOK CHUN. Protective Effect of β -Caryophyllene, a Natural Bicyclic Sesquiterpene, Against Cerebral Ischemic Injury. **Journal of Medicinal Food**. Volume: 16 Issue16(6): 471-480. 2013

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

JAESCHKE, H. & SMITH, C.W. Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. **American Journal of Physiology**, v.273, n.6 Pt 1, p.G1169-1173, Dec. 1997.

JANDER, S.; SCHROETER, M.; D'URSO, D.; GILLEN, C.; WITTE, O.W. & STOLL, G. Focal ischaemia of the rat brain elicits an unusual inflammatory response: early appearance of CD8+ macrophages/microglia. **European Journal of Neuroscience**, v.10, n.2, p.680-688, Feb. 1998.

JIN, R.; LIU, L.; ZHANG, S.; NANDA, A. e LI, G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 6, n. 5, p. 10.1007/s12265-12013-19508-12266, 2013.

JOHNSON, A. B. e SOHRABJI, F. Estrogen's effects on central and circulating immune cells vary with reproductive age. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 10, p. 1365-1374, 2005.

KATO, H.; KOGURE, K.; LIU, X.H.; ARAKI, T. & ITOYAMA, Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leukocytes following focal cerebral ischemia in the rat. **Brain Research**, v.734, n.1-2, p.203-212, Sep 23. 1996.

KATZAN, I. L.; HAMMER, M. D.; HIXSON, E. D.; FURLAN, A. J.; ABOU-CHEBL, A. e NADZAM, D. M. Utilization of intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 3, p. 346-350, 2004.

KLAUKE AL, RACZ I, PRADIER B, MARKERT A, ZIMMER AM, GERTSCH J, ET AL. The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid beta-caryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**. 24(4):608-20. 2014.

KLUSKA, M. M.; WITTE, O. W.; BOLZ, J. e REDECKER, C. Neurogenesis in the adult dentate gyrus after cortical infarcts: Effects of infarct location, N-methyl-d-aspartate receptor blockade and anti-inflammatory treatment. **Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 723-735, 2005.

KNOTT, A.B.; PERKINS, G.; SCHWARZENBACHER, R. & BOSSY-WETZEL, E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, n.7, p.505-518, Jul. 2008. 77

KOEHN FE, CARTER GT, Rediscovering natural products as a source of new drugs. **Discov Med.** V. 5(26):159-64. 2005

KRIZ, J. & LALANCETTE-HEBERT, M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. **Acta Neuropathologica**, v.117, n.5, p.497-509, May. 2009.

LAI, A.Y. & TODD, K.G. Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.84, n.1, p.49-59, Jan. 2006.

LAI, S.; PANARESE, A.; SPALLETTI, C.; ALIA, C.; GHIONZOLI, A.; CALEO, M. e MICERA, S. Quantitative Kinematic Characterization of Reaching Impairments in Mice After a Stroke. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. n. p. 2014.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. e HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. p. 97-97, 2009.

LALANCETTE-HÉBERT, M.; GOWING, G.; SIMARD, A.; WENG, Y. C. e KRIZ, J. Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 10, p. 2596-2605, 2007.

LAMPL, Y.; BOAZ, M.; GILAD, R.; LORBERBOYM, M.; DABBY, R.; RAPOPORT, A.; ANCA-HERSHKOWITZ, M. & SADEH, M. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. **Neurology**, v.69, n.14, p.1404-1410, Oct 2. 2007.

LIMA, R.R.; GUIMARAES-SILVA, J.; OLIVEIRA, J.L.; COSTA, A.M.; SOUZA-RODRIGUES, R.D.; DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-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, Feb. 2008.

- LIMA, RAFAEL RODRIGUES. Ativação microglial, lesão da substância branca e expressão de Nogo-A em ratos submetidos à isquemia estriatal. 2012. 84 f. **Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém**, 2012. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v.79, n.4, p.1431-1568, Oct. 1999.
- LIU, B. e HONG, J.-S. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 1-7, 2003.
- LIU, F. e MCCULLOUGH, L. D. Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rodents: Methods and Potential Pitfalls. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. p. 464701, 2011.
- LIU, X.; YE, R.; YAN, T.; YU, S. P.; WEI, L.; XU, G.; FAN, X.; JIANG, Y.; STETLER, R. A.; LIU, G. e CHEN, J. Cell based therapies for ischemic stroke: From basic science to bedside. **Progress in neurobiology**, v. 115, n. p. 92-115, 2014.
- LIU, Y.; SHAW, S.K.; MA, S.; YANG, L.; LUSCINSKAS, F.W. & PARKOS, C.A. Regulation of leukocyte transmigration: cell surface interactions and signaling events. **The Journal of Immunology**, v.172, n.1, p.7-13, Jan 1. 2004.
- LO, E.H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nature Medicine**, v.14, n.5, p.497-500, May. 2008.
- LONGA, E. Z.; WEINSTEIN, P. R.; CARLSON, S. e CUMMINS, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **Stroke**, v. 20, n. 1, p. 84-91, 1989.

LOPES, R.T.S, et al. Neurogênese Endógena Induzida Por Acidente Vascular Encefálico Experimental Após Inibição Da Ativação Microglial/Macrofágica Com O Anti-Inflamatório Indometacina. Dissertação de Mestrado (UFPA), 2011.

LÓPEZ-REDONDO, F.; NAKAJIMA, K.; HONDA, S. e SHINICHI, K. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. **Molecular Brain Research**, v. 76, n. 2, p. 429-435, 2000.

LOTUFO, P. A e BENSENOR, I. J. M. Raça e mortalidade cerebrovascular no Brasil. **Rev. Saúde Pública** , vol.47, n.6, pp. 1201-1204. 2013

LOTUFO, P. A. e BENSEÑOR, I. M. Stroke mortality in Brazil: one example of delayed epidemiological cardiovascular transition. **International Journal of Stroke**, v. 4, n. 1, p. 40-41, 2009.

LOTUFO, P.A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v.123, n.1, p.3-4, Jan 2. 2005.

LOU, J., CAO, G., LI, R., LIU, J., DONG, Z., XU, L. β -Caryophyllene attenuates focal cerebral ischemia -reperfusion injury by Nrf2/HO-1 Pathway in Rats. **Neurochemical Research Epub ahead of in press**. 2016.

LUDEWIG, P.; SEDLACIK, J.; GELDERBLOM, M.; BERNREUTHER, C.; KORKUSUZ, Y.; WAGENER, C.; GERLOFF, C.; FIEHLER, J.; MAGNUS, T. e HORST, A. K. Carcinoembryonic Antigen–Related Cell Adhesion Molecule 1 Inhibits MMP-9–Mediated Blood–Brain–Barrier Breakdown in a Mouse Model for Ischemic Stroke. **Circulation Research**, v. 113, n. 8, p. 1013-1022, 2013.

LUSKIN MB,Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. **Neuron** 11:173–189. 1993.

MAHLER, M.P.; ZUGER, K.; KASPAR, K.; HAEFELI, A.; JENNI, W.; LENIGER, T. & BEER, J.H. A cost analysis of the first year after stroke - early triage and inpatient rehabilitation may reduce long term costs. **Swiss Medical Weekly**, v.138, n.31-32, p.459-465, Aug 9. 2008.

MANWANI, B. e MCCULLOUGH, L. D. Sexual dimorphism in ischemic stroke: lessons from the laboratory. **Women's health (London, England)**, v. 7, n. 3, p. 319-339, 2011.

MARTIN, H. G. S. e WANG, Y. T. Blocking the Deadly Effects of the NMDA Receptor in Stroke. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 174-176, 2010.

MATYSZAK, M.K. & PERRY, V.H. A comparison of leucocyte responses to heat-killed bacillus Calmette-Guerin in different CNS compartments. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.22, n.1, p.44-53, Feb. 1996.

MEHTA, S. L. e VEMUGANTI, R. Mechanisms of stroke induced neuronal death: multiple therapeutic opportunities. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 8, p. 438-446, 2014.

MEHTA, S. L.; MANHAS, N. e RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 1, p. 34-66, 2007.

MONJE, M.L.; TODA, H. & PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v.302, n.5651, p.1760-1765, Dec 5. 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 1. 1993.

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 1. 1993.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H. e IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-198, 2010.

MOSKOWITZ, M. A.; LO, E. H. e IADECOLA, C. The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. **Neuron**, v. 67, n. 2, p. 181-198, 2010.

MOYANOVA, S.G.; KORTENSKA, L.V.; MITREVA, R.G.; PASHOVA, V.D.; NGOMBA, R.T. & NICOLETTI, F. Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. **Brain Research**, v.1153, p.58-67, Jun 11. 2007.

MUKHERJEE, A. e SWARNAKAR, S. Implication of matrix metalloproteinases in regulating neuronal disorder. **Molecular Biology Reports**, v. n. p. 1-11, 2014.

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. e SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development**, v. 116, n. 1, p. 201-211, 1992.

NEUMANN, H.; KOTTER, M.R. & FRANKLIN, R.J. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. **Brain**, v.132, n.Pt 2, p.288-295, Feb. 2009.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v.308, n.5726, p.1314-1318, May 27. 2005.

OHIRA, K. Injury-induced neurogenesis in the mammalian forebrain. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1645-1656, 2011.

PEREIRA ABCNG, ALVARENGA H, PEREIRA JÚNIOR RS, BARBOSA MTS. Prevalência de acidente vascular cerebral em idosos no Município de Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil, através do rastreamento de dados do Programa Saúde da Família. **Cad Saúde Pública**, v. 25(9): 1929-36. 2009.

PERRY, V.H. & GORDON, S. Modulation of CD4 antigen on macrophages and microglia in rat brain. **The Journal of Experimental Medicine**, v.166, n.4, p.1138-1143, Oct 1. 1987.

PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

PIVOVAROVA, N. B. e ANDREWS, S. B. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. **The FEBS journal**, v. 277, n. 18, p. 3622-3636, 2010.

POLAZZI, E. e MONTI, B. Microglia and neuroprotection: From in vitro studies to therapeutic applications. **Progress in Neurobiology**, 92, 293–315. 2010.

POPOVICH, P.G.; WEI, P. & STOKES, B.T. Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v.377, n.3, p.443-464, Jan 20. 1997.

QUAN, Z. H. E.; QUAN, Y.; WEI, B. O.; FANG, D.; YU, W.; JIA, H. A. O.; QUAN, W. E. I.; LIU, Y. e WANG, Q. Protein-protein interaction network and mechanism analysis in ischemic stroke. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 1, p. 29-36, 2014.

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

RAMIREZ BG, BLAZQUEZ C, GOMEZ DEL PULGAR T, GUZMAN M, DE CEBALLOS ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. **J Neurosci.** 23;25(8):1904-13. 2005

REYNOLDS BA E WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**, v.7255:1707–1710. 1992.

RITZEL, R. M.; CAPOZZI, L. A. e MCCULLOUGH, L. D. Sex, Stroke, and Inflammation: The potential for Estrogen-mediated immunoprotection in stroke. **Hormones and behavior**, v. 63, n. 2, p. 238-253, 2013.

ROCK, R.B. & PETERSON, P.K. Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v.1, n.2, p.117-126, Jun. 2006.

ROJAS, Hugo; RITTER, Cristiane and PIZZOL, Felipe Dal.Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Rev. bras. ter. intensiva**, vol.23, n.2, pp. 222-227. 2011

SAIN, S., PRAVIN K. NAOGHARE, S. SARAVANA DEVI, ATUL DAIWILE, K. KRISHNAMURTHI, P. ARRIGO, T. CHAKRABARTI Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from Aegle Marmelos, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v 11. 45-55, 2014.

SAWAMOTO, K., HYNEK WICHTERLE, OSCAR GONZALEZ-PEREZ, JEREMY A. CHOLFIN, MASAYUKI YAMADA, NATHALIE SPASSKY, NOEL S. MURCIA, JOSE MANUEL GARCIA-VERDUGO, OSCAR MARIN, JOHN L. R. RUBENSTEIN, MARC TESSIER-LAVIGNE, HIDEYUKI OKANO, ARTURO

ALVAREZ-BUYLLA . New Neurons Follow the Flow of Cerebrospinal Fluid in the Adult Brain. **Science**, v 3: 311 (5761), 629-632. 2006.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E. & PERRY, V.H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v.11, n.10, p.3648-3658, Oct. 1999.

SCHNELL, L.; FEARN, S.; KLASSEN, H.; SCHWAB, M.E. & PERRY, V.H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. **European Journal of Neuroscience**, v.11, n.10, p.3648-3658, Oct. 1999.

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.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; HUITINGA, I.; WITTE, O.W. & STOLL, G. Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. **Stroke**, v.28, n.2, p.382-386, Feb. 1997.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; WITTE, O.W. & STOLL, G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neuroimmunology**, v.55, n.2, p.195-203, Dec. 1994. _____. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v.89, n.4, p.1367-1377. 1999.

SCHWARTZ, M.; BUTOVSKY, O.; BRUCK, W. & HANISCH, U.K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends in Neuroscience**, v.29, n.2, p.68-74, 2006.

SCHYMEINSKY, J.; MOCSAI, A. & WALZOG, B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.98, n.2, p.262-273, Aug. 2007.

SEKIMOTO, M.; KAKUTANI, C.; INOUE, I.; ISHIZAKI, T.; HAYASHIDA, K. & IMANAKA, Y. Management patterns and healthcare costs for hospitalized patients with cerebral infarction. **Health Policy**, v.88, n.1, p.100-109, Oct. 2008.

SIERRA, A.; BECCARI, S.; DIAZ-APARICIO, I.; ENCINAS, J. M.; COMEAU, S. e TREMBLAY, M.-È. Surveillance, Phagocytosis, and Inflammation: How Never-Resting Microglia Influence Adult Hippocampal Neurogenesis. **Neural Plasticity**, v. 2014, n. p. 610343, 2014.

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.

SOUZA-RODRIGUES, R.D.; COSTA, A.M.; LIMA, R.R.; DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-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, p.78-88, Mar 20. 2008.

SPITELLER, G. e AFZAL, M. The Action of Peroxyl Radicals, Powerful Deleterious Reagents, Explains Why Neither Cholesterol Nor Saturated Fatty Acids Cause Atherogenesis and Age-Related Diseases. **Chemistry – A European Journal**, v. 20, n. 46, p. 14928-14945, 2014.

STEEBER, D.A.; TANG, M.L.; ZHANG, X.Q.; MULLER, W.; WAGNER, N. & TEDDER, T.F. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse

Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and beta7 integrin. **The Journal of Immunology**, v.161, n.12, p.6638-6647, Dec 15. 1998.

STOLL, G.; JANDER, S. & SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Progress in Neurobiology**, v.56, n.2, p.149-171, Oct. 1998.

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.

STREIT, W.J.; GRAEBER, M.B. & KREUTZBERG, G.W. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. **Experimental Neurology**, v.105, n.2, p.115-126, Aug. 1989.

STREIT, W.J.; MRAK, R.E. & GRIFFIN, W.S. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **Journal of Neuroinflammation**, v.1, n.1, p.14, Jul 30. 2004.

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**, v.1, n.1, p.17-25, Jan. 2004. 83

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**, v.1, n.1, p.17-25, Jan. 2004. 83

TAPIA-GONZALEZ, S.; CARRERO, P.; PERNIA, O.; GARCIA-SEGURA, L. M. e DIZ-CHAVES, Y. Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. **Journal of Endocrinology**, v. 198, n. 1, p. 219-230, 2008.

TAYLOR, R. A. e SANSING, L. H. Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, n. p. 746068, 2013.

TEELING, J. L.; CUNNINGHAM, C.; NEWMAN, T. A. e PERRY, V. H. The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 3-4, p. 409-419, 2010.

THORED, P.; HELDMANN, U.; GOMES-LEAL, W.; GISLER, R.; DARSALIA, V.; TANEERA, J.; NYGREN, J. M.; JACOBSEN, S.-E. W.; EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z. e LINDVALL, O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**, v. 57, n. 8, p. 835-849, 2009.

TWYXCROSS, J. & AICKELIN, U. Information fusion in the immune system. **Information Fusion**, v.doi:10, n.1016. 2009.

URRA, X.; SAN ROMÁN, L.; GIL, F.; MILLÁN, M.; CÁNOVAS, D.; ROQUER, J.; CARDONA, P.; RIBÓ, M.; MARTÍ-FÀBREGAS, J.; ABILLEIRA, S. e CHAMORRO, A. Medical and Endovascular Treatment of Patients with Large Vessel Occlusion Presenting with Mild Symptoms: An Observational Multicenter Study. **Cerebrovascular Diseases**, v. 38, n. 6, p. 418-424, 2014.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOWSKI, T. J. e GAGE, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999.

VEGETO, E.; BONINCONTRO, C.; POLLIO, G.; SALA, A.; VIAPPIANI, S.; NARDI, F.; BRUSADELLI, A.; VIVIANI, B.; CIANA, P. e MAGGI, A. Estrogen Prevents the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Microglia. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 1809-1818, 2001.

VILLARREAL, G.; ZAGORSKI, J. & WAHL, S.M.T., F. Inflammation Acute. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-8. 2001.

WANG, B. e JIN, K. Current perspectives on the link between neuroinflammation and neurogenesis. **Metabolic Brain Disease**, v. n. p. 1-11, 2014.

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.

WITTCHEM, E.S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. **Frontiers in Bioscience**, v.14, p.2522-2545. 2009.

WON SJ, KIM DY, GWAG B. J. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. **Journal Biochemical Molecular Biology**, v.35: 67–86.2002

WOODRUFF, T. M.; THUNDYIL, J.; TANG, S.-C.; SOBEY, C. G.; TAYLOR, S. M. e ARUMUGAM, T. V. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. **Molecular Neurodegeneration**, v. 6, n. p. 11-11, 2011.

XING, C.; ARAI, K.; LO, E. H. e HOMMEL, M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. **International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society**, v. 7, n. 5, p. 378-385, 2012.

YAMAGUCHI MH, GARCIA RF. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**. 5(1):137-46. 2012;

YANG, Y.; THOMPSON, J. F.; TAHERI, S.; SALAYANDIA, V. M.; MCAVOY, T. A.; HILL, J. W.; YANG, Y.; ESTRADA, E. Y. e ROSENBERG, G. A. Early inhibition of MMP activity in ischemic rat brain promotes expression of tight junction proteins and angiogenesis during recovery. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 33, n. 7, p. 1104-1114, 2013.

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 2. 2006.

YONEYAMA, M.; SHIBA, T.; HASEBE, S. e OGITA, K. Adult Neurogenesis Is Regulated by Endogenous Factors Produced During Neurodegeneration. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 115, n. 4, p. 425-432, 2011.

YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P.H. & KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.23, p.13496-13500, Nov 9. 1999.

Zhao Q, Pahlmark K, Smith ML, Siesjo BK. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Acta Physiol Scand** 152:349-350, 1994.

ZOU, C.G.; ZHAO, Y.S.; GAO, S.Y.; LI, S.D.; CAO, X.Z.; ZHANG, M. & ZHANG, K.Q. Homocysteine promotes proliferation and activation of microglia. **Neurobiology of Aging**, Jan 6. 2009.