



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

BLOQUEIO MICROGLIAL E TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS DA
FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

BELÉM – PARÁ
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO MARQUES CARDOSO

BLOQUEIO MICROGLIAL E TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS DA
FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

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 e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco.

BELÉM – PARÁ
2010

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

Cardoso, Marcelo Marques

Bloqueio microglial e transplante endovenoso de células da fração mononuclear da medula óssea após isquemia estriatal / Marcelo Marques Cardoso; orientador, Wallace Gomes Leal; co-orientadora, Edna Cristina Santos Franco. – 2010.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

1. Acidente vascular cerebral. I. Título.

CDD – 20. ed. 616.81

MARCELO MARQUES CARDOSO

BLOQUEIO MICROGLIAL E TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS DA
FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

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 e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco.

Aprovação em: 04 de fevereiro de 2010.

BANCA DE DEFESA

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

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco (ICB/UFPA) – Co-orientadora

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma (NMT/UFPA) – Membro Titular

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano (ICB/UFPA) – Membro Titular

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família. Meus tios (Fátima, José Airton e Aguielo) que financeira e moralmente investiram em mim. Meus avós (Marina Galeno Cardoso e Antônio José Cardoso) que me conduziram à escola e oportunizaram como puderam minha educação e formação pessoal, profissional e acadêmica. Devo muito a vocês. Não tenho como retribuir a não ser reconhecendo todo o esforço realizado ontem e hoje. Obrigado a todos!

Aos meus amigos de laboratório que desde o início (Andréa, Nelson, Adriano, Rafael, Prof. Dr. Antônio Pereira) ou mais recentemente (Michelle, Celice, Rosana, Elane, Louise, Igor e Ijair) participaram e compartilharam comigo, direta ou indiretamente, das minhas dificuldades, erros e acertos. Agradeço muito!

Aos meus irmãos de longa jornada distantes de casa: Ulisses, Miranda Júnior, Caroline, André e Josenildo. Com vocês aprendi muito, o que hoje aplico na minha vida pessoal. Agora são apenas lembranças.

Aos meus grande amigos que desde o ensino médio nos encontramos e confraternizamos bons momentos: Faye, Ana Liliam, Castelo e Solange. Com vocês, meus amigos, aprendi a amadurecer minha vontade de seguir em frente.

Aos remanescentes de uma época boa da minha vida de graduação e pós-graduação: Nayra e Andrison. Aqueles que foram monitores de anatomia comigo: Flavia, Carvalho, Sodré, Michelle, Carol, Aron, Baldomero, Rui e Fernando. Meus Amigos, com vocês aprendi responsabilidade e altruísmo. Isso ainda hoje tento exercer.

A todos vocês dedico o que faço para agradecer o que palavras não conseguem representar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Amauri Couveia Júnior pela inestimável colaboração para o entendimento e aplicação dos testes comportamentais e reflexões sobre meus ensaios experimentais e materiais de estudo sobre os mesmos.

Aos Laboratório de Biofísica, em nome do Prof. Dr. Manoel Filho, e Fertilização Animal, chefiado pelo Prof. Dr. Otávio Ohashi, pela ajuda material para fazer as micropipetas de vidro necessárias ao experimentos de indução isquêmica.

À responsável técnica do Laboratório de Neuroquímica, Neidiane Ramos, e ao Jorge Rissino do Laboratório de Citogenética pela ajuda e orientação no preparo dos reagentes necessários à extração das células mononucleares utilizadas nos meus experimentos.

Aos meus amigos de pós-graduação, Moisés Hamoy e Andréa de Sá pelas dicas e orientações nas manipulações dos animais e procedimentos para anestesiá-los.

Ao Prof. Dr. Cristovam Diniz por oportunizar a utilização do microscópio e câmera digital de seu Laboratório para registro fotográfico de nossas secções.

Meu orientador, Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, e co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco. Ao primeiro pela oportunidade e confiança no meu trabalho, estudo e esforço para alcançar os resultados apresentados aqui. E a Edna por me acolher e pela paciência prestada frente à minha imaturidade técnica e científica como aluno iniciante em um laboratório de pesquisa.

E ao apoio financeiro dos órgãos de fomento: CAPES e CNPq. Sem o qual não teria como subsidiar minha permanência no Estado e no Laboratório assim como o material necessário à realização dos experimentos do presente estudo.

RESUMO

Na presente dissertação, objetivou-se investigar se a modulação da resposta inflamatória, pelo uso de minociclina, um inibidor da ativação microglial, beneficia as ações terapêuticas de células mononucleares da medula óssea (CMOs) transplantadas após isquemia estriatal experimental. Ratos machos adultos, da raça Wistar, pesando 220-280g, foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle-isquêmico tratado com salina (IST, N=6), isquêmico tratado com minociclina (ICM, N=5), isquêmico tratado (endovenosamente) com CMOs (ITCT, N=4) e isquêmico com tratamento concomitante minociclina e CMOs (ICMCT, N=4). Todos os animais foram perfundidos 7 dias após a indução isquêmica. Testes comportamentais foram realizados em 1, 3 e 7 dias pós-isquemia para avaliar a recuperação funcional entre os grupos. Os animais tratados com minociclina receberam duas doses diárias de 50mg/kg nos primeiros dois dias, e mais cinco aplicações diárias únicas de 25mg/kg (i.p) até o sexto dia pós-indução isquêmica. 5×10^6 de CMOs foram obtidas de ratos da mesma linhagem e transplantadas endovenosamente, 24h após a indução isquêmica. Após perfusão e craniotomia, os encéfalos foram crioprotetidos e cortados em secções de 20 μ m e 50 μ m. As secções foram coradas pela violeta de cresila para análise histopatológica geral e por imunistoquímica para a identificação de corpos neuronais (neuN) e microglia/macrófagos ativados (ED1). Análise histopatológica geral mostrou grande perda tecidual com palor, necrose e acúmulo de um grande número de células inflamatórias (principalmente macrófagos ativados) nos cérebros de animais do grupo IST. O tratamento com minociclina diminuiu significativamente ($P < 0,05$, ANOVA-Tukey) o número de microglia/macrófagos ativados (IST=83,14 \pm 3,65; ICM: 53,32 \pm 3,27). As CMOs apresentaram um significativo ($P < 0,05$) efeito antiinflamatório isoladamente (ITCT=51,31 \pm 2,41), mas, no grupo ICMCT, o efeito antiinflamatório foi ainda mais intenso (29,78 \pm 1,56). Os tratamentos com minociclina, CMOs

e minociclina/CMOs induziram neuroproteção ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (IST), com um efeito mais intenso no grupo tratado concomitantemente com minociclina/CMOs (IST=47,61±2,25; ICM=70,73±3,87; ITCT=64,11±2,26; ICMCT= 87,97±4,27). O teste comportamental demonstrou recuperação funcional nos animais dos grupos ICM, ITCT e TCMCT em relação à linha de base ($P < 0,05$), corroborando os resultados histológicos. Os resultados sugerem que a ativação microglial excessiva dificulta as ações terapêuticas das CMOs transplantadas na fase aguda após isquemia estriatal e que a modulação da resposta microglial no ambiente isquêmico induz neuroproteção e favorece a recuperação funcional de forma mais eficaz do que o transplante isolado de CMOs. Considerando que o ambiente patológico pode influenciar negativamente as CMOs transplantadas, a abordagem sugerida nesta investigação pode configurar-se, futuramente, em uma importante terapia adjuvante para facilitar as ações terapêuticas de células tronco após doenças do sistema nervoso central e de outros tecidos.

PALAVRAS-CHAVE: Acidente Vascular Encefálico, Estriato, Minociclina, Células Mononucleares da Medula Óssea, Células Tronco.

Apoio Financeiro: CAPES/ CNPq.

ABSTRACT

In this dissertation, we have investigated whether the inflammatory response modulation by minocycline, an inhibitor of microglial activation, is beneficial for the therapeutic actions of Bone Marrow Mononuclear Cells (MBMCs) transplanted after experimental striatal ischemia. Male Wistar adult rats weighing 220-280g were divided in 4 experimental groups: ischemic control saline-treated (ICST, N=6), ischemic minocycline-treated (IMT, N=5), ischemic MBMC-treated (endovenously, ITCT, N=4) and ischemic minocycline MBMC-treated (IMMBMC N=4). All animals were perfused at 7 days post-ischemia. Behavioral tests were performed at 1, 3 and 7 days post-ischemia to evaluate functional recovery between groups. Animals treated with minocycline received two 50mg/kg (i.p.) doses in the first two days plus five single 25mg/kg (i.p.) daily doses up to sixth days post-ischemia. 5×10^6 MBMCs were obtained from Wistar rats and endovenously transplanted at 24h post-ischemia. After perfusion and craniotomy, brains were crioprotected and cut at 20 μ m and 50 μ m thick. Sections were stained with cresyl violet for gross histopathological analysis or immunolabelled for identification of neuronal bodies (neuN) and activated microglia/macrophages (ED1). Gross histopathological showed intense pallor, tissue loss, necrosis and accumulation of a great number of inflammatory cells (mainly activated macrophages) in the brains of animals of ICST group. Minocycline treatment significantly decreased ($P < 0.05$, ANOVA-Tukey post-hoc test) the number of activated microglia/macrophages (ICST = $83,14 \pm 3,65$; IMT: $53.32 \pm 3,27$). Transplant of MBMCs only induced a significant ($P < 0.05$) anti-inflammatory effect (ITCT = $51,31 \pm 2,41$), but this effect was even more prominent in the IMMBMC group ($29,78 \pm 1,56$). Treatment with minocycline, MBMCs and minocycline/MBMCs induced conspicuous neuroprotection ($P < 0.05$), but this effect was more prominent in IMMBMC group (ICST = $47.61 \pm 2,25$; IMT = $70.73 \pm 3,87$; MBMC = $64.11 \pm 2,26$; IMMBMC = $87.97 \pm 4,27$). The behavioral test showed better functional

recovery in animals of IMT, MBMC and IMMBMC groups compared to base line ($P < 0.05$) in agreement with histological data. The results suggest that uncontrolled microglia activation is detrimental to the therapeutic actions of MBMCs transplanted in the acute phase of striatal ischemia. It follows that a proper modulation of microglia response in the ischemic environment induces better neuroprotection and functional recovery than the transplant of MBMCs only. Considering that the pathological environment is detrimental for the transplanted MBMCs, the experimental approach suggested in this study may be proven in the future an important adjuvant therapy to improve the therapeutic actions of stem cells transplanted after diseases of the central nervous system and other tissues.

Key-Words: Stroke, Striatum, Minocycline, Bone Marrow Mononuclear Cells, Stem cells

Financial Support: CAPES/ CNPq.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1.	Representação percentual dos gastos realizados tendo por base nove parâmetros de serviços de assistência à pessoa acometida por doença cerebrovascular ao longo do primeiro ano...	17
FIGURA 2.	Principais mecanismos envolvidos com a morte celular isquêmica e a instalação de déficits neurológicos...	19
FIGURA 3.	Representação temporal dos principais eventos envolvidos com a morte celular isquêmica...	20
FIGURA 4.	Resumo esquemático dos principais passos envolvidos na transmigração celular mediada pelas moléculas de adesão em resposta ao dano tecidual...	25
FIGURA 5.	Apresentação fenotípica da microglia em condições normais e patológica...	30
FIGURA 6.	Representação de moléculas receptoras na membrana celular microglial e seus ligantes...	31
FIGURA 7.	Desenho esquemático das vias envolvidas com a morte celular apoptótica	34
FIGURA 8.	Estrutura molecular da minociclina	37
FIGURA 9.	Atuação da minociclina na modulação inflamatória e como anti-apoptótico	38
FIGURA 10.	Possíveis mecanismos de ação das células tronco transplantadas após AVENC e outras desordens neurais...	41
FIGURA 11.	Fotomicrografia, coloração por Violeta de Cresila	55
FIGURA 12.	Fotomicrografia, imunistoquímica ED1	56
FIGURA 13.	Gráfico de contagem de células ED-1 ⁺	56
FIGURA 14.	Fotomicrografia, imunistoquímica NeuN ⁺	57
FIGURA 15.	Gráfico de contagem de células NeuN ⁺	57
FIGURA 16.	Análise gráfica do teste modificado de remoção do adesivo	60
TABELA 1.	Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais/ grupo.	45

LISTA DE ABREVIACOES

AVENC	Acidente Vascular Encefálico
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CMOs	Células Mononucleares da Medula ssea
CTMs	Células Tronco Mesenquimais
EUA	Estado Unidos da América
ICM	Isquêmico tratado com minociclina
ICMCT	Isquêmico de tratamento concomitante
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IST	Isquêmico tratado com salina estéril
ITCT	Isquêmico tratado com células da fração mononuclear
MCP-1	Proteína-1 Quimiottica de Monócitos
MHC	Complexo e Histocompatibilidade Principal (Classe I ou II)
MMP	Metaloproteinase de Matriz Extracelular
NO	xido Ntrico
NOS	Sintase do xido Ntrico
rt-PA	Ativador Plasminognico Tecido Recombinate
TGF- β	Fator- β de Crescimento Transformador
TNF- α	Fator- α de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVE)	16
1.2	FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO	19
1.2.1	Excitotoxicidade	20
1.2.2	Estresse Oxidativo e Nitrosativo	21
1.2.3	A Ruptura da BHE	22
1.2.4	A Resposta Inflamatória	22
1.2.4.1	Citocinas	23
1.2.4.2	Quimiocinas	24
1.2.4.3	Moléculas de Adesão	24
1.2.4.4	Resposta Celular à Inflamação	26
	Neutrófilos	26
	Linfócitos	27
	Microglia	29
1.2.5	Apoptose	33
1.2.5.1	Via Intrínseca	33
1.2.5.2	Via Extrínseca	34
1.3	TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	35
1.3.1	Minociclina	36

1.3.2	Células-Tronco Adultas Derivadas da Medula Óssea	39
1.4	HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL	42
1.5	OBJETIVO	44
1.5.1	Objetivo geral	44
1.5.2	Objetivos específicos	44
2	MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
2.2	PROCEDIMENTOS PRÉ-INDUÇÃO ISQUÊMICA	46
2.3	INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÃO DE ET-1	46
2.4	TESTE COMPORTAMENTAL	47
2.5	TRATAMENTO COM MINOCICLINA PARA BLOQUEIO MICROGLIAL	47
2.6	TRATAMENTO COM CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA	48
2.7	TRATAMENTO CONCOMITANTE COM MINOCICLINA E CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA	49
2.8	PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	50
2.9	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA	50
2.9.1	Análise Histopatológica Geral	50
2.9.2	Imunoistoquímica	51
2.10	ANÁLISE QUALITATIVA	52
2.11	ANÁLISE QUANTITATIVA	52
2.11.1	Método de Contagem	52
2.11.2	Análise Estatística	53

3	RESULTADOS	54
3.1	MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM SINTOMAS MOTORES CARACTERÍSTICOS DE LESÃO ISQUÊMICA	54
3.2	MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM PERDA NEURONAL PROGRESSIVA CONCOMITANTE COM INTENSA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	54
3.3	O TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA, CONCOMITANTE COM BLOQUEIO MICROGLIAL, MINIMIZA MAIS EFETIVAMENTE A PERDA NEURONAL APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL	58
3.4	O TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS DA MEDULA ÓSSEA MODULA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL	59
3.5	EFEITO NEUROCOMPORTAMENTAL DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA MICROGLIAL APÓS TRASPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DURANTE ISQUEMIA ESTRIATAL	59
4	DISCUSSÃO	62
4.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS	62
4.2	MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA PELA CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA	63
4.3	MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA POR CELULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL	65
4.4	A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FAVORECE OS EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA SOBRE A RECUPERAÇÃO	

	FUNCIONAL NA FASE AGUDA DA ISQUEMIA ESTRIATAL	67
5	CONCLUSÃO	69
6	REFERÊNCIAS	70
7	ANEXO	85
	CERTIFICADO FESBE, 2009	85
	ATA DE APROVAÇÃO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR. NÍVEL: MESTRADO.	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO (AVENC)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define acidente vascular encefálico (AVENC) como o surgimento súbito focal ou global de déficits da função neurológica de duração superior a 24 horas ou que leve à morte, cuja única causa reside na origem vascular (WOLFE, 2000; MARKUS, 2008). A redução abrupta do suprimento sanguíneo à regiões do sistema nervoso pode ser causada por ocorrência isquêmica ou hemorrágica.

Os AVENCs isquêmicos perfazem 87% de todos os tipos de AVENC (ROSAMOND et al., 2008). Apresenta os subtipos trombolíticos e embólicos. O primeiro é secundário à aterosclerose que favorece o acúmulo paulatino de placas de ateroma na parede interna do vaso e, posterior, obstrução (CAPLAN et al., 2009). O último ocorre quando partes da placa de ateroma se soltam e obliteram a luz vascular seguinte (MARKUS, 2008; CAPLAN et al., 2009).

O restante dos acometimentos cerebrovasculares é de causa hemorrágica, caracterizado pela ruptura da parede vascular intracerebral ou subaracnóidea (CAPLAN et al., 2009) com extravasamento e acúmulo de sangue e seus derivados no parênquima neural ou no espaço dural. Esta alteração patológica ocorre geralmente após o rompimento de aneurismas (SEDER & MAYER, 2009).

Entre os fatores de risco para o AVENC, estão: tabagismo, obesidade, diabetes, dislipidemia e hipertensão (PETTY et al., 1999; SCHULZ & ROTHWELL, 2003; MARKUS, 2008; KIRSHNER, 2009; SKINNER et al., 2009). Estes fatores contribuem para a ocorrência anual de, aproximadamente, 780 mil casos de AVENC nos Estados Unidos da América

(EUA). Destes, cerca de 180 mil são acometimentos recorrentes (ROSAMOND et al., 2008). Dados sobre incidência, mortalidade e instalações de seqüelas enquadram o AVENC como a terceira causa de morte no mundo (ROSAMOND et al., 2008; ZHANG & CHOPP, 2009) e a principal complicação orgânica que leva à disfunções físico-neurológicas frequentemente graves e, às vezes, permanentes (LEGG & LANGHORNE, 2004; DOBKIN, 2005). Isso representa ônus socioeconômico elevado aos serviços de saúde e à sociedade.

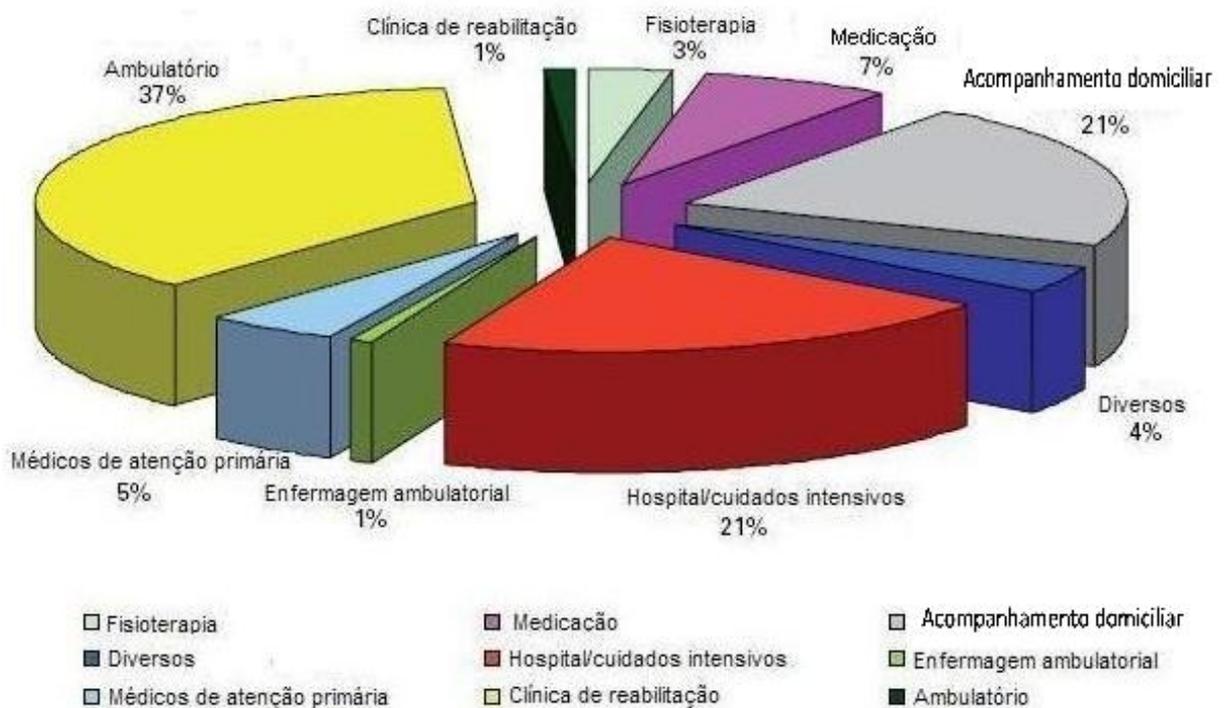


FIGURA 1. Representação percentual dos gastos realizados tendo por base nove parâmetros de serviços de assistência à pessoa acometida por doença cerebrovascular ao longo do primeiro ano. Estudo de recorte populacional de 131 indivíduos sobreviventes realizado no Hospital Universitário de Bern, Suíça. Modificado de Mahler et al (2008).

Nos EUA, o gasto estimado, de 2005 a 2050, incluindo hospitalização, reabilitação e medicamentos é superior à 1,5 trilhões 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) (FIGURA 1).

Na América do Sul, estudo de Saposnik e Del Brutto. (2003) indicam que a epidemiologia e os subtipos de AVENCs diferem de dados europeus e norte-americanos. Países sul-americanos apresentam menor incidência média de AVENC, apesar dos casos hemorrágicos e por doenças dos pequenos vasos possuírem maior incidência do que a de países desenvolvidos (SAPOSNIK & DEL BRUTTO, 2003). Isso, contudo, tende a ser alterado pelo aumento na expectativa de vida associado a mudanças no estilo de vida da população (SAPOSNIK & DEL BRUTTO, 2003).

Diferindo da tendência sul-americana, o Brasil possui índice de morte causada por complicações de doenças cerebrovasculares superior a países desenvolvidos, desde o final da década de 80 (LOTUFO, 2005; LOTUFO & BENSENOR, 2009). Dados oficiais do início deste século apontam o AVENC como a principal causa de morte no Brasil (LOTUFO, 2005).

É sabido que acidentes neurovasculares quando não levam à morte podem deixar seqüelas neurológicas (LEGG & LANGHORNE, 2004; DOBKIN, 2005). Entre tais alterações patológicas, os AVENCs sub-corticais respondem por um quarto de todos os AVENCs (JACKSON & SUDLOW, 2005; NORRVING, 2008). A cápsula interna, os núcleos da base (principalmente o estriato), tálamo e tronco encefálico são comumente afetados (NORRVING, 2008). O AVENC dos pequenos vasos (lacunar) possui mecanismo fisiopatológico semelhante aos demais subtipos de AVENC (FIGURAS 2 e 3). Neste tipo de AVENC, ocorre lesão de pequenos vasos perfurantes do parênquima nervoso, o que acarreta o aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam a Síndrome Lacunar (BAMFORD et al., 1987; BEJOT et al., 2008; DE REUCK et al., 2008; MARKUS, 2008; NORRVING, 2008).

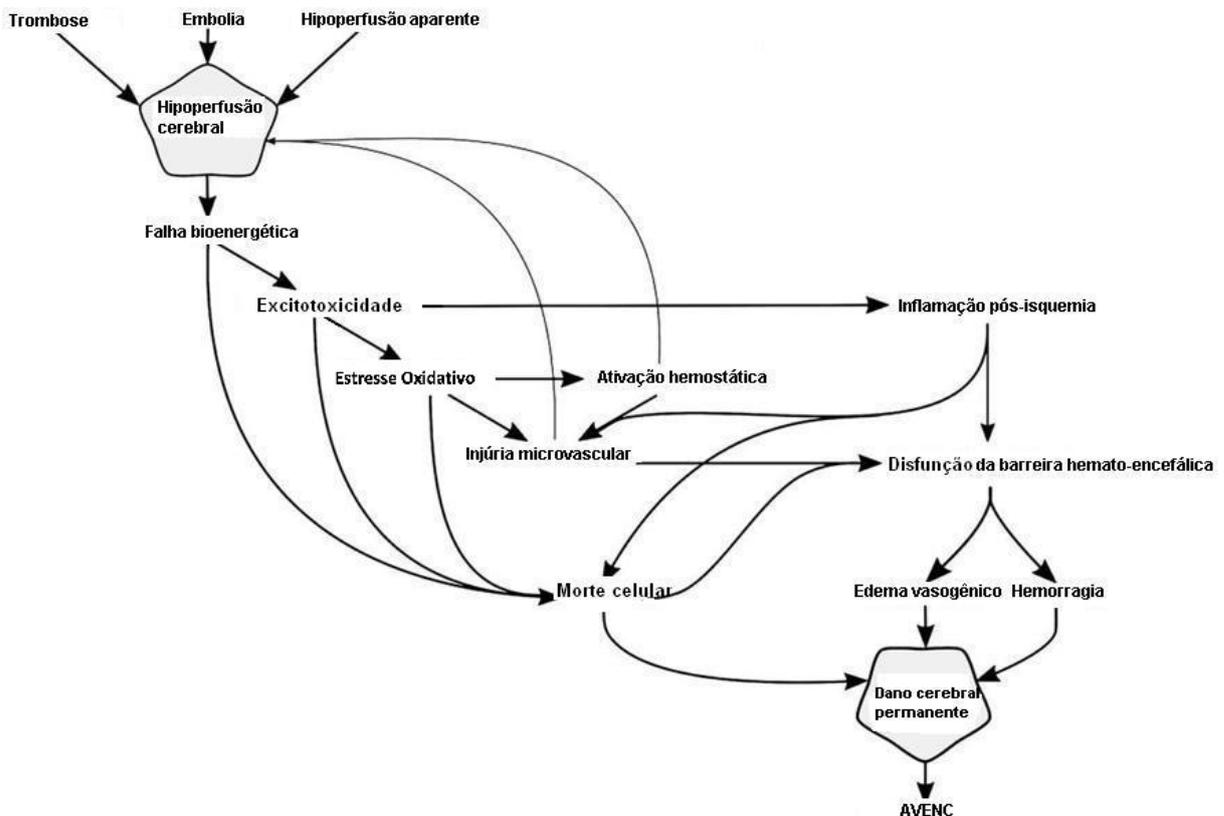


FIGURA 2. Principais mecanismos envolvidos com a morte celular isquêmica e a instalação de déficits neurológicos. Modificado de Brouns e De Deyn (2009).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO ISQUÊMICO

Eventos isquêmicos cerebrovasculares desencadeiam uma série de mecanismos fisiopatológicos que culminam com a instalação de dano cerebral (FIGURA 2). Nos primeiros minutos, a redução de glicose e oxigênio no centro isquêmico leva à morte celular por necrose, mediada, principalmente, por mecanismos citotóxicos (DOYLE et al., 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). Nesta janela temporal, na periferia da lesão, a penumbra isquêmica, sofre conseqüências moderadas (KAUFMANN et al., 1999). Contudo, em horas, diversos mecanismos secundários, incluindo apoptose, inflamação e estresse oxidativo, podem promover o avanço da lesão, com comprometimento da penumbra isquêmica (DOYLE et al., 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). Dias após o início da lesão, a penumbra isquêmica pode ser ainda mais afetada pelos mecanismos anteriormente descritos (BROUNS

& DE DEYN, 2009) juntamente com o aumento da intensidade do processo inflamatório devido à ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) e falência na rede microvascular. (FIGURA 3).

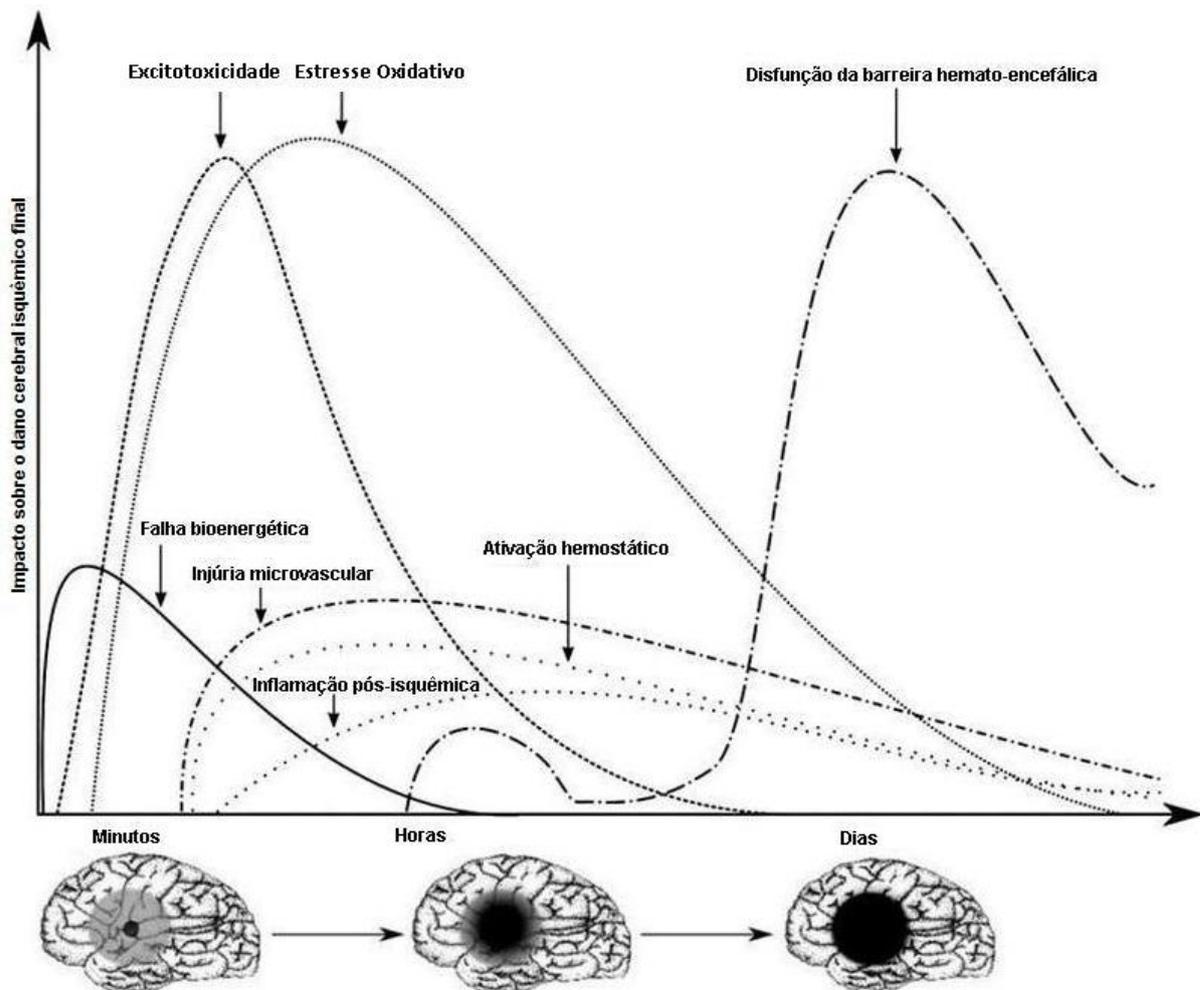


FIGURA 3. Representação temporal dos principais eventos envolvidos com a morte celular isquêmica. Modificado de Brouns e De Deyn (2009).

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

1.2.1 Excitotoxicidade.

Logo após a indução isquêmica, neurônios e células gliais entram em falência bioenergética com desequilíbrio iônico (HOSSMANN, 2006). Na membrana pré-sináptica,

ocorre liberação excessiva de glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC). O déficit energético também compromete a recaptura do glutamato da fenda sináptica através de receptores pré-sinápticos. Astrócitos, que possuem um papel de destaque na captação fisiológica de glutamato no parênquima tecidual, são afetados pelo ambiente isquêmico, o que gera o fenômeno patológico onde estas células liberam glutamato para o espaço extracelular (HAZELL, 2007). O acúmulo extracelular de glutamato excita continuamente a célula pós-sináptica até a morte. Neste transcurso, Receptores glutamatérgicos: AMPA, kainato e NMDA promovem a entrada exagerada dos íons sódio, cloreto e cálcio que conduz ao edema citotóxico, ativação de endonucleases e à liberação de radicais livres (BROUNS & DE DEYN, 2009). Isso culmina com a morte celular por necrose induzida por mecanismo excitotóxico (DOYLE et al., 2008).

1.2.2 Estresse Oxidativo e Nitrosativo.

Em condições fisiológicas, neurônios possuem mecanismos antioxidantes endógenos suficientes para degradar a demanda de radicais livres produzidos. Contudo, em condições patológicas, tais mecanismos são insuficientes (DOYLE et al., 2008). A perda da polaridade da membrana celular leva ao influxo de íons cálcio e sódio na célula. Este acúmulo iônico induz a mitocôndria produzir quantidades prejudiciais de espécies reativas derivadas do oxigênio (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 $^-$). Estes radicais ativam cascatas enzimáticas que destroem macromoléculas na célula e a levam à morte (HERTZ, 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). Paralelamente, no citoplasma, o íon cálcio promove a produção de óxido nítrico (NO) que, em níveis elevados, também tem efeito deletério (BROUNS & DE DEYN, 2009).

1.2.3 A Ruptura da BHE.

Em condições normais, a produção de NO pela parede neurovascular promove vasodilatação e apresenta efeito antiinflamatório (BROUNS & DE DEYN, 2009). Contudo, a liberação exacerbada, além de promover danos à integridade celular, pode ainda avariar a parede endotelial e comprometer a permeabilidade vascular pela ativação de metaloproteinase de matriz extracelular (MMP, do inglês, *matrix metaloproteinases*), em particular a MMP-9 (BROUNS & DE DEYN, 2009). A MMP é uma enzima proteolítica que degrada a laminina e fibras colágenas da lâmina basal. Esta protease prejudica a coesão entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade local e favorece o extravasamento de plasma, transmigração de leucócitos e eventual entrada de hemácias (hemorragias) (DEL ZOPPO & HALLENBECK, 2000; LO, 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009).

1.2.4 A Resposta Inflamatória.

Por muito tempo acreditou-se que o SNC, em particular o encéfalo, era um órgão isolado de influências do sistema imune periférico (o chamado privilégio imunológico). A escassa rede de drenagem linfática, a falta de células apresentadoras profissionais de antígenos como as células dendríticas, além do filtro imposto pela BHE (BARKER & WIDNER, 2004) e a suposta ausência do Complexo de Histocompatibilidade Principal Classe I (MHC-I, do Inglês: *Major Histocompatibility Complex*) (BOULANGER & SHATZ, 2004) sugeriam o isolamento anatômico e fisiológico do SNC e sistema imune. Hoje, contudo, sabe-se que moléculas e células do sistema imune têm trânsito de entrada e saída do encéfalo e medula espinhal tanto em condições normais quanto patológicas (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 Inglês: *interleukin-1*), fator- α de necrose tumoral (TNF- α , do Inglês: *tumor necrosis factor alpha*), interleucina-10 (IL-10, do Inglês: *interleukin-10*) e o fator-beta de crescimento transformador (TGF-beta, do Inglês: *transforming growth factor beta*); e quimiocinas – destaque para a proteína-1 quimiotática de monócito (MCP-1, do Inglês: *monocyte chemotactic protein 1*). Estes mediadores inflamatórios modulam a ativação de células imunes e induzem a expressão de moléculas de adesão na parede endotelial, entre as quais seletinas, integrinas e imunoglobulinas.

1.2.4.1 Citocinas

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

Entre as citocinas pró-inflamatórias estão a IL-1 e o TNF- α (WANG et al., 2007). A concentração de ambos os tipos de citocinas modula a intensidade da lesão. Estas moléculas são importantes para a ativação de células imunes periféricas e residentes e contribuem para a expressão de moléculas de adesão celular e NO (ASCHNER, 1998; CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004).

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

Outra citocina antiinflamatória é o TGF- β (SKINNER et al., 2009), liberado por células mononucleares periféricas e residentes (microglia e astrócitos). O TGF- β 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- α (CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004; WANG et al., 2007).

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

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: seletinas, 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) (FIGURA 4).

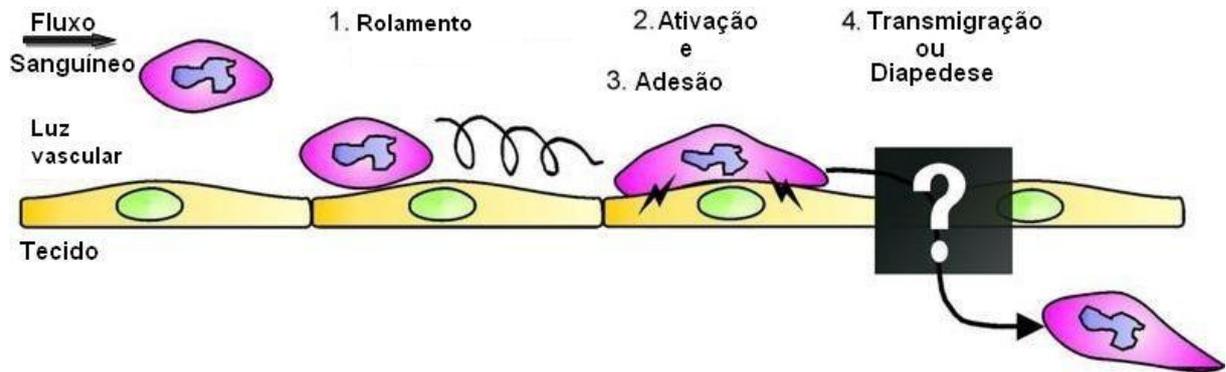


FIGURA 4. Resumo esquemático dos principais passos envolvidos na transmigração celular mediada pelas moléculas de adesão em resposta ao dano tecidual. Modificado de Wittchen (2009).

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 seletina-L (CD62L), propiciando o rolamento (STOLL et al., 1998). A seletina-P (CD62P), então, medeia a migração de monócitos e alguns linfócitos aumentando a adesão destes leucócitos ao endotélio (LIU et al., 2004; SCHYMEINSKY et al., 2007).

A adesão celular é requisito básico para a migração, que é mediada, principalmente, por integrinas. Estas moléculas de adesão são expressas nos leucócitos que interagem com imunoglobulinas da parede vascular e favorecem a transmigração (STOLL et al., 1998) (FIGURA 4).

Diferentes células imunes participam da resposta celular à inflamação. Neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos, microglia e astrócitos respondem ao processo inflamatório em diferentes escalas temporais.

1.2.4.4 Resposta inflamatória celular.

Na fase aguda, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, seguido pelos linfócitos (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). As células microgliais/macrófagos ativados dominam a cena lesiva nos tempos de sobrevida mais tardios após desordens neurais agudas, incluindo AVENC, trauma cerebral e da medula espinhal (CLARK et al., 1993; MORIOKA et al., 1993). Descreveremos as evidências experimentais de que os componentes celulares da resposta inflamatória participam do processo lesivo após desordens neurais agudas, principalmente AVENC.

Neutrófilos

Os neutrófilos são recrutados para o parênquima neural após desordens neurais agudas, incluindo lesão aguda da medula espinhal (SCHNELL et al., 1999; GOMES-LEAL et al., 2005) e do cérebro (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008). Estas células possuem um importante papel fagocitário, o que é importante para a remoção de detritos teciduais após desordens neurais (VILLARREAL et al., 2001). O pico máximo de recrutamento de neutrófilos em tecidos não neurais, como a pele, ocorre em torno de 6h, mas no SNC é de 24 após lesão (KATO et al., 1996; BOLTON & PERRY, 1998; GOMES-LEAL et al., 2005). 30 minutos após a lesão isquêmica, neutrófilos começam a ser recrutados ao sítio de lesão (KATO et al., 1996; HIROSE et al., 2000). O acúmulo de neutrófilo no sítio isquêmico 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 os reagentes prejudiciais ao tecido isquêmico liberados pelos neutrófilos está a ação proteolítica da elastase. A elastase é uma enzima que 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 transmigração 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).

Além disso, o acúmulo de neutrófilos na luz de pequenos vasos e a ativação plaquetária dificulta a restauração do fluxo sanguíneo pós-insulto, mecanismo descrito como fenômeno de não-refluxo (DEL ZOPPO & HALLENBECK, 2000; DOYLE et al., 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). Este fenômeno leva à extensão do dano primário pelo prolongamento da hipoxia tecidual. Como se vê, os neutrófilos exercem um papel prejudicial relevante na fisiopatologia aguda do AVENC e sinalização inflamatória aos demais leucócitos. Finalmente, neutrófilos podem ser encontrados 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).

Linfócitos

Existem duas populações de linfócitos: T e B. Ambos originam-se de precursores presentes na medula óssea. Os linfócitos B amadurecem na medula óssea, ao passo que as células T imaturas migram para o timo onde completam o desenvolvimento. A ativação de linfócitos leva à resposta celular, envolvendo produção de citocinas, expressão de receptores

de citocinas e proliferação celular (ABBAS & SEN, 2003). Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos e armazenamento da memória imune a antígenos específicos (ABBAS & JANEWAY, 2000). Enquanto que os linfócitos T são as células efetoras do sistema imune adaptativo pelo reconhecimento de antígenos específicos (PERRY, 1998; ABBAS & JANEWAY, 2000).

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

Linfócitos também podem expressar ação protetora. Contudo, este efeito depende do tipo de células T ativadas e a gravidade da lesão (LINFERT et al., 2009). Tal achado foi relatado em modelo de encefalite autoimune experimental (EAE, do Inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) (MOALEM et al., 1999) e em modelos de esclerose lateral amiotrófica, em roedores (CHIU et al., 2008).

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

Microglia

A microglia é considerada a célula imunoefetora do SNC (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; ZIELASEK & HARTUNG, 1996). Tanto no tecido nervoso saudável como em condições patológicas, a microglia responde realizando 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) (FIGURA 5A).

Sob condições fisiológicas, a microglia em repouso adota uma aparência morfológica ramificada característica. Entretanto, ela é bastante sensível à mudanças no microambiente onde vive e é prontamente ativada em resposta à diversos estímulos patológicos e às menores alterações fisiológicas (PERRY & GORDON, 1987; PERRY, 1994; KREUTZBERG, 1996; NEUMANN et al., 1998; STREIT et al., 2004; HAWLISCH & KOHL, 2006) (FIGURA 5B). 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).

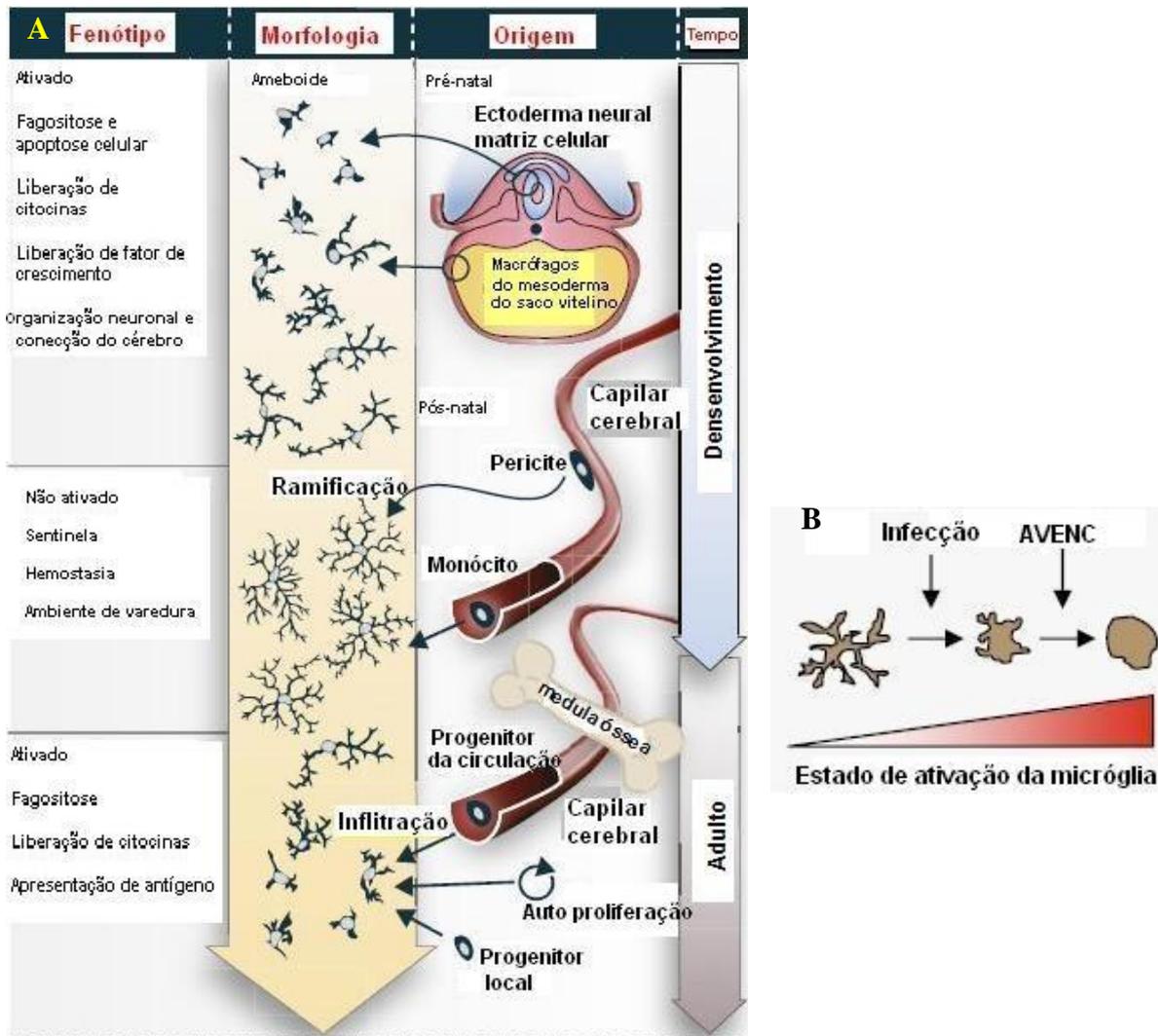


FIGURA 5. Apresentação fenotípica da microglia em condições normais e patológica. **A.** Morfologia e ontogenética do estágio de ativação e origem da microglia. **B.** Representação esquemática da escala de ativação da microglia em função da severidade ou tipo de insulto. À esquerda: microglia em repouso (*resting*); à direita: microglia ativada e; no centro: microglia reativa. Modificado de Soulet e Rivest (2008) e McColl; Allan e Rothwell (2009).

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

1993) (FIGURA 5B). Nestas circunstâncias, a microglia ativada aumenta o poder de síntese de diversas substâncias e aumenta a expressão de diversas moléculas de membrana (FIGURA 6), incluindo moléculas MHC, classes I e II, receptores CD4 e CD8, e receptores do complemento (PERRY & GORDON, 1987; PERRY, 1994; SCHROETER et al., 1994; SCHROETER et al., 1997; JANDER et al., 1998; PERRY, 1998; SCHROETER et al., 1999; STOLL & JANDER, 1999; SCHROETER et al., 2001).

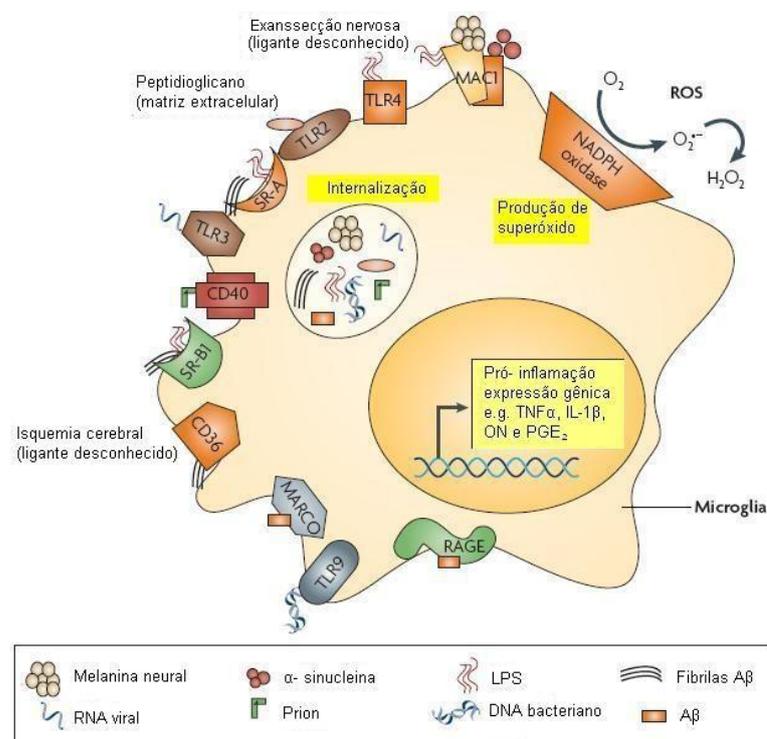


FIGURA 6. Representação de moléculas receptoras na membrana celular microglial e seus ligantes. Modificado de Block; Zecca e Hong (2007).

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 (GIULIAN et al., 1990; GEHRMANN et al., 1995;

GIULIAN et al., 1995; GIULIAN et al., 1996; STOLL et al., 1998; ELIASSON et al., 1999; BAL-PRICE & BROWN, 2001; GOMES-LEAL et al., 2004; STREIT et al., 2004; BLOCK & HONG, 2005).

Em modelos experimentais de isquemia cerebral, relatou-se intensa ativação microglial no centro do infarto e na penumbra isquêmica (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- α 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).

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 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 recente estudo *in vitro* que estímulos como LPS e β -amilóide podem induzir um fenótipo microglial deletério, como a síntese excessiva de TNF- α , enquanto que baixas doses de IFN- γ 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 inglês: *insulin-like growth factor*).

1.2.5 Apoptose.

Excitotoxicidade, radicais livres, dano ao DNA, desequilíbrio iônico, avaria à membrana mitocondrial e resposta imune exasperada são causas envolvidas na morte celular por apoptose (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008; BROUNS & DE DEYN, 2009). O mecanismo apoptótico pode envolver a via mitocondrial intrínseca ou estímulos extrínsecos à célula (DOYLE et al., 2008).

1.2.5.1 Via Intrínseca

Esta via independe de sinalizações de receptores de membrana celular (VILA & PRZEDBORSKI, 2003). A isquemia prejudica a estabilidade da membrana mitocondrial que transloca para o citoplasma a enzima mitocondrial constituinte da cadeia respiratória citocromo-C (SUGAWARA et al., 2004) e Smac/Diablo, inibidores de proteínas anti-apoptóticas (IAPs) (VILA & PRZEDBORSKI, 2003). No citosol, a citocromo-C reage com Apaf-1 e dATP (moléculas pró-apoptóticas citoplasmáticas) para ativar a caspase-9. Esta aciona a caspase-3 (SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008). A caspase-3 ativada despolimeriza o citoesqueleto celular e ativa endonucleases que clivam o DNA nuclear, conduzindo a célula, invariavelmente, à morte (VILA & PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008) (FIGURA 7).

1.2.5.2 Via Extrínseca

A via extrínseca é assim chamada porque a apoptose pode ser mediada por ligação de sinalizadores de morte a receptores celulares específicos (DOYLE et al., 2008), como membros das famílias Fas/CD-95 e TNF-R1, e seus respectivos ligantes de morte: ligante FAS (FasL) e TNF-alfa (VILA & PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008). Uma vez estabelecida a ligação entre receptores e ligantes, uma proteína adaptadora intracelular é acionada e ativa a caspase-8, que pode seguir duas cascatas distintas (FIGURA 7):

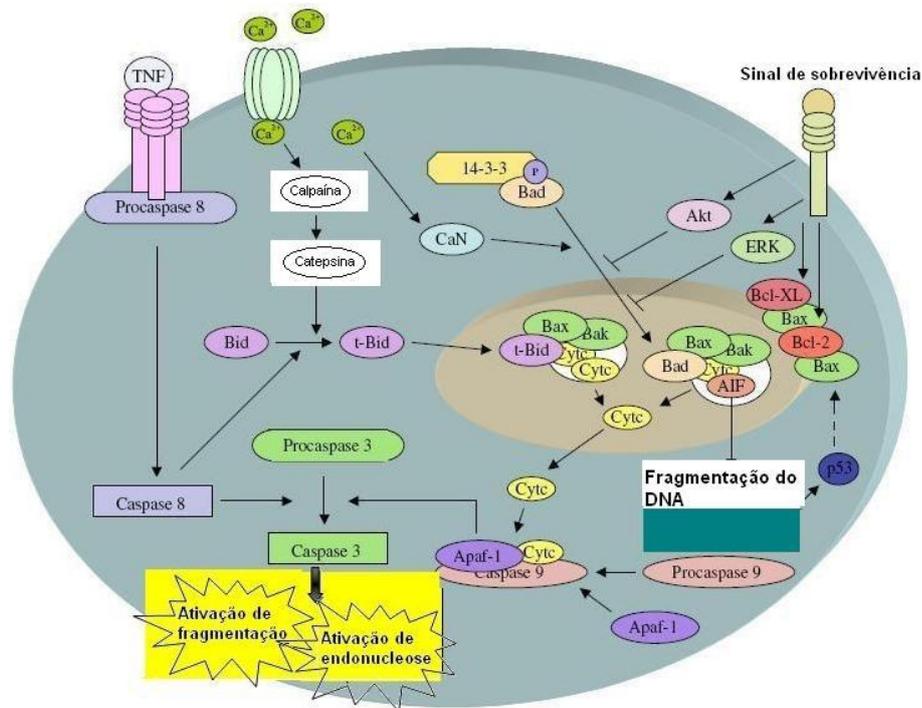


FIGURA 7. Desenho esquemático das vias envolvidas com a morte celular apoptótica. Modificado de Doyle, Simon e Stenzel-Poore (2008).

a. Ativar a caspase-3 efetora que aciona a poli(ADP-ribose)polimerase (PARP). O excesso de PARP leva à depleção de NADP e ATP que, respectivamente, causam dano ao DNA e aumento da falência energética. Pode haver a ativação da enzima desoxirribonuclease ativada por caspase (CAD) que, em última instância, também fragmenta o DNA nuclear (VILA & PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008);

b. Truncamento da proteína Bid citoplasmática, um membro da família Bcl pró-apoptótica, que, em conjunto com Bax e Bak, formam poros na membrana mitocondrial com vazamento de citocromo-C, o que leva à morte celular mediada por caspase-3 (VILA & PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008).

Vila e Przedborski (2003) afirmam existir certo aspecto proeminente entre o grau de ativação da resposta inflamatória extracelular e o acionamento da via extrínseca, pela grande oferta de ligantes de morte, como o TNF-alfa. Isso justifica, portanto, porque a modulação inflamatória reduz danos secundários à penumbra isquêmica.

1.3 TERAPIAS EXPERIMENTAIS PARA O ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O tratamento trombolítico com o ativador de plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA, alteplase) é a única intervenção aprovada para uso clínico em seres humanos após AVENC (WEINBERGER, 2006; GREEN, 2008). Contudo, diversos fatores limitam a um uso mais amplo desta terapia, fazendo com que pouco pacientes sejam beneficiados. O primeiro deles é a estreita janela temporal para administração, em torno de 3 horas após o início do acometimento neurovascular (GLADSTONE et al., 2002; BENTLEY & SHARMA, 2005; GREEN, 2008). Outros fatores são a baixa eficácia (GLADSTONE et al., 2002; BENTLEY & SHARMA, 2005) e a segurança do tratamento que pode induzir hemorragias secundárias através do fenômeno de transformação hemorrágica (FORD, 2008; GREEN, 2008).

A reduzida opção de tratamentos farmacológicos para AVENCs levou a estudos para o desenvolvimento de outras possibilidades terapêuticas. Entre tais propostas está a terapia gênica (SAPOLSKY, 2003), que busca potencializar fatores protetores endógenos e inibir os prejudiciais pela modulação da expressão gênica celular e a evolução de técnicas

neurocirúrgicas (KIRMANI et al., 2005), que torna os procedimentos menos invasivos e mais eficientes. Neste contexto, fármacos antiinflamatórios e a terapia celular surgem como possibilidades terapêuticas, entre os quais estão: a minociclina e o transplante de células-tronco.

1.3.1 Minociclina.

A minociclina é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, usada comumente como antibiótico, mas que possui consideráveis efeitos antiinflamatórios (DOMERCQ & MATUTE, 2004; HEWLETT & CORBETT, 2006). Yrjanheikki et al. (1998, 1999) demonstraram que esta tetraciclina possui consideráveis efeitos neuroprotetores após AVENC experimental. Nestes estudos, o tratamento de roedores isquêmicos com minociclina induziu cerca de 65% de diminuição da área de infarco cortical e cerca de 45% de diminuição na área de infarto estriatal (YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999). Os autores atribuíram estes efeitos, principalmente, à diminuição da ativação microglial. A partir destes estudos iniciais, diversos outros estudos mostraram os efeitos neuroprotetores da minociclina após isquemia e diversas outras doenças no SNC (BLUM et al., 2004; YONG et al., 2004; STIRLING et al., 2005; KIM & SUH, 2009). O tratamento de roedores submetidos à lesão aguda da medula espinhal com minociclina reduziu a degeneração secundária de oligodendrócitos, aumentou a regeneração axonal e modulou a morte celular por apoptose (STIRLING et al., 2004). O tratamento com minociclina aumenta a neurogênese endógena no cérebro adulto após AVENC experimental (LIU et al., 2007). Pacientes que foram tratados com minociclina na fase aguda do AVENC tiveram melhor prognóstico neurológico que o grupo placebo (LAMPL et al., 2007).

Parte do sucesso da minociclina pode estar associada à estrutura química desta droga (KIM & SUH, 2009). A organização molecular da minociclina (FIGURA 8) a permite ser até 5 vezes mais lipofílica que as demais tetraciclinas (BLUM et al., 2004). Isso favorece a esta tetraciclina atravessar facilmente a BHE (DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG et al., 2004). Além disso, a minociclina é rápida e facilmente absorvida (AGWUH & MACGOWAN, 2006), bem tolerada em altas doses (BLUM et al., 2004) e possui uma meia-vida média superior a outras drogas com ação biológica similar (ANDES & CRAIG, 2002; AGWUH & MACGOWAN, 2006). Estas características fazem da minociclina uma promessa terapêutica para diversas doenças do SNC, incluindo o AVENC isquêmico (DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG et al., 2004; HEWLETT & CORBETT, 2006; KIM & SUH, 2009).

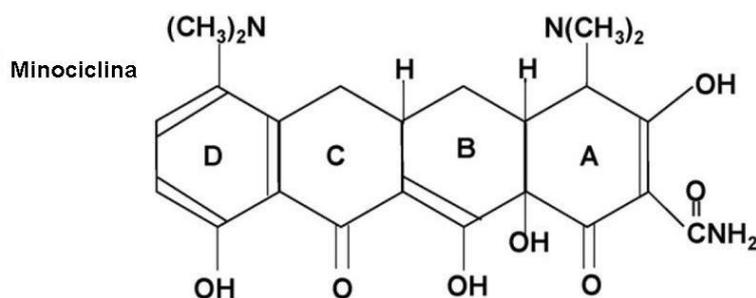


FIGURA 8. Estrutura molecular da minociclina. Modificado de Kim e Suh (2009).

Apesar de não ser totalmente claro o mecanismo de atuação da minociclina no AVENC isquêmico, o fármaco parece exercer influência em pontos diversificados da resposta inflamatória e apoptose (STIRLING et al., 2005). Na resposta inflamatória, estudos demonstram que a minociclina bloqueia a ativação e infiltração de leucócitos (YONG et al., 2004; STIRLING et al., 2005), atenua a permeabilidade da BHE inibe as enzimas MMPs e NOS (YONG et al., 2004; STIRLING et al., 2005; MACHADO et al., 2006), modula mediadores inflamatórios (YONG et al., 2004) e reduz a ativação e proliferação microglial (YRJANHEIKKI et al., 1999; DOMERCQ & MATUTE, 2004; YONG et al., 2004; STIRLING et al., 2005; HEWLETT & CORBETT, 2006; HAYAKAWA et al., 2008). Um

estudo recente sugere que a minociclina inibe a ativação microglial por uma ação específica em um mediador semelhante a citocina denominado HMGB-1 (do inglês, *high-mobility group box 1*) (HAYAKAWA et al., 2008).

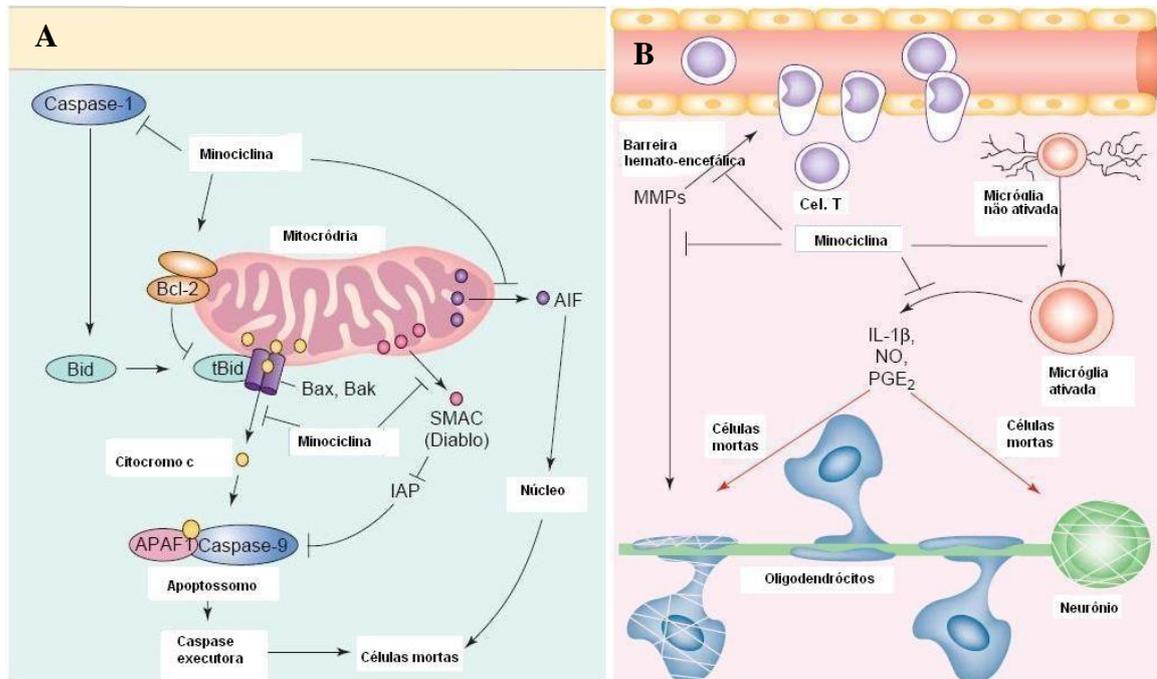


FIGURA 9. Atuação da minociclina na modulação inflamatória e como anti-apoptótico. **A.** representação de prováveis intervenções da minociclina nas vias intrínseca e extrínseca da apoptose. **B.** pontos de atuação chave da minociclina na resposta inflamatória. Modificado de Domercq e Matute (2004).

Na cascata apoptótica, a minociclina pode intervir na disponibilidade extracelular de ligantes de morte (TNF- α e ligante Fas) e/ou na presença de fatores neurotróficos no meio que ativam receptores de sobrevivência na célula. Intracelularmente, o principal alvo da minociclina é a mitocôndria (DOMERCQ & MATUTE, 2004). Nesta organela, o fármaco estabiliza a membrana mitocondrial e impede o vazamento de citocromo-C (TENG et al., 2004; YONG et al., 2004; STIRLING et al., 2005) (FIGURA 9A), aliado à redução direta da ativação de caspase-3 (STIRLING et al., 2005).

1.3.2 Células Tronco Adultas Derivadas da Medula Óssea

Células tronco são unidades teciduais reconhecidas pelo potencial proliferativo, multi-diferenciação e possibilidade de reconstituição funcional do tecido substituído (LINDVALL & KOKAIA, 2006; BACIGALUPPI et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009). As células tronco podem ser classificadas em adultas e embrionárias. As células embrionárias são obtidas da massa interna do blastocisto e possuem grande capacidade de proliferação e geração de células de qualquer tecido (totipotência) (LEEB et al., 2009). As células tronco adultas podem ser encontradas em vários locais do organismo, entre os quais cérebro, medula óssea, cordão umbilical e dente (LINDVALL & KOKAIA, 2006; BACIGALUPPI et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009).

Entre as células tronco adultas, são encontradas tipos celulares multipotentes e precursoras. As primeiras conseguem se diferenciar em células de alguns tecidos (CHEN et al., 2008), enquanto que as últimas possuem limitado poder de diferenciação e reduzida capacidade proliferativa (ENGLAND et al., 2009). Estas características são encontradas em células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais (JOHANSSON, 2003; DHARMASAROJA, 2009; GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009). Estas células tronco são derivadas da medula óssea (CMOs) e representam uma fração das células mononucleares do estroma ósseo (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009).

O transplante tanto de células tronco embrionárias como de células troncos adultas vem sendo utilizadas em diversos estudos pré-clínicos com terapia experimental para AVENC e outras desordens neurais agudas e crônicas (LINDVALL & KOKAIA, 2006; BACIGALUPPI et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009). Diversos estudos sugerem que o transplante de células tronco embrionárias induz neuroproteção e recuperação funcional após AVENC experimental (TOYODA et al., 2008; HICKS et al., 2009; ZOU et al., 2009). No

entanto, apesar da grande capacidade regenerativa e plasticidade das células tronco embrionárias, o uso das mesmas é limitado por questões éticas e disponibilidade (LEROU & DALEY, 2005). Este fato fez muitos grupos de pesquisa optarem pelas células tronco adultas como fonte de transplante em estudos pré-clínicos.

As CMOs constituem uma fonte alternativa à aquisição de células tronco para transplante por serem de fácil extração, não estarem envolvidas em grandes questões éticas ou religiosas e por apresentarem pluri ou multipotência no organismo receptor (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009). Estima-se que a quantidade de células tronco hematopoiéticas na medula óssea é da ordem de 0,05% - 0,5% (GUNSILIUS et al., 2001). O percentual restante é de células diferenciadas e progenitoras originadas neste tecido (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010). Estudos de Brenneman et al (2010) encontraram que o transplante de dez milhões de células mononucleares proporcionaram recuperação neurológica significativa, redução do volume isquêmico e modulação de mediadores inflamatórios em roedores (BRENNEMAN et al., 2010). O isolamento de tipos específicos de CMOs também demonstram resultados positivos sobre a formação da cicatriz glial em modelos de isquemia no córtex sensoriomotor de ratos (DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010).

Como se vê, mesmo em proporção reduzida, estudos sugerem que o transplante de CMOs é consideravelmente neuroprotetor e induz recuperação funcional após AVENC e outras desordens neurais agudas e crônicas, incluindo trauma cerebral e da medula espinhal (CHOPP et al., 2000; SCHWARTING et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009; ENGLAND et al., 2009; GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010).

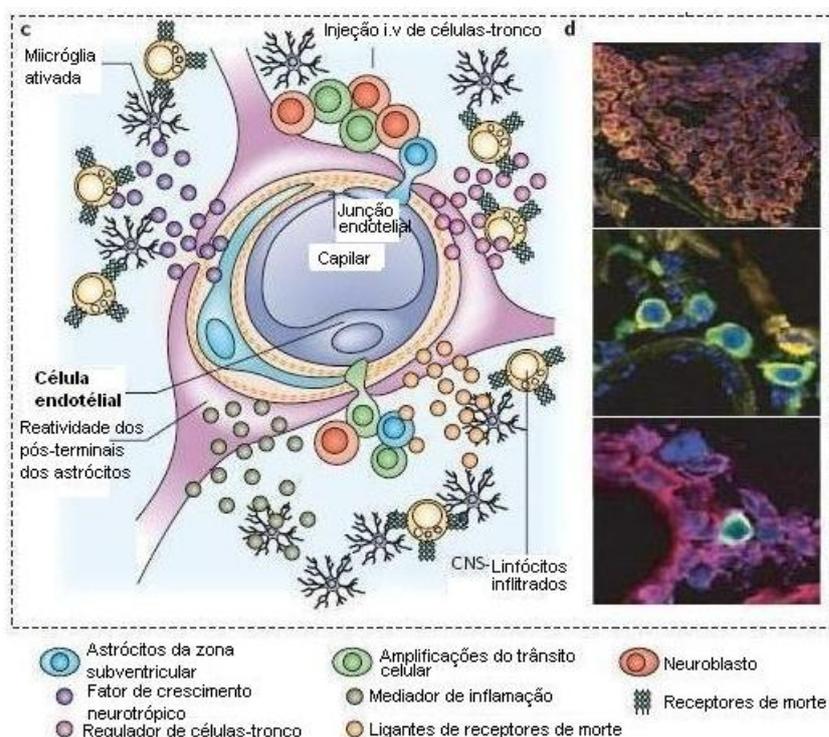


FIGURA 10. Possíveis mecanismos de ação das células tronco transplantadas após AVENC e outras desordens neurais. Modificado de Martino e Pluchino (2006).

O mecanismo de ação das CMOs no AVENC ainda não está definido. Estudos sugerem que células tronco transplantadas migram aos sítios de lesão e assumem fenótipos de células residentes, incluindo neurônios, astrócitos e oligodendrócitos o que resulta em melhora da função neurológica (MEZEY & CHANDROSS, 2000; MILLER, 2006; CHEN et al., 2008). No entanto, estudos recentes sugerem que, em função da reduzida quantidade de CMOs encontradas no parênquima nervoso, da ordem de 0,02% do montante transplantado (SAVITZ et al., 2004; SCHWARTING et al., 2008), as CMOs agem principalmente através de efeitos pleiotrópicos, cujo produto final é a neuroproteção tecidual (CHEN et al., 2001; LI et al., 2001; ANDREWS et al., 2008; CHEN et al., 2008; EINSTEIN & BEN-HUR, 2008; PAVLICHENKO et al., 2008; SCHWARTING et al., 2008). Nestes estudos, sugerem-se que fatores neurotróficos e citocinas anti-inflamatórias são liberados pelas células tronco transplantadas e ativam mecanismos de reparo endógeno (LI et al., 2000; CHEN et al., 2001;

LI et al., 2001; ANDREWS et al., 2008; EINSTEIN & BEN-HUR, 2008; PAVLICHENKO et al., 2008; SCHWARTING et al., 2008). Além disso, indução de neurogênese, angiogênese e sinaptogênese; neuroproteção e regulação do fluxo sanguíneo e da permeabilidade da BHE podem estar envolvidas nos mecanismos de ação das células tronco após AVENC e outras doenças (DHARMASAROJA, 2009) (FIGURA 10). Ou seja, as células tronco parecem modular amplamente o microambiente isquêmico (ENGLAND et al., 2009).

1.4 HIPÓTESE E PERGUNTA EXPERIMENTAL

Como visto, o AVENC possui um complexo mecanismo fisiopatológico que envolve inflamação, onde a ativação é um componente fundamental (CHAVARRIA & ALCOCER-VARELA, 2004; BLOCK et al., 2007; NAPOLI & NEUMANN, 2009), morte celular por necrose e apoptose (SYNTICHAKI & TAVERNARAKIS, 2002; 2003; VILA & PRZEDBORSKI, 2003; SUGAWARA et al., 2004; DOYLE et al., 2008) excitotoxicidade (HAZELL, 2007; KAUSHAL & SCHLICHTER, 2008; TAKEUCHI et al., 2008) e estresse oxidativo (LOVE, 1999; CHAN, 2001; ALEXANDROVA & BOCHEV, 2005). Estes e outros eventos fisiopatológicos levam a progressão da lesão primária sobre a penumbra isquêmica, o que aumenta a disfunção neurológica (LO, 2008).

Como discutido anteriormente, a resposta inflamatória mediada pela microglia pode evoluir com perfil deletério pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e produtos citotóxicos que induzem à morte neuronal e prejuízo à neurogênese endógena (MABUCHI et al., 2000; YENARI et al., 2006; BLOCK et al., 2007; LEHNARDT et al., 2008). Desta forma, a modulação do estado de reatividade microglial é um fator preponderante após desordens neurais agudas e crônicas (LIU & HONG, 2003; LAI &

TODD, 2006; NEUMANN et al., 2009). Esta célula é atualmente considerada alvo para intervenção terapêutica (ROCK & PETERSON, 2006; BLOCK & HONG, 2007).

Em diversos estudos as células tronco são transplantadas na fase aguda do AVENC, período no qual uma intensa resposta inflamatória está ocorrendo (ANDREWS et al., 2008; KEIMPEMA et al., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010). Existem evidências experimentais que as células tronco transplantadas são afetadas por componentes da resposta inflamatória aguda (COYNE et al., 2006; MOLCANYI et al., 2007). Após trauma experimental, a resposta inflamatória parece prejudicar a sobrevivência e a integração de células tronco transplantadas nesta condição patológica (MOLCANYI et al., 2007). Outro estudo sugere que o transplante de células tronco em cérebros normais iniciam um processo inflamatório que contribui para a rejeição das células transplantadas (COYNE et al., 2006).

Em estudos prévios de nosso grupo, investigamos como a modulação da ativação microglial influencia as ações terapêuticas de CMOs transplantadas na fase aguda após isquemia experimental do córtex motor (FRANCO, 2009). Neste estudo, encontramos evidências experimentais que a diminuição da ativação microglial é benéfica para as ações das células transplantadas 24h após isquemia do córtex motor. No entanto, ainda não se investigou como a resposta inflamatória influencia as ações terapêuticas de células tronco transplantadas após AVENC experimental no estriato, um componente importante dos núcleos da base, comumente afetado por AVENC em seres humanos (MARINKOVIC et al., 2001). Nesta dissertação, induzimos isquemia focal no estriato de ratos adultos para investigarmos a hipótese de que o tratamento de animais isquêmicos com células tronco da medula óssea, em concomitância com o bloqueio da ativação microglial com minociclina, pode induzir proteção tecidual e recuperação funcional mais eficazes do que a simples terapia celular sem o bloqueio da resposta inflamatória.

1.5 OBJETIVO

1.5.1 Objetivo Geral

Investigar se o bloqueio da ativação microglial pela minociclina potencializa os efeitos terapêuticos de células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas endovenosamente em ratos submetidos à isquemia experimental focal do estriato induzida por microinjeções de endotelina-1.

1.5.2 Objetivos específicos

- Descrever os aspectos histopatológicos da lesão estriatal isquêmica, incluindo padrões lesivos e resposta inflamatória aguda, com ênfase na ativação microglial.
- Induzir bloqueio microglial com minociclina, após lesão estriatal isquêmica.
- Investigar qualitativa e quantitativamente os efeitos do bloqueio microglial sobre as ações terapêuticas de células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas endovenosamente após lesão estriatal isquêmica, considerando parâmetros relacionados à preservação tecidual.
- Investigar de que forma o bloqueio microglial influencia os efeitos das células da fração mononuclear transplantadas na fase aguda do AVENC experimental sobre a recuperação funcional de animais com isquemia estriatal, avaliado através de testes comportamentais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 21 ratos Wistar, machos adultos, pesando entre 220-280g. Todos alojados em gaiolas contendo entre 4-5 animais, com água e comida *ad libitum*. Os procedimentos foram executados conforme aprovado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará, segundo protocolo nº BIO010-09. Todos os esforços foram realizados para evitar o sofrimento e ansiedade nos animais.

Para este estudo foram planejados quatro grupos experimentais e animais doadores de medula óssea, conforme disposto na tabela a baixo.

TABELA 01. Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais/ grupo.

Grupos	Descrição	Número
IST	Animais controle-isquêmico – são animais isquêmicos tratados apenas com salina estéril. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos e indução de isquemia com endotelina-1 (ET-1).	06
ICM	Animais isquêmicos tratados com minociclina – receberam todos os procedimentos cirúrgicos com indução isquêmica por ET-1 e tratamento (i.p.) diário com minociclina.	05
ITCT	Animais isquêmicos tratados com células da fração mononuclear da medula óssea. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos com indução isquêmica por ET-1 e tratamento intravenoso (i.v.) único com células mononucleares.	04
ICMCT	Animais isquêmicos tratados, concomitantemente, com minociclina e células mononucleares. Receberam todos os procedimentos cirúrgicos com indução isquêmica e tratamento segundo os protocolos dos grupos ICM e ITCT.	04
Doadores	Animais doadores de medula óssea para extração de células mononucleares visando o tratamento dos grupos ITCT e ICMCT.	02
	TOTAL	21

2.2 PROCEDIMENTOS PRÉ-INDUÇÃO ISQUÊMICA

Os animais foram adquiridos com cinco dias de antecedência da data prevista para a cirurgia. Durante este período, os animais foram ambientados e manipulados para reduzir reações de ansiedade e estresse nos testes comportamentais. No dia anterior à indução isquêmica, objetivando registrar as linhas de base dos animais, estes realizaram os testes comportamentais que foram posteriormente executados em dias específicos após a indução isquêmica.

2.3 INDUÇÃO DE ISQUEMIA FOCAL POR MICROINJEÇÃO DE ET-1

No dia da cirurgia, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol[®], König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol[®], König. 9mg/kg). Uma vez abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Insight[®], EFF-336), sob a proteção de uma manta térmica, para posterior registro das coordenadas estereotáxicas que permitissem injetar a ET-1 para a indução isquêmica no estriato. As coordenadas estereotáxicas foram as seguintes, tomando o bregma como ponto de referência: +2mm, lateral; +1mm, anterior; e, -4mm, ventral, a partir da superfície cortical. Uma incisão longitudinal foi feita com bisturi para exposição da caixa craniana e, no ponto especificado pelas coordenadas estereotáxicas, realizou-se craniotomia com auxílio de uma broca cirúrgica para exposição da superfície cortical. Em seguida, injetou-se lentamente 40 pMol de ET-1 (Sigma-Aldrich) diluídos em 1µl de solução salina estéril com auxílio de uma micropipeta de vidro graduada (Sigma-Aldrich, Hirschmann). A pipeta foi mantida estacionária por cinco minutos no parênquima neural, antes de ser lentamente retirada, de modo a evitar o refluxo da ET-1 injetada. Adicionou-se um pequeno volume de azul colanil, tanto à solução de ET-1 como à solução diluente, para facilitar a identificação do sítio de injeção. Depois da cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas

individuais durante o tempo de sobrevivência de sete dias, apenas saindo das mesmas para a realização dos testes comportamentais.

2.4 TESTE COMPORTAMENTAL

Foi utilizado o teste Modificado de Remoção do Adesivo proposto por Sughrue e et al. (2006) e corrigido por Komotar et al. (2007), o qual foi adaptado nas quantidades de tentativas propostas e no modo de análise dos dados gerados. Das cinco tentativas, o melhor e pior desempenho foram excluídos para se abstrair a média do teste apenas para a pata contralateral.

O teste consistiu em envolver o punho do animal com um adesivo (3,5cm de comprimento por 1,0 cm de largura) em tentativas de 30s cada, alternadas entre as patas, marcadas por um cronômetro em contagem regressiva. Com auxílio de um segundo cronômetro, todo e qualquer movimento esboçado pelo animal na tentativa de retirada do adesivo foi registrado (SUGHRUE et al., 2006; KOMOTAR et al., 2007). Portanto, este teste avalia a capacidade sensoriomotora do animal.

2.5 TRATAMENTO COM MINOCICLINA PARA BLOQUEIO MICROGLIAL

Está bem estabelecido que o tratamento com minociclina, na dosagem aqui utilizada, diminui a ativação microglial (YRJANHEIKKI et al., 1999; EKDAHL et al., 2003). Neste estudo, utilizamos o protocolo descrito por Ekdahl et al. (2003) e Franco et al. (2009) para a inibição da ativação microglial. Os animais do grupo ICM (N=5) injetados com ET-1 receberam duas injeções diárias (*i.p*) de 50 mg/kg de minociclina (Sigma Aldrich) de 12 - 12h

durante os primeiros dois dias. A primeira injeção foi administrada 2h após a indução da lesão isquêmica. Doses subsequentes de 25 mg/kg foram administradas uma vez por dia nos cinco dias subsequentes.

2.6 TRATAMENTO COM CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

A fração mononuclear foi extraída da medula óssea de animais doadores da mesma ninhada dos animais receptores 24h após a indução isquêmica. O protocolo de extração foi adaptado de Giraldo-Guimarães et al. (2009). Os animais doadores foram anestesiados com uma mistura de Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol[®], König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol[®], König. 9mg/kg). Abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em ambiente estéril, o fêmur e a tíbia de cada pata foram dissecados e imersos em solução salina estéril. Na capela de fluxo laminar (Veco, Clean Plus – CFLH-09), as epífises dos ossos foram cortadas e a medula óssea extraída com auxílio de uma seringa (10ml), cuidadosamente inserida no canal da medula óssea. Utilizou-se a pressão exercida por um volume de DMEM-F12 (Sigma-Aldrich, D8900-10X1L) para alojar a medula óssea em um tubo falcon de 14 ml. No tubo falcon, a medula óssea foi mecanicamente dissociada e centrifugada (Centribio, 80-2B) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a mistura de células ressuspensa em 2ml de DMEM-F12 e transferida para outro tubo falcon contendo 2ml de Histopaque[®] (108 31-6X100XL) e centrifugada por 30 minutos. Deste último, as células foram extraídas do meio limite entre o Histopaque[®] e o DMEM-F12. No terceiro tubo falcon, as células mononucleares foram centrifugadas em três tempos com solução salina por 5 minutos cada. Estas lavagens foram

feitas em 3ml da solução salina estéril com ressuspensão das células entre uma lavagem e outra (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009).

Depois da última lavagem, contaram-se as células. O sobrenadante foi descartado e, às células no tubo, adicionou-se 0,9ml de DMEM-F12 e 0,1ml de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), solução estoque. Após a ressuspensão, uma alíquota de 100 μ l da solução estoque foi retirada e misturada à 400 μ l de solução salina para extração de células mononucleares e 500 μ l de Solução Azul Tripano (Fluka). Uma parte desta última solução foi usada para contagem das células mononucleares viáveis em Câmara de Neubauer (Hemocitômetro), tomando-se por base, inicialmente, o fator de diluição igual a 10 (dez), o volume injetado contendo 5×10^6 células mononucleares foi da ordem de 100 μ l.

2.7 TRATAMENTO CONCOMITANTE COM MINOCICLINA E CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

Para testarmos a hipótese de que a modulação da ativação microglial é benéfica para as ações terapêuticas das células da medula óssea transplantadas na fase aguda após AVENC experimental, nós delineamos um grupo experimental onde os animais isquêmicos foram tratados, concomitantemente, com células da fração mononuclear da medula óssea e minociclina. Estes animais receberam, como previamente descrito, 5×10^6 células da medula 24h após a indução isquêmica (grupo ICMCT, N=4). Em seguida, nos cinco dias subsequentes (até o sexto dia pós-isquemia), receberam doses de minociclina de acordo com o protocolo descrito para o grupo ICM. A perfusão foi realizada ao sétimo dia após a indução isquêmica. Este tempo de sobrevida corresponde ao pico de ativação microglial após isquemia

(CLARK et al., 1993; MORIOKA et al., 1993; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008) e, portanto, é adequado para testar a hipótese em questão.

2.8 PERFUSÃO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

No sétimo dia após a indução isquêmica, concluídos os testes comportamentais, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetanarcol[®], König. 72mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (Kensol[®], König. 9mg/kg). Abolidos os reflexos de retirada da pata e corneano, os mesmos foram perfundidos através do ventrículo esquerdo do coração com 250-300 ml de tampão fosfato salina (PBS 0,1M; 0,9%; pH 7,2 – 7,4) heparinizada, seguido de 250-300 ml de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Depois da retirada dos encéfalos, estes foram pós-fixados por 24h no mesmo fixador. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos em soluções com concentrações crescentes de sacarose diluída em mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 – 7,4.

Após a crioproteção, os encéfalos foram incluídos em Tissue-Tek[®] (Sakura) e seccionados com auxílio de um criostato (Micron, HM505E), onde secções de 20 e 50 µm foram obtidas. As secções foram diretamente montadas em lâminas histológicas gelatinizadas e conservadas em um freezer a -20°C para posterior uso.

2.9 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA

2.9.1 Análise Histopatológica Geral

A análise histopatológica foi realizada com a coloração pela violeta de cresila. Esta coloração permite a visualização de corpos celulares e a perda dos mesmos em situações

patológicas (DOS SANTOS et al., 2007; LIMA et al., 2008; GUIMARAES et al., 2009). Para identificarmos precisamente o epicentro da lesão isquêmica, observamos secções coradas em diferentes pontos tanto anterior como posterior ao sítio de injeção de ET-1. Secções mais próximas ao epicentro lesivo foram escolhidas para análise histopatológica.

2.9.2 Imunoistoquímica

A presença de microglia/macrófagos ativados foi identificada pela imunomarcção com o anticorpo ED1 (1:200; Sorotec), que reconhece um epítipo na membrana de lisossomas de macrófagos ativados (ROBINSON et al., 1986). Corpos neuronais foram marcados com o anticorpo anti-NeuN (1:100, Chemicon-Millipore), que reconhece um epítipo específico no núcleo de neurônios maduros (MULLEN et al., 1992).

O protocolo utilizado foi previamente usado em (GOMES-LEAL et al., 2002). As lâminas com as secções montadas foram retiradas do freezer e colocadas na estufa (BrasDonto, BrClave[®]) à 40°C por 30 minutos. Em seguida, as secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica (Dako Pen, ref. S2002), lavadas em PBS por 3 minutos, e imersas em tampão borato (0,2M, pH 9,0; Nuclear) à temperatura constante de 65°C, por 25 minutos. Após esta fase, as secções ficaram mais 20 minutos à temperatura ambiente. As secções foram novamente lavadas em PBS por 3 minutos e submetidas ao tratamento com solução metanol (QEEL) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂, Merck) (1ml de H₂O₂ para cada 100ml de metanol absoluto) sob agitação constante. As secções foram então lavadas (3 tempos, 3 minutos cada) em solução de PBS/Tween[®] (Sigma-Aldrich) e incubadas por 1h em soro normal de cavalo a 10% em câmara úmida. Depois, o excesso de soro normal foi retirado para incubação no anticorpo primário, por uma noite. No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 tempos, 3 minutos cada) na solução de PBS/Tween[®] e incubadas por 2h no anticorpo secundário biotilado anti-camundongo feito em cavalo (1:100; Vector). Após este período, três

lavagens foram realizadas (3 minutos cada) em PBS/Tween para que as secções fossem incubadas no Complexo Avidina-Biotina Peroxidase (Vector, kit ABC Vectastain[®]) por 2h. As secções foram lavadas (4 tempos, 3 minutos cada) antes da revelação utilizando diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich). As secções foram incubadas em uma solução contendo 250 ml de PB 0.1M (pH 7,2 – 7,4) juntamente com 125mg de DAB e 130 µl de H₂O₂. As mesmas foram monitoradas em microscópio óptico até que a intensidade da reação ficasse adequada. Após o término da revelação, as secções foram lavadas em PB 0,1 M (pH 7,2 – 7,4), desidratadas em gradientes de álcool/ xileno e montadas em Entellan[®] (Merck).

2.10 ANÁLISE QUALITATIVA

As secções de todos os grupos experimentais, marcadas pelos métodos imunoistoquímicos e histoquímicos foram analisadas em microscópio óptico (Bioval, L2000C). Imagens de campos representativos foram obtidas com auxílio de uma câmera digital (Nikon, Coolpix 950) acoplada a um microscópio óptico (Nikon, Optiphot 2).

2.11 ANÁLISE QUANTITATIVA

2.11.1 Método de Contagem

Contou-se o número de macrófagos ativados (células ED1⁺) e corpos neuronais (células NeuN⁺) de todos os grupos experimentais, utilizando objetiva de 40X e gradícula de área 0.0625 mm² acoplada à ocular de um microscópio óptico (BIOVAL, L2000C). Utilizou-se nas contagens 3 secções por animal, 16 campos por secção, e, pelo menos, 3 animais para cada grupo experimental.

2.11.2 Análise Estatística

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

3 RESULTADOS

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

Três horas após a indução isquêmica por microinjeção de 40 pMol de ET-1 no estriato, os animais foram avaliados quanto aos déficits funcionais. Todos os animais apresentaram desvio ipsilateral do tronco quando estáticos e deslocamento circular ao se mover pela gaiola, além de retração da pata contralateral, evidenciada ao se erguer sutilmente os animais pela calda. Estes parâmetros evidenciam a eficácia da indução isquêmica.

3.2 MICROINJEÇÕES ESTRIATAIS DE ET-1 INDUZEM PERDA NEURONAL PROGRESSIVA CONCOMITANTE COM INTENSA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Microinjeções de 40 pMol de ET-1 no estriato de ratos adultos (grupo IST) induziram perda neuronal progressiva, caracterizada por palor tecidual e necrose 7 dias após a indução isquêmica (FIGURA 11A). Concomitante com a conspícua perda tecidual, houve intensa resposta inflamatória, caracterizada pela presença de macrófagos ativados no centro isquêmico e na região periinfarto (FIGURA 11A e 12A). O tratamento com minociclina (FIGURA 12B e 13) diminuiu consideravelmente o número de células ED1⁺ no parênquima estriatal (IST: 83,14±13,65, N=4; ICM: 53,32±3,27, N=4).

Para investigarmos especificamente a magnitude de perda neuronal no modelo experimental proposto realizamos imunistoquímica para NeuN. Microinjeções de ET-1 induziram conspícua perda neuronal no estriato de ratos adultos (FIGURAS 14A). Esta perda

neuronal foi claramente reconhecida pelo desaparecimento quase que completo de corpos neuronais no centro isquêmico no estriato (FIGURA 14A).

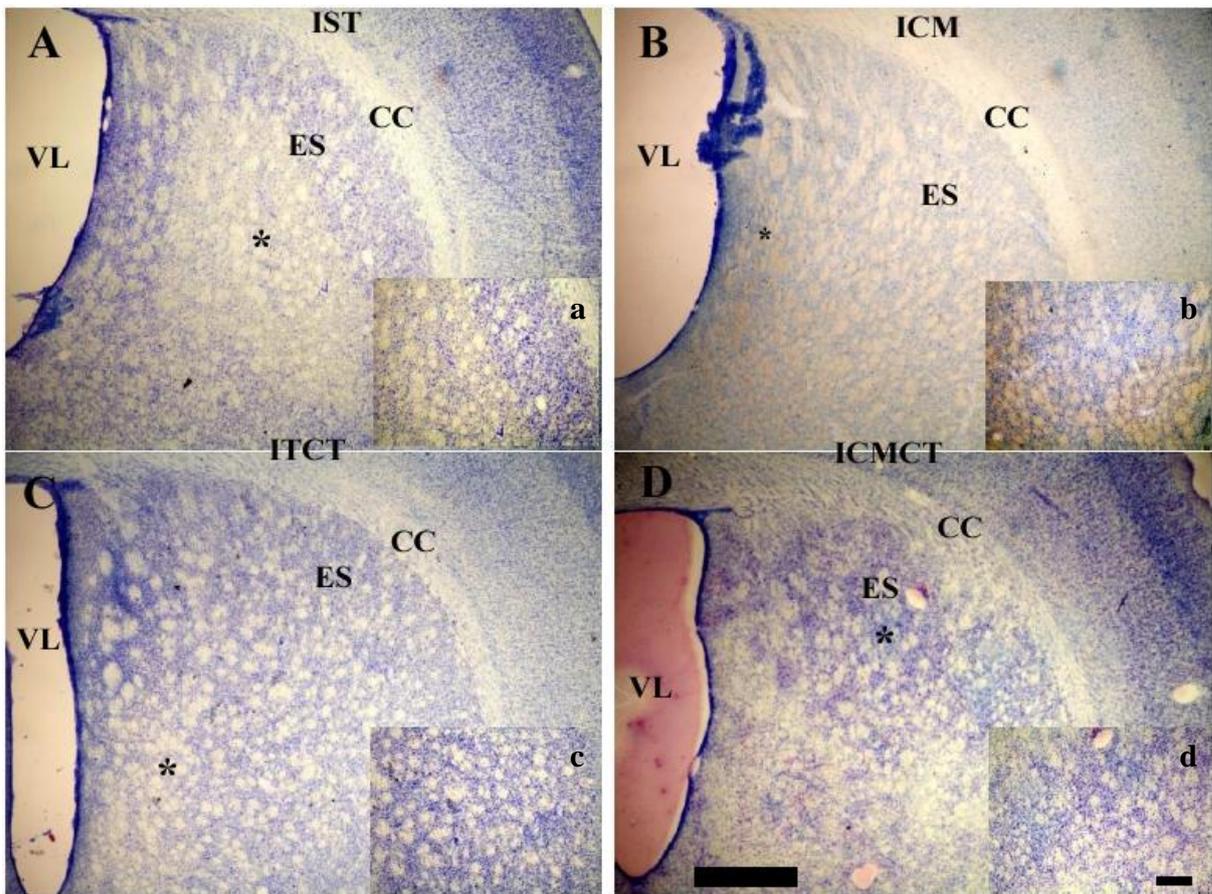


FIGURA 11. Análise histopatológica dos grupos experimentais pela violeta de cresila. **A.** Grupo controle isquêmico (**IST**). **B.** Grupo isquêmico tratado com minociclina (**ICM**). **C.** Grupo isquêmico tratado com células mononucleares (**ITCT**). **D.** Grupo isquêmico de tratamento concomitante minociclina e células mononucleares da medula óssea (**ICMCT**). **VL**, ventrículo lateral. **CC**, corpo caloso. **ES**, estriato. * centro isquêmico. Escalas: A-D (300 µm); a-d (200 µm).

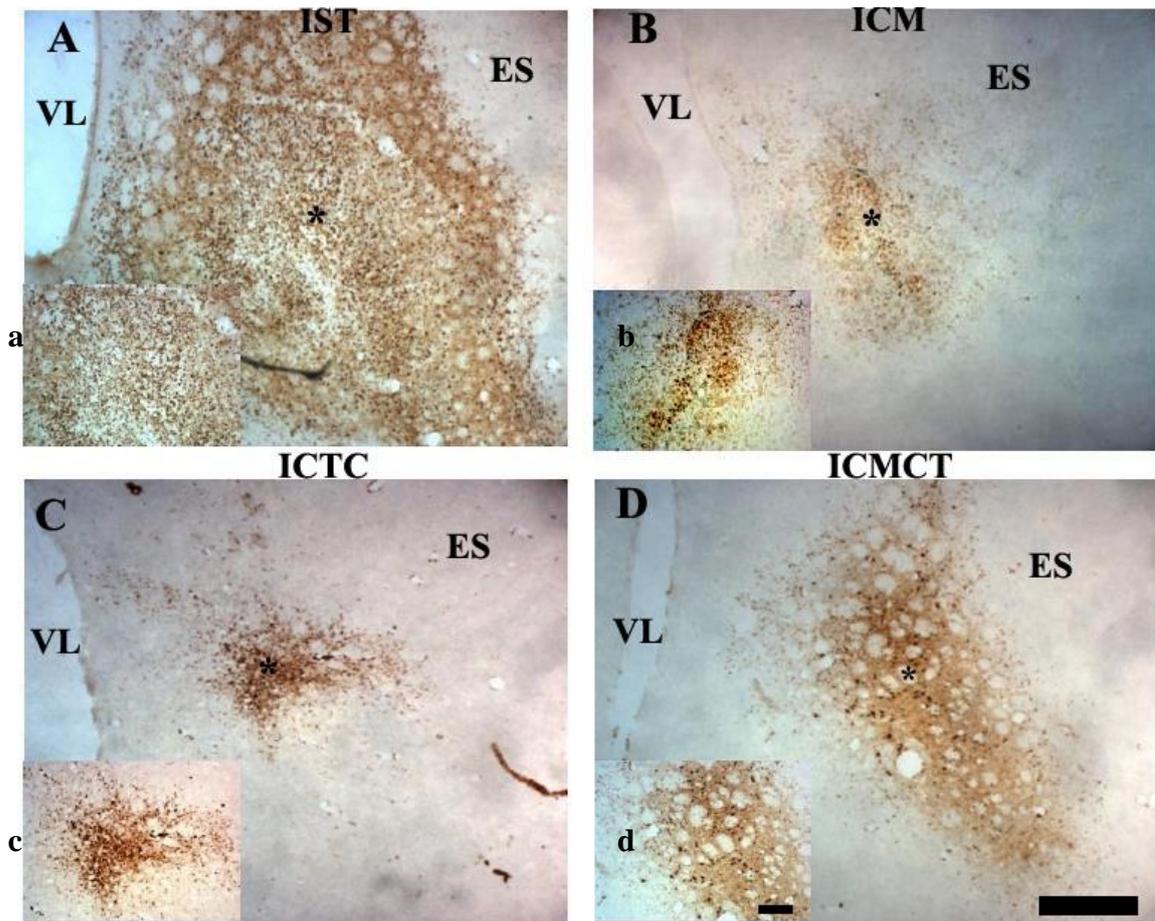


FIGURA 12. Ativação microglial/macrofágica revelada pela imunistoquímica para ED1. **A.** Grupo controle isquêmico (IST). **B.** Grupo isquêmico tratado com minociclina (ICM). **C.** Grupo isquêmico tratado com células mononucleares (ITCT). **D.** Grupo isquêmico de tratamento concomitante (ICMCT). Ampliação, objetiva: 4x (A, B, C e D); 10x (a, b, c e d). VL, ventrículo lateral. CC, corpo caloso. ES, estriato. * centro isquêmico. Escalas: A-D (300 μ m); a-d (200 μ m).

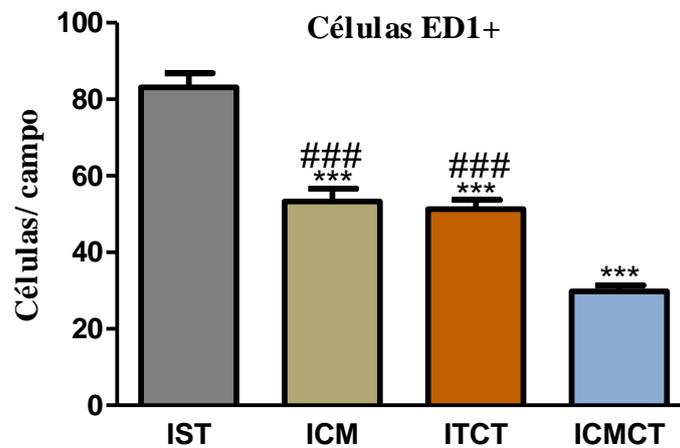


FIGURA 13. Análise quantitativa de macrófagos/microglia ativadas imunorreativas para ED1⁺ recrutadas à área de lesão induzida por ET-1. * comparação com o IST. # comparação com ICMCT. **IST**, grupo isquêmico tratado apenas com salina estéril. **ICM**, grupo isquêmico tratado apenas com minociclina. **ITCT**, grupo isquêmico tratado apenas com células-tronco. **ICMCT**, grupo isquêmico tratado concomitantemente. ($p < 0,05$).

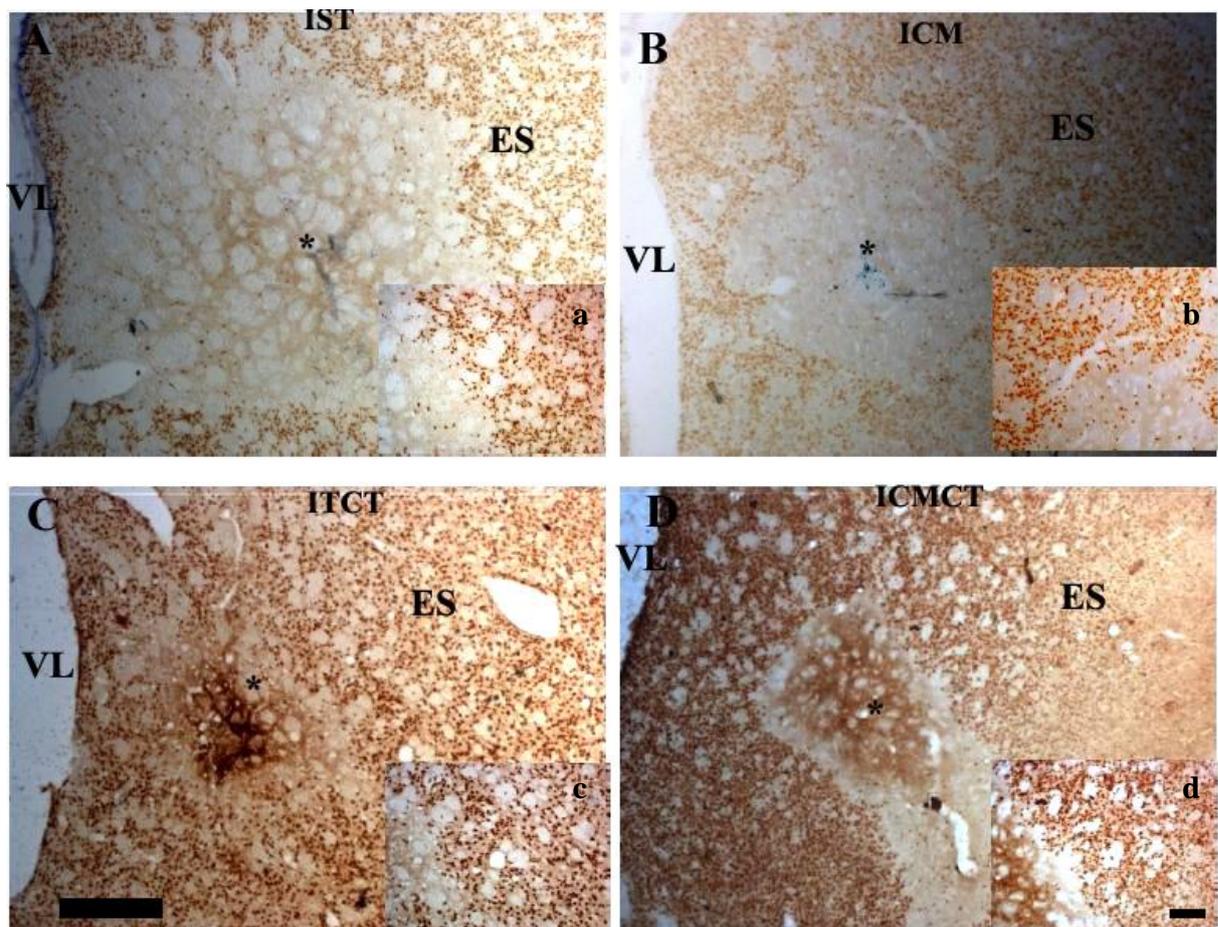


FIGURA 14. Corpos neuronais revelados por imunistoquímica para NeuN⁺ delimitando a lesão isquêmica induzida por ET-1. **A.** Grupo controle isquêmico (IST). **B.** Grupo isquêmico tratado com minociclina (ICM). **C.** Grupo isquêmico tratado com células mononucleares (ITCT). **D.** Grupo isquêmico de tratamento concomitante (ICMCT). VL, ventrículo lateral. CC, corpo caloso. ES, estriato. *, centro da lesão. Escalas: A-D (300 μ m); a-d (200 μ m).

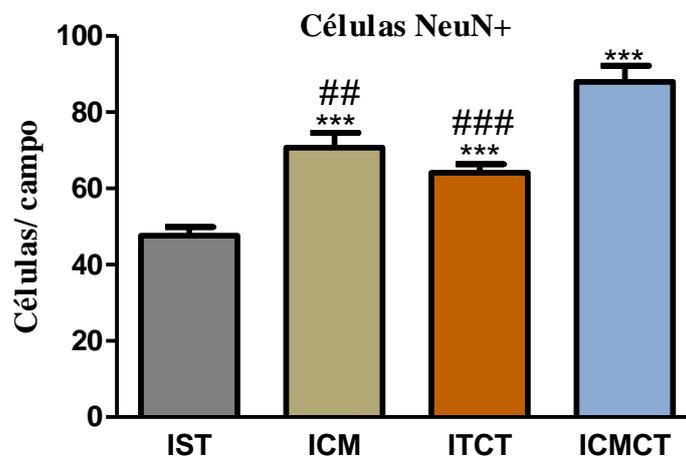


FIGURA 15. Análise quantitativa de células NeuN⁺ imunomarcadas no estriato isquêmico induzido por ET-1. * comparação com o IST. # comparação com ICMCT. IST, grupo isquêmico tratado apenas com salina estéril. ICM, grupo isquêmico tratado apenas com minociclina. ITCT, grupo isquêmico tratado apenas com células-tronco. ICMCT, grupo isquêmico tratado concomitantemente. ($p < 0,05$).

3.3 O TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA, CONCOMITANTE COM BLOQUEIO MICROGLIAL, MINIMIZA MAIS EFETIVAMENTE A PERDA NEURONAL APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Como revelado pela análise de tecido corado pela violeta de cresila, o transplante endovenoso de cinco milhões de CMOs após 24h de isquemia estriatal minimizou as perdas teciduais, com uma clara diminuição da área de infarto estriatal (FIGURA 11C). Resultado similar foi obtido nos grupos de animais tratados com minociclina (FIGURA 11B). A perda de corpos neuronais foi claramente menor nos grupos de animais tratados com minociclina ou com células mononucleares (FIGURAS 14B-C). Estes resultados foram parcialmente confirmados pela análise quantitativa (FIGURA 15). As densidades médias de células NeuN+ por campo foram claramente maiores nos grupos experimentais ICM ($70,73 \pm 3,87$. N=4), ITCT ($64,11 \pm 2,26$. N=3) e ICMCT ($87,97 \pm 4,84$. N=4) do que nos animais do grupo IST ($47,61 \pm 2,25$. N=5). Todos os grupos de tratamento experimental (ICM, ITCT e ICMCT) apresentaram diferenças estatisticamente significantes comparados ao grupo IST ($p < 0.05$, ANOVA-Tukey). Animais transplantados com células mononucleares e ao mesmo tempo tratados com minociclina (grupo ICMCT) apresentaram a maior densidade neuronal com diferença estatística mesmo quando comparados com os animais de tratamento isolado ($p < 0.05$, ANOVA-Tukey), o que sugere um efeito sinérgico entre os dois tratamentos (FIGURA 15).

3.4 O TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA MODULA A RESPOSTA INFLAMATÓRIA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

No presente estudo, a presença de macrófagos ativados foi evidenciada pela presença de células ED1⁺ no parênquima estriatal isquêmico (FIGURA 12). Os animais dos grupos ICM, ITCT e ICMCT apresentaram menos células ED1⁺ no estriato isquêmico do que os animais do grupo IST (FIGURA 12). Estes resultados foram confirmados por análise quantitativa (FIGURA 13).

As densidades de células ED1⁺/campo de contagem foram estatisticamente menores ($p < 0.05$, ANOVA-Tukey) nos grupos ITCT ($51,31 \pm 2,41$, N=4), ICM ($53,32 \pm 3,27$, N=4) e ICMCT ($21,53 \pm 2,88$, N=4) comparados aos animais do grupo IST ($83,14 \pm 3,65$, N=4). Não houve diferença estatística entre os valores de células ED1⁺ entre os grupos ICM e ITCT ($p > 0.05$, ANOVA-Tukey), mas as comparações dos valores destes dois grupos com os do grupo ICMCT foram estatisticamente significativas ($p < 0.05$, ANOVA-Tukey).

3.5 EFEITO NEUROCOMPORTAMENTAL DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA MICROGLIAL APÓS TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA DURANTE ISQUEMIA ESTRIATAL

No presente estudo realizou-se o teste modificado de remoção do adesivo para analisar a evolução da recuperação funcional dos animais em função da linha de base registrada no dia anterior à cirurgia para indução isquêmica.

O teste modificado de remoção do adesivo apresentou sensibilidade para demonstrar déficit funcional 24 horas após a isquemia ter sido induzida. Um dia antes da isquemia o valor

registrado para a pata contralateral foi de $22,87 \pm 0,53$ (n=19). Vinte e quatro horas após a isquemia os valores registrados para animais dos grupos IST (N=6), ICM (N=5), ITCT (N=4) e ICMCT (N=4) foram, respectivamente, $10,81 \pm 2,95$; $7,73 \pm 2,13$; $9,66 \pm 3,31$ e $10,67 \pm 2,53$ (FIGURA 16).

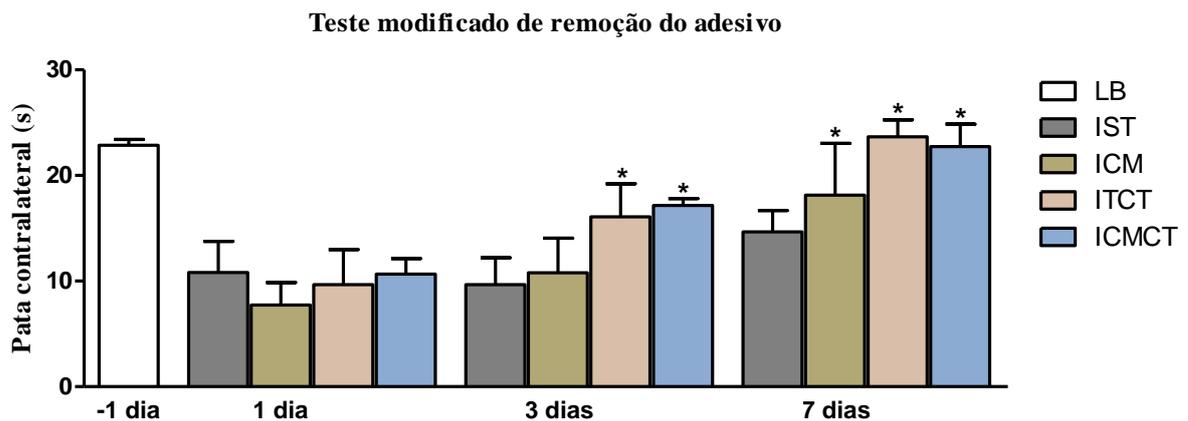


FIGURA 16. Gráfico do teste modificado de remoção do adesivo analisado ao longo de 30s, pata contralateral. O desempenho dos animais foi comparado antes e depois da indução da isquemia. **LB** = linha de base (1 dia antes da isquemia); **IST** = grupo isquêmico tratado com solução salina estéril; **ICM** = grupo isquêmico tratado com minociclina; **ITCT** = grupo isquêmico tratado com células mononucleares extraídas da medula óssea; **ICMCT** = grupo isquêmico de tratamento concomitante. (*) recuperação funcional em comparação com a linha de base pela ausência de significância estatística ($p > 0,05$).

O grupo de animais isquêmicos tratados com CMOs (N=4) e o grupo submetido ao tratamento concomitante com CMOs e minociclina (N=4) apresentaram melhora significativa de seu desempenho motor 72 horas após o tratamento ter iniciado (FIGURA 16). Animais tratados apenas com minociclina apresentaram melhora somente sete dias após o início do tratamento enquanto que animais isquêmicos sem tratamento não apresentaram recuperação funcional significativa (FIGURA 16).

Estes resultados sugerem que a recuperação funcional observada não ocorreu espontaneamente, mas foi consequência do tratamento ao qual foram submetidos. A terapia celular empregada no presente estudo foi importante para que os animais isquêmicos se

recuperassem em um período de tempo menor. O tratamento com minociclina também demonstrou ser eficiente, porém, em um período de tempo mais tardio.

4 DISCUSSÃO

4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente estudo, induzimos isquemia focal no estriato de ratos adultos através de microinjeções de ET-1. Este procedimento foi eficaz para a indução de perda tecidual progressiva, com intensa perda de corpos neuronais e resposta inflamatória. Estes achados estão de acordo com os estudos prévios de nosso grupo (DOS SANTOS et al., 2007; SOUZA-RODRIGUES et al., 2008) e de outros autores (HUGHES et al., 2003; MOYANOVA et al., 2007) utilizando o modelo de lesão isquêmica focal através de microinjeções de ET-1.

No modelo experimental em questão, investigamos a hipótese de que a modulação da resposta microglial após isquemia facilita as ações terapêuticas de células da fração mononuclear da medula óssea, transplantadas endovenosamente, em ratos adultos na fase aguda do processo isquêmico. Utilizando parâmetros histológicos e neurocomportamentais, sugerimos que a modulação da atividade microglial no ambiente isquêmico é benéfica para as ações terapêuticas da terapia celular realizada na fase aguda após AVENC.

Diversos estudos mostraram que células tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da medula óssea apresentam importantes efeitos neuroprotetores e comportamentais após desordens neurais agudas, incluindo AVENC experimental (CHEN et al., 2008; PAVLICHENKO et al., 2008; YOO et al., 2008). Apesar do uso viável e seguro, o protocolo de expansão destas células para se alcançar um quantitativo razoável para uso terapêutico em transplante autólogo é dependente de cultura celular que pode levar semanas (BOBIS et al., 2006). Esforços foram aplicados para reduzir este tempo (SCHOP et al., 2008). Isso, contudo, ainda dificulta o uso destas células para transplante durante desordens neurais agudas. Além

disso, o risco de contaminação da cultura é um fator a se considerar neste tipo de procedimento (GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010). Recentemente, demonstrou-se experimentalmente que os efeitos neuroprotetores e de recuperação funcional com o uso de CMOs são comparáveis aos obtidos com as células tronco isoladas (BRENNEMAN et al., 2010; DE VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010). Além disso, na prática clínica, a fácil obtenção de CMOs a partir da crista ilíaca, com separação em horas, torna o uso de CMOs uma alternativa promissora para o tratamento na fase aguda do AVENC. Na presente dissertação, utilizamos CMOs e não células tronco isoladas.

4.2 MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL APÓS ISQUEMIA PELA CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

Os resultados descritos sugerem que as células da fração mononuclear da medula óssea modulam a ativação microglial na fase aguda (primeira semana) da isquemia estriatal, em níveis comparados aos obtidos pela minociclina, um clássico inibidor da ativação microglial (YRJANHEIKKI et al., 1999; FOX et al., 2005; HEWLETT & CORBETT, 2006; LAMPL et al., 2007; HAYAKAWA et al., 2008). Este resultado é corroborado por trabalhos recentes que sugerem que uma das ações terapêuticas de células tronco da medula óssea e do cordão umbilical transplantadas após AVENC experimental é a modulação da resposta inflamatória, o que contribui para uma ação terapêutica mais eficaz (VENDRAME et al., 2005; CAPONE et al., 2007; SCHWARTING et al., 2008; KEIMPEMA et al., 2009). Schwarting et al., (2008) relataram que células tronco hematopoiéticas transplantadas 24h após oclusão experimental da artéria cerebral média em camundongos induz neuroproteção e recuperação funcional, concomitante com diminuição da infiltração de macrófagos e

linfócitos tanto no córtex como no estriato isquêmico. Estes autores sugerem que a modulação da resposta inflamatória é um importante componente dos efeitos neuroprotetores das células transplantadas. Resultados similares foram descritos por Keimpema et al., (2009) utilizando células tronco da medula óssea. Outros autores, utilizando células tronco do cordão umbilical (VENDRAME et al., 2005) ou células tronco neurais (CAPONE et al., 2007), relatam que a modulação da resposta inflamatória após isquemia é um importante componente dos efeitos neuroprotetores das células tronco da medula óssea após isquemia.

É válido mencionar, que nos estudos descritos anteriormente, as células tronco da medula óssea exercem seus efeitos se comportando, e mesmo apresentando um fenótipo, de células microgliais com um perfil antiinflamatório (SCHWARTING et al., 2008; KEIMPEMA et al., 2009). Este fato é ainda mais consubstanciado pelo relato experimental que macrófagos hematogênicos são células com um perfil antiinflamatório que possuem uma grande importância na recuperação funcional após lesão aguda da medula espinhal em camundongos (SHECHTER et al., 2009).

Na presente investigação, modulamos a ativação microglial antes de transplantar as células da medula óssea, para investigar a hipótese de que este procedimento facilitaria os efeitos terapêuticos das células transplantadas. Observamos que a atividade antiinflamatória das células transplantadas rivaliza com a obtida pelo uso da minociclina, um inibidor microglial clássico (YRJANHEIKKI et al., 1999; STIRLING et al., 2004; LAMPL et al., 2007) e que o transplante concomitante com o uso da minociclina possui um efeito antiinflamatório ainda mais intenso e, como veremos abaixo, ainda mais benéfico após isquemia.

Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos específicos pelos quais a modulação da resposta inflamatória induz neuroproteção e recuperação funcional após

isquemia. No entanto, estes mecanismos envolvem, provavelmente, a liberação de citocinas antiinflamatórias e fatores neurotróficos pelas células transplantadas. Esta hipótese é apoiada por estudos recentes que mostram que as células tronco hematopoiéticas induzem diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, entre as quais IL-1 β e TNF- α (SCHWARTING et al., 2008), bem como aumentam os níveis de neurogênese endógena (YOO et al., 2008) após isquemia experimental.

4.3 MODULAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA POR CELULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL

Neste estudo, observou-se que o bloqueio microglial com minociclina e CMOs isoladamente, bem como estes procedimentos em conjunto, induzem preservação neuronal, avaliada por contagens do número de células NeuN⁺ após isquemia estriatal. Observou-se também que no grupo de animais no qual implementou-se bloqueio microglial concomitantemente com o transplante de células da medula óssea houve maior preservação de neurônios. Estes resultados sugerem que a modulação da ativação microglial no ambiente isquêmico, facilita as ações terapêuticas das células mononucleares transplantadas na fase aguda após isquemia estriatal.

Diversos estudos sugerem que a ativação microglial pode exacerbar o processo lesivo após isquemia e outras desordens neurais (GIULIAN & VACA, 1993; YRJANHEIKKI et al., 1999; POPOVICH et al., 2002; HAYAKAWA et al., 2008). Por exemplo, o bloqueio da ativação microglial com minociclina diminui em até 65% a área de infarto cortical e 45% a área de infarto estriatal após oclusão experimental da artéria cerebral média (YRJANHEIKKI et al., 1999). Portanto, as células tronco transplantadas após processos isquêmicos podem ser deletoriamente afetadas pelo ambiente patológico. Existem evidências experimentais que as

células tronco transplantadas são afetadas por componentes da resposta inflamatória aguda (COYNE et al., 2006; MOLCANYI et al., 2007). Após trauma experimental, a resposta inflamatória parece prejudicar a sobrevivência e a integração de células tronco transplantadas nesta condição patológica (MOLCANYI et al., 2007). Outro estudo sugere que o transplante de células tronco em cérebros normais inicia um processo inflamatório que contribui para a rejeição das células transplantadas (COYNE et al., 2006).

A minociclina é um fármaco reconhecido em diversos estudos experimentais por sua propriedade neuroprotetora e antiinflamatória, entre os quais redução da produção de NO e outros radicais livres, estabilização da membrana mitocondrial, reforço à BHE, redução do infiltrado de células inflamatórias, inibição da ativação microglial e da expressão de citocinas pró-inflamatórias (YRJANHEIKKI et al., 1998; YRJANHEIKKI et al., 1999; TENG et al., 2004; MACHADO et al., 2006; HAYAKAWA et al., 2008; TANG et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais as células tronco da medula óssea, bem como os outros tipos de células tronco, exercem efeitos neuroprotetores ainda estão sendo investigados. No entanto, acredita-se que eventos neuroprotetores e modulatórios sejam mais importantes do que substituição celular nos modelos experimentais investigados (EINSTEIN & BEN-HUR, 2008). De um modo geral, tais efeitos incluem modulação de citocinas pró-inflamatórias, redução do volume do infarto, recuperação funcional, indução de proliferação celular em zonas neurogênicas, angiogênese e liberação de citocinas antiinflamatórias (SCHWARTING et al., 2008; ENGLAND et al., 2009; GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009; KEIMPEMA et al., 2009).

É provável que os benefícios do transplante de células tronco, encontrados em animais de experimentação, envolvam intervenções locais e periféricas das células transplantadas. Sistemicamente, as células tronco modulam a resposta inflamatória periférica,

em parte por reduzir as células do sistema imune na circulação (SCHWARTING et al., 2008). Nas áreas lesionadas, mesmo transitoriamente, as células tronco modulam o fenótipo prejudicial do microambiente reduzindo citocinas pró-inflamatórias, a ativação de células imunes efetoras e promovendo neuroproteção (DHARMASAROJA, 2009; BRENNEMAN et al., 2010), o que favorece a sobrevivência celular, a proliferação celular nas zonas neurogênicas e a ativação de mecanismos endógenos de recuperação (PAVLICHENKO et al., 2008; YOO et al., 2008; DHARMASAROJA, 2009).

4.4 A MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FAVORECE OS EFEITOS DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA SOBRE A RECUPERAÇÃO FUNCIONAL NA FASE AGUDA DA ISQUEMIA ESTRIATAL

O teste comportamental aplicado foi sensível para identificar déficit funcional 24 horas após a indução isquêmica no estriato em todos os grupos experimentais. Isso está de acordo com estudos prévios utilizando o modelo de isquemia focal por microinjeções de ET-1 (PEELING et al., 2006). No terceiro dia, animais dos grupos ITCT e ICMCT manifestam recuperação funcional, quando comparados à linha de base. Em modelos de oclusão da artéria cerebral média, a terapia celular proporciona melhora funcional precoce e sustentada em relação aos animais controle (PAVLICHENKO et al., 2008; BRENNEMAN et al., 2010). Brenneman et al (2010), usando testes de assimetria entre as patas, descreveram que a recuperação no grupo que recebeu transplante de CMOs ocorreu a partir do terceiro dia, quando comparado aos animais controle. O uso de teste cognitivo permitiu a Pavlichenko et al (2008) encontrarem melhora na memória espacial no grupo de terapia com células mesenquimais a partir da segunda semana, diferente do grupo controle que evoluiu

minimamente. De maneira similar, nossos resultados demonstram que o transplante de CMOs favorece a recuperação funcional em tempos precoces após isquemia experimental.

O grupo tratado apenas com minociclina também apresentou recuperação funcional, contudo, em tempo mais tardio, sete dias após a indução isquêmica. Este resultado é proporcionalmente semelhante àquele relatado por Peeling et al (2006). Os resultados destes autores revelam que os animais do grupo controle não manifestam recuperação funcional durante as cinco semanas de sobrevivência, e os animais tratados com minociclina precisaram de pelo menos três semanas para expressar recuperação funcional (PEELING et al., 2006).

Não está claro como que a terapêutica com células mononucleares ou minociclina, que apresentam efeitos neuroprotetores e antiinflamatórios similares em nosso estudo, despontam com resposta comportamental positiva em tempos distintos.

5 CONCLUSÃO

- 40 pMol de endotelina-1 foram eficazes para produzir isquemia estriatal com alterações histopatológicas e neurocomportamentais evidentes em ratos adultos
- Confirmamos os efeitos neuroprotetores e comportamentais das células mononucleares da medula óssea e da minociclina, isoladamente, e mostramos que a utilização concomitante destas duas abordagens possui efeitos neuroprotetores e comportamentais mais eficazes
- Ativação microglial excessiva dificulta as ações terapêuticas das células mononucleares da medula óssea transplantadas na fase aguda após isquemia estriatal, mas a modulação da resposta microglial no ambiente isquêmico induz neuroproteção e favorece a recuperação funcional induzida pelo transplante de células mononucleares da medula óssea
- Estudos futuros, utilizando tempos de sobrevivência mais longos após o bloqueio microglial, são necessários para a averiguação de que os efeitos encontrados são duradouros.
- Considerando que o ambiente patológico pode influenciar negativamente as células tronco transplantadas, a abordagem sugerida nesta investigação pode configurar-se em importante terapia adjuvante para facilitar as ações terapêuticas de células tronco após doenças do SNC e outros tecidos.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. & 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. & SEN, R. The activation of lymphocytes is in their CARMA. **Immunity**, v.18, n.6, p.721-722, Jun. 2003.
- AGWUH, K.N. & MACGOWAN, A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.2, p.256-265, Aug. 2006.
- 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**, v.27, n.10, p.1739-1743, Oct. 1996.
- ALEXANDROVA, M.L. & BOCHEV, P.G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v.39, n.3, p.297-316, Aug 1. 2005.
- ANDES, D. & CRAIG, W.A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, n.4, p.261-268, Apr. 2002.
- ANDREWS, E.M.; TSAI, S.Y.; JOHNSON, S.C.; FARRER, J.R.; WAGNER, J.P.; KOPEN, G.C. & KARTJE, G.L. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. **Experimental Neurology**, v.211, n.2, p.588-592, Jun. 2008.
- ARUMUGAM, T.V.; GRANGER, D.N. & MATTSON, M.P. Stroke and T-cells. **Neuromolecular Medicine**, v.7, n.3, p.229-242. 2005.
- ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. **Neurotoxicology**, v.19, n.2, p.269-281, Apr. 1998.
- BACIGALUPPI, M.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; KILIC, E. & HERMANN, D.M. Neural stem/precursor cells for the treatment of ischemic stroke. **Journal of the Neurological Science**, v.265, n.1-2, p.73-77, Feb 15. 2008.
- BAL-PRICE, A. & BROWN, G.C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v.21, n.17, p.6480-6491, Sep 1. 2001.
- BAMFORD, J.; SANDERCOCK, P.; JONES, L. & WARLOW, C. The natural history of lacunar infarction: the Oxfordshire Community Stroke Project. **Stroke**, v.18, n.3, p.545-551, May-Jun. 1987.
- BANATI, R.B.; GEHRMANN, J.; SCHUBERT, P. & KREUTZBERG, G.W. Cytotoxicity of microglia. **Glia**, v.7, n.1, p.111-118, Jan. 1993.
- BARKER, R.A. & WIDNER, H. Immune problems in central nervous system cell therapy. **NeuroRx**, v.1, n.4, p.472-481, Oct. 2004.
- BATCHELOR, P.E.; LIBERATORE, G.T.; PORRITT, M.J.; DONNAN, G.A. & HOWELLS, D.W. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor

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

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**, v.19, n.5, p.1708-1716, Mar 1. 1999.

BEJOT, Y.; CATTEAU, A.; CAILLIER, M.; ROUAUD, O.; DURIER, J.; MARIE, C.; DI CARLO, A.; OSSEBY, G.V.; MOREAU, T. & GIROUD, M. Trends in incidence, risk factors, and survival in symptomatic lacunar stroke in Dijon, France, from 1989 to 2006: a population-based study. **Stroke**, v.39, n.7, p.1945-1951, Jul. 2008.

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

BENTLEY, P. & SHARMA, P. Pharmacological treatment of ischemic stroke. **Pharmacology & Therapeutics**, v.108, n.3, p.334-352, Dec. 2005.

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

_____. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. **Biochemical Society Transactions**, v.35, n.Pt 5, p.1127-1132, Nov. 2007.

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

BLUM, D.; CHTARTO, A.; TENENBAUM, L.; BROTCHE, J. & LEVIVIER, M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiology of Disease**, v.17, n.3, p.359-366, Dec. 2004.

BOBIS, S.; JAROCHA, D. & MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, n.4, p.215-230. 2006.

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

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

BRENNEMAN, M.; SHARMA, S.; HARTING, M.; STRONG, R.; COX, C.S., JR.; ARONOWSKI, J.; GROTTA, J.C. & SAVITZ, S.I. Autologous bone marrow mononuclear cells enhance recovery after acute ischemic stroke in young and middle-aged rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.30, n.1, p.140-149, Jan. 2010.

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

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

- 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**, v.29, n.3, p.381-393, Jul. 2005.
- CABARROCAS, J.; BAUER, J.; PIAGGIO, E.; LIBLAU, R. & LASSMANN, H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v.33, n.5, p.1174-1182, May. 2003.
- CAPLAN, L.R.; SEARLS, D.E. & HON, F.K. Cerebrovascular disease. **Medical Clinics of North America**, v.93, n.2, p.353-369, viii, Mar. 2009.
- CAPONE, C.; FRIGERIO, S.; FUMAGALLI, S.; GELATI, M.; PRINCIPATO, M.C.; STORINI, C.; MONTINARO, M.; KRAFTSIK, R.; DE CURTIS, M.; PARATI, E. & DE SIMONI, M.G. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. **PLoS One**, v.2, n.4, p.e373. 2007.
- CHAN, P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.21, n.1, p.2-14, Jan. 2001.
- CHAVARRIA, A. & ALCOCER-VARELA, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? **Autoimmunity Reviews**, v.3, n.4, p.251-260, Jun. 2004.
- CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; LU, M.; ZHANG, X. & CHOPP, M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Journal of the Neurological Science**, v.189, n.1-2, p.49-57, Aug 15. 2001.
- CHEN, J.R.; CHENG, G.Y.; SHEU, C.C.; TSENG, G.F.; WANG, T.J. & HUANG, Y.S. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. **Journal of Anatomy**, v.213, n.3, p.249-258, Sep. 2008.
- CHIU, I.M.; CHEN, A.; ZHENG, Y.; KOSARAS, B.; TSIFTSOGLU, S.A.; VARTANIAN, T.K.; BROWN, R.H., JR. & CARROLL, M.C. T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.46, p.17913-17918, Nov 18. 2008.
- CHOPP, M.; ZHANG, X.H.; LI, Y.; WANG, L.; CHEN, J.; LU, D.; LU, M. & ROSENBLUM, M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. **Neuroreport**, v.11, n.13, p.3001-3005, Sep 11. 2000.
- CHOU, W.H.; CHOI, D.S.; ZHANG, H.; MU, D.; MCMAHON, T.; KHARAZIA, V.N.; LOWELL, C.A.; FERRIERO, D.M. & MESSING, R.O. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v.114, n.1, p.49-56, Jul. 2004.
- CLARK, R.K.; LEE, E.V.; FISH, C.J.; WHITE, R.F.; PRICE, W.J.; JONAK, Z.L.; FEUERSTEIN, G.Z. & BARONE, F.C. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain Research Bulletin**, v.31, n.5, p.565-572. 1993.
- COTA, A.M. & MIDWINTER, M.J. The immune system. **ANAESTHESIA AND INTENSIVE CARE MEDICINE**, v.10:5, n.Physiology, p.215-217. 2009.

COYNE, T.M.; MARCUS, A.J.; WOODBURY, D. & BLACK, I.B. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. **Stem Cells**, v.24, n.11, p.2483-2492, Nov. 2006.

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

DE REUCK, J.; DE GROOTE, L. & VAN MAELE, G. The classic lacunar syndromes: clinical and neuroimaging correlates. **European Journal of Neurology**, v.15, n.7, p.681-684, Jul. 2008.

DE VASCONCELOS DOS SANTOS, A.; DA COSTA REIS, J.; DIAZ PAREDES, B.; MORAES, L.; JASMIN; GIRALDI-GUIMARAES, A. & MENDEZ-OTERO, R. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. **Brain Research**, v.1306, p.149-158, Jan 8. 2010.

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

DHARMASAROJA, P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.16, n.1, p.12-20, Jan. 2009.

DOBKIN, B.H. Clinical practice. Rehabilitation after stroke. **New England Journal of Medicine**, v.352, n.16, p.1677-1684, Apr 21. 2005.

DOMERCQ, M. & MATUTE, C. Neuroprotection by tetracyclines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.25, n.12, p.609-612, Dec. 2004.

DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-DINIZ, C.W. & GOMES-LEAL, W. Differential patterns of inflammatory response, axonal damage and myelin impairment following excitotoxic or ischemic damage to the trigeminal spinal nucleus of adult rats. **Brain Research**, v.1172, p.130-144, Oct 3. 2007.

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

EINSTEIN, O. & BEN-HUR, T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. **Archives of Neurology**, v.65, n.4, p.452-456, Apr. 2008.

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

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

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**, v.173, n.1, p.168-181, Jan. 2002.

ENGLAND, T.; MARTIN, P. & BATH, P.M. Stem cells for enhancing recovery after stroke: a review. **International Journal of Stroke**, v.4, n.2, p.101-110, Apr. 2009.

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

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

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

FORD, G.A. Clinical pharmacological issues in the development of acute stroke therapies. **British Journal of Pharmacology**, v.153 Suppl 1, p.S112-119, Mar. 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.

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? **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.21, n.4, p.277-289, Aug. 1995.

GIRALDI-GUIMARAES, A.; REZENDE-LIMA, M.; BRUNO, F.P. & MENDEZ-OTERO, R. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. **Brain Research**, Feb 9. 2009.

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. Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system. **Stroke**, v.24, n.12 Suppl, p.184-90, Dec. 1993.

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.

GLADSTONE, D.J.; BLACK, S.E. & HAKIM, A.M. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. **Stroke**, v.33, n.8, p.2123-2136, Aug. 2002.

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

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

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

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

GREEN, A.R. Pharmacological approaches to acute ischaemic stroke: reperfusion certainly, neuroprotection possibly. **British Journal of Pharmacology**, v.153 Suppl 1, p.S325-338, Mar. 2008.

GUIMARAES, J.S.; FREIRE, M.A.; LIMA, R.R.; SOUZA-RODRIGUES, R.D.; COSTA, A.M.; DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-DINIZ, C.W. & GOMES-LEAL, W. [Mechanisms of secondary degeneration in the central nervous system during acute neural disorders and white matter damage]. **Review in Neuroscience**, v.48, n.6, p.304-310, Mar 16-31. 2009.

GUNSILIUS, E.; GASTL, G. & PETZER, A.L. Hematopoietic stem cells. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v.55, n.4, p.186-194, May. 2001.

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.

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

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

HEWLETT, K.A. & CORBETT, D. Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. **Neuroscience**, v.141, n.1, p.27-33, Aug 11. 2006.

HICKS, A.; SCHALLERT, T. & JOLKKONEN, J. Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke. **Cell Stem Cell**, v.5, n.2, p.139-140, Aug 7. 2009.

HIROSE, K.; OKAJIMA, K.; TAOA, 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.

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

HUGHES, P.M.; ANTHONY, D.C.; RUDDIN, M.; BOTHAM, M.S.; RANKINE, E.L.; SABLONE, M.; BAUMANN, D.; MIR, A.K. & PERRY, V.H. Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.62, n.12, p.1276-1286, Dec. 2003.

JACKSON, C. & SUDLOW, C. Are lacunar strokes really different? A systematic review of differences in risk factor profiles between lacunar and nonlacunar infarcts. **Stroke**, v.36, n.4, p.891-901, Apr. 2005.

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

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

JOHANSSON, C.B. Mechanism of stem cells in the central nervous system. **Journal of Cellular Physiology**, v.196, n.3, p.409-418, Sep. 2003.

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

KAUFMANN, A.M.; FIRLIK, A.D.; FUKUI, M.B.; WECHSLER, L.R.; JUNGRIES, C.A. & YONAS, H. Ischemic core and penumbra in human stroke. **Stroke**, v.30, n.1, p.93-99, Jan. 1999.

KAUSHAL, V. & SCHLICHTER, L.C. Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.9, p.2221-2230, Feb 27. 2008.

KEIMPEMA, E.; FOKKENS, M.R.; NAGY, Z.; AGOSTON, V.; LUITEN, P.G.; NYAKAS, C.; BODDEKE, H.W. & COPRAY, J.C. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.35, n.1, p.89-102, Feb. 2009.

KIM, H.S. & SUH, Y.H. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behavioural Brain Research**, v.196, n.2, p.168-179, Jan 23. 2009.

KIRMANI, J.F.; JANJUA, N.; AL KAWI, A.; AHMED, S.; KHATRI, I.; EBRAHIMI, A.; DIVANI, A.A. & QURESHI, A.I. Therapeutic advances in interventional neurology. **NeuroRx**, v.2, n.2, p.304-323, Apr. 2005.

KIRSHNER, H.S. Differentiating ischemic stroke subtypes: risk factors and secondary prevention. **Journal of the Neurological Science**, v.279, n.1-2, p.1-8, Apr 15. 2009.

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

KOMOTAR, R.J.; KIM, G.H.; SUGHRUE, M.E.; OTTEN, M.L.; RYNKOWSKI, M.A.; KELLNER, C.P.; HAHN, D.K.; MERKOW, M.B.; GARRETT, M.C.; STARKE, R.M. & CONNOLLY, E.S. Neurologic assessment of somatosensory dysfunction following an experimental rodent model of cerebral ischemia. **Nature Protocols**, v.2, n.10, p.2345-2347. 2007.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in Neuroscience**, v.19, n.8, p.312-318, Aug. 1996.

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

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

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.

LEEB, C.; JURGA, M.; MCGUCKIN, C.; MORIGGL, R. & KENNER, L. Promising New Sources for Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, Nov 29. 2009.

LEGG, L. & LANGHORNE, P. Rehabilitation therapy services for stroke patients living at home: systematic review of randomised trials. **Lancet**, v.363, n.9406, p.352-356, Jan 31. 2004.

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**, v.28, n.10, p.2320-2331, Mar 5. 2008.

LEROU, P.H. & DALEY, G.Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. **Blood Reviews**, v.19, n.6, p.321-331, Nov. 2005.

LI, Y.; CHEN, J.; WANG, L.; LU, M. & CHOPP, M. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. **Neurology**, v.56, n.12, p.1666-1672, Jun 26. 2001.

LI, Y.; CHOPP, M.; CHEN, J.; WANG, L.; GAUTAM, S.C.; XU, Y.X. & ZHANG, Z. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.20, n.9, p.1311-1319, Sep. 2000.

LIMA, R.R.; GUIMARAES-SILVA, J.; OLIVEIRA, J.L.; COSTA, A.M.; SOUZA-RODRIGUES, R.D.; DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-DINIZ, C.W. & GOMES-LEAL, W. Diffuse axonal damage, myelin impairment, astrogliosis and inflammatory response following microinjections of NMDA into the rat striatum. **Inflammation**, v.31, n.1, p.24-35, Feb. 2008.

LINDVALL, O. & KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**, v.441, n.7097, p.1094-1096, Jun 29. 2006.

LINFERT, D.; CHOWDHRY, T. & RABB, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. **Transplantation Reviews (Orlando)**, v.23, n.1, p.1-10, Jan. 2009.

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

- LIU, B. & HONG, J.S. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, v.304, n.1, p.1-7, Jan. 2003.
- 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**, v.38, n.1, p.146-152, Jan. 2007.
- LO, E.H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. **Nature Medicine**, v.14, n.5, p.497-500, May. 2008.
- LOTUFO, P.A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Sao Paulo Medical Journal**, v.123, n.1, p.3-4, Jan 2. 2005.
- LOTUFO, P.A. & BENSENOR, I.M. Stroke mortality in Brazil: one example of delayed epidemiological cardiovascular transition. **International Journal of Stroke**, v.4, n.1, p.40-41, Feb. 2009.
- LOVE, S. Oxidative stress in brain ischemia. **Brain Pathology**, v.9, n.1, p.119-131, Jan. 1999.
- 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.
- MACHADO, L.S.; KOZAK, A.; ERGUL, A.; HESS, D.C.; BORLONGAN, C.V. & FAGAN, S.C. Delayed minocycline inhibits ischemia-activated matrix metalloproteinases 2 and 9 after experimental stroke. **BioMed Central Neuroscience**, v.7, p.56. 2006.
- MAHLER, M.P.; ZUGER, K.; KASPAR, K.; HAEFELI, A.; JENNI, W.; LENIGER, T. & BEER, J.H. A cost analysis of the first year after stroke - early triage and inpatient rehabilitation may reduce long term costs. **Swiss Medical Weekly**, v.138, n.31-32, p.459-465, Aug 9. 2008.
- MARINKOVIC, S.; GIBO, H.; MILISAVLJEVIC, M. & CETKOVIC, M. Anatomic and clinical correlations of the lenticulostriate arteries. **Clinical Anatomy**, v.14, n.3, p.190-195, May. 2001.
- MARKUS, H.S. Stroke: causes and clinical features. **Medicine (Baltimore)**, v.32, n.10, p.5. 2008.
- MATYSZAK, M.K. & PERRY, V.H. A comparison of leucocyte responses to heat-killed bacillus Calmette-Guerin in different CNS compartments. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.22, n.1, p.44-53, Feb. 1996.
- MEZEY, E. & CHANDROSS, K.J. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. **European Journal Pharmacology**, v.405, n.1-3, p.297-302, Sep 29. 2000.
- MILLER, R.H. The promise of stem cells for neural repair. **Brain Research**, v.1091, n.1, p.258-264, May 26. 2006.

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.

MOLCANYI, M.; RIESS, P.; BENTZ, K.; MAEGELE, M.; HESCHELER, J.; SCHAFKE, B.; TRAPP, T.; NEUGEBAUER, E.; KLUG, N. & SCHAFER, U. Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain. **Journal of Neurotrauma**, v.24, n.4, p.625-637, Apr. 2007.

MONJE, M.L.; TODA, H. & PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v.302, n.5651, p.1760-1765, Dec 5. 2003.

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

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

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

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

NAPOLI, I. & NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. **Neuroscience**, v.158, n.3, p.1030-1038, Feb 6. 2009.

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

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**, v.95, n.10, p.5779-5784, May 12. 1998.

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

NORRVING, B. Lacunar infarcts: no black holes in the brain are benign. **Practical Neurology**, v.8, n.4, p.222-228, Aug. 2008.

PAVLICHENKO, N.; SOKOLOVA, I.; VIJDE, S.; SHVEDOVA, E.; ALEXANDROV, G.; KROUGLYAKOV, P.; FEDOTOVA, O.; GILEROVICH, E.G.; POLYNTSEV, D.G. & OTELLIN, V.A. Mesenchymal stem cells transplantation could be beneficial for treatment of experimental ischemic stroke in rats. **Brain Research**, v.1233, p.203-213, Oct 3. 2008.

PEELING, J.; YAN, H.; BUIST, R.; SITAR, D.S. & CORBETT, D. Protective effect of minocycline treatment on striatal ischemia. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v.15, n.3, p.101-105, May-Jun. 2006.

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

_____. A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v.90, n.2, p.113-121, Oct 1. 1998.

_____. 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.

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

_____. Macrophages and the nervous system. **International Review of Cytology**, v.125, p.203-244. 1991.

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

POPOVICH, P.G.; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W.F. & BASSO, D.M. The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.61, n.7, p.623-633, Jul. 2002.

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.

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.

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

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

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.

ROSAMOND, W.; FLEGAL, K.; FURIE, K.; GO, A.; GREENLUND, K.; HAASE, N.; HAILPERN, S.M.; HO, M.; HOWARD, V.; KISSELA, B.; KITTNER, S.; LLOYD-JONES, D.; MCDERMOTT, M.; MEIGS, J.; MOY, C.; NICHOL, G.; O'DONNELL, C.; ROGER, V.; SORLIE, P.; STEINBERGER, J.; THOM, T.; WILSON, M. & HONG, Y. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v.117, n.4, p.e25-146, Jan 29. 2008.

SAPOLSKY, R.M. Neuroprotective gene therapy against acute neurological insults. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, n.1, p.61-69, Jan. 2003.

SAPOSNIK, G. & DEL BRUTTO, O.H. Stroke in South America: a systematic review of incidence, prevalence, and stroke subtypes. **Stroke**, v.34, n.9, p.2103-2107, Sep. 2003.

SAVITZ, S.I.; DINSMORE, J.H.; WECHSLER, L.R.; ROSENBAUM, D.M. & CAPLAN, L.R. Cell therapy for stroke. **NeuroRx**, v.1, n.4, p.406-414, Oct. 2004.

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

SCHOP, D.; JANSSEN, F.W.; BORGART, E.; DE BRUIJN, J.D. & VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.2, n.2-3, p.126-135, Mar-Apr. 2008.

SCHROETER, M.; JANDER, S.; HUITINGA, I. & STOLL, G. CD8+ phagocytes in focal ischemia of the rat brain: predominant origin from hematogenous macrophages and targeting to areas of pannecrosis. **Acta Neuropathol**, v.101, n.5, p.440-448, May. 2001.

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

SCHROETER, M.; JANDER, S.; WITTE, O.W. & STOLL, G. Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. **Journal of Neuroimmunology**, v.55, n.2, p.195-203, Dec. 1994.

_____. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v.89, n.4, p.1367-1377. 1999.

SCHULZ, U.G. & ROTHWELL, P.M. Differences in vascular risk factors between etiological subtypes of ischemic stroke: importance of population-based studies. **Stroke**, v.34, n.8, p.2050-2059, Aug. 2003.

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

SCHWARTING, S.; LITWAK, S.; HAO, W.; BAHR, M.; WEISE, J. & NEUMANN, H. Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury. **Stroke**, v.39, n.10, p.2867-2875, Oct. 2008.

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

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

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

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.

SHECHTER, R.; LONDON, A.; VAROL, C.; RAPOSO, C.; CUSIMANO, M.; YOVEL, G.; ROLLS, A.; MACK, M.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; JUNG, S. & SCHWARTZ, M. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. **PLoS Medicine**, v.6, n.7, p.e1000113, Jul. 2009.

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

SOUZA-RODRIGUES, R.D.; COSTA, A.M.; LIMA, R.R.; DOS SANTOS, C.D.; PICANCO-DINIZ, C.W. & GOMES-LEAL, W. Inflammatory response and white matter damage after microinjections of endothelin-1 into the rat striatum. **Brain Research**, v.1200, p.78-88, Mar 20. 2008.

STEEBER, D.A.; TANG, M.L.; ZHANG, X.Q.; MULLER, W.; WAGNER, N. & TEDDER, T.F. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of L-selectin and beta7 integrin. **The Journal of Immunology**, v.161, n.12, p.6638-6647, Dec 15. 1998.

STIRLING, D.P.; KHODARAHMI, K.; LIU, J.; MCPHAIL, L.T.; MCBRIDE, C.B.; STEEVES, J.D.; RAMER, M.S. & TETZLAFF, W. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. **The Journal of Neuroscience**, v.24, n.9, p.2182-2190, Mar 3. 2004.

STIRLING, D.P.; KOOCHESFAHANI, K.M.; STEEVES, J.D. & TETZLAFF, W. Minocycline as a neuroprotective agent. **Neuroscientist**, v.11, n.4, p.308-322, Aug. 2005.

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

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

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

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

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

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

SUGAWARA, T.; FUJIMURA, M.; NOSHITA, N.; KIM, G.W.; SAITO, A.; HAYASHI, T.; NARASIMHAN, P.; MAIER, C.M. & CHAN, P.H. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v.1, n.1, p.17-25, Jan. 2004.

SUGHRUE, M.E.; MOCCO, J.; KOMOTAR, R.J.; MEHRA, A.; D'AMBROSIO, A.L.; GROBELNY, B.T.; PENN, D.L. & CONNOLLY, E.S., JR. An improved test of neurological dysfunction following transient focal cerebral ischemia in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.151, n.2, p.83-89, Mar 15. 2006.

SYNTICHAKI, P. & TAVERNARAKIS, N. Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? **EMBO Reports**, v.3, n.7, p.604-609, Jul. 2002.

_____. The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, n.8, p.672-684, Aug. 2003.

TAKEUCHI, H.; JIN, S.; SUZUKI, H.; DOI, Y.; LIANG, J.; KAWANOKUCHI, J.; MIZUNO, T.; SAWADA, M. & SUZUMURA, A. Blockade of microglial glutamate release protects against ischemic brain injury. **Experimental Neurology**, Aug 16. 2008.

TANG, M.; ALEXANDER, H.; CLARK, R.S.; KOCHANNEK, P.M.; KAGAN, V.E. & BAYIR, H. Minocycline reduces neuronal death and attenuates microglial response after pediatric asphyxial cardiac arrest. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.30, n.1, p.119-129, Jan. 2010.

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.

TENG, Y.D.; CHOI, H.; ONARIO, R.C.; ZHU, S.; DESILETS, F.C.; LAN, S.; WOODARD, E.J.; SNYDER, E.Y.; EICHLER, M.E. & FRIEDLANDER, R.M. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.9, p.3071-3076, Mar 2. 2004.

TOYODA, K.; YASAKA, M.; IWADE, K.; NAGATA, K.; KORETSUNE, Y.; SAKAMOTO, T.; UCHIYAMA, S.; GOTOH, J.; NAGAO, T.; YAMAMOTO, M.; TAKAHASHI, J.C. & MINEMATSU, K. Dual antithrombotic therapy increases severe bleeding events in patients with stroke and cardiovascular disease: a prospective, multicenter, observational study. **Stroke**, v.39, n.6, p.1740-1745, Jun. 2008.

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

VENDRAME, M.; GEMMA, C.; DE MESQUITA, D.; COLLIER, L.; BICKFORD, P.C.; SANBERG, C.D.; SANBERG, P.R.; PENNYPACKER, K.R. & WILLING, A.E. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. **Stem Cells and Development**, v.14, n.5, p.595-604, Oct. 2005.

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

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

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

WEINBERGER, J.M. Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke. **Journal of the Neurological Science**, v.249, n.2, p.101-109, Nov 15. 2006.

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

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

YENARI, M.A.; XU, L.; TANG, X.N.; QIAO, Y. & GIFFARD, R.G. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. **Stroke**, v.37, n.4, p.1087-1093, Apr. 2006.

YILMAZ, G.; ARUMUGAM, T.V.; STOKES, K.Y. & GRANGER, D.N. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. **Circulation**, v.113, n.17, p.2105-2112, May 2. 2006.

YONG, V.W.; WELLS, J.; GIULIANI, F.; CASHA, S.; POWER, C. & METZ, L.M. The promise of minocycline in neurology. **Lancet Neurology**, v.3, n.12, p.744-751, Dec. 2004.

YOO, S.W.; KIM, S.S.; LEE, S.Y.; LEE, H.S.; KIM, H.S.; LEE, Y.D. & SUH-KIM, H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. **Experimental and Molecular Medicine**, v.40, n.4, p.387-397, Aug 31. 2008.

YRJANHEIKKI, J.; KEINANEN, R.; PELLIKKA, M.; HOKFELT, T. & KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, n.26, p.15769-15774, Dec 22. 1998.

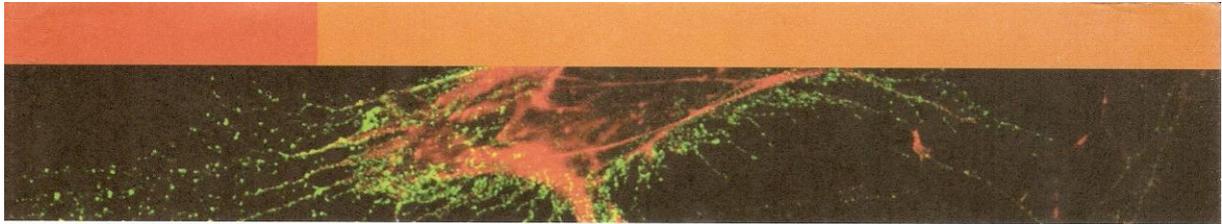
YRJANHEIKKI, J.; TIKKA, T.; KEINANEN, R.; GOLDSTEINS, G.; CHAN, P.H. & KOISTINAHO, J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, n.23, p.13496-13500,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

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

ZIELASEK, J. & HARTUNG, H.P. Molecular mechanisms of microglial activation. **Adv Neuroimmunologica**, v.6, n.2, p.191-122. 1996.

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

7. ANEXO Certificado FeSBE, 2009




FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 26.015

O TRATAMENTO COM MINOCICLINA INDUZ NEUPROTEÇÃO E RECUPERAÇÃO FUNCIONAL, MAS REDUZ A MIGRAÇÃO DE NEUROBLASTOS PARA O ESTRIATO APÓS ISQUEMIA FOCAL INDUZIDA POR MICROINJEÇÕES DE ENDOTELINA-1.

Cardoso, M. M. , Souza, C. C. , Franco, E. C. S. , Gomes-leal, W.
Lab de Neuroprot e Neurorreg Exp. Inst de Ciên. Biológ, UFPA foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora

ATA DE APROVAÇÃO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR. NÍVEL: MESTRADO.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA O MESTRADO



Programa: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: Neurociências

Candidato: Marcelo Marques Cardoso

Tema: "BLOQUEIO MICROGLIAL E TRANSPLANTE ENDOVENOSO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA APÓS ISQUEMIA ESTRIATAL"

Data: 04 de fevereiro de 2010, às 10h

Local: Sala MAT-4 do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará

Após o candidato apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

APROVAÇÃO

REPROVAÇÃO

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrado os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal, UFPA

(Presidente da banca examinadora e orientador, sem direito a voto)

Prof. Dra. Edna Cristina Santos Franco, UFPA

(Coorientadora, sem direito a voto)

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano, UFPA

Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma, UFPA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)