



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

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

NEUROGÊNESE ENDÓGENA INDUZIDA POR ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO  
MICROGLIAL/MACROFÁGICA COM O ANTI-INFLAMATÓRIO  
INDOMETACINA

BELÉM-PARÁ

2011

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

NEUROGÊNESE ENDÓGENA INDUZIDA POR ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO  
MICROGLIAL/MACROFÁGICA COM O ANTI-INFLAMATÓRIO  
INDOMETACINA

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

Área de Concentração: Neurociências

BELÉM-PARÁ

2011

ROSANA TELMA SANTOS LOPES

NEUROGÊNESE ENDÓGENA INDUZIDA POR ACIDENTE VASCULAR  
ENCEFÁLICO EXPERIMENTAL APÓS INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO  
MICROGLIAL/MACROFÁGICA COM O ANTI-INFLAMATÓRIO  
INDOMETACINA

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

Área de Concentração: Neurociências

Aprovação: 16 de maio de 2011

BANCA JULGADORA DE DEFESA

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

---

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia (ICS-UFPA) – Membro Titular

---

Profª. Dra. Edna Cristina Santos Franco (ICB-UFPA) – Membro Titular

---

## DEDICATÓRIA

A Deus, a quem serei eternamente grata, por tantas fases que já passei e só por Ele e por sua Misericórdia é que consegui me reerguer. Por ter-me feito resiliente e ter colocado os anjos que cito abaixo, em minha vida.

Ao Tutmés Costa, *in memoriam*, um dos maiores incentivadores para que eu ingressasse no mestrado e me descobrisse como pesquisadora. Por tantos aprendizados que me ajudaram a ser quem sou hoje e por tantas lembranças, um amor formidável.

À família Lopes pelo apoio incondicional, oração e confiança em Deus que sempre nos uniu. Em especial aos meus pais, Paulo e Terezinha, por renunciarem a planos e sonhos para que minhas irmãs e eu pudéssemos alcançar uma formação digna. Às amadas Roberta e Renata, que sempre foram mestres em me proteger, enchendo-me de cuidados e carinho especialmente por ser caçula. À sobrinha e afilhada, Camila, que alegrou os meus dias e me ajudou a ver a presença de Deus nas coisinhas singelas da sua condição de criança. Ao cunhado, Adailson, que não mediu esforços em me ajudar quando precisei e pelos sorrisos arrancados.

À família postiga, Ramsés, Socorro, Felipe, Lorena e Ramsés Jr. que me acompanham de longe e se alegram partilhando das minhas vitórias.

Ao namorado Alexandre Afonso, um anjo em minha vida, por seu amor imprescindível, amizade, respeito e companheirismo. Por ser instrumento de Deus, ser uma das maiores motivações para que eu concluísse o mestrado e por ter uma parcela significativa de tudo isso.

Às amigas que construí no LNNE, em especial aos imprescindíveis Celice Cordeiro (prima amada), Elane Magno (irmã gêmea), Michelle Castro (exemplo de competência, amizade e profissionalismo) e Marcelo Cardoso (muitas vezes educador e orientador) serão para sempre.

Aos “fungos” amados da biomedicina, aos amigos e irmãos de fé da CAJU, Casa da Juventude – Comunidade Católica.

A vocês que fizeram e fazem parte da minha é a quem dedico o resultado de muito esforço e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus;

Ao orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, por oportunizar o desenvolvimento desta dissertação e confiar no meu potencial de “cientista maluca” que após tantos experimentos piloto seríamos agraciados pela padronização de novo modelo experimental no laboratório. Pelo esforço e por se alegrar comigo ao alcançarmos os resultados esperados;

Ao Laboratório de Fertilização Animal, chefiado pelo Prof. Dr. Otávio Ohashi, pela ajuda material para fazer as micropipetas de vidro necessárias aos experimentos de indução isquêmica.

Ao Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges, do Núcleo de Estudos e Seleção de Biomoléculas da Amazônia /Faculdade de Farmácia, que ajudou na diluição da indometacina;

Aos membros do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE). Aos professores, alunos de doutorado e mestrado, além dos alunos de iniciação científica, em especial aos insolentes, Arthur, Mário e Carol. E a semi-membro do LNNE, Adriene Seabra, pelas tardes agradáveis e ajuda com material quando nos faltou.

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

## 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 neuronal é a segunda maior causa de mortalidade e incapacidade no mundo e a principal causa de mortes no Brasil. Demonstrou-se que após a oclusão da artéria cerebral média (MCAO), os neuroblastos migram para o estriado isquêmico e substituem parcialmente os neurônios perdidos durante a isquemia. Além disso, a maioria dos neuroblastos migratórios morre na primeira semana após MCAO e eventos inflamatórios, principalmente a ativação microglial, pode desencadear na morte desses neuroblastos. Neste estudo, investigaram-se os efeitos do anti-inflamatório não esteróide, indometacina, nas ativação microglial, preservação neuronal e neurogênese adulta MCAO experimental de ratos adultos. Os animais sofreram MCAO por microinjeções de endotelina-1 e foram tratados (i.p) com indometacina ( N=8) ou solução salina estéril (N=8). Analisou-se através da imunistoquímica, neurônios maduros (NeuN), ativação microglial/macrofágica (Iba1 e ED1) e migração de neuroblastos (DCX) 8 e 14 dias. O número de células NeuN, ED1 e DCX positivas por campo foram contadas no estriado isquêmico ou zona subventricular. O tratamento com indometacina reduziu a ativação microglial em geral e o número de células ED1+ em 8 e 14 dias após a lesão (médias de  $\pm 6,9$  e  $\pm 3,0$  células respectivamente), comparado ao controle ( $\pm 7,9$  ou  $\pm 6,5$  células,  $p < 0.001$ , ANOVA-Tukey). Aumentou o número de células DCX+ em ambas SVZ e estriado, em todos os tempos avaliados. Não houve diferença entre o número de células NeuN+ entre grupos. Os resultados mostram que o tratamento com indometacina inibe a ativação microglial concomitante com o aumento da proliferação e migração de neuroblastos após MCAO. Isto é resultado promissor, considerando que a indometacina é também usada em tratamentos de doenças humanas não neurais e que a neurogênese adulta pode levar à recuperação funcional após o AVE.

**PALAVRAS-CHAVE:** Acidente Vascular Encefálico, Estriado, Indometacina, Inibição microglial; Neurogênese

**APOIO FINANCEIRO:** FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DO PARÁ - FAPESPA

## 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. It has been shown that neuroblasts migrate to the ischemic striatum following middle cerebral artery occlusion (MCAO) and partially replace neurons lost during ischemia. Nevertheless, most of the migrating neuroblasts die in the first weeks following MCAO and inflammatory events, mainly microglia activation, may underlie neuroblast death. In this study, we investigated the effects of the nonsteroidal anti-inflammatory indomethacin on microglial activation, neuronal preservation and adult neurogenesis following experimental MCAO in adult rats. Animals were submitted to endothelin-1 induced-MCAO and treated (i.p) with indomethacin (N=8) or sterile saline (N=8) for 7 days and perfused at 8 or 14 days. Immunohistochemistry was performed to assess neuronal loss (anti-NeuN), microglial activation (anti-Iba1 and ED1) and migrating neuroblasts (anti-DCX). The numbers of NeuN, ED1 and DCX positive cells per field were counted in the ischemic striatum or subventricular zone. Indomethacin treatment reduced microglial activation in general and the number of ED1+ cells at both 8 and 14 days ( $\pm 6,9$  and  $\pm 3,0$  cells respectively) postinjury, compared to control ( $\pm 7,9$  or  $\pm 6,5$  cells,  $p < 0.001$ , ANOVA-Tukey). There was an increase in the number of DCX+ cells in both subventricular zone (SVZ) and striatum at the same survival times. There was no difference in the number of NeuN positive cells between groups in all investigated survival times. The results show that indomethacin treatment induces inhibition of microglial activation concomitant with increased neuroblast proliferation and migration following MCAO. This is a promising outcome, considering that indomethacin is already used in non-neural human diseases and that adult neurogenesis may underlie functional recovery following stroke.

**KEY-WORDS:** Stroke; Striatum; Indomethacin; Microglial Inhibition; Neurogenesis.

**FINNANCIAL SUPPORT:** FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA NO ESTADO DO PARÁ - FAPESPA

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
1.1. O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO: CONCEITOS E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2. FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	14
<b>1.2.1. Excitotoxicidade</b>	15
<b>1.2.2. Estresse Oxidativo e Nitrosativo</b>	17
<b>1.2.3. A Ruptura da Barreira Hematoencefálica</b>	18
<b>1.2.4. A Resposta Inflamatória</b>	19
1.2.4.1. Citocinas	20
1.2.4.2. Quimiocinas	21
1.2.4.3. Moléculas de Adesão Celular	22
1.2.4.4. Resposta inflamatória celular.	23
<i>a. Neutrófilos</i>	23
<i>b. Linfócitos</i>	25
<i>c. Microglia</i>	26
<b>1.2.5. Morte Celular Programada</b>	29
1.3. NEUROGÊNESE NO ENCÉFALO ADULTO	31
<b>1.3.1 Aspectos históricos</b>	31
<b>1.3.2 Neurogênese Nas Zonas Subventricular e Subgranular Em Condições Normais e Patológicas</b>	34
<b>1.3.3 Ativação microglial e neurogênese</b>	35
1.4. PROBLEMA E HIPÓTESE EXPERIMENTAL	38
1.6. OBJETIVOS	40
1.6.1. <b>Geral</b>	40



1.6.2. <b>Específicos</b>	40
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	41
2.1 MODELO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	41
2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA	42
2.3. TRATAMENTO COM INDOMETACINA	43
2.4. PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	44
2.5. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	44
2.7. ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA	46
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
<b>3. RESULTADOS</b>	49
3.1. MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES E PERDA NEURONAL CARACTERÍSTICOS DE LESÃO ISQUÊMICA	49
3.2 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA INIBIU A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MCAO	52
3.3 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA AUMENTOU A QUANTIDADE DE NEUROBLASTOS NA SVZ E NO ESTRIADO APÓS MCAO	59
<b>4. DISCUSSÃO</b>	63
4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	63
4.2 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA NÃO INDUZ NEUROPROTEÇÃO EM TEMPOS AGUDOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL	64
4.3 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA É UM MÉTODO EFICAZ PARA INIBIR A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA	65

4.4	INDOMETACINA PROMOVEU NEUROGÊNESE NA SVZ E INTENSIFICOU A MIGRAÇÃO DE NEUROBLASTOS PARA O ESTRIADO ISQUÊMICO	66
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	68
	<b>REFERÊNCIAS</b>	69
	<b>ANEXO</b>	91

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>FIGURA 1:</b> Desenho esquemático do processo de excitotoxicidade em ambiente isquêmico e seus efeitos celulares capazes de gerar a maximização da lesão	17
<b>FIGURA 2:</b> Neurogênese Adulta: Proliferação, Migração e Integração Celular	33
<b>FIGURA 3:</b> Análise quantitativa de células ED1+, NeuN+, caspase 3 ativa+ e DCX+ na região estriatal	47
<b>FIGURA 4:</b> Análise quantitativa de células DCX+ na zona subventricular	48
<b>FIGURA 5:</b> Perda neuronal após MCAO revelada pela imunistoquímica para NeuN	50
<b>FIGURA 6:</b> Padrão de distribuição celular microgliais/macrofágicas	54
<b>FIGURA 7:</b> Ativação microglial/macrofágica após indução da isquemia	57
<b>FIGURA 8:</b> Neurogênese após lesão isquêmica por MCAO	61
<b>FIGURA 9:</b> Quantificação do número de células DCX+ no estriado em todos os grupos experimentais	62
<b>TABELA 1:</b> Delineamento dos grupos experimentais avaliados segundo critério de agrupamento e número de animais por grupo.	41

# 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 (DOYLE *et al.*, 2008). Estatísticas indicam ser a segunda maior causa de mortalidade e a primeira em incapacidade dentre todas as demais doenças no mundo, resultando em torno de 6.000.000 de mortes anualmente (JIN *et al.*, 2010; WOODRUFF *et al.*, 2011). No Brasil, segundo dados recentes do Ministério da Saúde, o AVE foi apontado como a principal causa de mortalidade, ocupando a sexta posição entre os países com maior índice de morte por doença cerebrovascular (LOTUFO, 2005; LOTUFO e BENSENOR, 2009).

De acordo com a *American Heart Association* (2011), 795.000 americanos a cada ano 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 após AVE ao ano, resultando em 1 morte a cada 4 minutos. Quanto ao percentual de eventos por sexo, estimou-se que 40% dos casos acometeram homens e 60% mulheres.

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, gerando isquemia e conseqüente lesão e perda de função neural (DOYLE *et*

*al.*, 2008). As demais causas de AVE, incluem 10% de hemorragia intracerebral e 3% AVE hemorrágico subaracnóide (*National Heart, Lung, and Blood Institute*, 2006).

Somente em 2010, os americanos pagaram cerca de 73,7 bilhões de dólares em tratamentos medicamentosos e reabilitação física (*American Heart Association*, 2011). Nos Estados Unidos, o gasto estimado entre 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 (*FLYNN et al.*, 2008; *MAHLER et al.*, 2008).

As manifestações clínicas dos efeitos do AVE são variadas dependendo da região cerebral afetada. Se o hemisfério acometido for o hemisfério direito, ocorre paralisia do lado esquerdo do corpo, problemas de visão, comportamento com marcha acelerada e perda de memória. Se for o hemisfério esquerdo, comportamento com marcha mais lenta, paralisia do lado direito do corpo, problemas com a linguagem e fala, além da perda da memória (*American Heart Association*, 2011).

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, mas apenas promove fortalecimento, capacidade e confiança de que poderão continuar suas atividades mesmo com as seqüelas da doença (*American Heart Association*, 2011). Levando-se em consideração que a maior parte dos indivíduos acometidos por AVE

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 *American Heart Association* (2011), pode-se mencionar o tabagismo, obesidade, dislipidemias, estresse, sedentarismo, diabetes, doenças cardiovasculares e pressão sanguínea elevada, e ainda, as enfermidades tropicais endêmicas como a Doença de Chagas e a Malária (CAMARGO *et al.*, 2005).

## 1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

O AVE isquêmico resulta de redução permanente ou transitória do fluxo sanguíneo para o encéfalo (DIRNAGL *et al.*, 1999), podendo ocasionar lesão isquêmica focal caracterizado pela redução do fluxo sanguíneo em uma região específica do encéfalo, ou ainda, global (isquemia global), induzida geralmente pela redução do fluxo sanguíneo no encéfalo inteiro. Na isquemia focal, uma artéria ou veia é mecanicamente ocluída por embolia ou resulta de tromboembolismo encefálico (BACIGALUPPI *et al.*, 2010). Em humanos, os AVEs ocorrem, geralmente, no território de vascularização da artéria cerebral média (ACM) (JIN *et al.*, 2010).

Se a condição isquêmica persiste por um período de tempo prolongado, a morte neuronal primária aparece rapidamente nas áreas centrais do território de vascularização prejudicado e é acompanhada por degeneração secundária na penumbra isquêmica (DOYLE *et al.*, 2008). Os mecanismos de lesão secundária ocorrem pela ativação de múltiplas vias de morte celular, incluindo excitotoxicidade, formação excessiva de radicais livres durante o período de reperfusão, ruptura da barreira hemato-encefálica

(BHE), inflamação, morte celular programada, despolarização perinfarto e acidose metabólica (BROUNS & DE DEYN, 2009; JUDY *et al.*, 2006; MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

Os principais mecanismos celulares envolvidos com a fisiopatologia do AVE são apresentados abaixo.

### **1.2.1 Excitotoxicidade**

Em condições fisiológicas, o neurotransmissor glutamato é o principal responsável pela mediação da transmissão sináptica excitatória através da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, como o NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropiónico) ou cainato (WON *et al.*, 2002). A ativação dos receptores ionotrópicos 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 e para a plasticidade neuronal (WON *et al.*, 2002).

Na isquemia encefálica, a privação de oxigênio e glicose provoca um aumento da concentração de glutamato na fenda sináptica e no meio extracelular o que leva a intensa despolarização de membrana após a lesão isquêmica (WON *et al.*, 2002). A ativação excessiva de receptores glutamatérgicos induz aumento das concentrações intracelulares de íons, principalmente cálcio e sódio (MARTIN e WANG, 2010; WOODRUFF *et al.*, 2011).

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 (MEHTA *et al.*, 2007). O cálcio extracelular pode se integrar ao espaço intracelular principalmente através de canais iônicos dependentes de voltagem ou receptores ionotrópicos de alguns neurotransmissores, como o 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 (OLNEY, 1990). O acúmulo excessivo de cálcio dentro da célula desencadeia uma série de atividades neurotóxicas, que podem aumentar a morte celular, como ativação de enzimas, como as calpaínas e outras proteases, cinases, sintase de óxido nítrico (NOS, do acrônimo inglês, *nitric oxide synthase*), calcineurinas e endonucleases. Esses componentes são determinantes para processos fisiopatológicos posteriores, como a morte celular programada (apoptose) (ARUNDINE e TYMIANSKI, 2004; MELDRUM e GARTHWAIT, 1990).

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 (OLNEY, 1990). O acúmulo de sódio induz edema celular, com subsequente lesão estrutural e desencadeamento da resposta inflamatória (CHOI, 1987; WON *et al.*, 2002;



WOODRUFF *et al*, 2011;). A Figura 1 mostra, brevemente, o processo de excitotoxicidade e suas consequências em ambiente isquêmico.

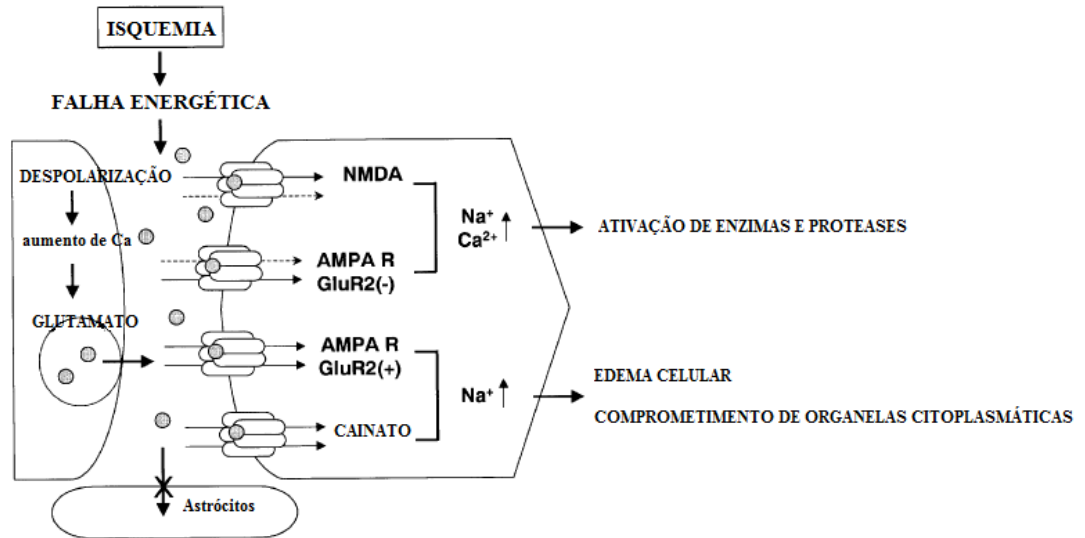


Figura 1: Desenho esquemático do processo de excitotoxicidade em ambiente isquêmico e seus efeitos celulares capazes de gerar a maximização da lesão. Fonte: Adaptado de WON *et al*, 2002.

## 1.2.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo

O equilíbrio entre a concentração de agentes oxidantes e antioxidantes é mantido em situações fisiológicas, degradando a demanda de radicais livres (LOVE, 1999). Isso acontece porque os neurônios, assim como todas as células do corpo, são submetidos, constantemente, a níveis basais de estresse oxidativo e nitrosativo, mas que não são capazes de gerar nenhum dano (LOVE, 1999). No entanto, os radicais livres são moléculas altamente reativas que podem interagir com o DNA, proteínas e lipídios causando graus variados de dano e disfunção (LOVE, 1999; WOODRUFF *et al*, 2011).

O estresse oxidativo induzido após a isquemia encefálica se dá por diversas vias do metabolismo isquêmico, especialmente pela inflamação e reperfusão, aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS, do acrônimo inglês, *reactive oxygen species*) (CEULEMANS *et al.*, 2010; LOVE, 1999) . A perda da polaridade da membrana celular leva ao influxo de íons cálcio e sódio na célula. Este acúmulo iônico faz com que a mitocôndria produza 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 ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxidril (OH $^-$ ) (MEHTA *et al.*, 2007). Estes radicais ativam cascatas enzimáticas que destroem macromoléculas na célula e a levam à morte (BROUNS & DE DEYN, 2009; HERTZ, 2008). Paralelamente, no citoplasma, o íon cálcio promove a produção de óxido nítrico (NO) que, em níveis elevados, também possui efeito deletério (BROUNS & DE DEYN, 2009; YING *et al.*, 1999).

### **1.2.3 A Ruptura da Barreira Hematoencefálica**

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 e esclerose múltipla devido a processos inflamatórios, ocorre um desequilíbrio à integridade da BHE, com conseqüente desequilíbrio da homeostase de íons e função transportadora. No AVE, alterações na BHE induzem perda de regulação iônica seguida de difusão passiva de água, resultando em edema cerebral (BROWN e DAVIS, 2002). O

parênquima encefálico é exposto aos constituintes intravasculares, havendo diminuição do fluido cerebral e hemorragia (BROWN e DAVIS, 2002). As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs do acrônimo inglês, *matrix metalloproteinases*), em particular as MMP-9, contribuem para a degradação da BHE após isquemia. Estas enzimas proteolíticas degradam a laminina e fibras colágenas da lâmina basal, o que prejudica a coesão entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade local e favorecendo o extravasamento de plasma, transmigração de leucócitos e eventual entrada de hemácias (hemorragias) (DEL ZOPPO e HALLENBECK, 2000; LO, 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009).

#### **1.2.4 A Resposta Inflamatória**

Acreditou-se por muito tempo 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 (BARKER & WIDNER, 2004) e a suposta ausência do Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe I (MHC-I, do acrônimo 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 (GALEA *et al.*, 2007; KRIZ & LALANCETTE-HEBERT, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento da resposta inflamatória à isquemia inicia pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como as citocinas – interleucina-1 (IL-1, do

acrônimo inglês: *interleukin-1*), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ , do acrônimo inglês: *tumor necrosis factor alpha*), interleucina-10 (IL-10, do acrônimo 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 acrônimo inglês: *monocyte chemotactic protein 1*). Estes mediadores inflamatórios modulam a ativação de células imunes e induzem a expressão de moléculas de adesão na parede endotelial, entre as quais selectinas, integrinas e imunoglobulinas.

#### 1.2.4.1 Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis que causam modificações comportamentais nas células-alvo (COTA & MIDWINTER, 2009; TWYCCROSS & AICKELIN, 2009), como mudanças morfológicas, expressão de moléculas de adesão, produção de radicais livres e liberação de mais citocinas (ASCHNER, 1998; CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004; WANG *et al.*, 2007). Entre as células-alvo estão as 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 (interleucina 1) e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) (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).

Por outro lado, citocinas como a IL-10 e TGF- $\beta$  (do acrônimo inglês *transforming growth factor*  $\beta$ ) possuem ação antiinflamatória (WANG *et al.*, 2007). A IL-10 inibe a atuação pró-inflamatória da IL-1 e TNF- $\alpha$  (LIU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2007). A principal fonte de IL-10 são leucócitos mononucleares como os monócitos/macrófagos (BEMEUR *et al.*, 2007). Contudo, em condições patológicas graves estas células manifestam fenótipo prejudicial.

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

#### 1.2.4.2 Quimiocinas

É uma família de macromoléculas com propriedade de comunicação e recrutamento celular (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 (STOLL *et al.*, 1998; BLOCK & HONG, 2005). Nestas circunstâncias, a MCP-1 pode ser liberada, através da indução por TNF- $\alpha$  (CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004; WANG *et al.*, 2007).

A sinalização de citocinas e quimiocinas altera o metabolismo 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 (WANG *et al.*, 2007).

#### 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) e/ou propiciando o rolamento (STOLL *et al.*, 1998). A selectina-P (CD62P), por sua vez, 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 no SNC.

#### 1.2.4.4 Resposta inflamatória celular

Os leucócitos polimorfonucleares tem um papel crucial na resposta inflamatória mediante a lesão isquêmica. Na fase aguda, os neutrófilos são predominantemente as primeiras células recrutadas, seguido pelos linfócitos (DOS SANTOS *et al.*, 2007; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008; THORED *et al.*, 2009). As células microgliais/macrofágicas ativadas dominam o microambiente lesivo nos tempos de sobrevivência mais tardios após desordens neurais agudas, incluindo AVE, trauma crânio-encefálico e da medula espinhal (CLARK *et al.*, 1993; MORIOKA *et al.*, 1993). As evidências experimentais de que os componentes celulares da resposta inflamatória participam do processo lesivo após desordens neurais agudas, principalmente AVE, são citadas abaixo.

##### a. *Neutrófilos*

Os neutrófilos possuem um importante papel fagocitário, o que é importante para a remoção de detritos teciduais após desordens neurais e não neurais (VILLARREAL *et al.*, 2001). Estas células são recrutadas para o parênquima neural após desordens neurais agudas, incluindo lesão aguda da medula espinhal (GOMES-LEAL *et al.*, 2005; TAOKA *et al.*, 1997; SCHNELL *et al.*, 1999;) e do encéfalo (DOS SANTOS *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2008; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008). O pico máximo de recrutamento de neutrófilos em tecidos não neurais, como a pele, ocorre em torno de 6 horas, mas no SNC é de 24 horas após lesão (KATO *et al.*, 1996; BOLTON e PERRY, 1998; GOMES-LEAL *et al.*, 2005). Trinta minutos após a lesão isquêmica, os neutrófilos começam a ser recrutados ao sítio de lesão (KATO *et al.*, 1996; HIROSE *et*

*al.*, 2000). O acúmulo de neutrófilos em regiões isquêmicas 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). Entre as moléculas liberadas por neutrófilos, que são prejudiciais ao tecido isquêmico, pode-se mencionar colagenase e a elastase. Esta última é uma enzima degrada componentes da matriz extracelular e da junção neurovascular, o que resulta no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos próximos à lesão (TAOKA *et al.*, 1998; STOWE *et al.*, 2009). Esta enzima atua ainda sinergicamente aos radicais livres e citocinas liberadas localmente e parece favorecer também o recrutamento e diapedese de mais neutrófilos e outros leucócitos ao sítio de lesão (CHOU *et al.*, 2004). A infiltração de leucócitos mediada pelos neutrófilos pode aumentar a expressão de fatores deletérios locais e aumentar o tamanho da lesão inicial (EMERICH *et al.*, 2002).

O acúmulo de neutrófilos na luz de pequenos vasos e a ativação plaquetária dificulta a restauração do fluxo sanguíneo pós-lesão, mecanismo descrito como fenômeno de não-refluxo (BROUNS & DE DEYN, 2009; DEL ZOPPO & HALLENBECK, 2000; DOYLE *et al.*, 2008). Este fenômeno leva à extensão do dano primário pelo prolongamento da hipóxia tecidual. Claramente, os neutrófilos exercem um papel prejudicial relevante na fisiopatologia aguda do AVE e sinalização inflamatória aos demais leucócitos. Finalmente, estas células podem ser encontradas no encéfalo humano após infarto isquêmico (AKOPOV *et al.*, 1996). Nestas circunstâncias, neutrófilos e outros leucócitos podem liberar proteases e radicais livres, os quais são extremamente lesivos ao parênquima tecidual (AKOPOV *et al.*, 1996).



## b. *Linfócitos*

A ativação de linfócitos em decorrência de evento isquêmico leva à resposta celular, envolvendo produção de citocinas, expressão de receptores de citocinas e proliferação celular (ARUMUGAM *et al.*, 2005; JIN *et al.*, 2010). Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos e armazenamento da memória imune a antígenos específicos (ABBAS e JANEWAY, 2000). Enquanto que os linfócitos T são as células efetoras do sistema imune adaptativo pelo reconhecimento de antígenos específicos (ABBAS e JANEWAY, 2000; PERRY, 1998).

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; DZIENNIS *et al.*, 2011) pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e por promover quimiotaxia para outros leucócitos (SCHWAB *et al.*, 2001), além do efeito citotóxico mediado pelo MHC classe I (CABARROCAS *et al.*, 2003). Recentemente, sugeriu-se que o bloqueio de um receptor recombinante de linfócitos T diminui a inflamação e reduz a área de infarto após MCAO (DZIENNIS *et al.*, 2011).

Linfócitos também podem exercer ação neuroprotetora após isquemia (LIESZ *et al.*, 2009). Em um estudo recente, LIESZ *et al.* (2009) mostraram que linfócitos T

regulatórios (CD4+CD25+Foxp3+) são recrutados para o tecido isquêmico e contribuem para neuroproteção, através de mecanismos imunomodulatórios envolvendo a síntese e liberação de IL-10. Em doenças autoimunes, como a esclerose múltipla, este efeito depende do tipo de células T ativadas e da gravidade da lesão (MOALEM *et al.*, 1999; CHIU *et al.*, 2008; LINFERT *et al.*, 2009).

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

### *c. Microglia*

A microglia é considerada a célula imunoefetora do SNC, posto que desenvolve um papel protetor, como sentinela (GEHRMANN *et al.*, 1995). Em condições normais, a microglia monitora constantemente as alterações homeostáticas do tecido em sua volta (DAVALOS *et al.*, 2005; NIMMERJAHN *et al.*, 2005). Nesta situação, a microglia é uma célula de corpo celular pequeno, com pouco citoplasma em torno do núcleo e numerosas ramificações (RANSOHOFF & PERRY, 2009). Alterações moleculares em seu microambiente podem induzir alterações morfológicas que a torna ativada (KREUTZBERG, 1996). Tanto no tecido nervoso saudável como em condições patológicas, a microglia realiza a endocitose de restos celulares e partículas dispersas no espaço extracelular (NAPOLI & NEUMANN, 2009). A origem desta célula é controversa. Contudo, estudos indicam que a microglia deriva de linhagem hematopoiética durante o período embrionário e pós-natal inicial (PERRY & GORDON, 1991).

As células microgliais são bastante sensíveis às mudanças no microambiente onde vivem e são prontamente ativadas em resposta a diversos estímulos patológicos e

as menores alterações fisiológicas (HAWLISCH e KOHL, 2006; KREUTZBERG, 1996; PERRY, 1994; PERRY e GORDON, 1987; NEUMANN *et al.*, 1998; STREIT *et al.*, 2004). Recentemente descobriu-se que mesmo situações de estresse podem induzir ativação microglial (PERRY, 2007).

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).

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 ativadas (GRAEBER *et al.*, 1988; STREIT *et al.*, 1989; STREIT e GRAEBER, 1993; THORED *et al.*, 2009). 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; JANDER *et al.*, 1998; PERRY, 1998; STOLL & JANDER, 1999; SCHROETER *et al.*, 1994, 1997, 2001).

O significado destas alterações morfofuncionais foram primeiramente estudados *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 (GOMES-LEAL *et al.*, 2004; STREIT *et al.*, 2004; BLOCK *et al.*, 2007; PERRY *et al.*, 2010).

Em modelos experimentais de isquemia encefálica, relatou-se intensa ativação microglial no centro do infarto e na penumbra isquêmica (MORIOKA *et al.*, 1993). 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 NO, aminoácidos excitatórios e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  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; EKDAHL *et al.*, 2009).

Concomitante às mudanças morfológicas e da regulação das moléculas de superfície, a microglia ativada também secreta fatores solúveis em condições patológicas (BATCHELOR *et al.*, 1999; BATCHELOR *et al.*, 2000). Alguns desses fatores, tais como, o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF, do acrônimo inglês: *glial-derived neurotrophic factors*), são potencialmente benéficos à sobrevivência de neurônios (BATCHELOR *et al.*, 1999; BATCHELOR *et al.*, 2000).

Estudos recentes têm enfatizado que é o tipo de estímulo que determina se o fenótipo microglial será benéfico ou deletério (BUTOVSKY *et al.*, 2005; SCHWARTZ *et al.*, 2006). Butovsky *et al.* (2005) demonstraram em um estudo *in vitro* que estímulos como LPS e  $\beta$ -amilóide podem induzir um fenótipo microglial deletério, como a síntese excessiva de TNF- $\alpha$ , enquanto que baixas doses de IFN- $\gamma$  e da citocina anti-inflamatória IL-4 podem induzir um fenótipo microglial neuroprotetor, com expressão de MCH

classe II e liberação do fator neurotrófico I semelhante à insulina (IGF-I, do acrônimo inglês: *insulin-like growth factor*).

### **1.2.5 Morte Celular Programada**

Existem vários padrões de morte celular, mas, de forma simplificada, a morte celular pode ser classificada em dois tipos: necrose e morte celular programada, cujo correlato morfológico denomina-se apoptose (SYNTICHANKI, 2003; VILA, 2003). A morte necrótica só ocorre em situações patológicas, causadas por estímulos extrínsecos às células (SYNTICHANKI, 2003). Já a morte celular programada envolve processos fisiológicos ordenados, que eliminam células dos tecidos durante o desenvolvimento normal (LIPTON, 1999; VILA, 2003). 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; VILA, 2003).

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 e lançamento de citocromo c após lesão mitocondrial (MEHTA *et al*, 2007; LIU *et al*, 1996; VILA, 2003). Outros eventos fisiopatológicos, como a excitotoxicidade induzida pelo excesso de glutamato no meio extracelular e a falta de regulação do cálcio afetam os sinais para morte celular (ARUNDINE e TYMIANSKY, 2003; VILA, 2003). Em geral, há duas vias de ativação de apoptose: a via intrínseca e a via extrínseca (WOODRUFF *et al*, 2011).

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, ocorre na isquemia encefálica por meio da liberação da enzima citocromo c, uma proteína de membrana da mitocôndria e um dos principais componentes da cadeia respiratória dessa organela (SUGAWARA *et al*, 2004; VILA, 2003). A citocromo é transportada da mitocôndria para o compartimento citoplasmático e interage com fator 1 de ativação de protease apoptótica Apaf-1 (do acrônimo inglês, apoptotic protease activating factor-1) e deoxiadenosina trifosfato, formando os apoptossomos e ativando a caspase-9, enzima que desencadeia a cascata de caspases dependente de citocromo c, ativando, em seguida, a caspase-3, uma das principais caspases executoras (JORDAN,2011).

Em relação à via extrínseca da morte celular programada, esta é iniciada por receptores, como receptor de Fas e receptor de fator de necrose tumoral (TNF). Na primeira via, o ligante extracelular de Fas (FasL) se liga ao seu receptor e a uma molécula adaptadora (FADD – proteína de morte associada a Fas), que ativa a pró-caspase 8, que, por sua vez, ativa caspase-3, enzima efetora que cliva PARP (Poli-ADP ribose polimerase), levando a dano ao DNA e morte celular (JORDAN, 2011). Além disso, a caspase-3 pode ativar a caspase-8, que aumenta a expressão gênica de um componente da família de proteínas Bcl-2 (Bid), desencadeando o início da via mitocondrial de apoptose (HENGARTNER e BRYANT, 2000; SUGAWARA *et al*, 2004).

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 neurogênese endógena adulta.

## 2.3 NEUROGÊNESE NO ENCÉFALO ADULTO

### 2.3.1 Aspectos históricos

A neurogênese adulta é a formação e integração de novos neurônios em circuitos neurais consolidados após o desenvolvimento pós-natal ter cessado (YONEYAMA *et al.*, 2011). Até meados do século XX, acreditava-se que a neurogênese adulta era um evento impossível de acontecer, uma noção ilustrada pela célebre frase do importante neuroanatomista espanhol Santiago Ramon y Cajal (1851-1934) “(...) nos centros neurais adultos, as vias neurais são fixas e imutáveis. Tudo morre. Nada pode ser regenerado (...)” (RAMON Y CAJAL, 1928).

Estudos realizados por Altman na década de 1960 (ALTMAN, 1963, 1967, 1969; ALTMAN e DAS, 1965) mostraram a presença de um número de células granulares não diferenciadas, em ratos jovens, próximo à camada granular no giro denteado que após certo período declinara coincidentemente com o aparecimento de uma população de células granulares recém-diferenciada. Nesta época, cogitou-se a hipótese de que essas células não diferenciadas migravam do ventrículo encefálico para o hipocampo, onde se diferenciavam (ALTMAN e DAS, 1965).

Altman, seguido por Kaplan e Hinds, na década de 1970 (KAPLAN e HINDS, 1977), evidenciaram a presença de novos neurônios recém-formados no cérebro adulto.

Evidências morfológicas e por microscopia eletrônica mostraram que algumas células adultas recém-formadas (identificadas pela incorporação de timidina tritiada, um isótopo radioativo que marca o DNA de células mitóticas) eram neurônios (ou microneurônios como ficaram conhecidas na época). No entanto, a ausência de marcadores neuronais específicos aliada à inespecificidade dos marcadores mitóticos disponíveis à época, fizeram com que a idéia de neurogênese no encéfalo adulto caísse em descrédito (KAPLAN, 2001).

Nos anos 80, Fernando Nottebohm e colaboradores demonstraram a proliferação celular regulada em núcleos vocais de canários, promovendo evidências da neurogênese adulta em aves (GOLDMAN e NOTTEBOHM, 1983). Apesar da demonstração de que a neurogênese ocorre no cérebro adulto de canários, este fenômeno foi considerado à época, restrito ao cérebro de pássaros e, portanto, sem relevância para mamíferos (GOLDMAN e NOTTEBOHM, 1983).

Apenas na década de 1990, com diversos laboratórios publicando, semanalmente, investigações da natureza e extensão da neurogênese no cérebro de mamíferos adultos, é que houve aceitação geral pela comunidade científica (GAGE *et al.*, 1995; GOULD *et al.*, 1999; VAN PRAAG *et al.*, 1999;). Demonstrou-se, no início dos anos 90, a presença de progenitores neurais no hipocampo de roedores adultos e que estes progenitores poderiam ser induzidos a proliferar *in vitro*, gerando tanto neurônios como células gliais (REYNOLDS e WEISS, 1992). Além disso, ocorreram os primeiros estudos com bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, que marca de forma inequívoca os progenitores neurais (McKAY, 1997; GAGE, 2000). Estes achados motivaram vários estudos que, claramente, demonstraram a presença de novos neurônios produzidos em algumas regiões do encéfalo de mamíferos adultos, inclusive em humanos, que se integram em circuitos funcionais em, pelo menos, duas regiões



encefálicas: a zona subgranular (SGZ, do acrônimo inglês *subgranular zone*) do giro denteado do hipocampo e a zona subventricular (SVZ, do acrônimo inglês, *subventricular zone*) na parede dos ventrículos laterais (LUSKIN, 1993) (Figura 2). Desde então, a neurogênese adulta vem sendo bastante estudada em condições normais e patológicas (ALVAREZ-BUYLLA e LIM, 2004; ARVIDSSON *et al.*, 2002; GAGE, 2002; LIE *et al.*, 2004; PARENT *et al.*, 2003; WINNER *et al.*, 2011).

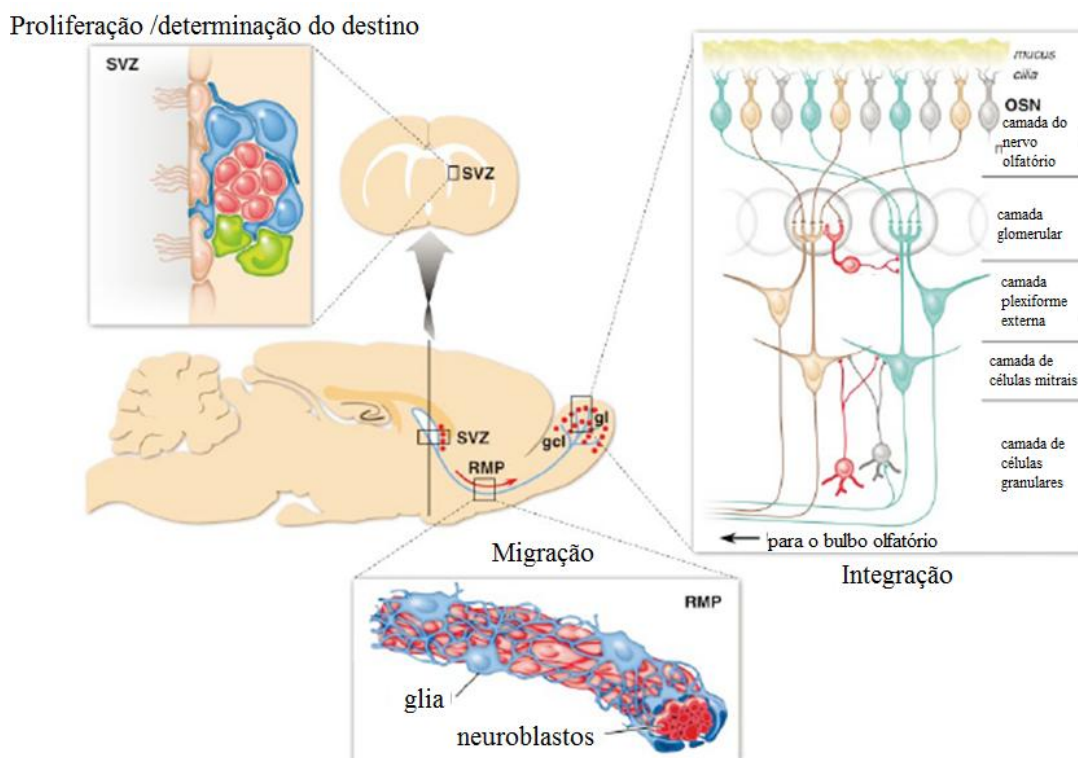


Figura 2: Neurogênese Adulta: Proliferação, Migração e Integração Celular. Proliferação celular na SVZ, parede dos ventrículos laterais; Migração de neuroblastos através da via migratória rostral, sustentada por uma rede formada por células da glia (mais especificamente, astrócitos) e; Diferenciação dos neurônios imaturos em interneurônios e integração aos circuitos neuronais pré-existentes na camada de células granulares na SGZ. SVZ, zona subventricular; RMP, via migratória rostral; gcl, camada de células granulares; gl, células granulares. (Fonte: Adaptada de Lie *et al.*, 2004)

### 2.3.2 Neurogênese Nas Zonas Subventricular e Subgranular Em Condições Normais e Patológicas

As células-tronco neurais persistem no cérebro de mamíferos adultos e exibem as duas propriedades fundamentais de células-tronco: autorregeneração e multipotência, esta última, a capacidade de gerar neurônios e células da macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) (DOETSCH *et al.*, 1999; RIQUELME *et al.*, 2008). Demonstrou-se que estas células são um tipo especial de astrócitos (DOETSCH *et al.*, 1999) e não células ependimárias, como sugerido inicialmente (JOHANSSON *et al.*, 1999).

Como mencionado anteriormente, a neurogênese ocorre na SVZ e na SGZ da formação hipocampal (DOETSCH *et al.*, 1997, 1999; DOETSCH e HEN, 2005; GAGE, 2002; ZHAO *et al.*, 2008) (Figura 2). Os neuroblastos migram da SVZ para o bulbo olfatório através da via migratória rostral, onde se diferenciam em interneurônios (DOETSCH *et al.*, 1997, 1999). A migração dos neuroblastos é feita em contato direto com uma espécie de túnel de astrócitos (ver *Migração* na Figura 2) (DOETSCH *et al.*, 1997) e parece usar pistas químicas como integrinas (DOETSCH *et al.*, 1997; LIE *et al.*, 2004; PENCEA *et al.*, 2001;). Esta migração, inicialmente observada em camundongos, acontece em humanos (CURTIS, 2007, 2011).

Células da SGZ migram por uma curta distância para a camada de células granulares do giro denteado. Na camada granular, os neuroblastos gerados são integrados funcionalmente nos circuitos neurais existentes (GAGE, 2002; KEMPERMANN *et al.*, 1998).

Após condições patológicas do SNC, incluindo o AVE, os neuroblastos migram para as regiões lesionadas, substituindo parcialmente as células perdidas pelo processo lesivo (AVIDSSON *et al.*, 1996, 2002; YONEYAMA *et al.*, 2011). Estas células são

atraídas por moléculas liberadas por astrócitos e microglia no ambiente isquêmico, incluindo a MCP-1 (do acrônimo inglês, *monocyte chemotactic protein 1*) (YAN, 2006), fator 1 $\alpha$  derivado do estroma (SDF-1 $\alpha$ , do acrônimo inglês, *stroma derived fator1 $\alpha$* ) (THORED *et al.*, 2006) e osteopontina (YAN, 2009). Além disso, as células microgliais parecem regular a neurogênese no encéfalo adulto (AARUM *et al.*, 2003; BATTISTA *et al.*, 2006; CACCI *et al.*, 2008; EKDAHL *et al.*, 2009; WALTON *et al.*, 2006).

#### **1.3.4 Ativação microglial e neurogênese**

Demonstrou-se que não somente moléculas, mas células e mecanismos celulares estão presentes e amplamente utilizados em ambos os sistemas nervoso e imune (HABIBI *et al.*, 2009). As evidências sugerem que há sinergia entre sistema imune e a diferenciação de células-tronco neurais para promover recuperação funcional, bem como células imunes que ajudam a manter a neurogênese nos centros germinais do SNC adulto dentro de condições não patológicas (BUTOVSKY *et al.*, 2006; ZIV *et al.*, 2006; EKDAHL *et al.*, 2009; MATHIEU *et al.*, 2010) ou até mesmo em casos comprovados de proliferação de células-tronco neurais na SVZ dos ventrículos laterais em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas (ARVIDSSON *et al.*, 2002; THORED *et al.*, 2006, 2009).

Dentre inúmeras células e moléculas que estão intimamente relacionadas ao processo de regulação da neurogênese, encontra-se a microglia. Estudos *in vitro* sugerem que as células microgliais podem regular a migração e a sobrevivência de progenitores neurais (AARUM *et al.*, 2003; WALTON *et al.*, 2006). Esta regulação

parece depender de fatores solúveis liberados pelas células microgliais (AARUM *et al.*, 2003; WALTON *et al.*, 2006). A quantidade de progenitores neurais em cultura diminui proporcionalmente ao número de passagens e isso é concomitante com a redução de células microgliais (WALTON *et al.*, 2006). O uso de substâncias que prolongam a sobrevivência microglial em cultura aumenta a sobrevivência de progenitores neurais na mesma região (WALTON *et al.*, 2006).

Existe um leque de evidências experimentais indicando que a microglia, dependendo do seu estágio de ativação e fenótipo funcional, pode ser prejudicial (neurotóxica) ou benéfica (neuroprotetora) para a neurogênese adulta em cérebros intactos ou lesionados (EKDAHL *et al.*, 2003; MONJE *et al.*, 2003; HOEHN *et al.*, 2005; BATTISTA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007; THORED *et al.*, 2009). 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 anti-inflamatórias produzidas como consequência desse processo de ativação (BATTISTA *et al.*, 2006; MONJE *et al.*, 2003).

Evidenciou-se que a ativação microglial pode prejudicar a neurogênese após AVE e outras doenças do SNC (EKDAHL, 2003; LIU, 2007; MONJE, 2003). Após *status epilepticus*, ativação microglial excessiva diminui a neurogênese hipocampal, o que é prontamente restaurado pelo bloqueio microglial com minociclina (EKDAHL, 2003). Fenômeno similar é observado após irradiação craniana (MONJE, 2003). O tratamento de ratos que sofreram MCAO (do acrônimo inglês *middle cerebral artery occlusion*) com minociclina inibe as células microgliais e aumenta a neurogênese endógena induzida pelo processo isquêmico (LIU, 2007). Fenômeno similar é observado quando ratos adultos isquêmicos são tratados com o anti-inflamatório

indometacina (HOEHN *et al.*, 2005). Em conjunto, estes resultados sugerem que a ativação microglial dificulta a neurogênese endógena após lesão do SNC.

A amplificação dos mecanismos intrínsecos de reparo cerebral é uma das abordagens mais promissoras com possibilidade de geração de novas abordagens terapêuticas para doenças do SNC (LINDVALL e KOKAIA, 2006). Demonstrou-se que após AVE, neuroblastos são recrutados para o estriado a partir da SVZ e, parte deles, transforma-se em neurônios maduros com fenótipo e morfologia de neurônios estriatais (ARVIDSSON *et al.*, 2002). No entanto, este mesmo estudo demonstrou que cerca de 80 % dos neuroblastos morrem nas primeiras semanas após oclusão da artéria cerebral média e que apenas 0.2% dos neurônios estriatais perdidos após AVE são substituídos (ARVIDSSON *et al.*, 2002). Os neurônios recém-formados morrem por apoptose, mas os fatores responsáveis por esta morte maciça dos mesmos são desconhecidos.

A resposta inflamatória pode ser patológica para a neurogênese no cérebro adulto (EKDAHL *et al.*, 2003). É possível que os macrófagos/microglia ativados secretem fatores repulsivos para a migração de neuroblastos ou que estes sejam mortos por substâncias, tais como citocinas inflamatórias e proteases, secretadas por estas células. A inibição microglial/macrofágica a fim de diminuir a ativação excessiva pode aumentar a migração e/ou sobrevivência de neuroblastos, além de induzir neuroproteção tecidual em geral (BATTISTA *et al.*, 2006).

O recrutamento de células inflamatórias circulantes é dependente do estado das células endoteliais e da expressão de quimiocinas. Um dos efeitos mais importantes da indometacina é a redução no recrutamento dos monócitos periféricos, sugerindo que, a resposta inflamatória das células endoteliais (como por exemplo, a expressão de quimiocinas ou da ICAM - molécula de adesão intercelular) pode ser normalizada pela indometacina. De fato, uma das características do tratamento com indometacina é a

normalização da permeabilidade vascular, o que certamente pode afetar o microambiente vascular neurogênico. A neuroinflamação e a ativação microglial estão associadas com algumas doenças da cognição e relacionadas à perda de memória, como doença de Alzheimer. Além disso, os níveis séricos de IL-6 em humanos estão relacionados com diminuição do desempenho cognitivo e risco aumentado de demência. O tratamento clínico com indometacina e outros anti-inflamatórios não esteróides diminuem o risco e a progressão da perda de memória. Alguns autores afirmam que o tratamento com esses fármacos pode contribuir para a melhora das demências a partir do momento em que a inflamação pode bloquear a neurogênese e, quando tratada, podeter efeitos benéficos sobre os processos patológicos da memória (MONJE *et al*, 2003).

Neste sentido, faz-se extremamente necessário modular o estado de reatividade microglial, posto que este 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).

#### 1.4. PROBLEMA E HIPÓTESE EXPERIMENTAL

Um dos maiores problemas com a neurogênese adulta consiste no fato de que apenas em torno de 0,2% de novas células precursoras neurais geradas após eventos isquêmicos, conseguem recompor os circuitos neurais (ARVIDSSON *et al.*, 2002). A maioria dos neuroblastos que migra para o estriado isquêmico morre por apoptose nas primeiras semanas (ARVIDSSON *et al.*, 2002; THORED *et al.*, 2006). 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 (DAS *et al.*, 2008; EKDAHL *et al.*, 2009; JAKUBS *et al.*, 2008).

Discutiu-se anteriormente que a resposta inflamatória mediada pela microglia pode evoluir com perfil deletério pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e produtos citotóxicos que induzem a morte neuronal e prejuízo à neurogênese endógena em casos de ativação exacerbada (BLOCK *et al.*, 2007; EKDAHL *et al.*, 2003, 2009; LEHNARDT *et al.*, 2008, MABUCHI *et al.*, 2000; YENARI *et al.*, 2006; ). Estudos prévios demonstraram o papel fundamental de bloqueadores da inflamação na modulação da neurogênese em modelos experimentais de doenças do SNC (MONJE *et al.*, 2003; EKDAHL *et al.*, 2003; HOEHN *et al.*, 2005; KLUSKA *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2008; CARDOSO, 2010; SILVA, 2011). Existe grande controvérsia sobre o papel microglial 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 *et al.*, 2005; LIU, 2007). Nesta dissertação, 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 com o anti-inflamatório não esteróide, indometacina, com base na hipótese de que a modulação da inflamação pode gerar neuroproteção e aumento da sobrevivência e migração celular, através da amplificação da neurogênese endógena.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Geral

Investigar os efeitos da inibição microglial com indometacina sobre os padrões de perda neuronal, neurogênese endógena e migração de neuroblastos em diferentes tempos de sobrevivência após lesão isquêmica induzida por oclusão da artéria cerebral média em ratos adultos.

### 1.5.2 Específicos

- Investigar os efeitos da indometacina sobre a inibição microglial/macrofágica no modelo experimental;
- Investigar qualitativa e quantitativamente os efeitos do tratamento com indometacina sobre a perda neuronal, 8 e 14 dias após oclusão da artéria cerebral média;
- Investigar os efeitos da inibição microglial/macrofágica sobre a proliferação e migração de neuroblastos para a área de lesão isquêmica estriatal, no modelo experimental proposto e nos tempos de sobrevivências especificados.



## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MODELO 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 BIO0029-09/2009 (em anexo).

Excluíram-se os animais que não apresentaram lesão extensa segundo o padrão de oclusão da artéria cerebral média após análise qualitativa. Todos os animais com MCAO e lesão padrão foram incluídos.

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

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

<b>Grupos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Número</b>
<b>G1</b>	Animais isquêmicos tratados com solução salina estéril e perfundidos em 8 dias	4
<b>G2</b>	Animais isquêmicos tratados com indometacina e perfundidos em 8 dias	4
<b>G3</b>	Animais isquêmicos tratados com solução salina estéril e perfundidos em 14 dias.	4
<b>G4</b>	Animais isquêmicos tratados com indometacina e perfundidos em 14 dias.	4
<b>Total</b>		<b>16</b>

## 2.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS E OCLUSÃO DA ARTÉRIA CEREBRAL MÉDIA

O modelo de oclusão da artéria cerebral média foi induzido com microinjeções do peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (ET-1) (Sigma, USA), 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 de rotina em nosso laboratório (CARDOSO, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2007; FRANCO, 2009; SILVA, 2011; SOUZA-RODRIGUES *et al.*, 2008) e possui vantagens e facilidades técnicas (DURUKAN & TATLISUMAK, 2007), em relação aos modelos tradicionais de isquemia experimental que consistem no clampeamento de artérias cerebrais através de cirurgia complexa (ZHAO *et al.*, 1994; WINDLE *et al.*, 2006).

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 (i.p). Depois de verificada a remissão dos reflexos de retirada da pata e corneano, fez-se tricotomia e assepsia na cabeça do animal. Os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico (EFF-336, Insight®) 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 com auxílio de microscópio cirúrgico, efetuou-se um orifício na calota craniana com uma broca, e posteriormente, a dura-máter foi rasgada para propiciar a visualização do córtex

cerebral. Depois de realizado o orifício prévio, introduziu-se uma micropipeta de vidro, com ponta de 10-20 $\mu$ m e graduações de 1 $\mu$ l (Sigma, USA), para injeção de 20 pMol de ET-1 diluídos em 1 $\mu$ l de solução salina estéril diretamente na porção lateral do estriado ventral. Uma pequena quantidade de azul colanil foi adicionada à solução de ET-1 para a identificação mais precisa do sítio de injeção.

Após a injeção, a micropipeta permaneceu estacionária por 5 minutos no parênquima nervoso 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 8 e 14 dias.

Após a MCAO induzida por microinjeções de 20 pMol de ET-1, os animais foram avaliados a fim de se averiguar possíveis déficits motores.

### 2.3 TRATAMENTO COM INDOMETACINA

Para o bloqueio da ativação microglial, utilizamos o protocolo adaptado de HOEHN *et al.* (2005) e MONJE *et al.* (2003). Os animais experimentais dos grupos 2 e 4 (n=4/grupo) receberam injeções intraperitoneais (2,5 mg/Kg) de indometacina (Sigma-Aldrich), duas vezes ao dia, por 7 dias, começando 24 horas após a MCAO. Os grupos 1 e 3 (n=3/grupo) receberam injeções intraperitoneais do mesmo volume de solução salina estéril a 0,9%, obedecendo-se as mesmas estratégias em relação a horários, intervalos de tempo e volumes da solução.

## 2.4 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após os tempos de sobrevivência especificados, os animais foram profundamente anestesiados como previamente descrito e perfundidos através do ventrículo esquerdo com 250 a 300 ml de solução salina tamponada (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) e heparinizada, seguida de 250 a 300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Após a retirada dos encéfalos com auxílio de tesoura e alveolótomo, os mesmos foram pós-fixados durante 24 horas no mesmo fixador usado na perfusão e crioprotetidos em concentrações crescentes de sacarose diluída em uma mistura de glicerina com PB 0,05M (pH 7,2 – 7,4) (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Após a crioproteção, os encéfalos foram imersos em gel (*tissue tek*) para confecção dos blocos de corte e cortados em criostato (Carl Zeiss, Mícron, HM505E, Alemanha), com o qual se obteve secções coronais de 20µm de espessura contendo a região estriatal com a lesão isquêmica. As secções foram diretamente montadas em lâminas gelatinizadas 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, inflamação e migração de neuroblastos após isquemia estriatal, utilizou-se os seguintes anticorpos:

a. Anti-ED-1 (Serotec®, 1:200): Marcador de micróglia/macrófagos ativados. Reconhece um epítipo na membrana de lisossomas de macrófagos ativados (Dijkstra *et al.*, 1985).

b. Anti-Iba1 (1:1000, Wako): Marcador de microglia/macrófago geral. Reconhece uma proteína quelante de cálcio expressa exclusivamente em microglia (Ito *et al.*, 1998);

c. Anti-NeuN (1:100, Chemicon): Marcador de neurônios maduros. Reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios diferenciados (MULLEN *et al.*, 1992);

d. Anti-DCX (1:400, Santa Cruz Biotechnology): Marcador de neuroblastos migratórios. Reconhece uma proteína chamada *doublecortin* associada a microtúbulos de neurônios imaturos (neuroblastos) (GLEESON *et al.*, 1999);

O protocolo de imunistoquímica 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, foram 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 imunistoquímica (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, em que as secções foram novamente lavadas em PBS, dessa vez com solução de PBS/Tween® (5 minutos) e, em seguida, incubadas em soro normal de cabra (anticorpo anti-Iba1) ou soro normal de cavalo (para marcação com anti-ED1, anti-NeuN e anti-DCX), 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; Iba1), anti-camundongo feito em cavalo (1:100; ED1 e NeuN) ou anti-cabra feito em cavalo (1:100; DCX) por 2 horas. Faltando 1 hora para o término da incubação no anticorpo secundário, preparou-se a solução de ABC e esta ficou em repouso até sua utilização. Após nova lavagem, as secções foram incubadas no complexo avidina-biotina – peroxidase (kit ABC dos laboratórios Vector®) por mais 2 horas. Em seguida, fizeram-se quatro novas lavagens (PBS/Tween, 5 minutos) 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 (ECLIPSE 50i, Nikon®) e as

imagens foram captadas por câmera fotográfica (5 MPixels – 5500 – Moticam®) acoplada a microscópio óptico (ECLIPSE 50i – Nikon®).

A análise quantitativa para a investigação dos padrões de ativação microglial e perda neuronal, consistiu na contagem do número de macrófagos/microglia ativados (células ED1+), corpos neuronais (células NeuN+) de todos os grupos experimentais, utilizando objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm<sup>2</sup> acoplada a ocular de um microscópio óptico (ECLIPSE 50i – Nikon®). Utilizou-se nas contagens 3 secções por animal e 16 campos por secção, todos na região estriatal no centro e penumbra isquêmica (Figura 3), e, no mínimo, 3 animais para cada grupo experimental.

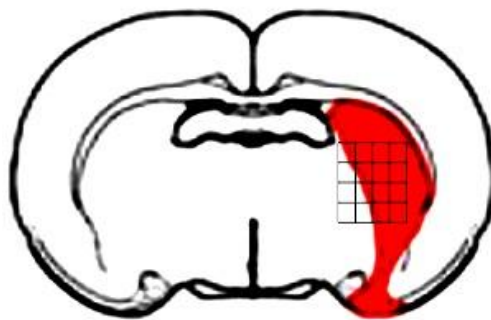


Figura 3: Análise quantitativa de células ED1+, NeuN+, caspase 3 ativa+ e DCX+ na região estriatal: contagem de 16 campos por secção na área de penumbra e centro isquêmico após MCAO. Fonte: Imagem adaptada de Engel *et al.*, 2011.

A contagem de neuroblastos migratórios (células DCX+) utilizou o protocolo adaptado de Thored *et al.* (2007). As contagens foram realizadas em toda extensão da zona subventricular ipsilateral à lesão e na região estriatal (Figura 4). A contagem dos neuroblastos estriatais foram realizadas em 16 campos na região de lesão isquêmica. Utilizou-se 3 secções por animal e, pelo menos, 3 animais para cada grupo experimental.

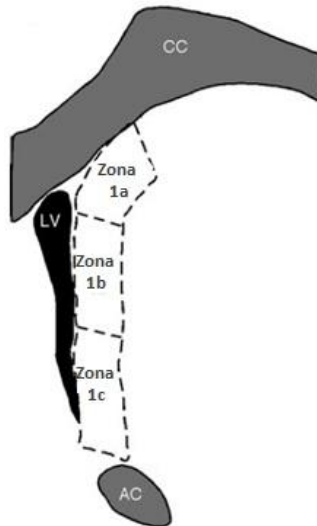


Figura 4: Análise quantitativa de células DCX+ na zona subventricular (Zona 1a, 1b e 1c). CC indica o corpo caloso; LV: ventrículo lateral; AC: comissura anterior. Fonte: Imagem adaptada de Thored *et al.*, 2007.

As células Iba1+ não foram contadas, posto que a marcação feita com anti-Iba1 teve como intuito apenas a caracterização morfológica das células microgliais ativadas, as quais foram quantificadas através das contagens das células ED1+.

## 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 serão realizadas no programa *GraphPad* (Prism 5.0).



### 3 RESULTADOS

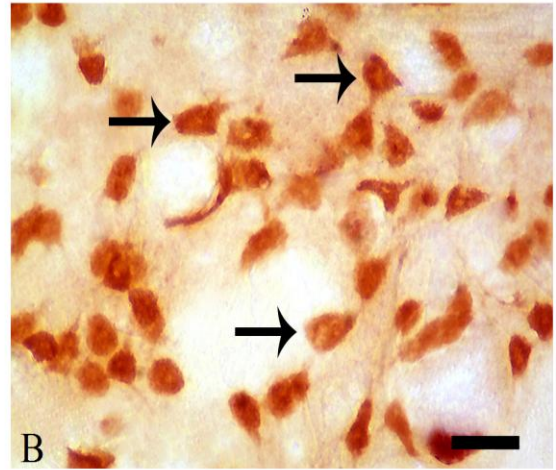
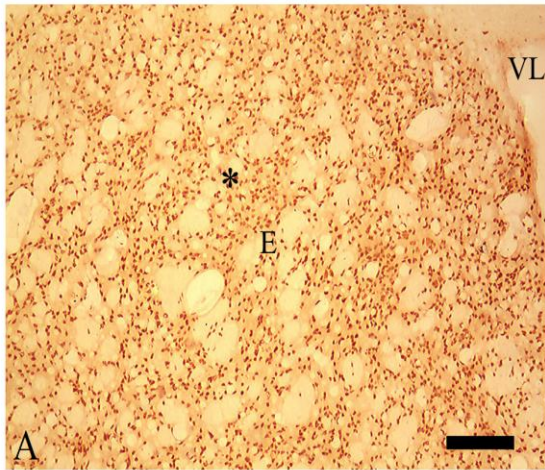
#### 3.1 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES E PERDA NEURONAL CARACTERÍSTICOS DE LESÃO ISQUÊMICA

Observou-se que todos os animais apresentaram desvio ipsilateral do tronco, permaneceram 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.

A perda neuronal foi avaliada através da imunistoquímica para NeuN, um marcador específico de corpos neuronais maduros (MULLEN *et al.*, 1992), em 8 e 14 dias após MCAO. Observou-se intensa perda neuronal no estriado após a indução isquêmica com microinjeções de ET-1 nos tempos de sobrevida especificados (Figura 5). Isso foi claramente reconhecido pelo desaparecimento de corpos neuronais no centro isquêmico em todos os grupos experimentais comparados ao estriado contralateral à lesão (Figura 4A-J). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios utilizando o modelo da MCAO (THORED *et al.*, 2009).

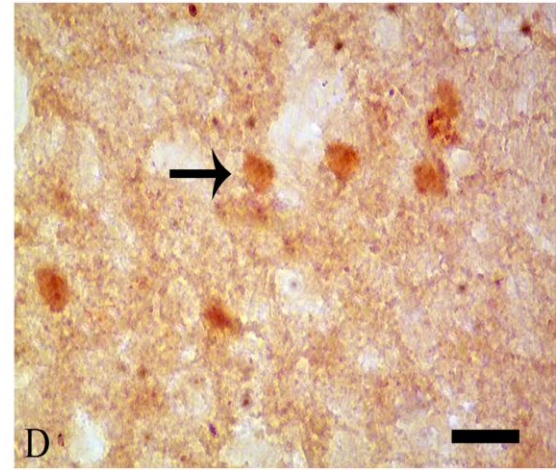
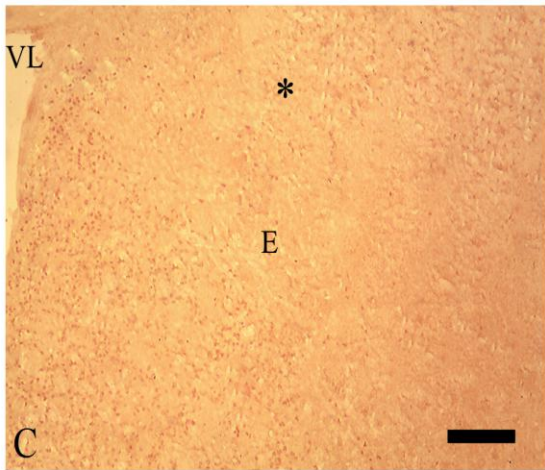
O tratamento com indometacina aparentemente não induziu redução da área isquêmica, quando comparado com valores dos animais isquêmicos que receberam somente solução salina. Os animais do grupo G1 (isquêmicos tratados com solução salina) apresentaram mais células NeuN+ (média de  $\pm 50,3$ ) que G2 (média  $\pm 42,1$ ). Foi verificado aumento significativo do número de neurônios em G4 ( $\pm 47,9$ ) após a MCAO em relação ao grupo G2, mas não houve diferença em relação a G1, neste mesmo tempo de sobrevida (Figura 5 K).

CONTRALATERAL



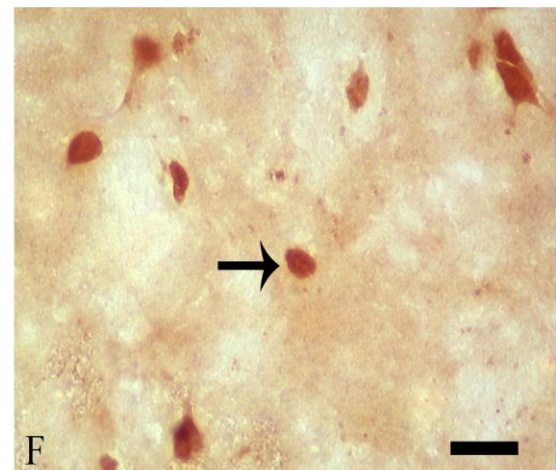
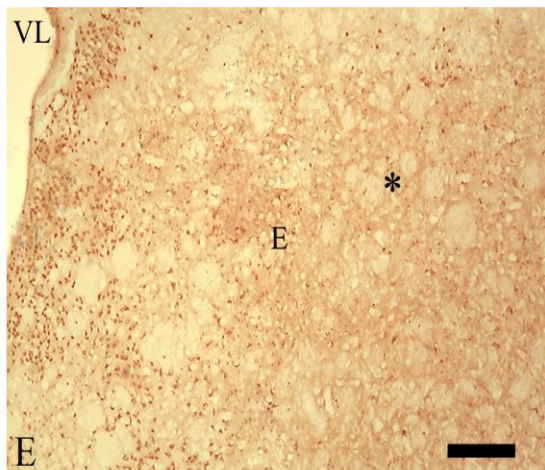
CONTROLE

8D

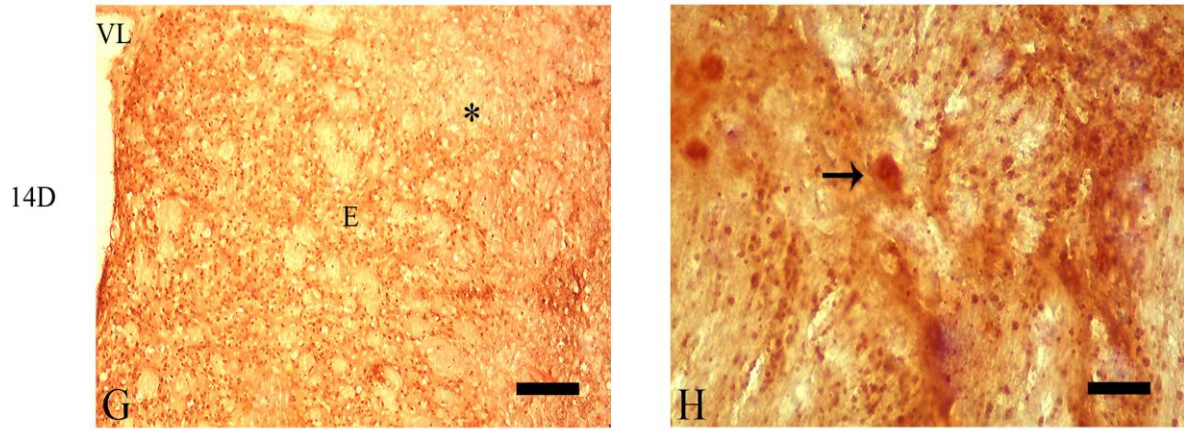


INDOMETACINA

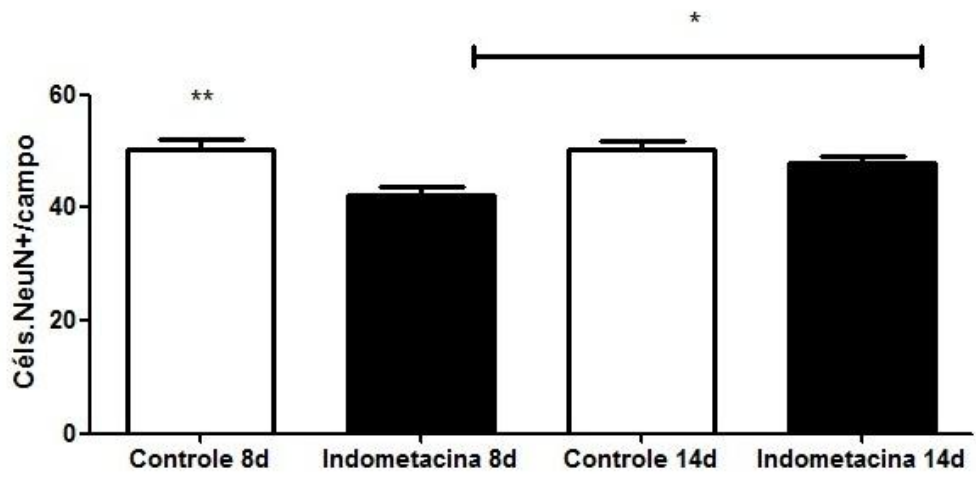
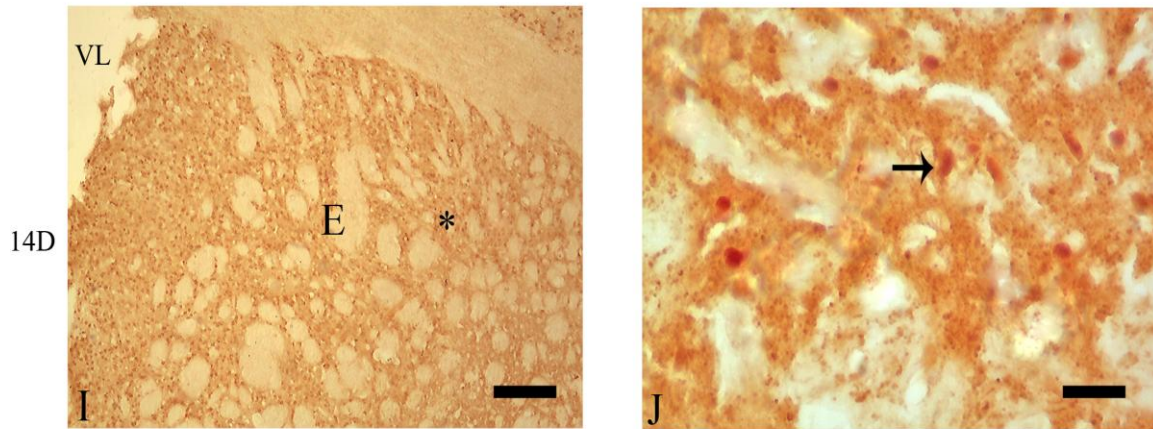
8D



CONTROLE



INDOMETACINA



K

Grupos experimentais

Figura 5: Perda neuronal após MCAO revelada pela imunistoquímica para NeuN. Lado contralateral do estriado de um animal isquêmico tratado com solução salina estéril (A-B). Animais isquêmicos tratados com salina estéril ou indometacina 8 (C-D e E-F) e 14 dias (G-H e I-J) após MCAO. Quantificação do número de células NeuN+ nos tempos de sobrevivência especificados (K). Apesar de haver diferença estatística entre animais isquêmicos tratados com salina e indometacina no tempo de sobrevivência de 8 dias (\*\*p <0,001, ANOVA / Tukey), não houve diferença entre tratado e controle em 14 dias (\*p>0,05 ANOVA / Tukey). As setas apontam para células NeuN+. O asterisco indica o centro de lesão, com exceção do lado contralateral que representa apenas o local escolhido para o maior aumento correspondente. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado) Escala: 400 µm (A, C, E, G); 40 µm (B, D, F, H).

### 3.2 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA INIBIU A ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS MCAO

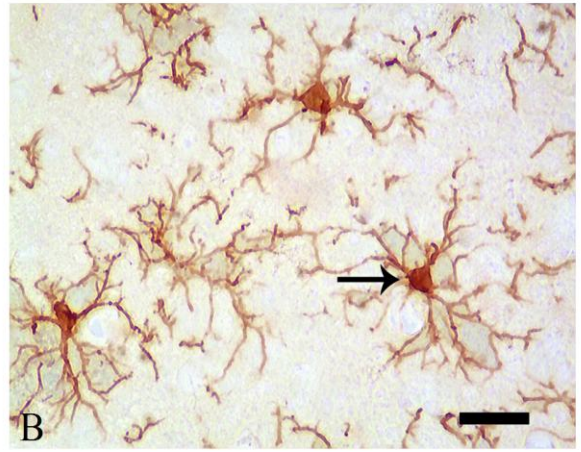
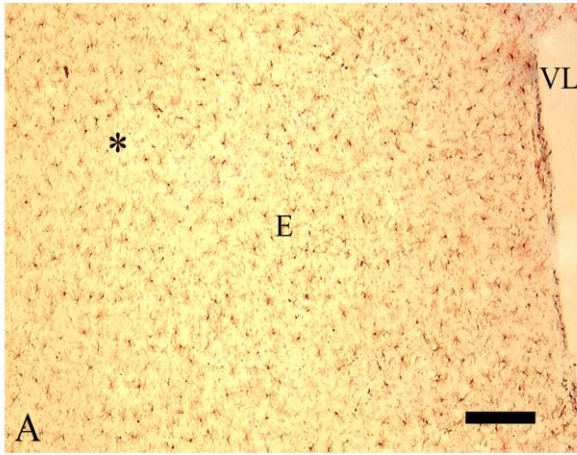
Avaliamos os padrões de ativação microglial após MCAO utilizando dois anticorpos: o Iba1, um marcador específico de microglia ativada e não ativada (ITO et al., 1998) e o ED1, um marcador de células altamente fagocíticas (macrófagos). Houve intensa ativação microglial 8 e 14 dias após a MCAO, como revelado por ambas as imunistoquímicas (Figuras 6 e 7). No lado contralateral à lesão, as células microgliais apresentaram um perfil ramificado, característico de situações não patológicas (Figura 6A-B). Oito dias após a MCAO, as células microgliais tornaram-se hipertróficas, com encurtamento de prolongamentos celulares e hipertrofia de corpos celulares (Figura 6C-D). As células apresentaram morfologia principalmente ameboide e arredondada, o que caracteriza a progressão de microglia para macrófagos (Figura 6D). Nas regiões do centro isquêmico, foram encontradas células microgliais principalmente arredondadas (fagócitos), enquanto que na região perinfarto foram principalmente amebóides (Figura 6C-D).

Quatorze dias após MCAO, as células microgliais continuavam muito ativadas (Figuras 6G-H e 7E-F), apesar de uma certa diminuição no padrão de ativação. As

células arredondadas, ED1+, foram mais frequentes na região periinfarcto (Figura 7E-F).

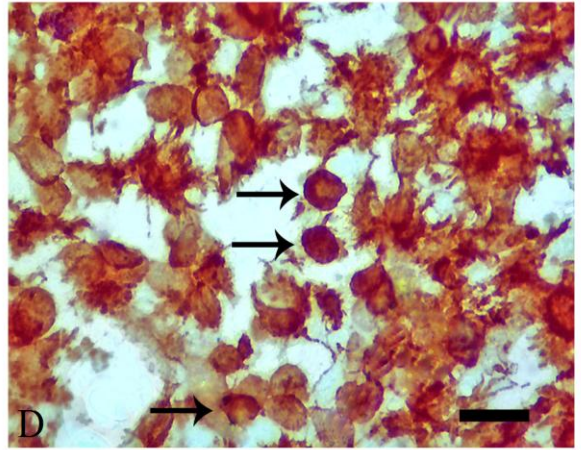
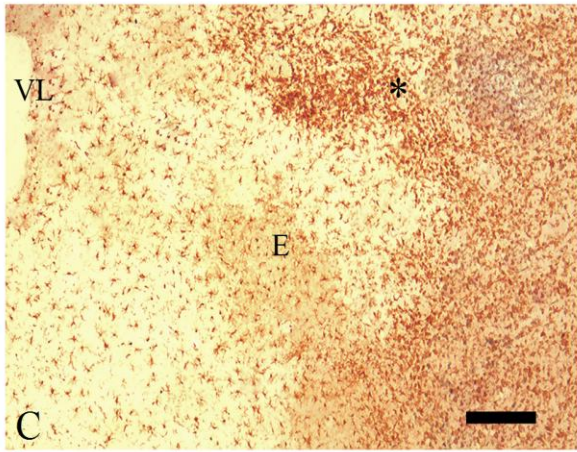
Para avaliarmos de forma quantitativa o padrão de ativação microglial entre 8 e 14 dias após MCAO, nós contamos o número de células ED1+ do estriado nestes tempos de sobrevivência. As contagens revelaram um pico de ativação microglial em 8 dias, com certa diminuição do número de células ED1+ 14 dias após a MCAO, apesar deste número permanecer elevado (Figura 7I).

CONTRALATERAL



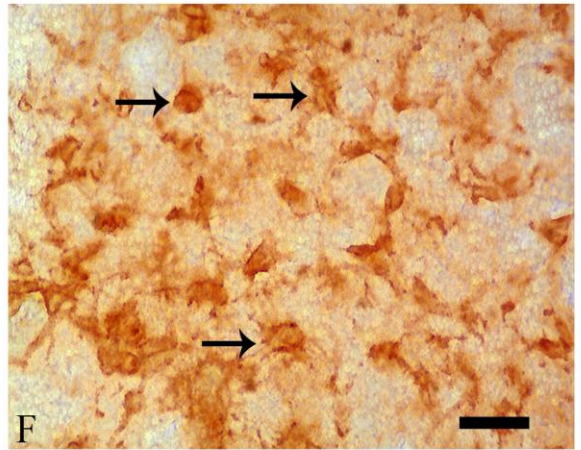
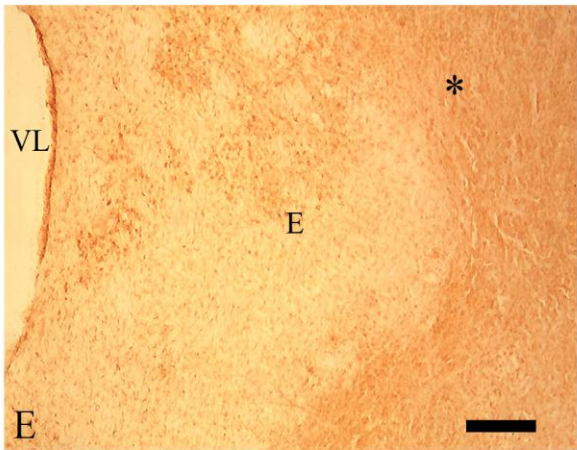
CONTROLE

8D



INDOMETACINA

8D



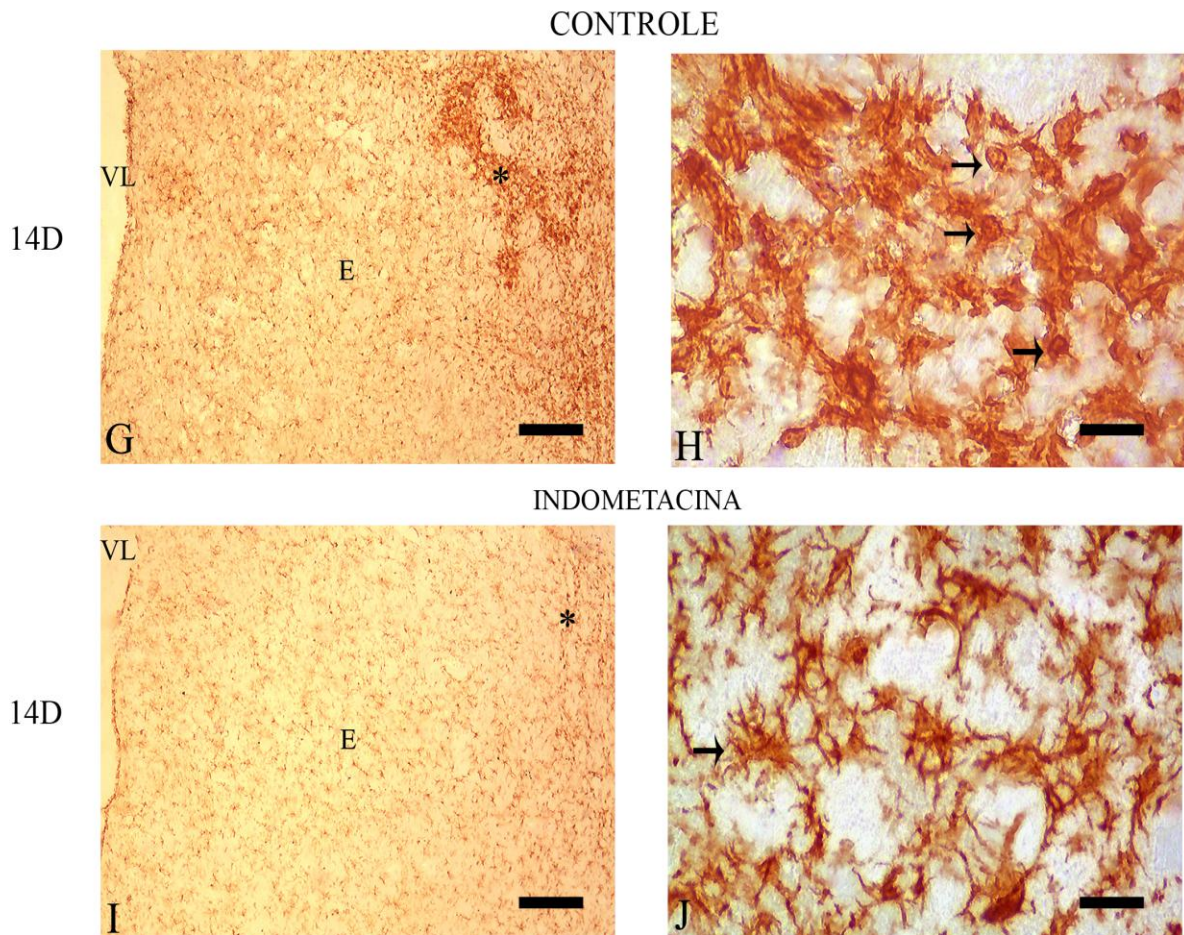
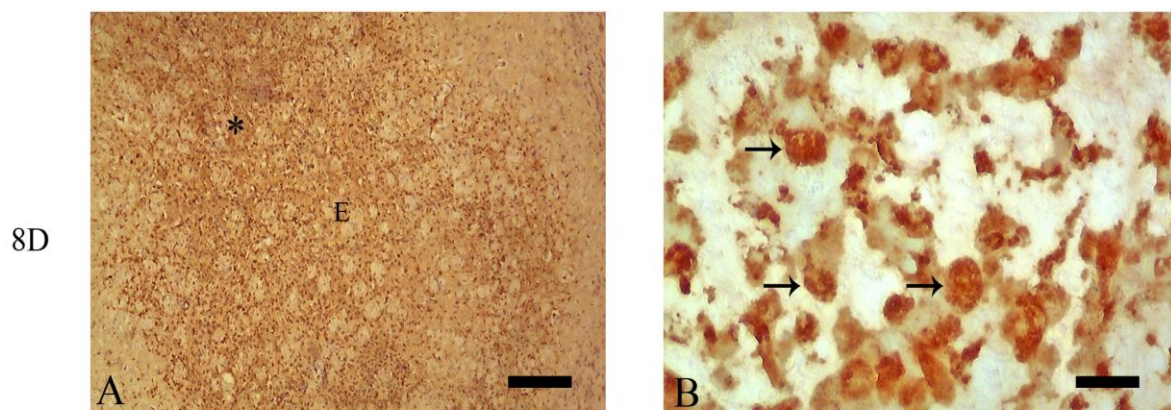


Figura 6: Padrão de distribuição celular microgliais/macrofágicas: no lado contralateral à lesão a distribuição é homogênea (A), células isoladas e extremamente ramificadas (B). O lado ipsilateral à lesão em animais controle 8 e 14 dias após a MCAO, mostrando intensa marcação Iba1+ no centro da lesão (C e G) e com morfologia predominantemente de células arredondadas e amebóides (D e H). Diferenças no recrutamento, para o centro da lesão, desse tipo celular em animais tratados com indometacina são observadas com redução notória de células marcadas por Iba1 8 e 14 dias após a MCAO (E e I) e com morfologia típica de células com padrão amebóide, intermediário de ativação e algumas isoladas (F e J). As setas apontam para células Iba+ e seus padrões morfológicos variados.\* 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  $\mu$ m (A, C, E, G, I); 40  $\mu$ m (B, D, F, H, J).

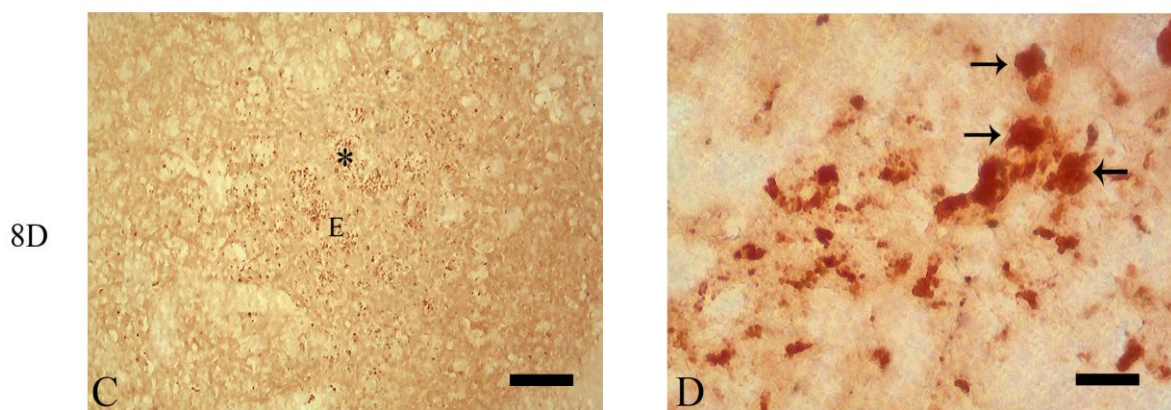
O tratamento com indometacina diminuiu a ativação microglial em G2 (média de  $\pm 6,9$ , não significativamente) (Figuras 6E-F, 7C-D, I) e G4 (média de  $\pm 3,0$ , significativamente) (Figuras 6I-J, 7G-I), em relação aos animais tratados com salina estéril ( $p < 0,001$ , ANOVA / Tukey). Em 14 dias após MCAO, onde houve uma redução de 62% do número de células ED1+ em relação aos animais tratados com salina estéril (Figura 7I,  $p < 0,001$ , ANOVA / Tukey). Além da redução numérica induzida pela indometacina, o padrão morfológico de ativação microglial foi consideravelmente inibido por este anti-inflamatório, o que foi revelado pela análise anteriormente relatada com o anticorpo Iba1 (Figura 6I-J).



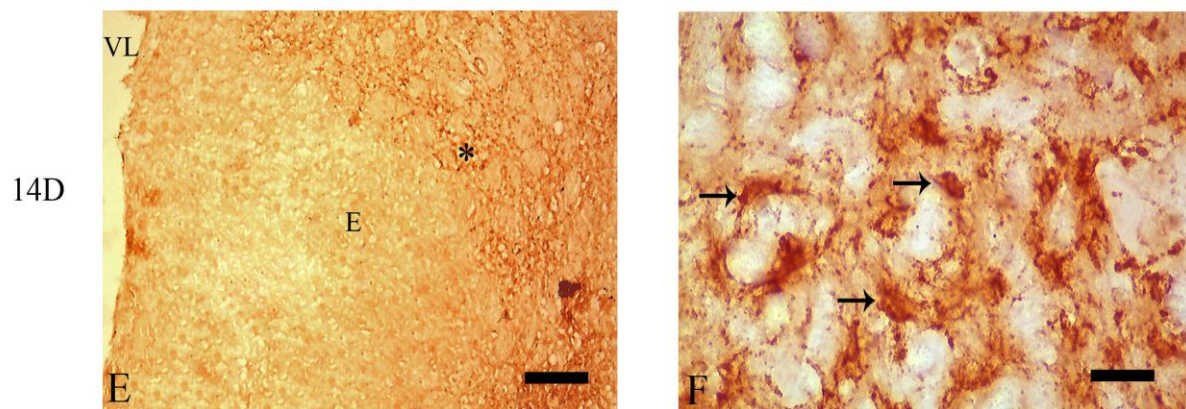
CONTROLE



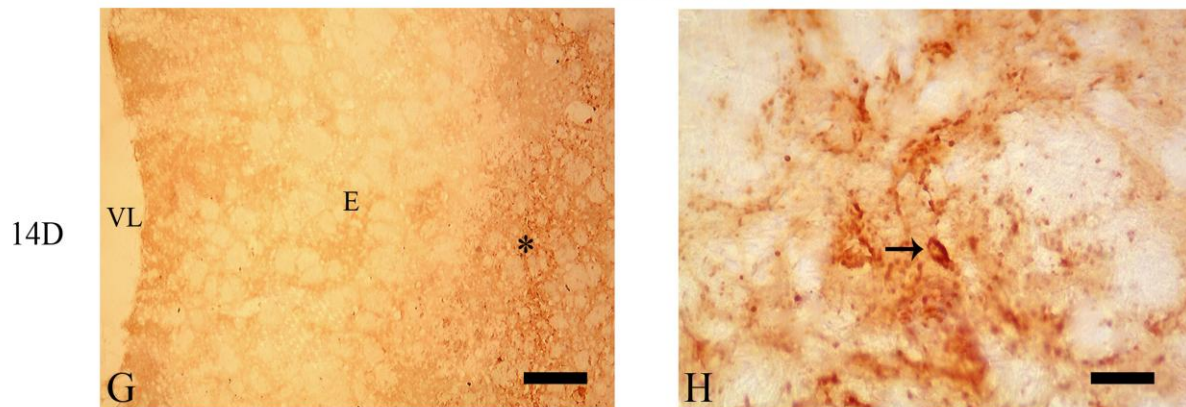
INDOMETACINA

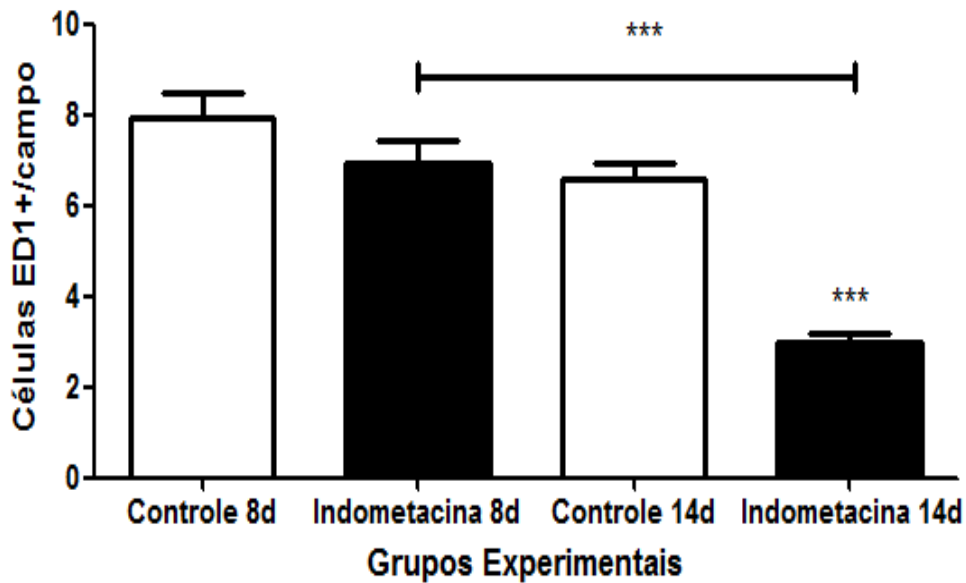


CONTROLE



INDOMETACINA





I

Figura 7: Ativação microglial/macrofágica após indução da isquemia: no centro isquêmico (A, C, E, G). Redução no número de células microgliais/macrofágicas ativadas após tratamento com indometacina em comparação com grupos controle, tratados apenas com salina estéril (B, D, F,H). Dados quantitativos (I) revelaram a redução significativa de células estriatais ED1+, em animais tratados com indometacina no grupo de 14 dias de sobrevivência após MCAO ( $p < 0,001$ ) e também significativa quando comparado ao grupo de animais tratados com indometacina e de 8 dias de sobrevivência ( $p < 0,001$ , ANOVA / Tukey). As setas apontam para as células ED1+ e seu padrão morfológico de micróglia/macrófago arredondado, típicos de ativação.\* Centro de lesão. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado). Escala: 400  $\mu\text{m}$  (A, C, E, G); 40  $\mu\text{m}$  (B, D, F, H).

### 3.3 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA AUMENTOU A QUANTIDADE DE NEUROBLASTOS NA SVZ E NO ESTRIADO APÓS MCAO

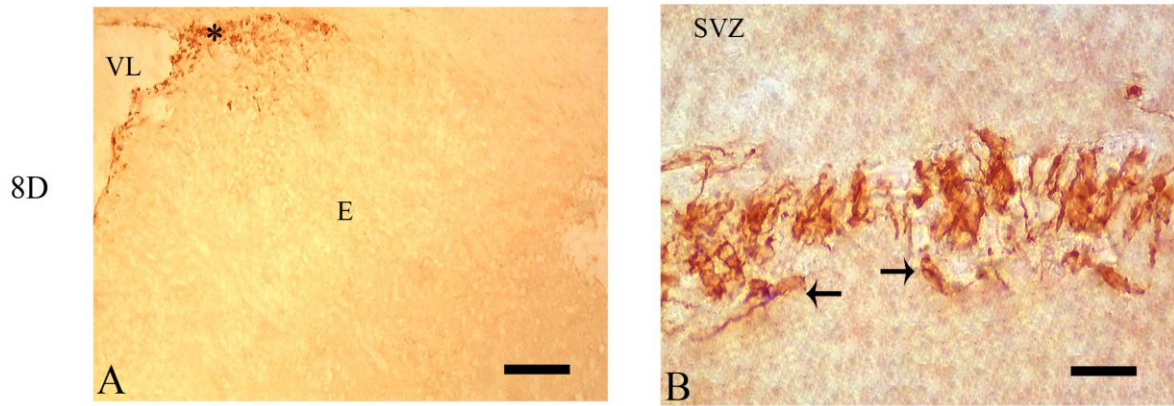
Para avaliar a neurogênese na SVZ e no estriado, utilizou-se a imunohistoquímica para DCX, com marcação específica para neuroblastos (Figura 8A-H). Oito dias após a indução de MCAO, verificou-se um aumento do número de neuroblastos na SVZ (Figura 8A-B). Estas células migraram em pouca quantidade para o estriado isquêmico neste tempo de sobrevivência (Figura 8A). Quatorze dias após a MCAO, o número de neuroblastos na SVZ continuava alto (Figura 8E-F) e houve maior migração de neuroblastos migratórios para o estriado isquêmico (Figura 8G-H).

O tratamento com indometacina aumentou o número de neuroblastos na SVZ (Figura 8D e H) em relação ao grupo controle (Figura 8 B e F) em ambos os tempos de sobrevivência avaliados, porém, este aumento foi significativo apenas em G4 (média de  $\pm 124,8$  células) após MCAO (Figura 8I,  $p < 0,001$  ANOVA / Tukey). Os animais isquêmicos tratados com indometacina apresentaram um aumento de até 141,2% no número de células DCX+ na SVZ em relação ao G3 (média de  $\pm 51,7$  células). Quando comparados aos do G2 (média de  $\pm 71,7$  células), esse aumento foi de aproximadamente 74% (Figura 8I,  $p < 0,001$  ANOVA-Tukey).

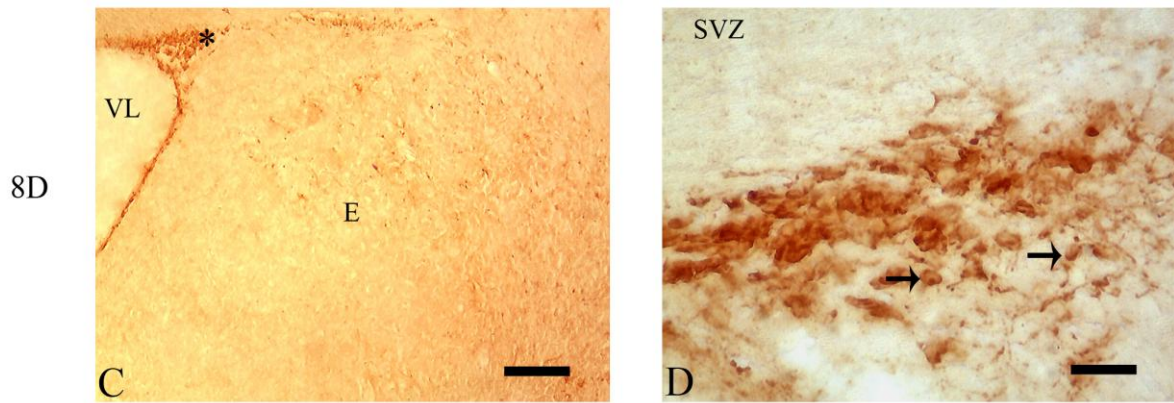
O tratamento com indometacina aumentou significativamente o número de neuroblastos migratórios para o estriado em ambos os tempos de sobrevivência investigados (Figura 9,  $***p < 0,001$  ANOVA-Tukey). No entanto, o aumento foi mais significativo 14 dias após a indução de MCAO (Figura 9,  $***p < 0,001$  ANOVA-Tukey). Em valores percentuais, esse aumento foi de 166,7% (média de  $\pm 0,8$  células) em G2 e de 40,8% (média de  $\pm 1,4$  células) em G4, em relação aos animais isquêmicos tratados com salina estéril (Figura 9I). No entanto, a comparação entre tempos de sobrevivência

revelou que o tratamento com indometacina induziu um aumento de 82% no número de neuroblastos migratórios estriatais em relação ao tempo de sobrevivência de 9 (Figura DCX 2, \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA-Tukey).

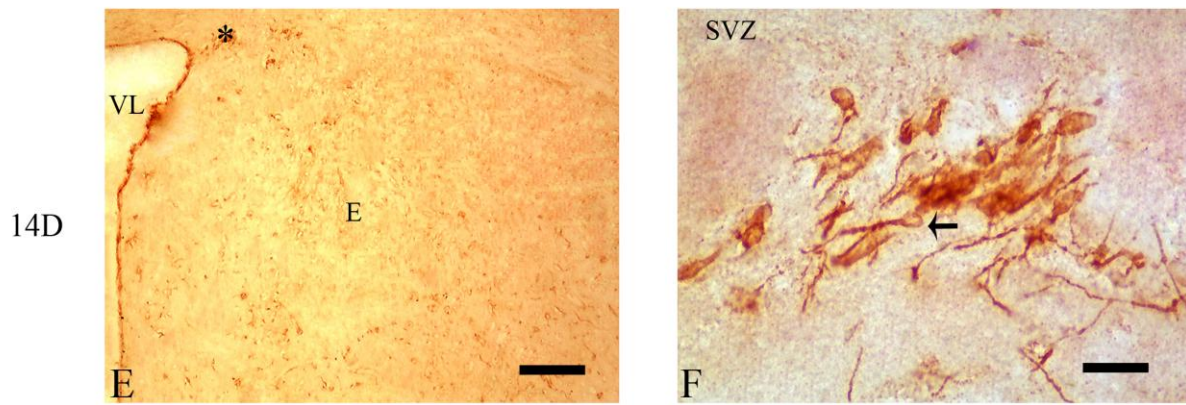
CONTROLE



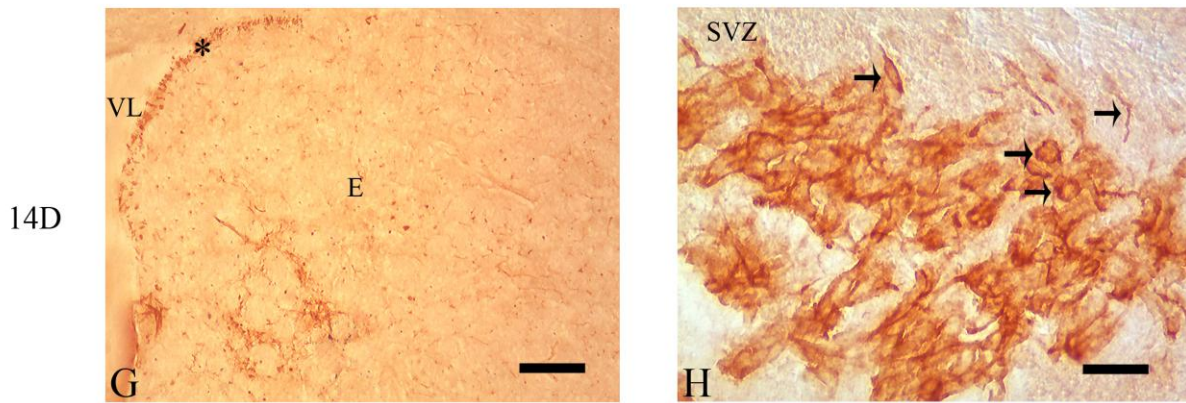
INDOMETACINA

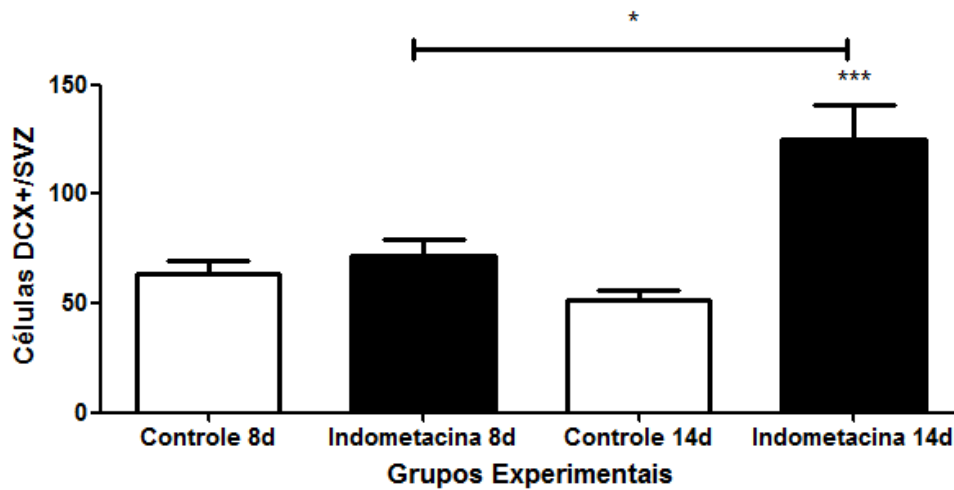


CONTROLE



INDOMETACINA





I

Figura 8: Neurogênese após lesão isquêmica por MCAO, neuroblastos marcados com DCX na SVZ (A-G). Aumento no número de células DCX+ em animais tratados com indometacina (C e D, G e H) em relação aos controles (A e B, E e F). A análise quantitativa (I) demonstrou aumento significativo (\*\* $p < 0,001$  ANOVA-Tukey) do número de neuroblastos na SVZ de animais tratados com indometacina avaliados 14 dias após isquemia quando comparado aos controles de 8 e 14 dias e aumento significativo ( $p < 0,05$  ANOVA-Tukey) quando comparado ao grupo tratado com indometacina de 8 dias de sobrevivência. As setas apontam para as células DCX+.\* SVZ representada em aumento maior nas figuras de maior aumento na coluna à direita. VL (Ventrículo lateral). E (Estriado). SVZ (Zona Subventricular). Escala: 400 um (A, C, E, G); 40um (B, D, F, H).

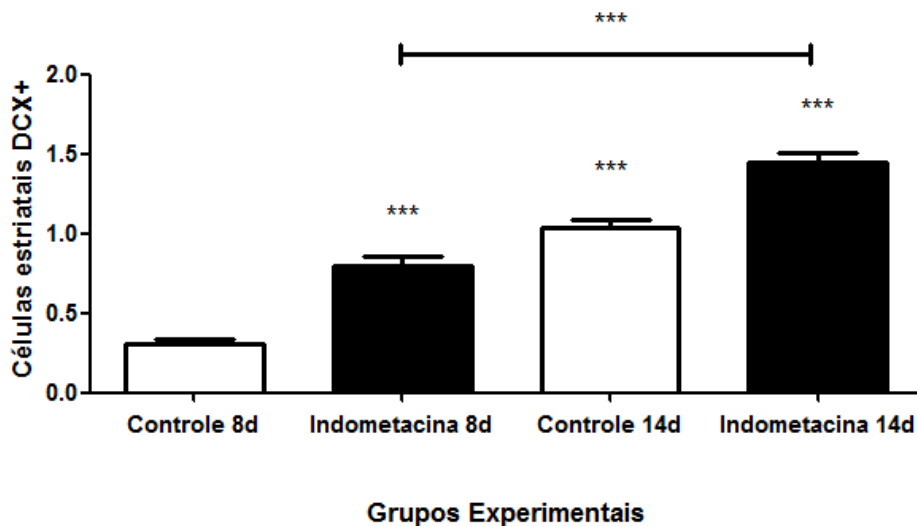


Figura 9: Quantificação do número de células DCX+ no estriado em todos os grupos experimentais. Notar que o tratamento com indometacina aumentou de maneira significativa o número de células DCX+ no estriado isquêmico em ambos os tempos de sobrevivência avaliados. Observa-se também uma diferença estatisticamente significativa no número de células estriatais DCX+ entre os animais tratados com indometacina em 8 e 14 dias (\*\* $p < 0,001$  comparação entre tratamento com indometacina e em relação aos tratados com salina – ANOVA / Tukey).

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nesta dissertação, 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 e perda neuronal entre 8 e 14 dias. O tratamento com indometacina diminuiu a ativação microglial, mas não induziu preservação de corpos neuronais nos tempos de sobrevivência investigados. No entanto, o tratamento com este anti-inflamatório não esteróide aumentou a quantidade de neuroblastos tanto na SVZ como neuroblastos migratórios para o estriado, principalmente 14 dias após MCAO.

O modelo de MCAO é o que melhor simula a doença humana, considerando a alta incidência de obstrução desta artéria em pacientes (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).

#### 4.2 O TRATAMENTO COM INDOMETACINA NÃO INDUZ NEUROPROTEÇÃO EM TEMPOS AGUDOS APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

O tratamento com indometacina não induziu neuroproteção nas primeiras duas semanas após MCAO. Estes resultados são similares aos obtidos por HOEHN *et al.*, (2005), utilizando um outro modelo experimental de MCAO. Em outro estudo, MONJE *et al.* (2003) também não encontraram preservação neuronal após tratamento com indometacina que tiveram perda neuronal por irradiação intracraniana.

No entanto, Sasaki *et al.*, (1988) relataram que o tratamento com indometacina (1 a 10 mg/Kg) induziu preservação de neurônios hipocâmpais após 5 minutos de isquemia global no esquilo da Mongólia (Gerbil). Não se sabe o porquê das diferenças mencionadas, mas os efeitos neuroprotetores da indometacina podem ser influenciados pelo modelo experimental e pela área investigada.

A minociclina induz neuroproteção em diversos modelos experimentais de distúrbios 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). Alguns estudos do nosso grupo sugerem que a minociclina induz preservação neuronal na primeira semana após isquemia cortical ou estriatal focal (FRANCO, 2009; CARDOSO, 2010). Outros inibidores microgliais, como o PJ34, induzem proteção neuronal após isquemia hipocâmpal (HAMBY *et al.*, 2007). Neste estudo, o PJ34, reduziu a perda neuronal no hipocampo em até 84%, em um modelo de isquemia global.

Os efeitos dos anti-inflamatórios podem estar relacionados à diminuição do bloqueio microglial e diversos outros efeitos pleiotrópicos, como previamente discutido



(YONG *et al.*, 2004). É possível que os mecanismos de ação da indometacina e minociclina possam diferir em suas vias moleculares, o que explicaria a ineficácia da indometacina em induzir neuroproteção na primeira semana em modelos de isquemia focal.

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

Neste estudo, a indometacina diminuiu significativamente, em até 62%, o número de células ED1+ no estriado isquêmico. Poucos autores investigaram o uso deste anti-inflamatório não esteróide como um inibidor microglial (MONJE *et al.*, 2003; HOEHN *et al.*, 2005). Relatou-se que o tratamento, via oral, de roedores com indometacina diminui a ativação microglial induzida por irradiação (MONJE *et al.*, 2003) ou MCAO (HOEHN *et al.*, 2005). HOEHN *et al.*, (2005) induziram MCAO pelo método do filamento e mostraram que o tratamento oral com indometacina diminuiu o percentual de células ED1+ durante várias semanas após MCAO. No entanto, neste estudo, não houve diminuição do número total de células microgliais, avaliado pela imunistoquímica para CD11b, um marcador geral de micróglia. Os autores não avaliaram os efeitos da indometacina sobre os padrões morfológicos microgliais, mas apenas sobre o número de células microgliais ativadas. Neste trabalho, utilizando a imunistoquímica para o anticorpo anti-Iba1, observamos que a indometacina diminuiu a ativação microglial, fazendo com que haja maior predominância de células microgliais com um padrão mais ramificado, como células intermediárias e amebóides na penumbra isquêmica. Outros estudos mostraram a

eficácia da indometacina em diferentes doses após outras desordens neurais em regiões extraestriatais (PHILLIS *et al.*, 1994; OGASAWARA *et al.*, 1999; PRECHEL *et al.*, 2000; KLUSKA *et al.*, 2005; INSTITORIS *et al.*, 2007; TASKIN *et al.*, 2009; TEELING *et al.*, 2010).

Estudos prévios de nosso grupo e de outros autores mostraram que outros anti-inflamatórios e/ou antibióticos, principalmente 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), 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 microgliais não são totalmente estabelecidos. Ambos anti-inflamatórios inibem enzimas pró-inflamatórias, incluindo as cicloxigenases (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999; HOEHN *et al.*, 2005). A indometacina é bloqueador não seletivo das enzimas pró-inflamatórias cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (HOEHN *et al.*, 2005). Este mecanismo pode ter grande influência na inibição microglial descrita nesta dissertação. A minociclina também inibe COXs (YRJANHEIKKI *et al.*, 1999), além de possuir diversos efeitos pleiotrópicos, como a inibição de metaloproteinases, NOS imunológica e proteína do grupo 1 de alta mobilidade (YONG *et al.*, 2004; HAYAKAWA *et al.*, 2008).

#### 4.4 INDOMETACINA PROMOVEU NEUROGÊNESE NA SVZ E INTENSIFICOU A MIGRAÇÃO DE NEUROBLASTOS PARA O ESTRIADO ISQUÊMICO

Nossos dados revelam que o tratamento com a indometacina aumentou a neurogênese na SVZ e o número de neuroblastos migratórios no estriado dos animais

isquêmicos 8 e 14 dias após a MCAO. Estes resultados estão de acordo com trabalhos previamente publicados, que relatam o efeito benéfico da indometacina sobre a neurogênese adulta no hipocampo (MONJE *et al.*, 2003; KLUSKA *et al.*, 2005), córtex e estriado (HOEHN *et al.*, 2005) após isquemia experimental.

Após MCAO, Hoehn *et al.* (2005) relataram aumento do número de neuroblastos migratórios para o estriado nas primeiras semanas após o evento isquêmico. Estes autores não quantificaram o número de neuroblastos na SVZ, o que foi feito no presente estudo. Além disso, neste estudo, o método de indução de MCAO usou microinjeções de ET-1, o que não havia sido investigado anteriormente na neurogênese no encéfalo adulto. Kluska *et al.* (2005) mostraram aumento de neurogênese hipocampal após isquemia cortical focal em animais tratados com indometacina.

O papel da ativação microglial sobre a neurogênese endógena induzida por isquemia adulta é controverso. Alguns estudos relatam que o bloqueio microglial com minociclina aumenta a neurogênese endógena nas primeiras semanas após MCAO (LIU *et al.*, 2007), enquanto que outros estudos sugerem que diminui a neurogênese estriatal (KIM *et al.*, 2009). Em um estudo recente com participação do nosso grupo, mostrou-se que as células microgliais podem liberar fatores tróficos como o IGF-1 no nicho neurogênico (SVZ), o que supostamente contribui para a sobrevivência ou proliferação de neuroblastos (THORED *et al.*, 2009). No entanto, um trabalho recente sugere que a ablação de células microgliais (MAC-1+) da SVZ com um anticorpo conjugado à saporina não interfere na migração de neuroblastos para o estriado (HELDMAN *et al.*, 2011). No entanto, as conclusões deste trabalho são questionáveis já que as células microgliais estriatais podem liberar fatores para atrair neuroblastos (THORED *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2006; YAN *et al.*, 2009) e a ablação mencionada foi restrita à SVZ.

Os papéis microgliais sobre a neurogênese endógena adulta podem ser diferentes, dependendo do local, por exemplo, SVZ ou estriado. A indometacina pode minimizar a ativação microglial excessiva que bloqueia a neurogênese, permitindo que células microgliais com uma ativação mais fisiológica exerça seus efeitos benéficos sobre esse fenômeno.

## **5. CONCLUSÃO**

- O tratamento com indometacina é um eficaz inibidor microglial nas primeiras duas semanas após MCAO induzida por microinjeções de ET-1;
- O tratamento com indometacina não induz preservação de neurônios adultos, 8 e 14 dias após MCAO;
- O tratamento com indometacina promove considerável aumento do número de neuroblastos tanto na SVZ como no estriado, nas primeiras duas semanas após MCAO;
- Os efeitos pró-neurogênicos da indometacina são uma abordagem promissora que pode contribuir para a recuperação funcional após AVE experimental e em humanos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. e JANEWAY, C.A., JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v.100, n.1, p.129-138, Jan 7. 2000.
- ABBAS, A.K. e SEN, R. The activation of lymphocytes is in their CARMA. **Immunity**. 2003. v.18, n.6, p.721-722.
- ABDIPRANOTO A, WU S, STAYTE S, VISSEL B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. Abr, 2008;7(2):187-210.
- AKOPOV, S.E.; SIMONIAN, N.A. & GRIGORIAN, G.S. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. **Stroke**, Oct. 1996; v.27, n.10, p.1739-1743.
- ALTMAN J, DAS GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol**.1965;124:319.
- ALTMAN J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **Anat Rec**. 1963;145:573.
- ALTMAN J. DNA metabolism and cell proliferation. In: Lajtha A, editor. **Handbook of Neurochemistry, Structural Neurochemistry**. 1969. Plenum Press; New York:. Vol. 2 p. 137.
- ALTMAN J. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. In: Quarten GC, Melnechuck T, Schmitt FO, editors. **The Neurosciences, First Program Study**. Rockefeller University Press; New York: 1967. p. 723.
- ALVAREZ-BUYLLA,A., SERI,B., DOETSCH,F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. **Brain Res Bull**. 2002. 57 (6): 751-8.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION: Heart Disease and Stroke Statistics – 2011 Update. Dallas, Texas: **American Heart Association**; 2011.
- ARUMUGAM, T.V.; GRANGER, D.N. & MATTSON, M.P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Medicine**, 2005. v.7, n.3, p.229-242.
- ARUNDINE M, TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**. Out-Nov, 2003;34(4-5):325-37.

ARUNDINE M, TYMIANSKI M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. **Cell Mol Life Sci.** Mar, 2004; 61(6):657-68.

ARVIDSSON A, COLLIN T, KIRIK D, KOKAIA Z, LINDVALL O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. **Nat Med.** 2002. 8:963-970.

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

BACIGALUPPI S, BACIGALUPPI M, TREDICI G. Solitary demyelinating plaques mimicking brain tumors: a tricky similarity. **J Postgrad Med.** Out-Dec, 2010;56(4):254-6.

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**, Sep 1. 2001,v.21, n.17, p.6480-6491.

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

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

BASTOS GN, MORIYA T, INUI F, KATURA T, NAKAHATA N. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. **Neuroscience.** Aug, 2008;155(2):454-62.

BATCHELOR, P.E.; LIBERATORE, G.T.; PORRITT, M.J.; DONNAN, G.A., HOWELLS, D.W. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor 71 expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. **European Journal of Neuroscience**, Oct. 2000, v.12, n.10, p.3462-3468.

BATCHELOR, P.E.; LIBERATORE, G.T.; WONG, J.Y.; PORRITT, M.J.; FRERICHS, F.; DONNAN, G.A. & HOWELLS, D.W. Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. **The Journal of Neuroscience** Mar 1. 1999, v.19, n.5, p.1708-1716.

BATTISTA, D., C. C. FERRARI, F. H. GAGE, AND F. J. PITOSI. Neurogenic niche BEDERSON J. B., PITTS L. H., GERMANO S. M., NISHIMURA M. C., DAVIS R. L., BARTKOWSKI H. M. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. **Stroke**. Nov Dec ,1986;17(6):1304-8.

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

BIERNASKIE J, CORBETT D, PEELING J, WELLS J, LEI H. A serial MR study of cerebral blood flow changes and lesion development following endothelin-1-induced ischemia in rats. **Magn Reson Med**. Oct, 2001;46(4):827-30.

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

BLOCK, M.L.; ZECCA, L. & HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, Jan. 2007.v.8, n.1, p.57-69.

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

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

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

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

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**, Oct 24. 2006. v.67, n.8, p.1390-1395.

BUTOVSKY, O. *et al.* Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Mol Cell Neurosci.** 2006, v.31, p. 149–160.

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

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**, May. 2003, v.33, n.5, p.1174-1182.

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

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

CEULEMANS AG, ZGAVC T, KOOIJMAN R, HACHIMI-IDRISSI S, SARRE S, MICHOTTE Y. The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **J Neuroinflammation.** 2010 Nov 1;7:74.

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



CHIU, I.M. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , 2008. v. 105, p. 17913– 17918.

CHOI, D. W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, February 1967, 7(2): 369-379.

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**, Jul. 2004, v.114, n.1, p.49-56,.

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**, 1993. v.31, n.5, p.565-572.

CORDEIRO DE SOUZA, C. Comparação dos tratamentos com minociclina e células da fração mononuclear da medula óssea na lesão aguda da medula espinhal. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 80 f. Abr. 2011.

COTA, A.M. & MIDWINTER, M.J. The immune system. **Anaesthesia and intensive care medicine**, 2009. v.10:5, n.Physiology, p.215-217.

DAS S., MANDAL A.K., GHOSH A., PANDA S., DAS N., SARKAR S.  
Nanoparticulated quercetin in combating age related cerebral oxidative injury. **Curr Aging Sci**. Dez, 2008;1(3):169-74.

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**, Jun. 2005. v.8, n.6, p.752-758.

DAVID R. RIDDLE AND ROBIN J. Lichtenwalner. Ioverview of neurogenesis in the adult brain **Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms**. Riddle DR, editor. Boca Raton (FL): 2007. **CRC Pres**;

DEL ZOPPO, G.J. & HALLENBECK, J.M. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. **Thrombosis Research**, May 1. 2000. v.98, n.3, p.73-81.

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

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

DOETSCH F, GARCÍA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. **J Neurosci**. Jul, 1997. 17(13):5046-61.

DOETSCH F, HEN R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. **Curr Opin Neurobiol**. Feb , 2005;15(1):121-8.

DOS SANTOS CDP-D, 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** .2007. 1172:130-144.

DOYLE KP, SIMON RP, STENZEL-POORE MP. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**. 2008. 55:310-318.

DURUKAN A, TATLISUMAK T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. **Pharmacol Biochem Behav**. 2007 May;87(1):179-97.

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

EKDAHL CT, CLAASEN JH, BONDE S, KOKAIA Z, LINDVALL O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proc Natl Acad Sci**. 2003. 100:13632-13637.

EKDAHL CT, KOKAIA Z, LINDVALL O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. **Neuroscience** .2009. 158:1021-1029.

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**, Jul 15. 1999, v.19, n.14, p.5910-5918.

EMERICH, D.F.; DEAN, R.L., 3RD & BARTUS, R.T. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? **Experimental Neurology**, Jan. 2002. v.173, n.1, p.168-181.

ENDRES M, LAUFS U, HUANG Z, NAKAMURA T, HUANG P, MOSKOWITZ MA, LIAO JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1998 Jul 21;95(15):8880-5.

ENGEL, O., KOLODZIEJ, S., DIRNAGL, U., PRINZ, V.; Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. **Journal of Visualized Experiments**. 2011

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

FETLER L, AMIGORENA S. Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol. **Science**. 2005 Jul 15;309(5733):392-3.

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

FOX, C.; DINGMAN, A.; DERUGIN, N.; WENDLAND, M.F.; MANABAT, C.; JI, S.; FERRIERO, D.M. & VEXLER, Z.S. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.25, n.9, p.1138-1149, Sep. 2005.

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

GAGE FH, RAY J, FISHER LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. **Annu Rev Neurosci**. 1995;18:159.

GAGE FH, COATES PW, PALMER TD, KUHN HG, FISHER LJ, SUHONEN JO, PETERSON DA, SUHR ST, RAY J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Dez,1995. 92(25):11879-83.

GAGE FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000;287:1433.

GAGE FH. Neurogenesis in the adult brain. **J Neurosci**. 2002 Feb 1;22(3):612-3.

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

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

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 SA, NOTTEBOHM F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1983, v.80, n.8, p.2390-2394.

GOMES-LEAL W, CORKILL DJ, FREIRE MA, PICANCO-DINIZ CW, PERRY VH. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**. 2004.190:456-467.

GOMES-LEAL W, CORKILL DJ, PICANCO-DINIZ CW .Systematic analysis of axonal damage and inflammatory response in different white matter tracts of acutely injured rat spinal cord. **Brain Res**. 2005. 1066:57-70.

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)**, 2002. v.205, n.4, p.291-300.

GOULD E, REEVES AJ, FALLAH M, TANAPAT P, GROSS CG, FUCHS E. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1999;96:5263.

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**, Set. 1988. v.21, n.1, p.18-24.

GUIMARÃES, J.S.; FREIRE, M.A.M.; LIMA, R.R.; PICANÇO-DINIZ, C.W.; PEREIRA, A.; GOMES-LEAL, W. Minocycline treatment reduces white matter damage after excitotoxic striatal injury. **Brain research**. v.1329, p. 182 – 193, 2010.

HAMBY, A. M., S. W. SUH, T. M. KAUPPINEN, AND R. A. SWANSON. Use of a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor to suppress inflammation and neuronal death after cerebral ischemia-reperfusion. **Stroke**. v. 38, p. 632-636, 2007.

HAWLISCH, H. & KOHL, J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. **Molecular Immunology**, v.43, n.1-2, p.13-21, Jan. 2006.

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

HENGARTNER, M. O. , BRYANT, J. A. Apoptotic cell death: from worms to wombats...but what about the weeds? **Symp. Soc. Exp. Biol.** 2000; 52:1 – 12.

HENSHALL D.C., BUTCHER, S. P., SHARKEY, J. A rat model of endothelin-3 induced middle cerebral occlusion with controlled reperfusion. **Brain Res**.1999. 834 (1 2): 105-11.

HERTZ,L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. **Neuropharmacology**. 2008. 55(3): 289-309.

HIROSE, K.; OKAJIMA, K.; TAOKA, Y.; UCHIBA, M.; TAGAMI, H.; NAKANO, K.; UTOH, J.; OKABE, H. & KITAMURA, N. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. **Annals of Surgery**, v.232, n.2, p.272-280, Aug. 2000.

HOEHN BD, PALMER TD, STEINBERG GK. Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. **Stroke**. 2005. 36:2718-2724.

INSTITORIS, A., FARKAS, E., BERCZI, S., SULE, Z., BARI, F. Effects of cyclooxygenase (COX) inhibition on memory impairment and hippocampal damage in the early period of cerebral hypoperfusion in rats. 2007, 574 (1): 29-38.

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

JAKUBS, K., BONDE, S., IOSIF, R.E., EKDAHL, C.T., KOKAIA, M., LINDVALL, OL. Inflammation regulates functional integration of neurons born in adult brain. **J Neuroscience**. 2008;28 (47): 12477-88.

JIANG, Y. et al. Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local Inflammation in rats. **Neuroscience**. v. 172, p. 398–405, 2011.

JIN, R.; YANG, G.; JIANG, Y. et al. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **J Leukoc Biol**. v. 87, p. 779–789, 2010.

JORDAN, J., T. SEGURA, D. BREA, M. F. GALINDO, AND J. CASTILLO. Inflammation as therapeutic objective in stroke. **Curr Pharm Des**. v. 14, p. 3549-3564, 2008.

KAPLAN MS, HINDS JW. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. **Science**.1977;197:1092.

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**, 1996. v.734, n.1-2, p.203-212.

KHAJA, A.M., GROTTA, J.C., 2007. Established treatments for acute ischaemic stroke. **Lancet**. v. 369, p. 319 - 330, 2007.

KLEIM J. A. et . Models of Upper Extremity Impairment in Stroke. **ILAR Journal**. 2007.v. 48, n. 4.

KLUSKA, M.M, WITTE, O. W., BOLZ, J., 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**. 2005. 135 (3): 732-735.

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

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

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

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

LAKHAN, S.E.; KIRCHGESSNER, A.; HOFER, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. **Journal of Translational Medicine**. 2009

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

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.

LEHNARDT, S.; SCHOTT, E.; TRIMBUCH, T.; LAUBISCH, D.; KRUEGER, C.;

WULCZYN, G.; NITSCH, R. & WEBER, J.R. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. **The Journal of Neuroscience**, 2008. v.28, n.10, p.2320-2331.

LIE, D.C., SONG, H., COLAMARINO, S.A., MING, G.L, GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. **Annu Ver Pharmacol Toxicol**. 2004;44: 399-421.

LIMA R.R., GUIMARAES-SILVA, J., OLIVEIRA, J.L., COSTA, A. M. R, SOUZA RODRIGUES, R., DOS SANTOS, C. D., PIKANÇO-DINIZ, C.W., GOMES-LEAL, W. Diffuse Axonal Damage, myelin impairment, astrocytosis and Inflammatory Response Following Microinjections of NMDA into The Rat Striatum. **Inflammation**. 2008. 31:24-35.

LINDVALL, O., KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**. 2006. 441:1094-1096.

LINFERT, D., CHOWDHRY, T., RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. **Transplant Rev (Orlando)**, 2009. 23 (1):1-10.

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

LIU Z., STAFSTROM C.E., SARKISIAN, M., TANDON, P., YANG, Y., HORI, A., HOLMES, G.L. Age- dependent effects of glutamate toxicity in the hippocampus. **Brain Res Dev Brain Res**. 1996. 23; 97 (2): 178-84.

LIU, B. & HONG, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, 2003. v.304, n.1, p.1-7.

LIU, N., CHEN, R., DU, H., WANG, J., ZHANG, Y., WEN, J. Expression of IL-10 and TNF-alpha in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells. **Cell Mol Immunol**. Jun, 2009; 6(3):207-13.



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.

LIU, Z., FAN, Y., WON, S.J., NEUMANN, M., HU, D., ZHOU, L., WEINSTEIN, P.R., LIU, J. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. **Stroke**. 2007. 38:146-152.

LIU, J. Narasimhan, P., Yu, F., Chan, P. H. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. **Stroke**. 2005. 36 (6): 1264-9.

LO EH, DALKARA, T., MOSKOWITZ, M.A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. **Nature reviews neuroscience** 2003. 4:399-415.

LO EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nat Med**. 2008. 14:497-500.

LOPEZ-REDONDO, F., NAKAJIMA, K., HONDA, S., KOHSAKA, S. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. **Brain Res Mol Brain Res**. 2000. 76 (2): 429-35.

LOTUFO PA. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Med J** 2005. 123:3-4.

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

LOVE S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathol**. v. 9, p. 119–31, 1999.

LUSKIN MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neuron derived from the forebrain subventricular zone. **Neuron**. 1993;11(1):173-89.

MABUCHI, T.; KITAGAWA, K.; OHTSUKI, T.; KUWABARA, K.; YAGITA, Y.; YANAGIHARA, T.; HORI, M. & MATSUMOTO, M. Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v.31, n.7, p.1735-1743, Jul. 2000.

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

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**, 2008. v.138, n.31-32, p.459-465.

MARTIN, H. G., WANG, Y.T. Blocking the deadly effects of the NMDA receptor in stroke. **Cell**. 2010. 140 (2): 174-6.

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**, 1996. v.22, n.1, p.44-53.

MCKAY R. Stem cells in the central nervous system. **Science**. 1997;276:66.  
MEHTA, S.L., NAMRATTA, M., RAGHUBIR, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. **Brain Research Review**. 2007; (54) 34-66.

MOALEM, G.; LEIBOWITZ-AMIT, R.; YOLES, E.; MOR, F.; COHEN, I.R. & SCHWARTZ, M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. **Nature Medicine**, v.5, n.1, p.49-55, Jan. 1999.  
modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Eur J Neurosci**. 2006, v. 23, p. 83-93.

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.

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

MOYANOVA SG, KORTENSKA LV, MITREVA RG, PASHOVA VD, NGOMBA RT, NICOLETTI. Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. **Brain Res**. 2007

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

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

NAPOLI, I.; NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. **Neuroscience**, 2009. v.158, n.3, p.1030-1038.

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

NEUMANN, H.; MISGELD, T.; MATSUMURO, K. & WEKERLE, H. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1998. v.95, n.10, p.5779-5784.

NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F., HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic. **Science**. 2005. 308 (5726): 1314-8.

NOTTEBOHM F, ALVAREZ-BUYLLA A, CYNX J, KIRN J, LING CY, NOTTEBOHM M, SUTER R, TOLLES A, WILLIAMS H. Song learning in birds: the relation between perception and production. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 1990; 329(1253):115-24.

OGASAWARA M, NAKAJIMA W, ISHIDA A, TAKADA G. Striatal perfusion of indomethacin attenuates dopamine increase in immature rat brain exposed to anoxia: an in vivo microdialysis study. **Brain Res**. 1999 Sep 25;842(2):487-90.

PARENT JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. **Neuroscientist**. 2003.9:261-272.

PENCEA, V., BINGAMAN, K.D., FREEDMAN, L.J., LUSKIN, M.B. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. **Exp. Neurol**. 2001. 172(1): 1-16.

PEREL, P., *et al.* Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. **British Medical Journal**. v. 334, p. 197 - 200, 2007.

PERÉZ-PINZON, M.A, SICK, T.J., ROSENTHAL, M. Mechanism(s) of mitochondrial hyperoxidation after global cerebral ischemia. **Adv. Exp. Med. Biol**. 1999. 471: 175-80.

PERRY, V. H., GORDON, S. Macrophages and the nervous system. **Int. Rev. Cytol.** 1991. 125: 203-44.

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

PERRY, V.H. Modulation of microglia phenotype. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 1994. v.20, n.2, p.177.

\_\_\_\_\_. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. **Journal of Neuroimmunology**, 1998. v.90, n.2, p.113-121.

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

PHILLIS JW, PERKINS LM, SMITH-BARBOUR M, O'REGAN MH. Transmitter amino acid release from rat neocortex: complete versus incomplete ischemia models. **Neurochem Res.** 1994 Nov;19(11):1387-92.

POLAZZI E, MONTI B. Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. **Prog Neurobiol.** 2010 Nov;92(3):293-315.

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.

PRECHEL MM, DING C, WASHINGTON RL, KOLODZIEJ MS, YOUNG MR. In vivo indomethacin treatment causes microglial activation in adult mice. **Neurochem Res.** 2000 Mar;25(3):357-62.

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.

RAMON y CAJAL, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York: Hafner; 1928.

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

REYNOLDS BA, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science**. 1992;255(5052):1707-10.

RIDDLE, D. R., LICHTENWALNER, R.J. Neurogenesis in the adult and aging brain. In: Riddle D.R., editor. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. **Frontiers in Neuroscience**. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007 Cap. 6.

RIQUELME PA, DRAPEAU E, DOETSCH F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2007

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.

SAWAMOTO K, WICHTERLE H, GONZALEZ-PEREZ O, CHOLFIN JA, YAMADA M, SPASSKY N, MURCIA NS, GARCIA-VERDUGO JM, MARIN O, RUBENSTEIN JL, TESSIER-LAVIGNE M, OKANO H, ALVAREZ-BUYLLA A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. **Science**. 2006 Feb 3;311(5761):629-32

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**. 1999. v.11, n.10, p.3648-3658.

SCHROETER ML, MERTSCH K, GIESE H, MÜLLER S, SPORBERT A, HICKEL B, BLASIG IE. Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. **FEBS Lett**. 1999 Apr 23;449(2-3):241-4.

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**, 2001. v.101, n.5, p.440-448.

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**, 1997. v.28, n.2, p.382-386.

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.

SCHWAB, J.M.; NGUYEN, T.D.; MEYERMANN, R. & SCHLUESENER, H.J. Human focal cerebral infarctions induce differential lesional interleukin-16 (IL-16) expression confined to infiltrating granulocytes, CD8+ T-lymphocytes and activated microglia/macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, 2001. v.114, n.1-2, p.232-241.

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

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.

SHARKEY, J., BUTCHER, S. P. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. 1995. **Journal of Neuroscience Methods**. (60) 125-131.

SIERRA, A., ENCINAS, J.M, DEUDERO, J.J., CHANCEY, J. H., OVERSRREET-WADICHE, L.S., TSIRKA, S.E., MALETIC-SAVATIC, M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. **Cell Stem Cell**. 2010. 7(4): 483-95.

SILVA, M.C. Tratamento com minociclina e células mononucleares da medula óssea após acidente vascular encefálico experimental. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. ICB/ UFPA. 130 f. Mai. 2011.

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

SLEE E. A., ADRAIN, C., MARTIN, S.J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. **Cell Death Differ.** 1999 Nov;6(11):1067-74.

SMIRKIN A, MATSUMOTO H, TAKAHASHI H, INOUE A, TAGAWA M, OHUE S, WATANABE H, YANO H, KUMON Y, OHNISHI T, TANAKA J. Iba1(+)/NG2(+) macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2010 Mar;30(3):603-15.

SOUZA-RODRIGUES RD, LIMA, R.R, GUIMARAES-SILVA, J,COSTA, A.MR, DOS SANTOS, C.D., PICAÑÇO- DINIZ, C.W, GOMES-LEAL, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. *Brain Research.* 2008. 1200C:78-88.

STEEBER DA, TANG ML, ZHANG XQ, MÜLLER W, WAGNER N, TEDDER TF. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and beta7 integrin. **J Immunol.** 1998 Dec 15;161(12):6638-47.

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 beta 7 integrin. **J.Immunol.** 1998. 161 (12): 6638-47.

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

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

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

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

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**, 1989. v.105, n.2, p.115-126.

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

SYNTICHAKI, P; TAVERNARAKIS, N. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nature Reviews** 2003. 4: 672-684;

TAOKA, Y.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; JOHNO, M. & NARUO, M. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. **Brain Research**, v.799, n.2, p.264-269, Jul 20. 1998.

TAŞKIN EI, AKGÜN-DAR K, KAPUCU A, OSANÇ E, DOĞRUMAN H, ERALTAN H, ULUKAYA E. Apoptosis-inducing effects of Morinda citrifolia L. and doxorubicin on the Ehrlich ascites tumor in Balb-c mice. **Cell Biochem Funct.** 2009 Dec;27(8):542-6.

TEELING JL, CUNNINGHAM C, NEWMAN TA, PERRY VH. 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 Behav Immun.** 2010 Mar;24(3):409-19.

THORED, P., ARVIDSSON, A., CACCI, E., AHLENIUS, H., KALLUR, T., DARSALIA, V., EKDAHL, C.T., KOKAIA, Z., LINDVALL, O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells.** 2006 Mar;24(3):739-47.



THORED, P., HELDMANN, U., GOMES-LEAL, W., GISLER, R., DARSALIA, V., TANEERA, J., NYGREN, J.M., JACOBSEN, S.E., EKDAHL, C.T., KOKAIA, Z., LINDVALL, O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. **Glia**. 2009 Jun;57(8):835-49.

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

VAN PRAAG H, KEMPERMANN G, GAGE FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**. 1999;2:266.

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

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

WALTON,N.M., SUTTER, B. M., LAYWELL, E. D., LEVKOFF, L. H., KEARNS, S. M., MARSHALL, G. P., SCHEFFLER, B., STEINDLER, D. A. Microglia Instruct Subventricular Zone Neurogenesis. **Glia**. 2006. (54): 815-825.

WANG Y, JIN K, GREENBERG DA. Neurogenesis associated with endothelin-induced cortical infarction in the mouse. **Brain Res**. 2007  
WINNER *et al.*,2011

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

WON, S. J., KIM, D. Y., GWAG, B. J. Cellular and Molecular Pathways of Ischemic Neuronal Death. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 35, No. 1, January 2002, pp. 67-86

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

YENARI MA, XU L, TANG XN, QIAO Y, GIFFARD RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. **Stroke**. 2006 Apr;37(4):1087-93.

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

YING, W.; HAN, S.K.; MILLER, J.W. Swanson, R.A. Acidosis potentiates neuronal death by multiple mechanisms. **J Neurochemistry**. 1999;73: 1549; 73: 1549-56

YONEYAMA M, SHIBA T, HASEBE S, OGITA K. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. **J Pharmacol Sci**. 2011 Apr 15;115(4):425-32

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**, 1999. v.96, n.23, p.13496-13500.

ZHAO J, XU L, ZHANG T, REN G, YANG Z. Influences of nanoparticle zinc oxide on acutely isolated rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Neurotoxicology**. 2009 Mar;30(2):220-30

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



comitê de ética em pesquisa  
com animais de experimentação



PARECER B000029-09

**Projeto: Neurogênese endógena induzida por acidente vascular encefálico experimental após bloqueio seletivo da ativaçãomicroglial/Macrofágica com um inibidor de Poli (ADP-Ribose) Polimerase (PJ34)**

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

**Área Temática:** Biologia

**Vigência:** 01/2009 a 01/2012

**Nº do CEPAE-UFPA:** B00029-09

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

Belém, 12 de dezembro de 2009

Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa  
Com Animais de Experimentação da Universidade  
Federal do Pará