



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MARTA REGINA SANTOS DO CARMO**

**EFEITO DO PPADS, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2, SOBRE A  
LESÃO CEREBRAL, COMPORTAMENTO E MEMÓRIA DE  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL  
PERMANENTE**

**FORTALEZA**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**MARTA REGINA SANTOS DO CARMO**

**EFEITO DO PPADS, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2, SOBRE A  
LESÃO CEREBRAL, COMPORTAMENTO E MEMÓRIA DE  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL  
PERMANENTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

Orientador(a): Profa. Dra. Geanne Matos Andrade

**FORTALEZA**

**2010**

**C285e Carmo, Marta Regina Santos do**

**Efeito do PPADS, antagonista do receptor P2, sobre a lesão cerebral, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente / Marta Regina Santos do Carmo. – Fortaleza-Ce, 2010.**

**99 f.: il.**

**Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos Andrade  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia.**

**1. Isquemia Encefálica 2. Trifosfato de Adenosina 3.  
Atividade Motora 4. Memória 5. Antiinflamatórios I. Andrade,  
Geanne Matos (Orient.) II. Título.**

**CDD: 616.81**

**MARTA REGINA SANTOS DO CARMO**

**EFEITO DO PPADS, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2, SOBRE A LESÃO  
CEREBRAL, COMPORTAMENTO E MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS  
SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL PERMANENTE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 07/01/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profª. Dra. Danielle Silveira Macêdo  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Dedico este trabalho  
aos meus pais, que sempre  
me deram força e me incentivaram  
a estudar, me deixando como maior  
herança, o conhecimento.*

## AGRADECIMENTOS

**À Deus** por se fazer presente, dando-me forças para enfrentar todos os momentos dessa caminhada, me ajudando a concluir mais esta etapa da minha vida com sucesso.

**À Minha Família** por sempre terem me incentivado o conhecimento e por terem me apoiado na concretização deste objetivo.

**Ao Bruno**, meu esposo, pelo amor, força e compreensão, principalmente nos períodos de ausência durante os momentos dedicados à realização deste trabalho.

**À Minha orientadora Professora Geanne Matos Andrade** pela dedicação e competência na execução deste trabalho, por ter contribuído para a minha formação científica e pela oportunidade dos ensinamentos que serão importantes para a construção da minha trajetória profissional, mas acima de tudo pela amizade e simpatia com que sempre me presenteou.

**Aos Amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento: Daniele, Juliana, Analu, Flávio, Dayse, Aline e Rafael**, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica, fazendo do trabalho diário um ambiente agradável e alegre.

**Às Amigas Carolina Melo Souza e Ana Paula Fontenele** um agradecimento especial pela disponibilidade sempre demonstrada e pela colaboração dada à realização deste trabalho.

**Ao Prof. Dr. Rodrigo Cunha** da Universidade de Coimbra, Portugal, pela colaboração e suporte oferecidos, concedendo a droga utilizada neste estudo.

**À Profa. Dra. Danielle Silveira Macedo, Profa. Dra. Flávia Santos de Almeida e Prof. Dr. Jairo Diniz Filho** por prontamente participarem da minha banca de Exame de Qualificação.

**Aos Professores do Curso de Pós-Graduação**, por terem transmitido com muita dignidade seus conhecimentos, os quais adquiriram com muito esforço e dedicação.

**A Capes/CNPq e Funcap**, por ter colaborado financeiramente durante todo o desenvolvimento da pesquisa.



*“...e nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para proveito da humanidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro”.*

**(Albert Einstein)**

## RESUMO

Após isquemia cerebral, o Trifosfato de Adenosina (ATP) atinge altas concentrações no espaço extracelular e pode atuar como agente tóxico, que causa degeneração celular e morte, mediada através de receptores P2X e P2Y. No presente estudo, foram investigados os efeitos do PPADS, um antagonista não-seletivo dos receptores P2, sobre o comportamento e dano neuronal após isquemia induzida por oclusão permanente da artéria cerebral média por eletrocoagulação. Os animais receberam PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L) ou fluido cerebrospinal artificial (FCE) por injeção intracerebroventricular 10 min antes da isquemia. Os parâmetros estudados foram função sensorio-motora, aquisição e retenção de memória, área de infarto cerebral e atividade da MPO, como marcador para infiltração granulocítica. Após isquemia, verificou-se através de avaliação neurológica, uma diminuição significativa do desempenho motor e função sensorial dos animais. A percentagem da área de infarto nos animais falso-operados foi significativamente menor que naqueles submetidos à isquemia (FO:  $0,89 \pm 0,18\%$ ; FO + PPADS 1,0:  $1,18 \pm 0,1\%$ ; ISQ:  $9,06 \pm 1,2\%$ ; ISQ + PPADS 0,5:  $2,2 \pm 0,32\%$ ; ISQ + PPADS 1,0:  $1,86 \pm 0,18\%$ ). Foi observado ainda um aumento da atividade exploratória vertical (nº de *Rearings*) nos animais tratados com PPADS quando comparados aos animais do grupo isquemiado (ISQ:  $9,5 \pm 1,8$ ; ISQ + PPADS 0,5:  $26,9 \pm 2,9$ ; ISQ + PPADS 1,0:  $20,6 \pm 3,7$ ; Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ). O tratamento com PPADS melhorou de forma significativa os déficits na memória operacional induzidos pela isquemia, avaliado no teste do Labirinto em Y (FO:  $73,8 \pm 1,9\%$ ; ISQ:  $56,7 \pm 2,9\%$ ; ISQ + PPADS 0,5:  $76,7 \pm 3,2\%$ ; ISQ + PPADS 1,0:  $72,6 \pm 4,0\%$ ). Um resultado semelhante foi observado na memória aversiva (teste da esquiwa passiva) no qual o PPADS melhorou a aquisição de memória de curta duração. Os animais isquemiados demonstraram um aumento nos níveis de MPO no estriado (FO:  $3,6 \pm 0,63$ ; ISQ:  $16,24 \pm 4,86$ ) e córtex temporal (FO:  $6,16 \pm 1,23$ ; ISQ:  $22,33 \pm 4,98$ ), e o tratamento com PPADS (1,0 nmols/1 $\mu$ L) reverteu significativamente esse efeito (ISQ + PPADS – estriado:  $6,13 \pm 0,65$ ; córtex:  $6,28 \pm 0,38$ ). Os resultados demonstram o envolvimento dos receptores P2 na fisiopatologia da isquemia cerebral. A inibição dos receptores P2 pelo PPADS mostrou um significativo efeito neuroprotetor sobre o dano neuronal, comportamento motor e memória após isquemia e indicam que este efeito pode estar relacionado pelo menos em parte a uma atividade antiinflamatória deste composto.

Palavras-chave: Isquemia Cerebral. Neuroproteção. PPADS. ATP. Atividade Locomotora. Memória. Efeito Antiinflamatório.

## ABSTRACT

After brain ischemia adenosine 5'-triphosphate (ATP) can reach high concentrations and may act as a toxic agent, which causes cellular degeneration and death, mediated through P2X and P2Y receptors. In the present study, effects of the non-selective P2 receptor antagonist PPADS on behavior and neuronal injury after permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) were investigated. Mice received either PPADS (0.1, 0.5 and 1.0 nmols/1 $\mu$ L) or artificial cerebrospinal fluid (ACSF) by intracerebroventricular route 10 min before MCAO. The parameters studied were, sensorimotor function, memory acquisition and memory retention, cerebral infarct area and MPO activity, as an index of of granulocyte infiltration. After MCAO a significant decrease of motor performance and sensory function was found after a neurological evaluation. The infarct area rate on PPADS-treated groups were significantly less than those submitted to MCAO (ACSF:  $0.89 \pm 0.18\%$ ; PPADS 1.0:  $1.18 \pm 0.1\%$ ; MCAO:  $9.06 \pm 1.2\%$ ; MCAO + PPADS 0.5:  $2.2 \pm 0.32\%$ ; MCAO + PPADS 1.0:  $1.86 \pm 0.18\%$ ). We observed an increase of vertical exploratory activity (rearings) in the PPADS group compared to the MCAO (n° of rearings: MCAO:  $9.5 \pm 1.8$ ; MCAO + PPADS 0.5:  $26.9 \pm 2.9$ ; MCAO + PPADS 1.0:  $20.6 \pm 3.7$ ; Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). PPADS treatment significantly improved working memory deficits induced by ischemia evaluated by Y-maze test (ACSF:  $73.8 \pm 1.9\%$ ; MCAO:  $56.7 \pm 2.9\%$ ; MCAO + PPADS 0.5:  $76.7 \pm 3.2\%$ ; MCAO + PPADS 1.0:  $72.6 \pm 4.0\%$ ). A similar result was observed on aversive memory (passive avoidance test) where PPADS improved early memory. Mice submitted to MCAO showed an increase in MPO levels on striatum (SO:  $3.6 \pm 0.63$ ; MCAO:  $16.24 \pm 4.86$ ) and temporal cortex (SO:  $6.16 \pm 1.23$ ; MCAO:  $22.33 \pm 4.98$ ) and PPADS-treatment (1.0 nmols/1 $\mu$ L) significantly reversed this effect (MCAO + PPADS – Striatum:  $6.13 \pm 0.65$ ; Cortex:  $6.28 \pm 0.38$ ), ANOVA and Newman-Keuls,  $p < 0.001$ ). The data provide evidence for the involvement of P2 receptors on cerebral ischemia pathophysiology. The inhibition of P2 receptors by PPADS showed a significant protective effect on locomotor activity, memory, and neuronal damage after cerebral ischemia, at least by an antiinflammatory effect.

Keywords: Brain Ischemia. Neuroprotection. PPADS. ATP. Locomotor Activity. Memory. Antiinflammatory Effect.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Esquema mostrando as artérias cerebrais que formam o polígono de Willis. ....	19
<b>Figura 2</b> – Patogênese do dano neuronal no AVC isquêmico agudo. ....	22
<b>Figura 3</b> – Mecanismos potenciais de injúria neuronal após isquemia. ....	33
<b>Figura 4</b> - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração. ....	34
<b>Figura 5</b> – Vias de degradação do ATP pelas ecto-ATPases. ....	38
<b>Figura 6</b> – Foto mostrando a cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo. ....	47
<b>Quadro 1</b> – Escores obtidos através da avaliação neurológica 24 horas após oclusão da artéria cerebral média. ....	49
<b>Figura 7</b> – Campo Aberto. ....	50
<b>Figura 8</b> – Aparelho de Esquiva Passiva. ....	51
<b>Figura 9</b> – Labirinto em Y. ....	52
<b>Figura 10</b> - Escores neurológicos dos camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média, 24 horas após a cirurgia. ....	55
<b>Figura 11</b> – Quantificação do dano neuronal isquêmico dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média, visualizadas através da coloração de TTC. A) Percentagens das áreas de edema calculadas 1h, 24hs e 96hs após a isquemia. B) Visualização das áreas de edema (regiões sem coloração), 24hs após a isquemia. ....	56
<b>Figura 12</b> – Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) sobre os escores neurológicos de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	58
<b>Figura 13</b> - Efeito do tratamento com PPADS nas doses de 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v., sobre a extensão da lesão cerebral de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média, visualizadas através da coloração de TTC. ....	59
<b>Figura 14</b> – Efeito do tratamento com PPADS nas doses de 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v., sobre a extensão da lesão cerebral (percentagens das áreas de edema) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média, visualizadas através da coloração de TTC. ....	60

<b>Figura 15</b> - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) no número de <i>crossings</i> de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>62</b>
<b>Figura 16</b> - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) no número de <i>rearings</i> de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>63</b>
<b>Figura 17</b> - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) na aquisição de memória (Memória Recente) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>65</b>
<b>Figura 18</b> - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) na retenção da memória (Memória Tardia) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>66</b>
<b>Figura 19</b> - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1µL, i.c.v.) na memória operacional de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>68</b>
<b>Figura 20</b> – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1µL, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>70</b>
<b>Figura 21</b> – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1µL, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no estriado de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>71</b>
<b>Figura 22</b> – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1µL, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. ....	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>AA</b>	Ácido Araquidônico
<b>ACM</b>	Artéria Cerebral Média
<b>ADP</b>	Difosfato de Adenosina
<b>AGL</b>	Ácidos Graxos Livres
<b>AMP</b>	Monofosfato de Adenosina
<b>AMPA</b>	Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propionico
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>CE</b>	Córtex Entorrinal
<b>COX</b>	Clicooxigenase
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DNA</b>	Ácido Dexorribonucléico
<b>EPM</b>	Erro Padrão Médio
<b>FCE</b>	Fluído cerebroespinal
<b>FO</b>	Falso-operado
<b>FSC</b>	Fluxo sanguíneo cerebral
<b>GPX</b>	Glutaciona Peroxidase
<b>h</b>	Hora
<b>HTAB</b>	Brometo de cetil trimetil amônio
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ISQ</b>	Isquemiado
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intracelular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>IP-3</b>	Trifosfato de inositol
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida

<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kg</b>	Kilograma
<b>LTP</b>	Potenciação de longa duração
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócito-1
<b>mA</b>	Miliampere
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatória de macrófagos
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minutos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazol
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>Nm</b>	Nanômetro
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>Nmol</b>	Nanomoles
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>PPADS</b>	Ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico
<b>PIP-3</b>	Fosfatidilinositol-3
<b>PKC</b>	Proteína Quinase C
<b>RLs</b>	Radicais livres
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TTC</b>	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Acidente Vascular Cerebral</b> .....	<b>16</b>
1.1.1 Epidemiologia .....	16
1.1.2 Definição e Classificação.....	17
1.1.3 Fisiopatologia do AVC isquêmico .....	17
1.1.4 Isquemia Cerebral Focal: Modelos experimentais <i>in vivo</i> .....	19
1.1.5 Conceito de Núcleo e Penumbra .....	20
<b>1.2 Mecanismos de dano neuronal induzidos por isquemia</b> .....	<b>22</b>
1.2.1 Depleção de oxigênio e ATP .....	22
1.2.2 Cálcio e Glutamato.....	23
1.2.3 Inflamação.....	25
1.2.4 Estresse Oxidativo .....	27
1.2.4.1 Peroxidação Lipídica .....	29
1.2.4.2 Sistemas antioxidantes.....	30
1.2.5 Apoptose .....	31
<b>1.3 Memória</b> .....	<b>33</b>
<b>1.4 Nucleotídeos purínicos e injúria neuronal</b> .....	<b>37</b>
1.4.1 Subtipos de receptores P2.....	38
1.4.2 Interações glutamatérgicas e purinérgicas .....	40
1.4.3 PPADS e Neuroproteção .....	41
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>43</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Objetivos Gerais</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>44</b>
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 Drogas</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2 Animais</b> .....	<b>45</b>
<b>4.3 Estereotaxia</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4 Isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média em camundongos</b> .....	<b>46</b>
<b>4.5 Protocolo Experimental</b> .....	<b>47</b>
<b>4.6 Avaliação Neurológica</b> .....	<b>48</b>
<b>4.7 Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)</b> .....	<b>49</b>
<b>4.8 Testes comportamentais</b> .....	<b>50</b>
4.8.1 Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto).....	50
<b>4.9 Testes de Memória</b> .....	<b>51</b>
4.9.1 Esquiva passiva ( <i>passive avoidance test</i> ) .....	51



4.9.2 Labirinto em Y ( <i>Y-maze</i> ) .....	52
<b>4.10 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO).....</b>	<b>53</b>
<b>4.11 Análise Estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Avaliação Neurológica dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 Quantificação do dano neuronal isquêmico através de coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Efeito do tratamento com PPADS sobre os escores neurológicos dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média .....</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Efeito do tratamento com PPADS na extensão do dano neuronal dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média, através de coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) .....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Testes comportamentais .....</b>	<b>61</b>
5.5.1 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto).....	61
<b>5.6 Testes de Memória.....</b>	<b>64</b>
5.6.1 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste da Esquiva Passiva .....	64
5.6.2 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste de Labirinto em Y .....	67
<b>5.7 Efeito do tratamento com PPADS sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.....</b>	<b>69</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Acidente Vascular Cerebral

### 1.1.1 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, ocorrem no mundo cerca de 6 milhões de mortes/ano relacionadas ao Acidente Vascular Cerebral (AVC), representado a terceira maior causa de morte, depois das doenças coronarianas (7,2 milhões) e câncer (7,1 milhões).

O AVC é responsável por cerca de 50% a 60% de todas as internações realizadas em neurologia nos hospitais dos Estados Unidos, país no qual mais de 700.000 pessoas sofrem um AVC a cada ano, sendo que 25% morrem no momento do evento ou logo depois e 15-30% tornam-se permanentemente incapacitadas (*CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION*). Em 2008, a incidência de AVC passou a 780.000, sendo 180.000 AVC recorrentes (ROSAMOND *et al.*, 2008). Neste mesmo ano, os custos diretos e indiretos com AVC alcançaram a marca de 65,5 bilhões de dólares (*AMERICAN HEART ASSOCIATION*, 2008).

No Brasil, apesar de haver nítidas diferenças regionais na prevalência e mortalidade, decorrentes principalmente das influências étnicas e sócio-econômicas, recentes estatísticas indicam que o AVC é ainda a causa mais freqüente de óbito na população. Cerca de 129.000 mortes relacionadas ao AVC foram constatadas pela Organização Mundial de Saúde no Brasil em 2002. (MASSARO, 2006). Estima-se, ainda, que o AVC seja responsável por algo em torno de 8% das internações e por cerca de 19% dos custos dos hospitais públicos brasileiros.

Dados epidemiológicos revelam que aproximadamente,  $\frac{3}{4}$  da incidência do AVC acomete pessoas acima de 65 anos (*CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION*). A taxa de incidência anual do infarto cerebral isquêmico na faixa etária de 15 a 49 anos é de 65-90 por 100.000. A incidência na população pediátrica é de 2 a 3 casos por 100.000 crianças por ano, que é vinte vezes menor que a incidência entre adultos na faixa de 45 a 54 anos. Apesar de raros na infância, o AVC isquêmico tem um sério impacto e pode também ser o primeiro sinal de uma doença sistêmica (ROTTA *et al.*, 2002).

### 1.1.2 Definição e Classificação

O AVC é uma doença caracterizada pelo início agudo de um déficit neurológico (diminuição da função) que persiste por, pelo menos 24 horas, refletindo envolvimento focal do sistema nervoso central como resultado de um distúrbio na circulação cerebral. É causado pela redução do suprimento sanguíneo, resultando no decréscimo da tensão de oxigênio e nos metabólitos de alta energia em uma área do cérebro (ATP, Glicose, principalmente).

O AVC é comumente dividido em duas maiores categorias: isquêmico e hemorrágico. O AVC isquêmico é mais prevalente que o hemorrágico, acometendo aproximadamente 87% dos casos, e sendo alvo da maioria dos testes com drogas (ROSAMOND *et al.*, 2007). Ele ocorre devido a um suprimento sanguíneo inadequado como resultado de um coágulo sanguíneo. A segunda categoria é o AVC hemorrágico, que envolve sangramento no parênquima cerebral ou no espaço subaracnóideo (FERRO; VERDELHO, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

### 1.1.3 Fisiopatologia do AVC isquêmico

A isquemia cerebral pode ser desencadeada através da oclusão de vasos cervico-cranianos ou por hipoperfusão para o cérebro, causada por variados processos: arterotrombose, embolia ou anormalidades hemodinâmicas (KAPOSZTA *et al.*, 1999). A arterotrombose ocorre nas artérias cervico-cranianas e nas pequenas artérias penetrantes intracranianas. Nesta condição, um trombo é formado *in situ* em um estreitamento arterial aterosclerótico que impede o fluxo sanguíneo distal e causa isquemia e conseqüente infarto do tecido cerebral suprido pelo vaso ocluído. Na embolia cerebral, a artéria cerebral é subitamente bloqueada pelo material embólico que é geralmente um trombo originado do coração e grandes vasos (aorta, carótidas e artérias cerebrais) (KAPOSZTA *et al.*, 1999).

O infarto embólico é responsável por cerca de 30% dos casos de derrame isquêmico, a perda súbita de perfusão arterial para uma determinada área do cérebro gera sinais clínicos abruptos. A embolia, geralmente, ocorre devido a alterações cardíacas (sendo as mais comuns as valvulopatias cardíacas, o aneurisma ventricular e as miocardiopatias), apesar de também ocorrerem por problemas cirúrgicos em pulmões ou fraturas ósseas que

desenvolvem embolia gordurosa (ROWLAND; MERRI, 2002). A outra anormalidade associada à isquemia cerebral é a hipoperfusão sistêmica que é caracterizada por fluxo sanguíneo cerebral criticamente diminuído causado por falência cardíaca ou hipovolemia que leva a uma redução global no fluxo sanguíneo. Dessa forma o SNC pode sofrer lesões isquêmicas globais e focais, e para ambas as situações existem modelos experimentais (COLLI; NUNES; CARLOTTI, 1998), sendo a isquemia global encontrada durante situações como parada cardíaca e a isquemia focal durante falência do suprimento sanguíneo a uma parte restrita do cérebro.

As seqüelas do AVC isquêmico dependem da localização e do tamanho da área cerebral que foi atingida e do tempo que o paciente levou para ser atendido (melhor o prognóstico quanto mais rápido for iniciada a recuperação), sendo as mais comuns hemiparesia, alterações visuais, da fala e da memória (CRAMER *et al.*, 2000).

Os danos causados ao cérebro por um AVC podem provocar perda de sua função, mas o cérebro pode superar essa situação, isto ocorre com uma reorganização dos mapas corticais conhecidos como “neuroplasticidade” (LIEPERT *et al.*, 2000). As mudanças descritas na organização do córtex incluem o aumento dos dendritos, das sinapses e de fatores neurotróficos essenciais para a sobrevivência de células nervosas. Após ocorrer uma lesão, em algum lugar do córtex motor, mudanças de ativação em outras regiões motoras são observadas. Essas mudanças podem ocorrer em regiões homólogas do hemisfério não afetado, que assumem as funções perdidas, ou no córtex intacto adjacente a lesão. Graças a essas reorganizações corticais, que podem ter início de um a dois dias após o AVC e podem se prolongar por meses, os pacientes podem recuperar, pelo menos em parte, as habilidades que haviam sido perdidas (LIEPERT *et al.*, 2000). Os estudos dos fenômenos ligados a entidades clínicas que levam a hipóxia-isquemia do SNC são relevantes, pois visam a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (TERENT; JONSSON, 1994).. A alta demanda metabólica e a baixa reserva energética disponível rendem ao SNC susceptibilidade única frente às alterações na irrigação sanguínea, apesar da rede de circulação colateral muito desenvolvida neste.



isquemia, permanente ou temporária, aos sítios e técnicas de oclusão da artéria cerebral média, na parte proximal ou distal do vaso e aos animais utilizados. Os modelos de oclusão da artéria cerebral média têm sido extensivamente usados devido a sua relevância para a isquemia tromboembólica humana (HOSSMANN, 1991; TAKIZAWA; HAKIM 1991; GARCIA, 1994a).

Na isquemia focal permanente, a artéria é mantida bloqueada por todo o experimento, usualmente de 1 a 7 dias, enquanto que no modelo focal temporário, os vasos são bloqueados por até 3 horas, seguida de prolongada reperfusão. Apesar da grande diferença entre os insultos, os tamanhos das lesões máximas são comparáveis nos dois modelos, e a progressão do dano, em termos de números de neurônios lesados e extensão do dano avaliada 6 a 72 horas após a cirurgia, é extraordinariamente similar (ZHANG *et al.*, 1994a).

Existem dois principais sítios de oclusão da artéria cerebral média. Na oclusão proximal, a ACM é ocluída próximo a sua origem da artéria carótida interna, antes de originar as artérias lenticuloestriadas. Um método amplamente utilizado para esta oclusão é a inserção de um monofilamento de nylon através da artéria carótida externa, dentro da artéria carótida interna e artéria cerebral média, sendo a ACM ocluída próximo a sua origem (ZHAO *et al.*, 1996). A oclusão distal, realizada de forma permanente, pode ser feita através de uma abordagem transtemporal da ACM, método no qual a duramáter é aberta em toda a extensão da craniectomia, rebatida sobre o teto da órbita e a ACM ocluída por eletrocauterização. Outro método menos invasivo é a criação de um trombo permanente por irradiação a laser quando a artéria é perfundida com o corante Rosa Bengala (LIPTON, 1999).

#### 1.1.5 Conceito de Núcleo e Penumbra

Uma consideração sobre fluxo sanguíneo cerebral (FSC) é importante para se entender a evolução e conseqüências do ataque isquêmico focal. Quando a autoregulação é perdida durante um processo isquêmico, o FSC varia com a pressão de perfusão. Se a taxa do FSC cai a um terço do normal, existe uma perda da excitabilidade elétrica (HOSSMANN, 1994). Entretanto, a homeostase iônica não é perdida até o FSC cair abaixo de um quarto do normal. Esta falência na membrana vai resultar na perda do fluxo de íons e na morte dos neurônios dentro de minutos. O limiar para redução da síntese protéica e o desenvolvimento

de edema ou acidose é alcançado mais cedo que o limiar para a falência da excitabilidade elétrica.

Tanto na oclusão distal quanto proximal da artéria cerebral média existem regiões de core isquêmico, regiões primariamente irrigadas pela ACM, onde o fluxo sanguíneo é reduzido para menos de 15% do normal e regiões de penumbra isquêmica, zona de tecido adjacente à zona central (*core*) do infarto isquêmico, onde o fluxo é menos de 40%, assim como regiões corticais extra-penumbra em que o fluxo sanguíneo é reduzido para aproximadamente 40% normal. Depois de um insulto longo o suficiente, ou um insulto permanente, tanto o core quanto a penumbra se tornam regiões de infarto, enquanto a região extra-penumbra apresenta somente morte de neurônios isolados, com densidade insuficiente para causar infarto (LIPTON, 1999).

A zona central (*core*) sofre rápida despolarização anóxica dentro de 1 a 3 minutos com um aumento concomitante do  $K^+$  extracelular para aproximadamente 70 mM (GIDO; KRISTIAN; SIESJO, 1997). Há ainda uma diminuição acentuada do  $Ca^{++}$  extracelular dentro de 1 a 2 minutos, significando entrada no tecido. Dessa forma o *core* contém neurônios necróticos, como conseqüência da falência da membrana associada a perda da homeostase do  $Ca^{++}$  e glutamato.

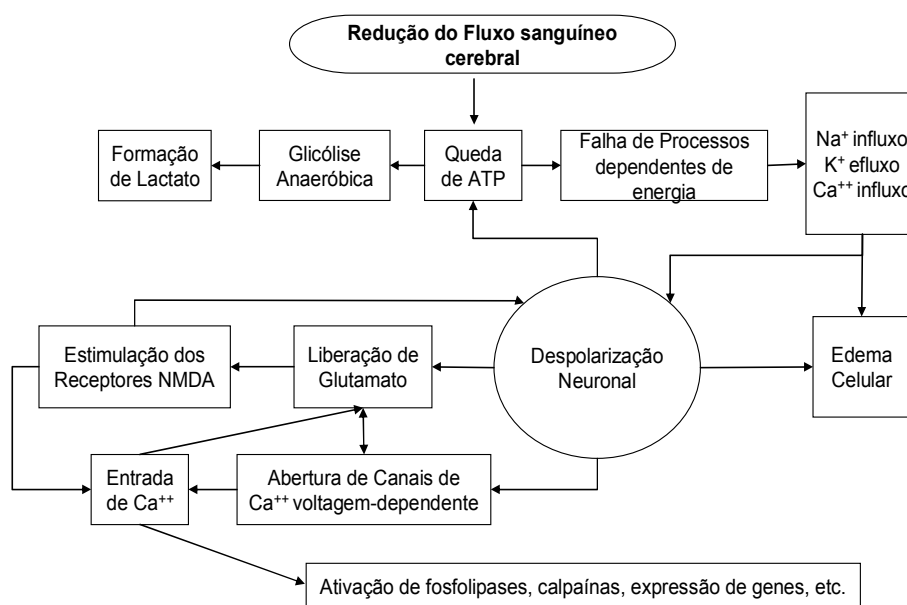
Os eventos na penumbra são menos drásticos, apesar de também levar ao infarto. Nessa região, a morte celular ocorre menos rapidamente via mecanismos como apoptose e inflamação (GONZALEZ *et al.*, 2006). O nível de ATP é mantido em torno de 50 a 70% do normal, não caindo o suficiente para permitir despolarizações anóxicas. Entretanto, essa região contém neurônios eletricamente silenciosos (que não respondem ao estímulo elétrico), com seus gradientes iônicos intactos e com neurônios que podem ter suas membranas despolarizadas se o fluxo não for restaurado rapidamente.

Os neurônios perifocais na zona de penumbra são os de mais alto risco e com o tempo a zona de infarto vai crescer em tamanho, com mais células da penumbra sendo recrutadas para a zona central. O período de tempo deste processo de recrutamento constitui um período crítico, em que a onda de tecido necrótico pode ser bloqueada pela intervenção farmacológica. Esta janela terapêutica corresponde as primeiras 2 a 4 horas que se segue o derrame, após as quais a eficácia da terapêutica decresce rapidamente (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002; WEINSTEIN; HONG; SHARP, 2004).

## 1.2 Mecanismos de dano neuronal induzidos por isquemia

### 1.2.1 Depleção de oxigênio e ATP

A interrupção focal do fluxo sanguíneo cerebral restringe a oferta de substratos metabólicos, particularmente oxigênio e glicose, levando a depleção dos estoques de energia requeridos para manutenção do gradiente iônico das células (MARTIN; LLOYD; COWAN, 1999). A ordem dos eventos a partir daí é constantemente debatida, mas o que se sabe é que as conseqüências desses eventos levam à morte celular por múltiplos processos: excitotoxicidade, acidotoxicidade, desbalanço iônico, despolarizações na região do peri-infarto, estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Figura 2).



**Figura 2** – Patogênese do dano neuronal no AVC isquêmico agudo.  
Fonte: Adaptado de Fisher e Schaebitz (2000).

A hipóxia acarreta às células a inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e a queda da produção de trifosfato de adenosina (ATP). Por um curto período de tempo, a via metabólica anaeróbica mantém os níveis de ATP, depletando a glicose restante com uma



produção bem inferior de energia (YOSHIDA, 2002). A falta de energia celular causa a falência da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) e, devido à falência da bomba, há um maior acúmulo de  $\text{Na}^+$  intracelular e perda de  $\text{K}^+$  para fora da célula, com conseqüente edema da célula e de suas organelas, assim como profundas despolarizações anóxicas. O excesso de  $\text{Na}^+$  intracelular reduz a eficiência do simporte de  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$  (SMITH, M., 2004).

### 1.2.2 Cálcio e Glutamato

A falência energética resultante da diminuição da oferta de oxigênio e glicose durante a isquemia impede a manutenção da baixa concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), que está normalmente presente em cada célula, pela  $\text{Ca}^{++}$  ATPase (DOYLE; SIMON; STENZEL-POORE, 2008). A concentração extracelular de  $\text{Ca}^{++}$  é aproximadamente 1,2 mM e a maioria dos processos regulados pelo  $\text{Ca}^{++}$  tem valor de Km que varia de 0,1 a 1,0 mM. Durante a isquemia, os níveis de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular aumentam para 50 a 100 mM, ativando muitas, se não todas as proteases, lipases e DNAses dependentes de cálcio (EDVINSSON; KRAUSE, 2002). A ativação dessas enzimas leva à morte muitas células do core isquêmico por simples catabolismo. Pois, pelo fato do ATP não está disponível para ressíntese dos constituintes celulares, essas enzimas catabólicas causam a necrose de estruturas celulares essenciais.

Quando analisado em curso temporal, após um modelo de isquemia focal permanente, o  $\text{Ca}^{++}$  total na região do core da lesão aumenta gradualmente a uma taxa bem maior que na penumbra, subindo cerca de 1,0 mM/h do início do insulto até 24 horas depois deste (KIM; VAUGHAN; GHOSH, 1998). A despolarização neuronal maciça também abre os canais de  $\text{Ca}^{++}$  voltagem-dependente e leva ao acúmulo de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, uma importante neurotoxina do SNC, que desempenha uma função crítica na patologia isquêmica. Dessa forma, como o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  está fortemente envolvido na morte celular neuronal, bloqueadores de canal de cálcio devem, portanto, proteger diretamente neurônios sobre injúria isquêmica. Apesar dos canais de cálcio tipo P e Q estarem implicados no influxo de cálcio ao citoplasma, o tipo L é muito mais importante para o dano celular relacionado ao cálcio (LUKIC-PANIN, 2007). Bloqueadores do canal tipo L são protetores contra lesões focais transitórias (CAMPBELL; MACKAY; PATEL, 1997) e permanentes (BIELENBERG *et al.*, 1990; JACEWICZ *et al.*, 1990), reduzindo área de infarto mensurada em aproximadamente 50% em todos os casos. Resultados de estudos recentes

também demonstraram que o tratamento com bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{++}$  reduziu o volume de infarto, apoptose e o estresse oxidativo no cérebro isquêmico.

Um gradiente de concentração elevado de glutamato é mantido através da membrana plasmática por transportadores de glutamato dependentes de sódio localizados sobre membranas pré e pós-sinápticas. A concentração sináptica de glutamato se encontra na faixa micromolar, enquanto a concentração citossólica é aproximadamente 10 mM (HSU, 1998). Assim, as despolarizações de membrana e a acumulação de sódio dentro das células durante a isquemia levam à reversão dos transportadores de glutamato e permite que este saia das células através de seu gradiente de concentração. O efeito de um aumento na concentração sináptica de glutamato é a ativação de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionico). Receptores NMDA são canais iônicos operados por ligantes, que medeiam o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  e contém um sítio de ligação a agonistas, um sítio modulatório de glicina, assim como um sítio de ligação dentro do canal iônico, onde o magnésio exerce um bloqueio voltagem dependente (GINSBERG, 1995). A abertura desses canais leva a mais despolarizações da membrana e um aumento ainda maior do influxo de  $\text{Ca}^{++}$ , exacerbando a sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  (excitotoxicidade). Drogas como MK-801 e Aptiganel, antagonistas não-competitivos dos receptores NMDA, assim como CGS 19755, um antagonista competitivo, são capazes de reduzir significativamente a área de infarto, ou a área significante de necrose celular, causada por isquemia focal (GINSBERG, 2008).

Receptores AMPA não são normalmente permeáveis ao  $\text{Ca}^{++}$  em virtude de sua subunidade GluR2, contudo, essa subunidade está reduzida durante a isquemia, aumentando em cerca de 18 vezes a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{++}$  desses receptores, permitindo assim, que receptores AMPA contribuam para morte celular tardia dependente de cálcio (LIU *et al.*, 2006; PENG *et al.*, 2006).

A neurotoxicidade iniciada pela superestimulação dos receptores de glutamato, principalmente receptores NMDA, e subsequente influxo de  $\text{Ca}^{++}$  livre leva a uma cascata intracelular de eventos citotóxicos. Esses eventos incluem: ativação da NOS, ativação da calpaína, ativação de segundos mensageiros, com mudanças na expressão gênica, estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais hidroxila, anions superóxidos ou óxido nítrico, produzindo peroxidação lipídica e dano à membrana.

### 1.2.3 Inflamação

Em adição aos eventos excitotóxicos que ocorrem durante a isquemia, reações inflamatórias agudas que iniciam horas e persistem por dias após a isquemia também podem contribuir para morte neuronal (BARONE; FEUERSTEIN, 1999). Um dos principais eventos que levam a inflamação no cérebro é a expressão de moléculas de adesão como a molécula de adesão intracelular (ICAM-1) sobre as células endoteliais capilares que irão facilitar a adesão e migração transendotelial de neutrófilos e macrófagos (YI *et al.*, 2007).

Após a oclusão transitória ou permanente da artéria cerebral média em roedores, a acumulação de neutrófilos pode ser detectada muito cedo na área de infarto (BARONE; SCHIMIDT; HILLEGASS, 1992; GARCIA *et al.*, 1994b; BRAUN *et al.*, 1996; YANAKA *et al.*, 1997). Além disso, estudos demonstram que a diminuição da circulação de neutrófilos pode reduzir o volume de infarto e o edema em vários modelos de isquemia cerebral (SHIGA *et al.*, 1991; MATSUO *et al.*, 1994). Enquanto nos capilares a acumulação dos leucócitos prejudica o fluxo sanguíneo, quando extravasados no parênquima cerebral, eles liberam uma grande quantidade de substâncias neurotóxicas incluindo citocinas e quimiocinas, algumas das quais induzem os ligantes e receptores que medeiam o recrutamento e infiltração de leucócitos no cérebro.

A isquemia focal particularmente leva a um aumento significativo dos níveis de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 e quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) (LIU *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; VEMUGANTI *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2003; KAPADIA *et al.*, 2006). Todas essas moléculas induzem a expressão de moléculas de adesão ICAM-1, P-selectina e E-selectina sobre as células endoteliais e células brancas do sangue (STOLL; JANDER; SCHROTER, 1998; ABBASSI *et al.*, 1993; EPPIHIMER *et al.*, 1996). A interação de quimiocinas induz a uma mudança conformacional nas  $\beta$ 2-integrinas sobre a membrana dos leucócitos, o que facilita a interação entre integrinas e moléculas de adesão sobre a parede do vaso levando ao rolamento, adesão e migração transendotelial dos neutrófilos (PENBERTHY *et al.*, 1995; GERSZTEN *et al.*, 1999). Esses eventos tornam o fluxo sanguíneo consideravelmente mais lento, levando a oclusão do vaso por plaquetas e neutrófilos ativados, diminuindo a perfusão sanguínea.

Em condições patológicas de hipóxia/isquemia a ativação da micróglia residente, que adquire características de células citotóxicas e fagocíticas, também aumenta o processo

inflamatório, tomando parte no remodelamento do tecido nervoso após o insulto. A micróglia ativada representa a resposta primária ao dano no cérebro, precedendo a infiltração de macrófagos (SCHILLING *et al.*, 2003; GÜNTHER *et al.*, 2005). A micróglia é também ativada por purinas e pirimidinas para liberarem citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (HIDE *et al.*, 2000). Assim, a sinalização intercelular mediada entre os astrócitos e a micróglia pelo ATP pode ser capaz de ter uma função em eventos patológicos em vez de fisiológicos (NEDERGAARD; RANSOM; GOLDMAN, 2003).

No cérebro, a inflamação pode ter dois tipos de efeito. Assim, o tempo, o tipo de mediador inflamatório e a extensão de seu estímulo determinam o balanço entre um bom e um mau efeito da inflamação (BARONE; FEUERSTEIN, 1999). Os neutrófilos e macrófagos infiltrados aumentam a geração de radicais livres que é prejudicial à integridade vascular, o que leva à morte celular. Contudo, a resposta microglial e dos macrófagos após a isquemia é necessária para o seqüestro dos restos celulares, facilitando a plasticidade neuronal (DANTON; DIETRICH, 2003).

Por exemplo, o sistema complemento que se torna ativado no cérebro pós-isquêmico, inicia uma série de respostas inflamatórias locais que contribuem para a sobrevivência neuronal e remodelamento do tecido. Contudo, a ativação do complemento em uma extensão inapropriada promove a liberação de mediadores inflamatórios e injúria tecidual. Portanto, a inflamação cerebral pode exercer efeitos benéficos ou deletérios dependendo do contexto patofisiológico (VAN BEEK; ELWARD; GASQUE, 2003).

Muitos estudos da última década têm demonstrado os efeitos benéficos das terapias antiinflamatórias sobre a isquemia cerebral focal. Terapias que reduzem leucócitos, previnem citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, assim como inibem a COX-2 e a iNOS foram reportadas como sendo neuroprotetoras contra a isquemia (IADECOLA; ALEXANDER, 2001; DEL ZOPPO *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 1994b; YRJANHEIKKI *et al.*, 1998). Drogas antiinflamatórias como minociclina e indometacina são conhecidas por induzir neuroproteção por prevenir a ativação microglial (YRJANHEIKKI *et al.*, 1998; TIKKA *et al.*, 2001; TIKKA; KOISTINAHO, 2001; MONJE; TODA; PALMER, 2003; SASAKI *et al.*, 2003a). Entretanto, conclusões devem ser cuidadosamente desenhadas, já que ainda não é tão evidente em que extensão as cascatas pró-inflamatórias pioram o resultado da isquemia cerebral.

#### 1.2.4 Estresse Oxidativo

Na estrutura dos átomos e das moléculas, os elétrons associam-se normalmente em pares. Define-se *espécies reativas* ou *radicais livres* (RLs) espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados (CLARK, 2002).

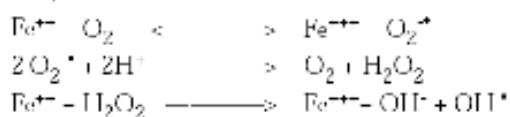
O estresse oxidativo tem sido definido com um distúrbio no balanço pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro levando a um dano potencial (SIES, 1991). O cérebro consome uma grande quantidade de oxigênio, fazendo-o particularmente suscetível ao estresse oxidativo. A formação natural de oxidantes durante o transporte mitocondrial de elétrons, auto-oxidação de alguns neurotransmissores (e.x. norepinefrina e dopamina) e iniciação de eventos durante hipóxia ou isquemia, pode resultar na formação de oxidantes e subsequente dano tecidual (WARNER; SHENG; BATINIC-HARBELE, 2004).

Os RLs são lesivos através de uma variedade de mecanismos: 1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares; 2) oxidação de grupos sulfidríla inativando uma variedade de enzimas; 3) alterações do DNA, promovendo mutagênese; 4) inibição da síntese de ATP e consumo das reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida; 5) inativação direta do óxido nítrico (NO) comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio; 6) reação com o NO formando o peroxinitrito, um ânion instável e tóxico; 7) inibição da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .

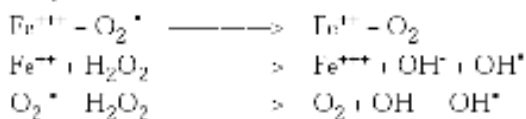
As espécies reativas de oxigênio são produzidas durante a fosforilação oxidativa mitocondrial como bioprodutos do metabolismo aeróbico celular, sendo o oxigênio o principal fornecedor de RLs. Se o oxigênio receber um elétron o produto será o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), se receber dois elétrons, o produto é o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O superóxido é um oxidante fraco (BECKMAN *et al.*, 1990, 1991; CHAN, 1996) e sua ação tóxica ocorreria, na verdade, mais em função dos produtos de sua redução, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o radical peroxila ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), este último um potente agente oxidante.

O peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), apesar de não ser um radical livre, pois não tem elétrons desemparelhados na última camada, é importante porque participa das reações que produzem o radical  $\text{OH}^{\cdot}$ , seja via reação de Fenton ou de Haber-Weiss:

Reação de Fenton:



Reação de Haber Weiss:



Tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1990). Por esse motivo, há uma tendência atual de se chamar de “espécies reativas do oxigênio” ao invés de radicais livres do oxigênio, o conjunto de substâncias envolvidas nessas reações.

Radicais livres como  $\text{OH}^{\bullet}$  são altamente lesivos, pois causam quebra e modificações nas bases de DNA, levando a alterações na expressão genética, mutação e apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica, com conseqüente prejuízo do transporte intercelular. A peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular contribui para a aterosclerose, risco de acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (HALLIWELL, 1997).

Além do oxigênio, o nitrogênio também participa da estrutura dos RLs, em especial o óxido nítrico, cujo precursor é a L-arginina. Entre suas principais funções destacam-se a regulação da pressão arterial e a sinalização intercelular. Seu efeito tóxico, como RL, contribui de modo importante para a lesão tecidual que ocorre nos processos inflamatórios crônicos e também na sepse.

A formação de óxido nítrico é tanto constitutiva, produzido pela óxido nítrico sintase constitutiva (nNOS ou tipo 1), quanto induzida, produzido pela NOS induzida (iNOS ou tipo 2) encontrada na micróglia. A superprodução de óxido nítrico induzida pela isquemia é em parte causada pelo aumento da concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular mediada pelo glutamato, resultando em *upregulation* da nNOS dependente de calmodulina (DAWSON; DAWSON; SNYDER, 1994).

Um importante mecanismo de regulação da concentração de óxido nítrico é sua reação com íon superóxido formando peroxinitrito (BECKMAN *et al.*, 1990). Radicais hidroxila, peroxinitrito e produtos derivados do peroxinitrito (radical hidroxila, radical carbonato e dióxido de nitrogênio) todos têm potencial de reagir, danificando a maioria dos

alvos celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA.

Na isquemia focal, inibidores relativamente específicos da nNOS, quando usados em níveis que não diminuem o fluxo sanguíneo, são fortemente protetores contra a isquemia focal permanente (YOSHIDA *et al.*, 1994) e transitória (ZHANG; REIF; MACDONALD, 1996; ESCOTT *et al.*, 1998) em estudos controlados, implicando que o dano é principalmente mediado por peroxinitrito. A enzima superóxido-dismutase (SOD) previne a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, apresentando efeito sinérgico com a L-arginina.

#### 1.2.4.1 Peroxidação Lipídica

O dano por RLs foi um dos primeiros mecanismos postulados para explicar a injúria após um insulto cerebral isquêmico. Por essa razão as pesquisas rapidamente passaram a focar o metabolismo lipídico.

O aumento de  $Ca^{++}$  intracelular, juntamente com o aumento de potássio extracelular, provocado pela isquemia, leva à ativação das fosfolipases C e A2, resultando em hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular e liberando grande quantidade de ácidos graxos livres (AGL), principalmente, o ácido araquidônico (AA), cuja liberação estaria diretamente relacionada ao tempo de isquemia e ao local cerebral que é acometido (BRALET *et al.*, 1987; TRAYSTMAN; KIRSCH; KOEHLER, 1991; LIPTON, 1999; GUTTERIDGE *et al.*, 1990).

Além do dano à membrana, o metabolismo dos ácidos graxos livres tem outros efeitos incluindo inibição da fosforilação oxidativa, conversão oxidativa do ácido araquidônico livre pela via da ciclooxigenase em eicosanóides (tromboxanos e prostaglandinas), geração de radicais livres e peroxidação lipídica mediada por reações em cadeia, que se inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio de um grupo carbonometileno da cadeia lateral de uma molécula de ácido graxo livre (AGL), transformando-o, igualmente, em um radical livre ( $L\cdot$ ) (WATSON, 1993; BECKMAN *et al.*, 1990; GUTTERIDGE; HALIWELL, 1990), assim como citotoxicidade dos produtos da peroxidação lipídica, que podem estimular apoptose (MATTSON; CULMSEE; YU, 2000).

O aumento da concentração de óxido nítrico associado com a isquemia pode ter dois tipos de efeitos sobre a peroxidação lipídica. Reação do óxido nítrico com superóxido formando peroxinitrito que inicia a peroxidação lipídica através da reação de seus produtos de

decomposição, radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio, com lipídios (BROOKES *et al.*, 1998; RUBBO *et al.*, 1994). Em contraste, o óxido nítrico pode inibir diretamente a peroxidação por intercepção de intermediários das reações, como o radical peroxil, terminando assim a propagação da cadeia de reações da peroxidação lipídica (NICOLESCU *et al.*, 2002; NIZIOLEK; KORYTOWSKI; GIROTTI, 2003; RUBBO *et al.*, 1994).

#### 1.2.4.2 Sistemas antioxidantes

Sabe-se que existem muitos antioxidantes, dentre os quais as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela conversão de ânion superóxido em  $H_2O_2$ , e a catalase, que transforma o peróxido de hidrogênio em  $O_2$  e  $H_2O$ . Ambas agiriam como antioxidantes “preventivos”, evitando a formação de  $OH^\bullet$ . Da mesma forma que a catalase, a hemoglobina e a mioglobina agiriam convertendo  $H_2O_2$  em  $O_2$  e  $H_2O$  (DE BONO, 1994). Outro grupo antioxidante seria o “sistema glutaciona”, podendo este agir como preventivo ou como antioxidante de quebra de cadeia, ou seja, agiria reduzindo grupos oxidados por espécies reativas de oxigênio e formas oxidadas por outros agentes antioxidantes (DE BONO, 1994).

Em vista de suas características particulares, o tecido cerebral seria suscetível às lesões por agentes oxidantes por possuir grandes reservas de ferro e altos níveis de lipídios poliinsaturados e por exibir uma escassa defesa antioxidante (WEIGAND *et al.*, 1999). Alguns autores (ALMEIDA *et al.*, 1998; ANDERSON; SIMS, 2002; LIÈVRE; BECUWE; BIANCHI, 2001) ressaltam que alterações na função do sistema glutaciona poderiam relacionar-se a uma maior suscetibilidade do tecido cerebral às lesões de isquemia e reperfusão.

As células aeróbicas são protegidas da ação do superóxido e do peróxido de hidrogênio pela ação da superóxido-dismutase (SOD), uma metaloenzima que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, e pela ação da catalase, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A SOD citoplasmática (Cu, Zn-SOD) necessita da presença de cobre e zinco para agir e a mitocondrial (MnSOD), de manganês; já a catalase depende do ferro (HEITOR; SARNI, 2003).

Além da catalase, outra enzima importante no controle dos peróxidos é a glutaciona peroxidase (GPX), que utiliza para sua ação a glutaciona (GSH), um tripeptídeo contendo cisteína, e representa o tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos. É



substrato para as enzimas anti-oxidantes: GSH transferases e peroxidases (dependentes de selênio). As demais funções da GSH envolvem sua participação no estoque e transporte de cisteína, regulação do balanço "redox", metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos, função imune e proliferação celular. Suas múltiplas funções, em vários tecidos, têm sido documentadas na literatura, pelas inter-relações entre GSH tecidual, nutrição, estresse oxidativo e doença (EVANS; HALLIWELL, 2001; BRAY; TAYLOR, 1993; NUTALL *et al.*, 1998).

### 1.2.5 Apoptose

A apoptose é um processo de autodestruição celular que envolve mecanismos codificados no genoma das células eucarióticas (BREDESEN, 1996). Na última década, muito progresso tem sido feito para elucidar as várias vias de transdução de sinal que podem levar a essa morte celular programada. Baseado nesta informação, muitas cascatas apoptóticas têm sido descritas, como vias intrínsecas, extrínsecas, caspases-dependentes e independentes, em associação com fases de início, comprometimento e execução. Tem se tornado aparente, portanto, que a apoptose não é uma série de vias claramente definidas, mas uma multiplicidade de vias interconectadas, altamente reguladas e convergentes resultando nas alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose (ASHE; BERRY, 2003).

A apoptose pode ser induzida por um grande número de estímulos, e muitas das condições que prevalecem durante a isquemia, são capazes de induzir apoptose em um ou mais tipos de células (LIPTON, 1999). Essas condições incluem geração de radicais livres, produção de NO, redução da atividade mitocondrial e do potencial de membrana, desintegração de microtúbulos, aumento do  $Ca^{++}$ , ativação de calpaína e aumento da expressão de um mutante do gene *p53*.

As alterações características da apoptose são fragmentação do DNA, além de outras alterações morfológicas características tais como, condensação da cromatina, alterações no arranjo dos microtúbulos e fragmentação da célula em "corpos apoptóticos", que são estruturas celulares limitadas por membrana contendo citoplasma e massas negras de cromatina.

Fragmentos de DNA podem ser encontrados na penumbra de lesões permanentes após uma há várias horas, assim como 24 horas após 2 horas de oclusão temporária da artéria

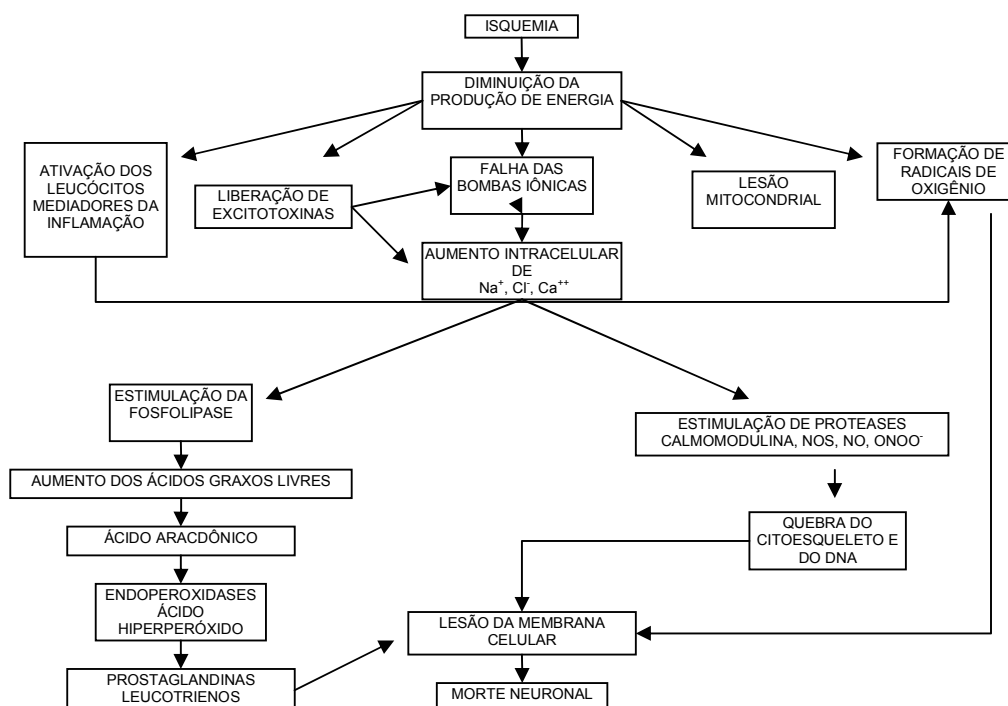
cerebral média. Havendo, portanto, diferente da isquemia global, fortes evidências de que a apoptose contribui significativamente para a morte celular tanto na isquemia focal quanto na hipóxia/isquemia. Neurônios apoptóticos parecem surgir logo após um insulto isquêmico focal e predomina inicialmente ou em regiões onde o insulto é menos severo. A razão entre células apoptóticas e necróticas é de 9:1 na região de penumbra versus 1:1 no core 4 horas após duas horas de isquemia temporária (CHARRIAUT-MARLANGUE *et al.*, 1996).

A injúria isquêmica moderada induz preferencialmente morte celular via apoptose em vez de necrose. Como na penumbra isquêmica a lesão é menos severa e há uma preservação de ATP, a apoptose predomina nessa região. (LOVE, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2006). As células apoptóticas são rapidamente removidas por fagocitose sem promover uma reação inflamatória. Em contraste, necrose celular geralmente afeta grande número de células contíguas causando edema citoplasmático, mitocondrial e de outras organelas que levam à ruptura da membrana plasmática e lise celular produzindo reação inflamatória.

Já foram identificados vários genes envolvidos no processo de apoptose, entre eles, a Apo-1, o receptor do fator de necrose tumoral (TNF), e receptores da membrana plasmática que ativam proteases denominadas caspases (NAGATA; GOLSTEIN, 1995; HU; JOHSON; SHU, 1999).

A ativação das caspases resulta da clivagem da pró-caspase, geralmente devido à ação de outras caspases ativadas. As caspases podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas que estão envolvidas na maturação de citocinas e na indução de inflamação (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 14) e aquelas diretamente envolvidas com a apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10). Este último grupo pode ser dividido em caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). Os substratos degradados ou inativados por caspases incluem proteínas do citoesqueleto, proteínas do reparo do DNA, proteínas anti-apoptóticas como da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) e inibidores das DNAsases caspase-ativadas (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000). Ao ser ativada, uma caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase executora. Esta destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose. Existem evidências para a ativação de um tipo de caspase, a caspase 3 dentro de algumas horas após um episódio de isquemia cerebral (BLOMGREN *et al.*, 1999, NAMURA *et al.*, 1998) e que inibidores de caspases reduzem o dano tecidual em modelos de isquemia em ratos (HARA *et al.*, 1997).

Visto que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias (Figura 3), muitas das quais pode levar a morte celular por apoptose, vários estudos experimentais têm demonstrado que a inibição da apoptose reduz a injúria isquêmica (GRAHAM; CHEN, 2001). Como exemplo, a inibição da caspase 3 e deleções de gene de Bid são conhecidas estratégias neuroprotetoras (SHINOURA *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2006; GUAN *et al.*, 2006a, 2006b).

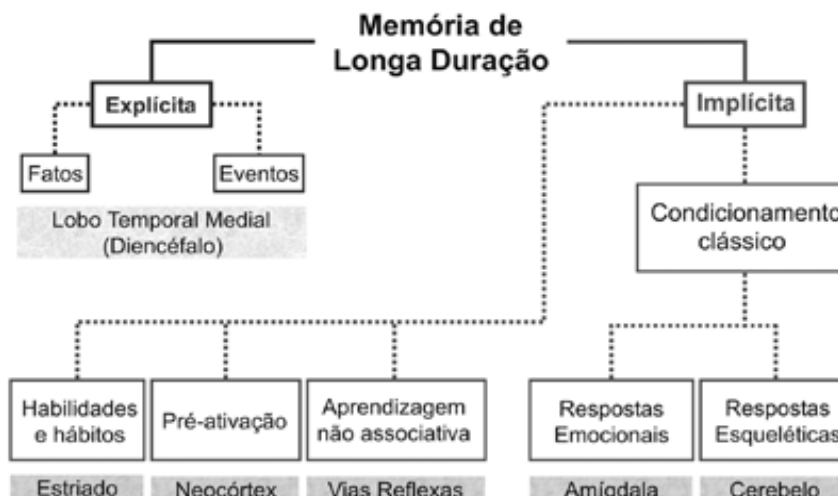


**Figura 3** – Mecanismos potenciais de injúria neuronal após isquemia.  
Fonte: Adaptado de Traystman, 2003.

### 1.3 Memória

Memória é a habilidade de se guardar uma informação aprendida previamente dentro de um sistema interno de armazenagem de tal forma que este possa ser acessado e usado posteriormente (LUCAS, 2002). Assim, a memória não é uma construção unitária e sim um sistema que reflete inúmeras habilidades cognitivas distintas que podem ser categorizadas ao longo de diferentes dimensões (LUCAS, 2002). Uma das divisões conceituais de memória mais abordadas distingue entre memória “declarativa” ou explícita e

“não declarativa” ou implícita, ambas consideradas como memórias de longa duração. (Figura 4).



**Figura 4** - Taxonomia dos sistemas de memória de longa duração.  
Fonte: Adaptado de Squire e Knowlton, (1995)

A memória não declarativa, implícita ou “de procedimento” (*procedural*) – de “como fazer” refere-se a várias formas de memória que não estão diretamente acessíveis à consciência. Estas incluem habilidades e hábitos de aprendizagem, condicionamento clássico, assim como “*priming*” ou pré-ativação que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (ERIKSSON, 2002). Estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados.

A memória declarativa geralmente refere-se à memória explícita – de “o que” - e está relacionada a experiências próprias, reconhecimento de cenas e de objetos familiares. A memória declarativa envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos, nos quais está incluída a memória episódica, que se refere a informações que estão relacionadas a um lugar e tempo específicos, assim como a memória semântica que se refere a um conhecimento geral não ligado a contexto espacial ou temporal em particular.

Estudos farmacológicos e clínicos têm mostrado que a memória explícita ou declarativa é processada por estruturas no lobo temporal e suas conexões. Acredita-se que a memória implícita ou de procedimento (*procedural*) seja processada pelo núcleo estriado e/ou

diencéfalo (IZQUIERDO *et al.*, 1993c).

No homem a memória declarativa é dividida em recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso, memória a curto prazo ou recente de eventos que ocorrem de segundo a horas ou dias antes, e memória remota de eventos do passado distante. Um aspecto da memória de curto prazo é a memória operacional (*working memory*), um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Pesquisa recente sobre a memória operacional indica o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral.

A memória a curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). O processo de codificação que converte memórias de curto prazo em memórias de longo prazo no homem e em outros primatas envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial.

No homem, a destruição bilateral do hipocampo ventral ou processos patológicos que destroem seus neurônios na área CA1 causa defeitos acentuados na memória recente. Humanos com esta destruição mantêm intactas a memória imediata e a remota, e não podem constituir novas memórias de longo prazo. As conexões do hipocampo para o diencéfalo também estão envolvidas com a memória. Do tálamo, as fibras projetam-se para o córtex pré-frontal e para o prosencéfalo basal. Deste, há uma projeção colinérgica para todo o neocórtex, amígdala e hipocampo, a partir do núcleo basal de Meynert. Enquanto o processo de decodificação para a memória a curto prazo envolve o hipocampo, as de longo prazo estão armazenadas no neocórtex (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996).

Em 1973, os fisiologistas Timoty Bliss e Terje Lomo demonstraram em neurônios localizados no hipocampo que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. O aumento pode durar algumas horas em animais anestesiados ou vários dias ou mesmo meses em animais acordados. Este fenômeno foi denominado pelos pesquisadores de potenciação de longa duração (*long-term potentiation- LTP*). Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo ou numa analogia, depende do “treinamento” e, portanto, de um processo de aprendizagem. A ativação repetitiva dos

receptores NMDA causa LTP (BLISS; LOMO, 1973; CHAPMAN *et al.*, 1990), que pode ser definida como uma forma ou mecanismo de memória importante no hipocampo e amígdala (CLUGNET; LE DOUX, 1990), ambas estruturas envolvidas no processamento dos estágios iniciais da memória (consolidação), e também no córtex, onde se acredita ser o sítio de estocagem da memória (IZQUIERDO, 1989; KELLER; PAVLIDES; ASANUMA, 1990).

Pacientes com doença cerebrovascular ocasionalmente exibem distúrbios cognitivos, como amnésia e desorientação topográfica (CAPLAN *et al.*, 1985; CAPLAN *et al.*, 1990). Vários autores têm detectado distúrbios na aquisição da memória após oclusão da artéria cerebral média em animais usando testes como esQUIVA passiva e labirintos.

No teste da esQUIVA passiva, estudos recentes demonstram que a isquemia focal provoca déficit na aquisição e retenção de memória (WAHL *et al.*, 1992; HATTORI *et al.*, 2000). Nesse modelo, que lida com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada com cada evento, a amígdala, o hipocampo e septo medial (IZQUIERDO *et al.*, 1992, 1993a) estão envolvidos.

A isquemia também leva a déficits na memória operacional, acessada através de tarefas de reconhecimentos de objetos e lugares (WOOD *et al.*, 1993; MUMBY *et al.*, 1996; GULINELLO *et al.*, 2006; PLAMONDON; MORIN; CHARRON, 2006) e na memória espacial (SANDSTROM; ROWAN, 2007). Estudos demonstraram déficit na memória de curta duração em ratos no labirinto em Y seguido de hipóxia-isquemia e subsequente injúria hipocampal (FAN *et al.*, 2005; MATCHETT *et al.*, 2007).

O septo medial e o hipocampo processam a memória de trabalho e a memória espacial. O hipocampo também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em humanos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO, 1994a; IZQUIERDO *et al.*, 1993b). Pesquisas sobre a memória operacional indicam o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral, principalmente córtex occipital, parietal e frontal direitos (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996). O córtex entorrinal (CE) está interconectado com o hipocampo, amígdala e septo medial por caminhos aferentes e eferentes mono e polissinápticos (WITTER *et al.*, 1989) e participa tanto da memória espacial, quanto do aprendizado da esQUIVA inibitória (IZQUIERDO, 1993c; ZOLA-MORGAN *et al.*, 1989).

#### 1.4 Nucleotídeos purínicos e injúria neuronal

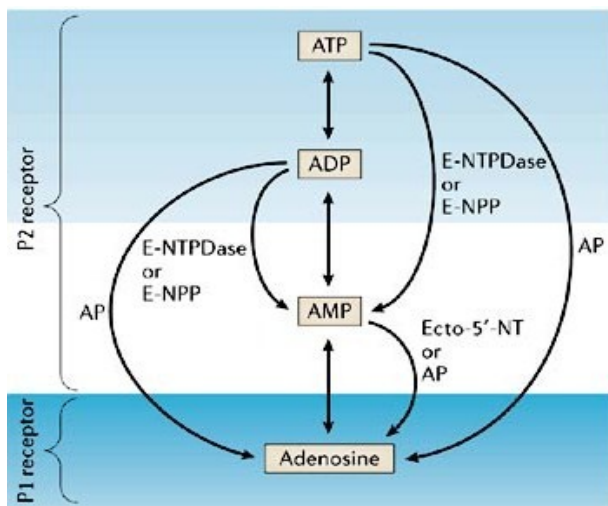
Purinas são liberadas no SNC por exocitose de vesículas sinápticas e são consideradas como neurotransmissores onipresentes na comunicação intercelular entre neurônios e células gliais, afetando desse modo a onda de propagação glial do  $\text{Ca}^{++}$  (FIELDS; STEVENS-GRAHAM, 2002; BURNSTOCK, 2004). Elas podem agir como fatores tróficos tanto no desenvolvimento/crescimento quanto na regeneração/proliferação de diferentes tipos de células sobre condições fisiológicas normais e de desenvolvimento (VOLONTE *et al.*, 2003; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006).

Sobre condições patológicas de injúria cerebral aguda (hipóxia, isquemia, injúria mecânica) altas concentrações de nucleotídeos purínicos são liberadas das células danificadas, astrócitos ativados, micróglia e células endoteliais no espaço extracelular (BRAUN *et al.*, 1998; JAMES; BUTT, 2002; MELANI *et al.*, 2005; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). A liberação de nucleotídeos como ATP, resulta na ativação dos purinoreceptores P2X e P2Y que alteram as mudanças morfológicas e funcionais induzidas pelo dano (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006), sendo uma causa potencial de eventos neurodegenerativos no SNC (AMADIO *et al.*, 2002). O ATP pode agir ainda como um modulador do processo inflamatório mediado por células microgliais envolvidas no estabelecimento de inúmeras condições patológicas.

As conseqüências das altas concentrações extracelulares de ATP são determinadas principalmente pela atividade das nucleotidases metabolizadoras de ATP, que normalmente efetua sua rápida remoção e formação de adenosina (EDWARDS, 1996), com subsequente ativação dos receptores do tipo P1. Os receptores do tipo P1 da Adenosina foram subdivididos de acordo com evidências moleculares, bioquímicas e farmacológicas em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, todos acoplados à proteína G. (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Um quinto subtipo (A<sub>4</sub>) foi identificado, no entanto, ainda não foi bem caracterizado. Várias linhas de pesquisas indicam que a adenosina age como um agente neuroprotetor endógeno no SNC, prevenindo o dano causado pela isquemia e excitotoxicidade (VON LUBITZ, 1999; DE MENDOÇA *et al.*, 2000), sendo as drogas que interagem com seus receptores importantes alvos terapêuticos contra o dano neuronal provocado pela isquemia.

Melani *et al.* (2005) encontraram que a inibição da 5'-ectonucleotidase aumenta a concentração de ATP para aproximadamente três vezes a de condições fisiológicas. Assim, enquanto sobre condições normais essas onipresentes ecto-ATPases regulam a concentração

do ATP extracelular (Figura 5), reações inflamatórias ou estresse oxidativo podem inibir a atividade dessas enzimas de degradação, resultando na acumulação de ATP (ROBSON *et al.*, 1997), que age como um agente tóxico, causando degeneração e morte celular.



**Figura 5** – Vias de degradação do ATP pelas ecto-ATPases.  
Fonte: FIELDS; BURNSTOCK, 2006.

#### 1.4.1 Subtipos de receptores P2

Os receptores P2 são expressos tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico, onde eles medeiam várias formas de comunicação intercelular e modulam uma variedade de funções biológicas incluindo inflamação, transmissão sináptica rápida, liberação de neurotransmissores, excitabilidade e morte celular neuronal (KENNEDY, 2000; LAMBRECHT, 2000).

A família de receptores P2 compreende sete subunidades de receptores P2X ionotrópicos (P2X<sub>1-7</sub>), formados por receptores monoméricos e heteroméricos (NORTH, 2002), e oito de receptores P2Y metabotrópicos (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>) (LAZAROWSKI; BOUCHER; HARDEN, 2003), baseados em suas estruturas e vias de transdução de sinais.

Os receptores P2X foram descritos tanto em neurônios pré- quanto pós-sinápticos e células gliais. Esses receptores formam uma grande família de canais iônicos ativados por ligantes, que permitem a passagem rápida e não seletiva de cátions através da membrana, resultando em um aumento na concentração de Ca<sup>++</sup> intracelular e despolarização da



membrana, sendo responsáveis por mediar as ações rápidas do ATP (JAMES; BUTT, 2002; NORTH, 2002; ILLES; RIBEIRO, 2004)

Os receptores P2X<sub>7</sub> são considerados como tendo uma importante função em várias condições inflamatórias. Uma importante característica desse receptor é sua participação na liberação de IL-1 $\beta$ , induzida por ATP, dos macrófagos e micróglia que foram ativados por substâncias bacterianas como endotoxinas (FERRARI *et al.*, 1997) Além disso, eles demonstraram estimular a transcrição do fator nuclear kappa B, TNF- $\alpha$  e proteínas quinases ativadas por estresse. O ATP evoca a liberação de plasminogênio (INOUE *et al.*, 1998) e IL-6 (SHIGEMOTO-MOGAMI *et al.*, 2001) e foi reportado como um potencial mediador da produção de NO pela iNOS (OHTANI *et al.*, 2000). A estimulação da micróglia tanto por ATP, quanto por BzATP (3'-O-(4-benzoil)-benzoil-ATP), um agonista P<sub>2</sub>, tem propriedades neurotóxicas, indicando que os eventos mediados pelos receptores P2X<sub>7</sub> podem contribuir para neurodegeneração (PANENKA *et al.*, 2001).

A supra-regulação dos receptores P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>7</sub> sobre a micróglia e os efeitos tóxicos que diferentes agonistas do receptor P<sub>2</sub> exercem durante a privação de oxigênio/glicose sobre áreas corticais sugerem que mecanismos purinérgicos estão fortemente relacionados à atividade da micróglia (FERRARI *et al.*, 2006).

As respostas mediadas por receptores P<sub>2Y</sub> se desenvolvem a uma velocidade consideravelmente menor que aquelas mediadas por receptores P<sub>2X</sub>, pois estão envolvidas com a geração de segundos mensageiros e com a interação com receptores para outros transmissores (VOLONTE *et al.*, 2003; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). A família de receptores P<sub>2Y</sub> é ativada pela adenina e/ou uracila extracelular ou no caso dos receptores P<sub>2Y</sub><sub>14</sub>, pelo açúcar presente nos nucleotídeos (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006). Os subtipos P<sub>2Y</sub><sub>1</sub>, P<sub>2Y</sub><sub>2</sub>, P<sub>2Y</sub><sub>4</sub>, P<sub>2Y</sub><sub>6</sub> e P<sub>2Y</sub><sub>11</sub> estão acoplados via proteína Gq/11 à estimulação da fosfolipase C e subsequente formação de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), que posteriormente mobiliza Ca<sup>++</sup> intracelular. O DAG estimula diferentes subtipos de proteína quinases C (PKC) levando a ativação de diferentes cascatas ativadas por essas proteínas. Em adição, o receptor P<sub>2Y</sub><sub>11</sub> medeia a estimulação, enquanto os receptores P<sub>2Y</sub><sub>12</sub> e P<sub>2Y</sub><sub>13</sub> medeiam a inibição da adenilato ciclase (VON KÜGELGEN, 2006).

### 1.4.2 Interações glutamatérgicas e purinérgicas

O cérebro dispõe de uma robusta expressão de RNAm, uma intensa ligação e imunorreatividade para receptores P2X e P2Y em neurônios e em elementos não-neuronais, apesar da função central dos receptores P2 permanecer indefinida.

Como a contribuição ATPérgica para a transmissão sináptica tem sido demonstrada apenas em algumas sinapses centrais, foi proposto que receptores P2 agem principalmente como moduladores pré-sinápticos no cérebro (CUNHA; RIBEIRO, 2000). Essa visão é suportada pela localização de várias subunidades de receptores P2X (CUNHA; RIBEIRO, 2000; DEUCHARS *et al.*, 2001; DIÁZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2001) e P2Y nos terminais nervosos cerebrais (SCHÄFER; REISER, 1997; SIMON; WEBB; BARNARD, 1997) e por estudos funcionais indicando uma modulação bifásica da liberação de diversos tipos de neurotransmissores em diferentes regiões do cérebro por esses receptores: inibição via receptores P2Y e estimulação via receptores P2X (CUNHA; RIBEIRO, 2000).

Rodrigues *et al.* (2005) demonstraram, em um estudo utilizando terminais nervosos purificados, que o ATP modula pré-sinápticamente a liberação evocada de glutamato, em um manejo bifásico através da ativação dos receptores pré-sinápticos facilitatórios, P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2/3</sub> e P2X<sub>3</sub> e inibitórios, P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>. Isso sugere que a liberação de glutamato estimulada por ATP pode contribuir para os efeitos deletérios da alta concentração de ATP (CHOIN, 1998). A super estimulação dos receptores NMDA do glutamato resulta em um excessivo influxo de cálcio que culmina na ativação de uma gama de mecanismos potencialmente neurotóxicos, como ativação de, endonucleases, NOS e produção de radicais livres.

Em adição à liberação exocitótica dependente de cálcio do glutamato dos terminais nervosos, um mecanismo similar parece operar nos astrócitos (JEREMIC *et al.*, 2001; ARAQUE *et al.*, 2001). Os astrócitos possuem um compartimento vesicular, que é responsável por regular a exocitose após um aumento de Ca<sup>++</sup> intracelular, sofrendo uma rápida fusão exocitótica dependente de Ca<sup>++</sup> e SNARE e levando a liberação de glutamato (BEZZI *et al.*, 2004). As proteínas conhecidas como SNARE são um conjunto de proteínas relacionadas presentes nas membranas das vesículas (e.x. sinaptobrevina) e na superfície interna da membrana plasmática (e.x. syntaxina) que são responsáveis pela junção e conseqüente fusão das membranas, desempenhando um papel chave na exocitose. Essa

liberação astrocítica de glutamato parece ainda envolver receptores P2X<sub>7</sub>, conforme sugerido em alguns estudos. A estimulação de astrócitos, que são capazes liberar glutamato após estimulação por ATP, foi bastante potenciada, em um meio livre de íons divalentes, pelo agonista dos receptores P2X<sub>7</sub>, BzATP, e pôde ser abolida por antagonistas P2X<sub>7</sub> (NEWMAN, 2003).

#### 1.4.3 PPADS e Neuroproteção

O PPADS (ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2,4'-dissulfônico) é um antagonista não-seletivo dos receptores P2 (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Os antagonistas do receptor P2 mostraram ser protetores contra morte celular apoptótica e necrótica induzidas por ATP, glutamato, hiperglicemia, assim como insultos de isquemia/hipóxia em culturas primárias de neurônios do cerebelo, núcleo estriado, córtex e hipocampo. A neurotoxicidade induzida pelo ATP em culturas de células granulares do cerebelo foi inibida pelo PPADS, promovendo 80 a 100% de neuroproteção (AMADIO *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* demonstraram que a astrogliose induzida por injúria no núcleo accumbens de ratos foi aumentada pela aplicação local de agonistas P2 e que o PPADS, quando administrado sozinho, diminuiu a formação da cicatriz glial provavelmente por antagonizar o efeito da ativação dos purinoreceptores como consequência da injúria tecidual e em adição, antagonizar o efeito dos respectivos agonistas (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 1999).

Lämmer *et al.* (2006) também demonstraram que o pré-tratamento de ratos espontaneamente hipertensivos com PPADS antes da oclusão da artéria cerebral média reduziu o volume do infarto, assim como o déficit motor dos animais, sugerindo que interferências com o sistema excitatório do ATP podem prover neuroproteção e que o bloqueio dos receptores P2 pode melhorar as consequências funcionais e morfológicas da isquemia.

Estudos recentes demonstrando que antagonistas dos receptores P2 desempenham uma função em modular a toxicidade neuronal mediada por receptores NMDA, através da inibição de subtipos de receptores capazes de aumentar a frequência da liberação de glutamato, indicam que a neuroproteção mediada pelo PPADS pode ser devido ao bloqueio

do influxo de cálcio, envolvido no agravamento do dano isquêmico.

O PPADS pode ainda contribuir para neuroproteção, através de uma ação antiinflamatória, reduzindo a ativação da micróglia e diminuindo a liberação de citocinas e outros fatores tóxicos que exarcebam a injúria e a morte neuronal. (CAVALIERE *et al.*, 2005; FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O acidente vascular cerebral (AVC) representa a terceira causa de morte e a primeira causa de invalidez no mundo. No Brasil, dados do Instituto Nacional de Seguridade Social demonstram que o AVC é responsável por 40% das aposentadorias precoces (FALCÃO *et al.*, 2004). Visto que a fisiopatologia da isquemia cerebral é complexa e envolve múltiplas vias, iônicas, enzimáticas e genéticas, que variam em função da profundidade e duração da isquemia (SMITH, 2004), devemos procurar entender os mecanismos envolvidos no dano e reparação neuronal, com o objetivo de diminuir esta morbidade neurológica, bem como procurar a terapia mais efetiva.

Apesar dos resultados laboratoriais, muitas drogas neuroprotetoras apresentam pouco ou nenhum sinal de eficácia em testes clínicos controlados em pacientes com AVC. A lista de fracassos inclui antagonistas de canais de cálcio, fármacos que inibem a liberação de glutamato, fármacos que potencializam os efeitos do GABA e removedores de radicais livres (MADDEN; CLARCK; LESSOV, 2003). O uso clínico de antagonistas NMDA foi associado a efeitos colaterais neuropsiquiátricos e cardiovasculares provavelmente relacionados à interferência com a função glutamatérgica cerebral. Os bloqueadores de canal de cálcio não demonstraram melhora nos pacientes (SMITH, 2004), que apresentaram efeitos colaterais similares aos vistos com antagonistas glutamatérgicos, em particular efeitos cardiovasculares.

A revascularização dos vasos cerebrais durante o AVC isquêmico agudo, através do uso do ativador plasminogênio tecidual (tPA), tem provado ser o único método capaz de melhorar o resultado funcional da isquemia em humanos. No entanto, devido à estreita janela terapêutica, esse tratamento é apropriado somente para um pequeno número de pacientes, além do risco do problema circulatório piorar se o derrame for hemorrágico em vez de trombótico (SMITH, 2004).

Pelo exposto fica evidente a importância de se pesquisar novas drogas que tenham ação de diminuir o dano isquêmico. Assim, este trabalho procura avaliar o efeito do tratamento com PPADS, um antagonista do receptor P2 de purinas, sobre o dano neuronal, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Estudar os efeitos do PPADS sobre o dano neuronal, comportamento e memória de camundongos submetidos à isquemia cerebral focal permanente.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Produzir dano neuronal usando modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média em camundongos.
- Produzir déficits de memória e alterações comportamentais usando modelo de isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média em camundongos.
- Reverter o dano neuronal nos animais isquemiados, pelo tratamento com PPADS.
- Reverter às alterações comportamentais e déficits de memória nos animais isquemiados, pelo tratamento com PPADS.
- Quantificar a atividade da Mieloperoxidase no hipocampo, estriado e córtex temporal dos animais submetidos a isquemia cerebral focal permanente por oclusão da artéria cerebral média.
- Verificar o efeito do PPADS sobre a resposta inflamatória produzida pelo modelo de isquemia através da ação do PPADS sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Drogas

PPADS; ketamina (50mg/mL) (Sigma- USA); Xilazina (0,02g/mL) (Sigma-USA).

### 4.2 Animais

Foram utilizados camundongos albinos adultos *Swiss*, machos, com peso entre 25 e 30g. Os animais foram mantidos em condições normais de laboratório com alimentação *ad libitum* e ciclo de claro escuro de 12 horas.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo - nº68/09), dentro das normas que regulamentam a pesquisa em animais.

### 4.3 Estereotaxia

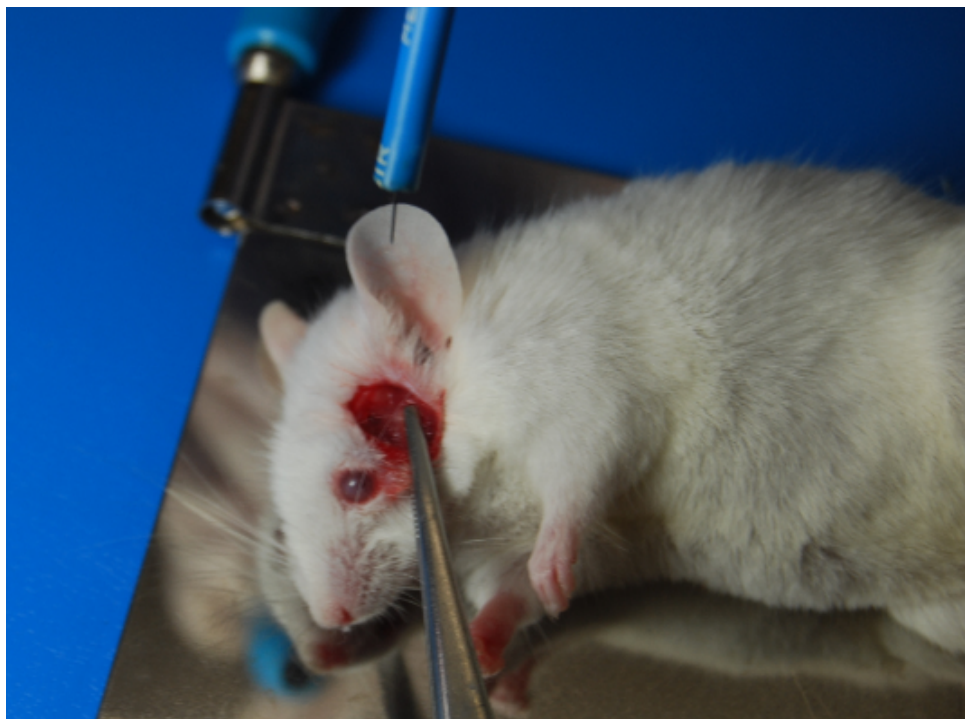
Os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.) e submetidos a uma cirurgia estereotáxica para administração intracerebroventricular (i.c.v.) da droga. Foram administrados PPADS, nas doses de 0,1, 0,5 ou 1,0 nmols/1 $\mu$ L, ou fluido cerebrospinal artificial (FCE - 132 mM de NaCl, 2,95 mM de KCl, 1,71 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,64 mM de MgCl<sub>2</sub>, 24,6 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 3,71 mM de Dextrose e 6,7 mM de Uréia), utilizando as coordenadas relativas ao bregma: ântero-posterior: 1.0; lateral: 1,5 e ventral: 3,5 (FRANKLIN; PAXINOS, 1997).

#### **4.4 Isquemia cerebral focal por oclusão permanente da artéria cerebral média em camundongos.**

Dez minutos após o tratamento dos camundongos, a oclusão da artéria cerebral média foi realizada como descrito por Welsh *et al.* (1987), através dos seguintes procedimentos:

1. A temperatura do animal foi mantida entre 36,5 e 37° C, através do uso de uma lâmpada;
2. Uma pequena incisão foi feita na pele do animal com uma tesoura, na linha entre a órbita do olho direito e a orelha;
3. A pele foi rebatida para expor o pólo superior da glândula parótida e o músculo temporal direito;
4. Foi feito um pequeno corte no músculo temporal, sendo este retraído até expor o crânio;
5. A área foi limpa, observando-se o curso distal da artéria cerebral média logo acima do arco zigomático;
6. Um pequeno orifício foi feito com uma broca (1mm) no crânio acima da bifurcação da artéria;
7. A artéria cerebral média foi eletrocoagulada com um bisturi elétrico (Figura 6), observando-se a não continuidade do fluxo sanguíneo, acima da eletrocoagulação;
8. O músculo temporal foi suturado e depois a pele com um fio mononylon 3-0, sendo o local limpo com polvidine;
9. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais para recuperação da cirurgia com livre acesso a ração e água.





**Figura 6** – Foto mostrando a cirurgia de isquemia cerebral focal em um camundongo no momento da aproximação do bisturi elétrico para eletrocoagulação da artéria cerebral média.

#### 4.5 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos em seis grupos de acordo com o seguinte esquema de tratamento:

Grupos	Tratamento
1	Falso-operado (FO) + FCE
2	Isquemiado (ISQ) + FCE
3	ISQ + PPADS 0,1 nmoles/1 $\mu$ L
4	ISQ + PPADS 0,5 nmoles/1 $\mu$ L
5	ISQ + PPADS 1,0 nmol/1 $\mu$ L
6	FO + PPADS 1,0 nmol/1 $\mu$ L

Entenda-se como falso-operados os animais nos quais todos os procedimentos descritos para isquemia foram realizados, exceto a eletrocoagulação da artéria cerebral média. O dano neuronal isquêmico foi analisado através de uma Avaliação Neurológica, realizada 24 horas após a cirurgia (n=5), e da extensão da lesão cerebral pelo método do TTC (coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol), realizado em uma curva de tempo, 1 hora, 24 horas e 96 horas após à cirurgia (n=5).

Vinte e quatro horas após o término da cirurgia, seis animais (n=6) foram sacrificados e seus cérebros dissecados (hipocampo, estriado e córtex temporal) para realização do ensaio para mieloperoxidase, sendo outros dez animais (n=10) de cada grupo, submetidos aos testes comportamentais e de memória (Campo Aberto, Y-Maze e Esquiva Passiva), 72 horas após a isquemia.

#### **4.6 Avaliação Neurológica**

A Avaliação Neurológica foi realizada 24 horas após a isquemia. Os achados neurológicos foram pontuados utilizando uma escala previamente descrita por Garcia *et al.* (1995a). Seis parâmetros foram avaliados: 1. Atividade espontânea, que analisou a habilidade do animal de se aproximar das quatro paredes de uma caixa de polipropileno (49x34x16), explorando o ambiente; 2. Simetria do movimento das quatro patas, a qual foi analisada observando-se o animal ao ser segurado pela cauda e suspenso no ar; 3. Estiramento das patas dianteiras, no qual o animal é levado a caminhar sobre as patas dianteiras na borda de uma mesa; 4. Escalada, quando o animal é puxado pela cauda enquanto escala uma grade de ferro (49x34), sendo analisada a capacidade do animal de se agarrar firmemente à grade ou se ele tende a fazer movimentos circulares; 5. Propriocepção corpórea, na qual o animal é tocado com uma pinça em ambos os lados do corpo e sua reação é observada; e 6. Resposta ao toque da vibrissa, no qual a pinça toca as vibrissas em ambos os lados do animal. O total de escores dado a cada animal ao fim da avaliação, denominado escores neurológicos, vai de 3 a 18 pontos, representando o somatório dos escores obtido pelo animal em cada parâmetro analisado (Quadro 1).

Testes	Escores			
	0	1	2	3
<b>Atividade Espontânea</b>	Animal sem movimento	Animal não se ergue e raramente se movimenta	Animal se movimenta, mas não se aproxima de 3 lados da caixa	Animal se movimenta e se aproxima de 3 lados da caixa
<b>Simetria do movimento das quatro patas</b>	Lado esquerdo: sem movimento	Lado esquerdo: raros movimentos	Lado esquerdo: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
<b>Estiramento das patas dianteiras</b>	Lado esquerdo: sem movimento	Lado esquerdo: raros movimentos	Lado esquerdo: movimentos lentos	Ambos os lados: movem simetricamente
<b>Escalada</b>	...	Animal falhou em escalar	Lado esquerdo com dificuldade	Animal escalou normalmente
<b>Propiocepção Corpórea</b>	...	Lado esquerdo: sem resposta	Lado esquerdo < Lado direito	Resposta Simétrica
<b>Resposta ao toque da Vibrissa</b>	...	Lado esquerdo: sem resposta	Lado esquerdo < Lado direito	Resposta Simétrica

**Quadro 1** – Escores obtidos através da avaliação neurológica 24 horas após oclusão da artéria cerebral média. Fonte: GARCIA *et al.*, 1995

#### 4.7 Quantificação do dano isquêmico através da coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) (GOLDLUST *et al.*, 1996)

Os animais foram anestesiados, decapitados e seus cérebros retirados 1 hora, 24 horas e 96 horas após as cirurgias com o objetivo de determinar a extensão da lesão cerebral, através da análise da viabilidade celular. O TTC é um sal derivado do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazol) que ao ser reduzido pelas mitocôndrias viáveis (recebe um próton da succinato desidrogenase) adquire coloração avermelhada, ficando as células que não são mais viáveis (com enzimas inativas) como uma região esbranquiçada (correspondendo a área de edema).

Conservados em salina gelada até o momento dos cortes, os cérebros foram fatiados na espessura de 2 mm e imersos em solução de 2% de TTC à 37°C por 30 minutos. Em seguida tiveram suas imagens digitalizadas em alta resolução, sendo analisadas as áreas de edema e as áreas totais para os cálculos das respectivas percentagens. Tal metragem foi

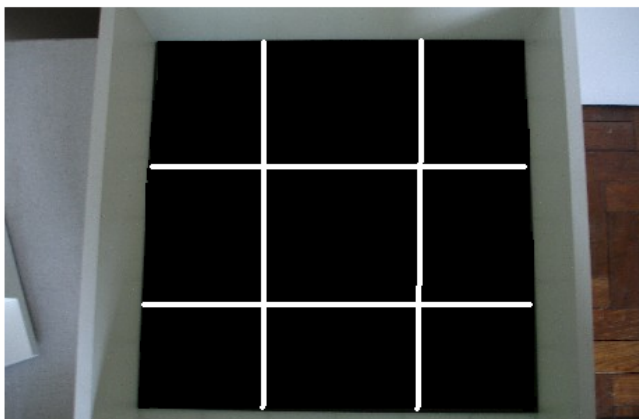
realizada utilizando-se o software Osiris™ (*University of Geneva, Switzerland*).

## 4.8 Testes comportamentais

### 4.8.1 Avaliação da atividade locomotora (Teste de campo aberto) (BROADHURST, 1957)

Para verificar se a cirurgia ou tratamento acarretou alteração da atividade locomotora, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi feito o teste de atividade locomotora usando o modelo de Campo Aberto (*Open Field*).

No teste, o animal foi colocado em uma caixa de locomoção, uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm) de acrílico preto com o piso dividido em nove quadrantes iguais (Figura 7) e durante 5 minutos foram registrados, o número de cruzamento entre os quadrantes (*crossing*) e o número de episódios em que os animais levantaram o corpo apoiados apenas pelas patas traseiras (*rearing*), que mede a atividade exploratória vertical. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar interferência do cheiro de urina e fezes no teste.



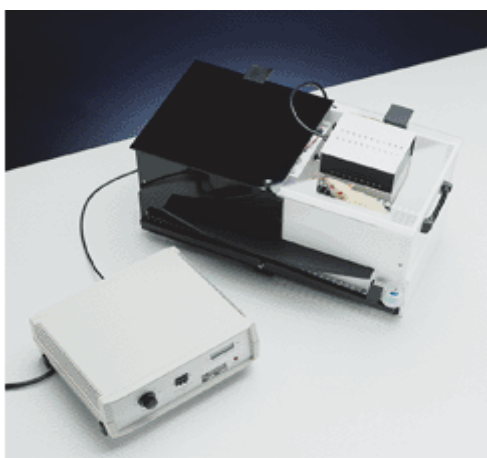
**Figura 7** – Campo Aberto.

## 4.9 Testes de Memória

### 4.9.1 Esquiva passiva (*passive avoidance test*) (DE NOBLE *et al.*, 1986)

Com o objetivo de avaliar a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada a um evento, três dias após o protocolo de isquemia, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva (Figura 8). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), dividida em dois compartimentos separados por uma janela, um branco (iluminado) e um preto (escuro), o qual tem o piso eletrificado. O animal foi colocado no compartimento iluminado e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 min., quando então foi retirado.

Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente no compartimento iluminado. O animal ao entrar no compartimento escuro, recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 300 s (treino). Retirou-se o animal (alguns animais saíram espontaneamente após o choque) e após 15 min. este foi colocado novamente no compartimento iluminado e registrou-se a latência de entrada (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 hs, quando os animais foram colocados no compartimento iluminado e o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro foi registrado (os animais nesta fase não levaram choque) até um tempo limite de 300 segundos.



**Figura 8** – Aparelho de Esquiva Passiva.

#### 4.9.2 Labirinto em Y (*Y-maze*)

A memória operacional ou de trabalho foi avaliada pela taxa de alterações espontâneas em um labirinto em Y (Figura 9) com os três braços (40 x 5 x 16 cm) posicionados em ângulos iguais como descrito anteriormente por Sarter *et al.* (1988). Antes do teste, os braços foram numerados, sendo o animal colocado em um deles e deixado para explorar o ambiente por 8 minutos. A seqüência dos braços os quais os animais entraram foram então anotadas e as informações analisadas de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição.

Uma alteração foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou aos dois braços anteriormente visitados. Assim, a percentagem das alterações foi calculada como a razão entre as alterações corretas (n) e o número de visitas realizadas durante o período de observação (n-2), multiplicado por 100.

$$\% \text{ Alterações espontâneas} = \frac{n}{n-2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último (STONE *et al.*, 1991). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.



**Figura 9** – Labirinto em Y.

#### 4.10 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos dos neutrófilos, sendo utilizada como marcador para o conteúdo dessas células nos tecidos. A extensão da acumulação de neutrófilos foi mensurada no hipocampo, estriado e córtex temporal, através da técnica de Bradley *et al.* (1982), com algumas modificações.

Vinte e quatro horas após a isquemia, os animais foram sacrificados e as áreas cerebrais retiradas e homogeneizadas em tampão HTAB (5g de HTAB em 1L de tampão de fosfato de potássio, pH 6), sendo 1mL de tampão para cada 50mg de tecido. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 30µL do sobrenadante da amostra e 200µL da solução de O-dianisidina 526 mM contendo 1mL de peróxido de hidrogênio a 30%.

Neste ensaio, o  $H_2O_2$  é clivado por meio da MPO liberada das amostras de tecido por homogeneização com tampão HTAB (detergente). O radical oxigênio ( $O^-$ ) resultante se combina com diidrocloreto de O-dianisidina, o doador de hidrogênio ( $AH_2$ ), que é convertido a um composto colorido (A). O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio. A absorbância foi medida nos tempos 0,1 e 3 minutos no comprimento de onda 405 nm. Os resultados foram dados como unidades de MPO por mg de tecido. E uma unidade de MPO equivale à quantidade que degrada 1µmol/min de peróxido de hidrogênio.

#### 4.11 Análise Estatística

Foram realizados testes não paramétricos (Kruskall-Wallis e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes comportamentais, sendo os resultados expressos como média ± erro padrão da média. O programa de computador usado foi o Graph Pad Instat. Os escores neurológicos foram expressos em mediana, utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação entre as medianas. Para o ensaio para Mieloperoxidase foram utilizados ANOVA e o teste de Newman-Keuls como teste post-hoc, com o critério de significância de  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Avaliação Neurológica dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média**

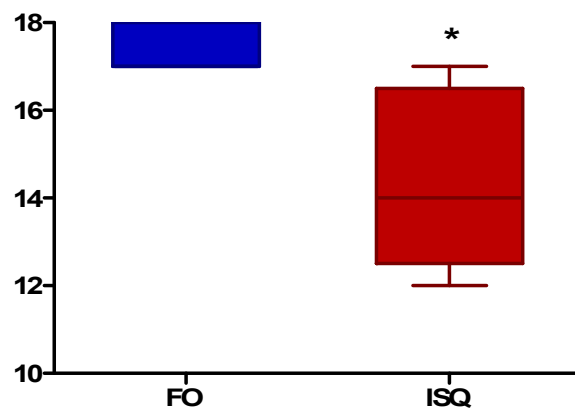
Os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média apresentaram déficits neurológicos significativos 24 horas após a isquemia (grupo ISQ: 14 (12-17)) em relação aos animais falso-operados (FO: 17 (17-18)) (Figura 10), apresentando principalmente diminuição da capacidade de responder a estímulos e movimentar o lado contralateral à isquemia. Os escores neurológicos apresentados pelos animais estão expressos em mediana, estando o valor mínimo e máximo demonstrados entre parênteses.

### **5.2 Quantificação do dano neuronal isquêmico através de coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC) dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média**

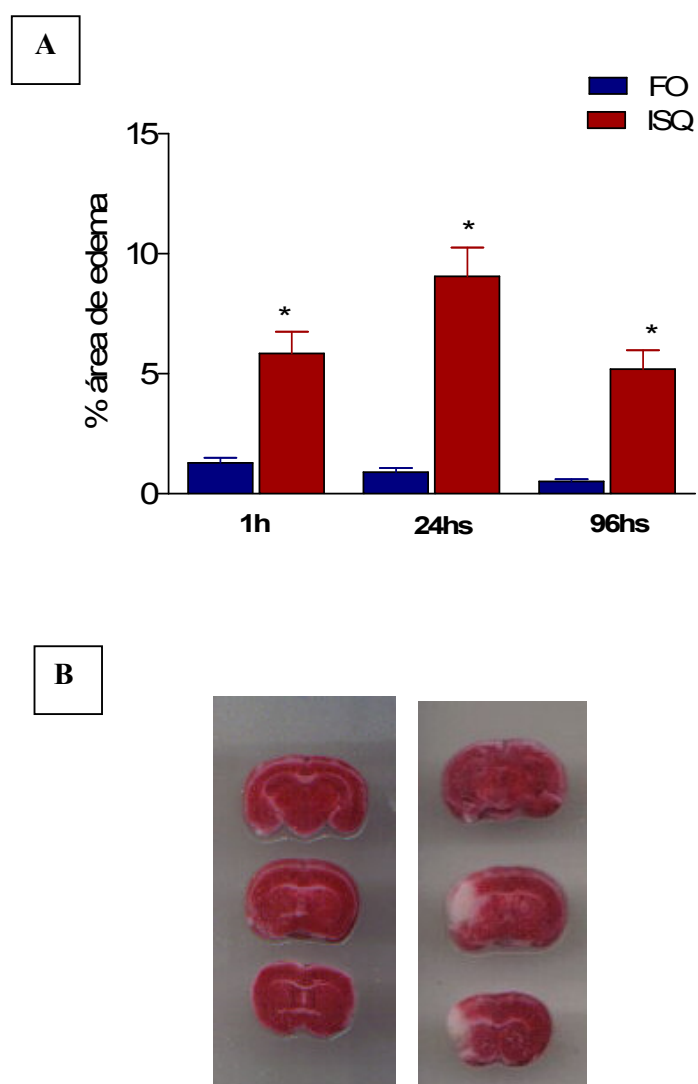
Com o objetivo de avaliar a extensão do dano neuronal dos animais submetidos à isquemia focal permanente, a técnica de coloração com TTC foi realizada em uma curva de tempo, 1 hora, 24 horas e 96 horas após a cirurgia, sendo quantificadas as áreas de edema, regiões sem coloração nas quais as células não são mais viáveis.

Verificou-se um aumento significativo da área de edema nos animais isquemiados, nos três tempos analisados (1 h - FO:  $1,28 \pm 0,21\%$ ; ISQ:  $5,85 \pm 0,89\%$ ; 24 hs - FO:  $0,89 \pm 0,18\%$ ; ISQ:  $9,06 \pm 1,2\%$ ; 96 hs - FO:  $0,51 \pm 0,09\%$ ; ISQ:  $5,18 \pm 0,79\%$ ), sendo as maiores áreas visualizadas 24 horas após a isquemia, com um aumento de cerca de 90 % em relação aos animais falso-operados (Figura 11).





**Figura 10** - Escores neurológicos dos camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=5), 24 horas após a cirurgia. O total de escores variou de 3 a 18 pontos, representando o somatório dos escores obtido pelo animal nos seis parâmetros analisados, sendo o escore mais elevado dado ao maior desempenho. \* vs FO;  $p < 0.05$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores estão expressos em mediana.



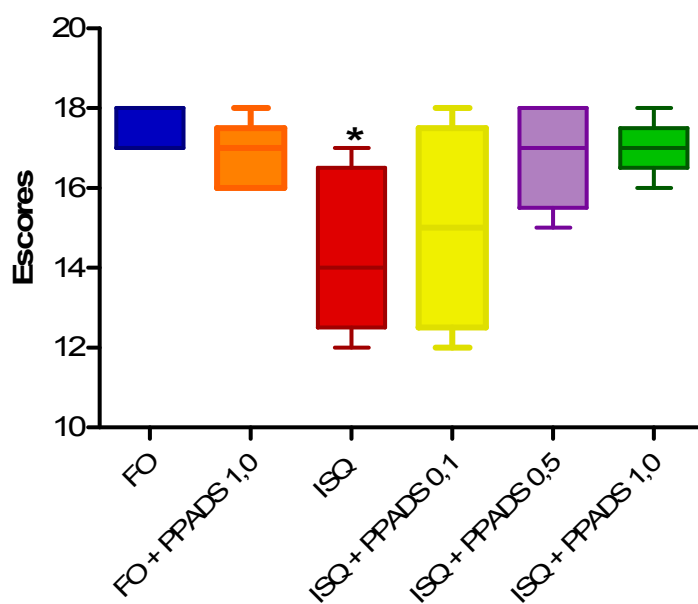
**Figura 11** – Quantificação do dano neuronal isquêmico dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média (n=5), visualizadas através da coloração de TTC. A) Percentagens das áreas de edema calculadas 1h, 24hs e 96hs após a isquemia. \*vs FO;  $p < 0.05$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. B) Visualização das áreas de edema (regiões sem coloração) 24hs após a isquemia.

### **5.3 Efeito do tratamento com PPADS sobre os escores neurológicos dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média**

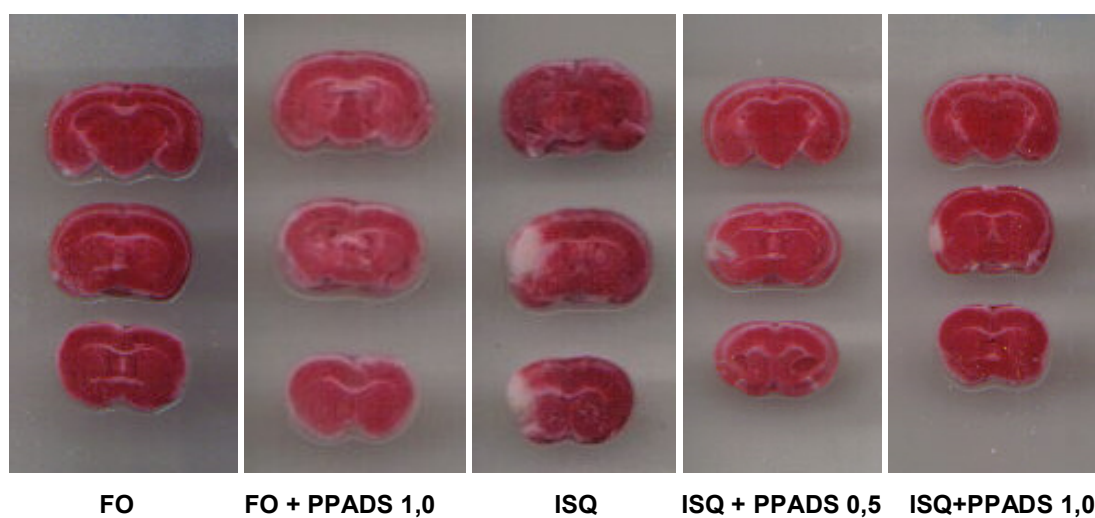
A isquemia provocou déficits neurológicos significativos (ISQ: 14 (12-17)) em relação aos animais do grupo controle (FO: 17 (17-18)), 24 horas após as cirurgias. Essas alterações foram reduzidas pelo tratamento com PPADS na dose de 1,0 nmol (ISQ + PPADS 1,0: 17 (16-18)), apesar dos escores não diferirem estatisticamente (Figura 12). Os escores neurológicos apresentados pelos animais estão expressos em mediana, estando o valor mínimo e máximo demonstrados entre parênteses.

### **5.4 Efeito do tratamento com PPADS na extensão do dano neuronal dos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média, através de coloração pelo Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazol (TTC)**

O efeito do PPADS sobre o dano neuronal isquêmico foi analisado 24 horas após a cirurgia, quando as áreas de edema se mostraram maiores, tendo sido verificado uma diminuição significativa da lesão cerebral nos animais tratados com PPADS nas doses de 0,5 ( $2,24 \pm 0,33\%$ ) e 1,0 nmols ( $1,86 \pm 0,18\%$ ) em relação aos animais submetidos à isquemia ( $9,06 \pm 1,2\%$ ) (Figura 13 e 14).

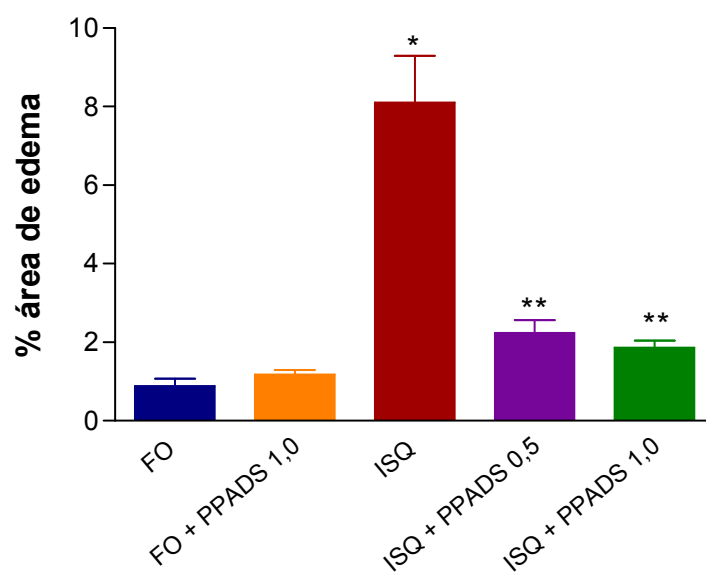


**Figura 12** – Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) sobre os escores neurológicos de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=5). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. O total de escores variou de 3 a 18 pontos, representando o somatório dos escores obtido pelo animal nos seis parâmetros analisados, sendo o escore mais elevado dado ao maior desempenho. \* vs FO;  $p < 0.05$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores estão expressos em mediana.



**Figura 13** - Efeito do tratamento com PPADS nas doses de 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v., sobre a extensão da lesão cerebral de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=5), visualizadas através da coloração de TTC.

As áreas de edema, nas quais as células não são mais viáveis (com enzimas inativas) correspondem às regiões esbranquiçadas, sem coloração. O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia.

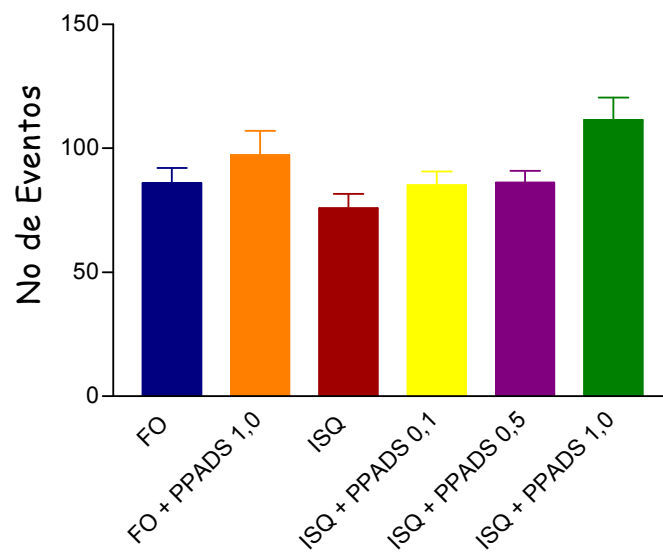


**Figura 14** – Efeito do tratamento com PPADS nas doses de 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v., sobre a extensão da lesão cerebral (percentagens das áreas de edema) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=5), visualizadas através da coloração de TTC. O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ; p<0.05. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

## 5.5 Testes comportamentais

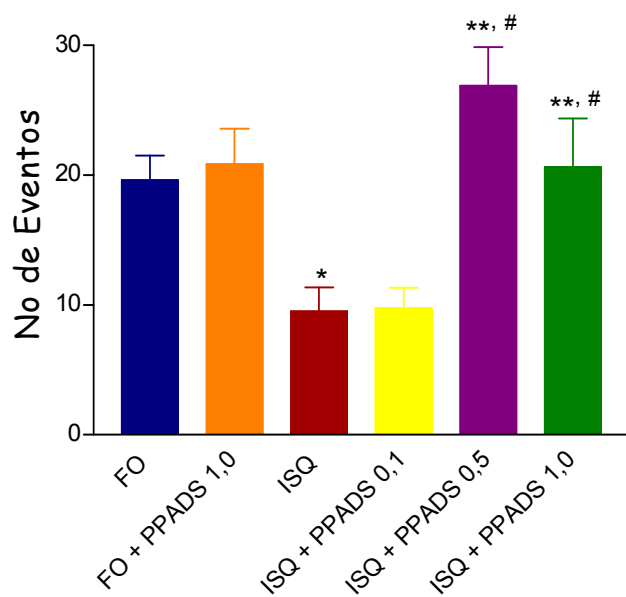
### 5.5.1 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste da Atividade Locomotora (Campo Aberto)

No teste da atividade locomotora, nenhuma alteração foi verificada entre os grupos em relação ao número de *crossings* (Nº de *crossings*: FO -  $86 \pm 6,0$ ; FO + PPADS 1,0 -  $97,1 \pm 9,87$ ; ISQ -  $75,8 \pm 5,9$ ; ISQ + PPADS 0,1 -  $85,1 \pm 5,5$ ; ISQ + PPADS 0,5 -  $86,2 \pm 4,8$ ; ISQ + PPADS 1,0 -  $111,4 \pm 9,0$ ) (Figura 15). No entanto, em relação aos *rearings*, que mede a atividade exploratória vertical, observou-se uma diminuição deste comportamento no grupo submetido à isquemia focal em relação aos grupos falso-operados e uma reversão desta diminuição pelo tratamento com PPADS (Nº de *rearings*: FO -  $19,6 \pm 1,9$ ; FO + PPADS 1,0 -  $20,9 \pm 2,7$ ; ISQ -  $9,5 \pm 1,9$ ; ISQ + PPADS 0,1 -  $9,7 \pm 1,6$ ; ISQ + PPADS 0,5 -  $26,9 \pm 3,0$ ; ISQ + PPADS 1,0 -  $20,6 \pm 3,7$ ) (Figura 16).



**Figura 15** - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) no número de *crossings* de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=10). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM





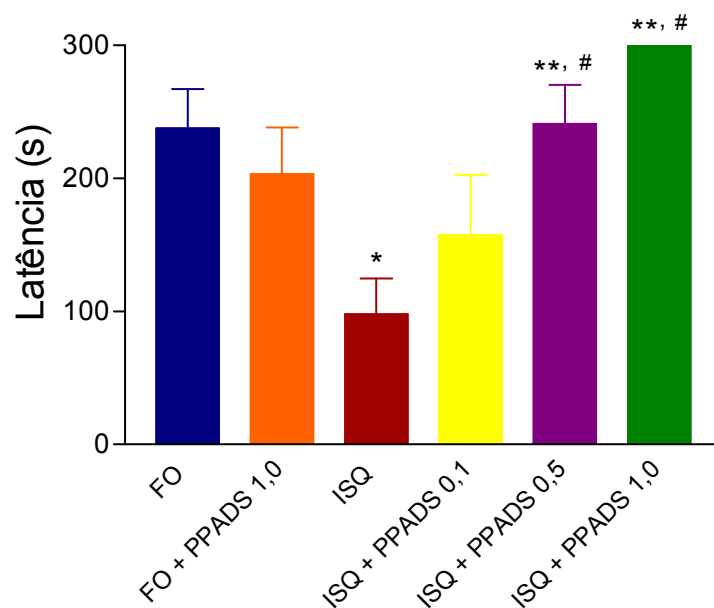
**Figura 16** - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) no número de *rearings* de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=10). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ; # vs ISQ + PPADS 0,1.  $p < 0.05$ , Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

## 5.6 Testes de Memória

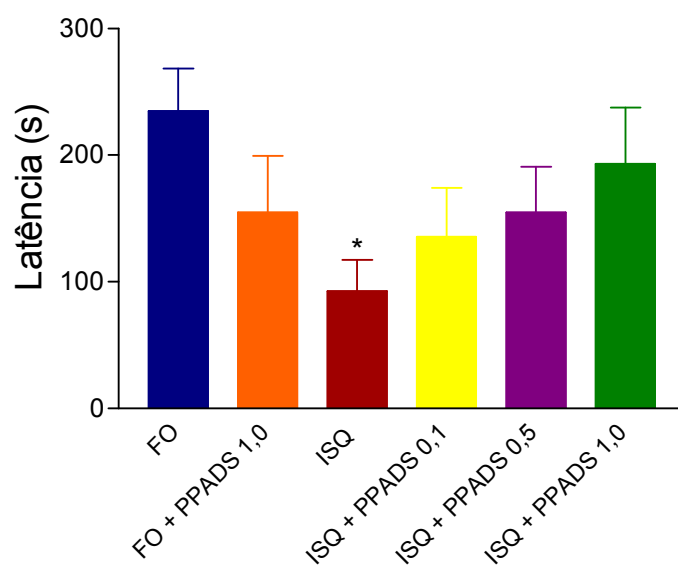
### 5.6.1 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste da Esquiva Passiva

Na avaliação da memória aversiva através da esquiva passiva, os animais aprendem a evitar o choque (treino) não entrando no lado escuro do aparelho, quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). Os animais do grupo controle apresentaram uma boa retenção da memória, tanto na fase imediata (Memória Recente: FO –  $237,5 \pm 29,6s$ ; FO + PPADS 1,0 –  $203,2 \pm 35,2s$ ), quanto na fase de consolidação (Memória Tardia: FO –  $235,0 \pm 33,3s$ ; FO + PPADS 1,0 –  $158,4 \pm 44,6s$ ).

Por outro lado, os animais submetidos à isquemia focal apresentaram déficit na aprendizagem e dano na aquisição e retenção da memória (Memória Recente:  $97,84 \pm 26,9s$ ; Memória Tardia:  $92,5 \pm 25,0s$ ) apresentando uma diferença significativa nesse tempo em relação aos controles. Esse resultado não foi revertido pelo tratamento com PPADS na dose de 0,1 nmols (ISQ + PPADS 0,1 – Memória Recente:  $157,5 \pm 45,2s$ ; Memória Tardia:  $135,7 \pm 38,5s$ ), entretanto, foi em parte revertido pelas doses de 0,5 e 1,0 nmols, verificando-se um aumento significativo no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho 15 minutos após o choque (Memória Recente: ISQ + PPADS 0,5 –  $240,8 \pm 29,6s$ ; ISQ + PPADS 1,0 –  $299,7 \pm 0,28s$ ) (Figura 17), mas não 24 horas após o choque (Memória Tardia: ISQ + PPADS 0,5 –  $154,8 \pm 36,1s$ ; ISQ + PPADS 1,0 –  $193,1 \pm 44,6s$ ) (Figura 18).



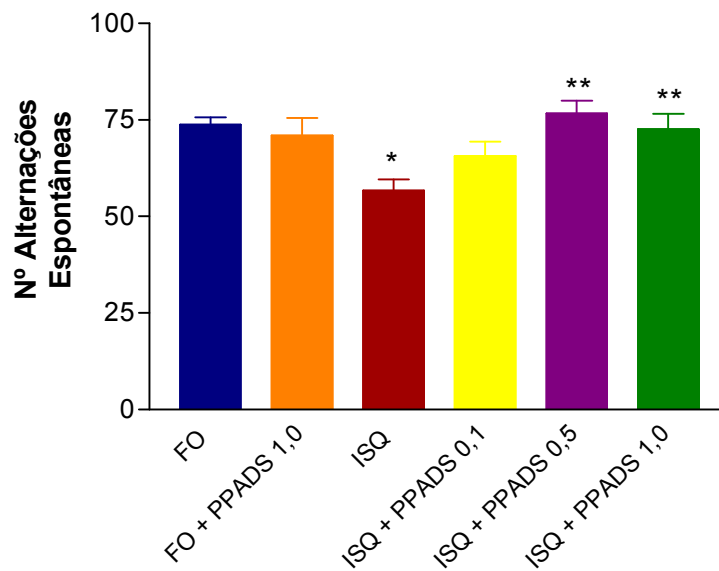
**Figura 17** - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) na aquisição de memória (Memória Recente) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=10). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ; # vs ISQ + PPADS 0,1.  $p < 0.05$ ; Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



**Figura 18** - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) na retenção da memória (Memória Tardia) de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=10). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO;  $p < 0.05$ , Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

### 5.6.2 Efeito do tratamento com PPADS nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média no Teste de Labirinto em Y

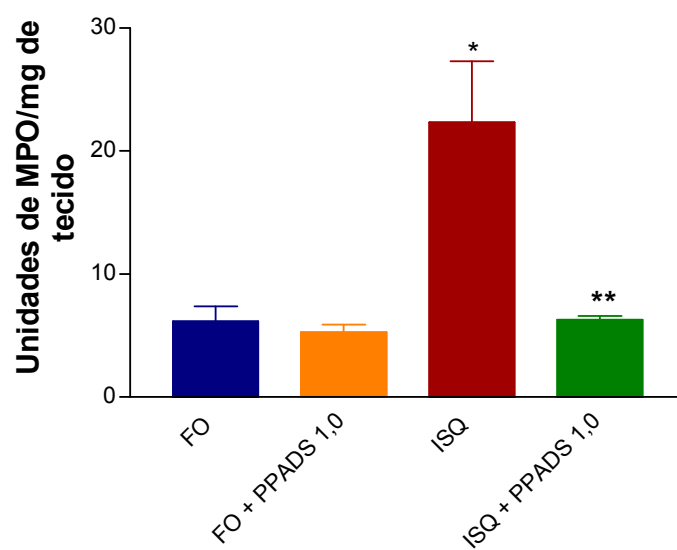
Os resultados dos experimentos do Labirinto em Y (Y-Maze), que avalia a memória operacional (*working memory*) demonstraram uma diminuição da percentagem de alterações espontâneas nos animais que sofreram isquemia (ISQ –  $56,7 \pm 2,9\%$ ) em relação aos animais falso-operados (FO –  $73,8 \pm 1,9\%$ ; FO + PPADS 1,0 –  $70,9 \pm 4,5\%$ ), assim como a reversão deste déficit de memória, pelo tratamento com PPADS nas doses de 0,5 e 1,0 nmols (ISQ + PPADS 0,5 –  $76,7 \pm 3,3\%$ ; ISQ + PPADS 1,0 –  $72,6 \pm 4,0\%$ ) (Figura 19).



**Figura 19** - Efeito do tratamento com PPADS (0,1, 0,5 e 1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) na memória operacional de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média. (n=10). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ; p<0.05, Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

### **5.7 Efeito do tratamento com PPADS sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase nos camundongos submetidos à isquemia focal permanente por oclusão da artéria cerebral média**

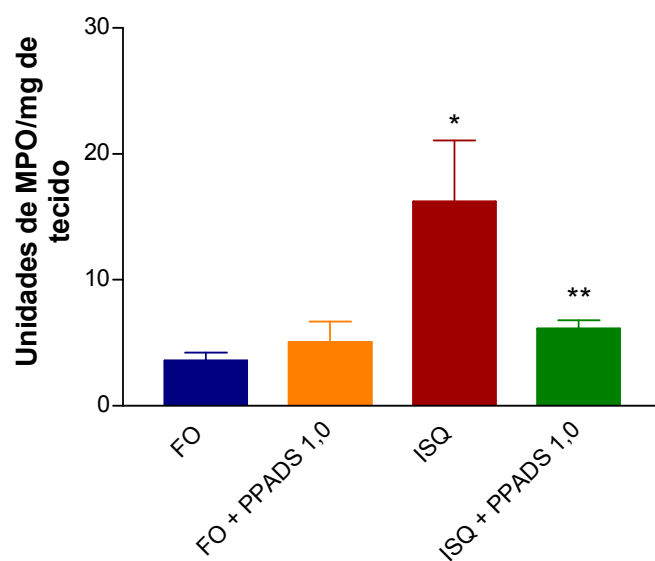
O ensaio para Mieloperoxidase, um marcador do conteúdo de neutrófilos nos tecidos, foi realizado para verificar o papel do PPADS sobre a que resposta inflamatória que exacerba a injúria cerebral promovida pelos processos de isquemia. As figuras 20 e 21 demonstram que a atividade da MPO, dada por unidades de MPO por mg de tecido, aumentou drasticamente no córtex temporal (FO –  $6,16 \pm 1,23$ ; FO + PPADS 1,0 –  $5,3 \pm 0,58$ ; ISQ –  $22,3 \pm 4,98$ ) e estriado (FO –  $3,6 \pm 0,63$ ; FO + PPADS 1,0 –  $5,0 \pm 1,64$ ; ISQ –  $16,24 \pm 4,86$ ) dos animais submetidos à isquemia e que esse aumento foi revertido pelo tratamento com PPADS (ISQ + PPADS 1,0 - córtex temporal:  $6,29 \pm 0,38$ ; estriado:  $6,13 \pm 0,65$ ) indicando uma substancial melhora da inflamação. Já no hipocampo não houve diferença significativa em relação a atividade da MPO entre os grupos (FO –  $3,25 \pm 0,44$ ; FO + PPADS 1,0 –  $4,34 \pm 0,3$ ; ISQ –  $6,56 \pm 1,78$ ; ISQ + PPADS 1,0 –  $5,85 \pm 0,89$ ) (Figura 22).



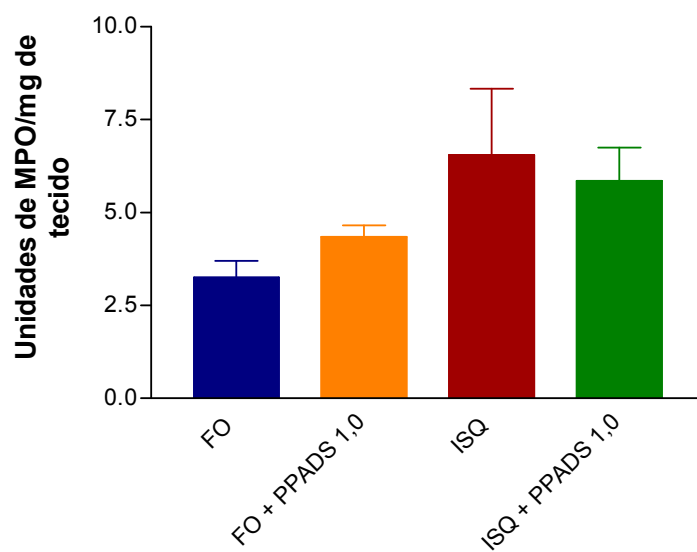
**Figura 20** – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no córtex temporal de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=6).

O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ .  $p < 0,001$ , ANOVA e Teste de Newman-Keuls.





**Figura 21** – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no estriado de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=6). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. \* vs FO; \*\* vs ISQ .  $p < 0,001$ , ANOVA e Teste de Newman-Keuls.



**Figura 22** – Efeito do tratamento com PPADS (1,0 nmols/1 $\mu$ L, i.c.v.) sobre a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) no hipocampo de camundongos submetidos à isquemia por oclusão da artéria cerebral média (n=6). O tratamento foi realizado 10 minutos antes da cirurgia. ANOVA e Teste de Newman-Keuls.

## 6 DISCUSSÃO

O modelo de oclusão da artéria cerebral média é amplamente utilizado para mimetizar a isquemia cerebral focal em humanos. Assim, as conseqüências patológicas desse modelo têm sido extensivamente estudadas. No presente trabalho o dano neuronal isquêmico foi analisado através da avaliação neurológica e da extensão da lesão cerebral pela coloração com TTC.

Este trabalho demonstrou que após 24 horas, a isquemia diminuiu o desempenho motor e a função sensorial dos animais, diminuindo principalmente a capacidade de extensão das patas e de resposta a estímulos do lado contralateral à isquemia. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores utilizando o mesmo modelo de isquemia, nos quais os animais demonstraram déficit neurológico, como distúrbios na atividade motora espontânea e flexão das patas dianteiras através de avaliação neurológica (WAHL *et al.*, 1992). De acordo com esses estudos, o déficit neurológico é máximo 24 horas após a isquemia e não ocorrem mudanças significativas durante os dois dias posteriores (WAHL *et al.*, 1992).

Melani *et al.* (2006), demonstraram uma disfunção das funções sensório-motoras de ratos, 24 horas após oclusão permanente da artéria cerebral média, com uma significativa redução dos escores neurológicos, utilizando a mesma escala neurológica previamente descrita por Garcia *et al.* (1995a). Esses déficits neurológicos podem ser atribuídos a lesões neuronais afetando áreas sensório-motoras. A área motora do animal, o córtex frontal, inclui áreas que correspondem às patas dianteiras e traseiras que são quase sempre danificadas pela isquemia (WAHL *et al.*, 1992). Além disso, danos ao estriado têm sido previamente associados com alterações na habilidade motora e controle sensório-motor (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998).

Na determinação da extensão do dano cerebral, a técnica de coloração com TTC tem ampla utilidade em experimentos com modelos de isquemia e na avaliação do potencial neuroprotetor de drogas para a isquemia cerebral (GOLDLUST *et al.*, 1996). A marcação pelo TTC demonstra as lesões da isquemia que podem ser avaliadas visualmente mesmo sem exame por microscópio. A estabilidade desta técnica permite avaliação do tamanho da lesão com pequena quantidade de preparação de tecido.

A isquemia torna-se progressivamente menos severa, quanto mais distante o core isquêmico, até que o fluxo retorne ao normal em regiões supridas por artérias adjacentes que

não estão ocluídas. Esta região na periferia do território isquêmico é então chamada de penumbra isquêmica. A manutenção relativa da perfusão nessa região é o resultado de fluxo colateral originado de território não-isquêmico adjacente (IADECOLA, 1999). A penumbra isquêmica é uma região eletrofisiologicamente dinâmica e metabolicamente instável, porque, a despeito do declínio crítico da perfusão na zona de penumbra, o nível de metabolismo de glicose tende a ser mantido em níveis normais (ZHAO *et al.*, 1997).

Dentro do core isquêmico, onde o fluxo sanguíneo é mais severamente restrito, a morte celular necrótica e excitotóxica ocorrem dentro de minutos. Na penumbra isquêmica, a morte celular ocorre menos rapidamente, via mecanismos como apoptose e inflamação. (GONZALEZ *et al.*, 2006). No entanto, o aumento dessa região por uma onda de tecido necrótico vindo do core pode ser bloqueado por intervenção farmacológica, com uma janela terapêutica que corresponde as primeiras 2 a 4 horas após a isquemia (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

No presente trabalho, verificou-se um aumento bastante significativo nas percentagens das áreas de infarto nos animais isquemiados, analisados em uma curva de tempo, 1 hora, 24 horas e 4 dias após à cirurgia. As áreas de infarto foram visualizadas principalmente no córtex temporal e estriado, sendo as maiores áreas 24 horas após a isquemia, com um aumento de cerca de 90% em relação aos animais falso-operados. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, os quais demonstram que o infarto chega ao seu tamanho máximo, incluindo core e penumbra, de 6 a 24 horas após o início da isquemia focal permanente (GARCIA *et al.*, 1993) e que a oclusão da artéria cerebral média resulta em redução do fluxo sanguíneo cerebral principalmente em regiões do córtex e estriado, mais especificamente no caudato e putâmen, representando as áreas com maior volume de infarto (HATTORI *et al.*, 2000; TRAYSTMAN, 2003; MELANI *et al.*, 2006).

A administração do PPADS, um antagonista não seletivo do receptor P2, reduziu os déficits neurológicos nos animais isquemiados, assim como diminuiu significativamente a área de infarto.

Após um evento isquêmico cerebral, a liberação de ATP aumenta consideravelmente durante os primeiros minutos e este pode atuar como agente tóxico, causando degeneração e morte celular. A participação direta de receptores P2 estimulada por ATP durante o estresse isquêmico, dá suporte à idéia de que esse nucleotídeo exerce uma função crucial durante a isquemia. Os receptores P2X são canais seletivos a cátions e sua ativação resulta em aumento da concentração intracelular de  $Ca^{++}$  e despolarização da

membrana celular. Esses receptores são responsáveis por mediar a transmissão sináptica rápida, neuromodulação, morte e diferenciação celular (KHAKH, 2001; FRANKE; ILLES, 2006). Já a maioria dos subtipos de receptor P2Y geralmente age via proteínas G para ativar a Fosfolipase C (PLC), levando à formação de IP<sub>3</sub> e mobilização de Ca<sup>++</sup> intracelular e à inibição da adenilato ciclase (TU; WANG, 2009). Desde que esses receptores estão envolvidos com sistemas de segundo mensageiros e/ou condutância iônica mediada por proteína G, o tempo de resposta celular é mais longo que o mediado pelos subtipos P2X.

Já foi demonstrado que antagonistas do receptor P2 como o suramin, diminuem o dano cerebral causado pela oclusão da artéria cerebral média (MELANI *et al.*, 2006; KHARLAMOV; JONES; KIM, 2002). O efeito neuroprotetor do Suramin foi verificado pela melhora do escore neurológico e diminuição do volume do edema cerebral observados após isquemia cerebral focal em ratos. De acordo com esse estudo, o Suramin seria seletivo para os receptores P2X em concentrações específicas, sugerindo que sua ação neuroprotetora está relacionada ao antagonismo dos receptores P2X e inibição da excitotoxicidade purinérgica do Ca<sup>++</sup> (KHARLAMOV; JONES; KIM, 2002).

Visto que o aumento do Ca<sup>++</sup> intracelular é um dos eventos cruciais na morte celular durante a isquemia, pois dentre outras ações, leva à morte celular pela ativação de enzimas hidrolíticas e aumento da liberação de glutamato, é possível que a ativação de receptores P2X esteja envolvida no processo de excitotoxicidade neuronal e que o bloqueio desses receptores seja neuroprotetor (FRANKE; ILLES, 2006).

Vários estudos demonstraram claramente as ações protetoras da inibição do receptor P2 pelo PPADS sobre condições hipóxicas em culturas neuronais (CAVALIERE *et al.*, 2000; RUNDÉN-PRAN *et al.*, 2005). Rundén-Pran *et al.* (2005) mostraram que o PPADS age como protetor contra morte celular induzida por privação de oxigênio e glicose em culturas hipocâmpais, concluindo que esse efeito se deve provavelmente à inibição dos receptores P2X, visto que estes estão expressos abundantemente no hipocampo.

De acordo com Rodrigues *et al.* (2005) o ATP pode modular bifasicamente a liberação de glutamato de terminais nervosos hipocâmpais através de efeitos facilitatórios, mediados por receptores pré-sinápticos P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2/3</sub>, e P2X<sub>3</sub>, e efeitos inibitórios, mediados por receptores pré-sinápticos P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub>, sendo esses efeitos prevenidos pelo PPADS.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que o ATP contribui para o aumento da concentração de glutamato extracelular (JEREMIC *et al.*, 2001), e que esse aumento pode ser

diminuído pelo PPADS também *in vivo* (KRÜGEL *et al.*, 2004), sugerindo que a liberação de glutamato estimulada por ATP pode contribuir para os efeitos deletérios da alta concentração de ATP e que as ações neuroprotetoras do PPADS podem estar relacionadas à inibição de receptores P2X e conseqüentemente a inibição da liberação de glutamato.

No entanto, somente Lämmer *et al.* (2006) estudou o efeito do PPADS sobre os distúrbios na função cerebral causados pela isquemia *in vivo*. Esse estudo demonstrou que o pré-tratamento de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com PPADS antes da oclusão da artéria cerebral média reduziu o déficit motor dos animais analisados 24 e 72 horas após a isquemia através de um teste de Labirinto em T elevado. Este teste foi usado ainda para quantificar déficits cognitivos, mas nenhuma melhora foi observada nos animais pré-tratados com PPADS.

Dessa forma, como a disfunção do sistema nervoso central é uma consistente conseqüência da isquemia/hipóxia em humanos e outros mamíferos (HATTORI *et al.*, 2000) e, sendo o principal objetivo das pesquisas experimentais sobre isquemia, a melhora do resultado funcional da recuperação em humanos, o presente trabalho avaliou além da extensão da lesão neuronal, o efeito do PPADS sobre os déficits sensório-motor e cognitivo dos animais submetidos à isquemia focal, através de testes comportamentais (teste da atividade locomotora) e de memória, que analisam a aquisição e retenção de memória (Esquiva Passiva), assim como a memória operacional (Labirinto em Y).

O início dos estudos comportamentais foi realizado 72 horas após a isquemia, tempo para os animais se recuperarem da cirurgia e do estresse de oclusão da artéria cerebral média após 24 horas. Além disso, o total de escores neurológicos mínimo apresentado foi de 12 pontos, o que significa que nenhum animal teve a capacidade de movimentação ou de resposta a estímulos severamente afetados, permitindo a realização dos testes comportamentais normalmente.

No teste da atividade locomotora, nenhuma alteração foi verificada entre os grupos em relação ao número de *crossings*. No entanto, em relação aos *rearings*, que mede a atividade exploratória vertical, observou-se uma diminuição deste comportamento nos animais isquemiados em relação aos grupos falso-operados e uma reversão desta diminuição pelo tratamento com PPADS.

O dano ao estriado, especificamente ao caudato e putâmen, tem sido associado a déficits na atividade locomotora (KIRIK; ROSENBLAD; BJORKLUND, 1998). A diminuição no número *rearings* pode ocorrer devido a uma leve hemiplegia induzida por um

residual déficit motor, reduzindo a estabilidade do animal sobre as patas traseiras. Outros estudos já haviam demonstrado uma diminuição desse comportamento exploratório em ratos submetidos à isquemia, utilizando, no entanto, um teste de campo aberto modificado (LE PEILLET *et al.*, 1988).

As alterações na função sensório-motora, particularmente atividade locomotora, são fatores confundidores comuns nos testes cognitivos (HATTORI *et al.*, 2000). Assim tanto o teste do Campo Aberto, assim como a Avaliação Neurológica, objetivou principalmente analisar se o animal adquiriu alguma disfunção motora grave como consequência da cirurgia, o que prejudicaria a realização dos testes de memória. Dessa forma, apesar da diminuição da atividade exploratória vertical do animal devido à isquemia, os animais não apresentaram um déficit motor severo, o que não prejudicou a realização dos testes cognitivos.

A memória é a capacidade que o homem e os animais têm de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Difere da aprendizagem, pois esta é apenas o processo de aquisição das informações. Os mecanismos neurais da memória não são completamente conhecidos. Considera-se que as informações transitórias e duradouras são armazenadas em diversas áreas corticais, de acordo com sua função: memórias motoras no córtex motor, memórias visuais no córtex visual, e assim por diante (ROBERTO, 2001). Dessas regiões elas podem ser mobilizadas como memória operacional pelas áreas pré-frontais, em ligação, com áreas do córtex parietal e occipitotemporal. Além disso, as memórias explícitas podem ser consolidadas pelo hipocampo e áreas corticais adjacentes do lobo temporal medial, em conexão com núcleos do tálamo e do hipotálamo (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996; ROBERTO, 2001). Finalmente, o processo de consolidação é fortemente influenciado por sistemas moduladores, especialmente aqueles envolvidos com o processamento emocional, como o complexo amigdalóide do lobo temporal (ROBERTO, 2001).

No teste da esquiva passiva, que lida com a memória emocional envolvida com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada a um evento, o sistema límbico, do qual fazem parte, o hipocampo, amígdala, septo medial, bulbo olfatório e áreas talâmicas anteriores estão envolvidos (BRIONI, 1993; IZQUIERDO *et al.*, 1993b).

Nesse modelo os animais submetidos à isquemia focal apresentaram déficit na aprendizagem e dano na aquisição e retenção da memória. O PPADS foi capaz de melhorar os déficits na aquisição de memória, verificando-se um aumento significativo no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho 15 minutos após o choque (memória recente).

Os resultados dos experimentos do Labirinto em Y (Y-Maze) demonstraram déficit na memória operacional nos animais submetidos à isquemia e que o tratamento com PPADS melhorou de forma dose-dependente os déficits de memória induzidos pela isquemia focal neste modelo.

A alternância espontânea é um comportamento utilizado para avaliar a memória operacional (*working memory*) de animais colocados em um novo ambiente (OADES *et al.*, 1985). A memória operacional é um aspecto da memória de curta duração e significa um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Pesquisas sobre a memória operacional indicam o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral, principalmente córtex occipital, parietal e frontal direitos (SQUIRE; ZOLA-MORGAN, 1996).

As alternâncias espontâneas no Labirinto em Y são consideradas ainda a reflexão de uma forma primitiva de memória de trabalho espacial (MALM *et al.*, 2006), visto que o animal tenta utilizar locais específicos da caixa para se localizar, este tipo de memória pode ser localizada no hipocampo, uma área especialmente vulnerável ao dano isquêmico. O hipocampo é um sítio de ação de influências modulatórias em muitos tipos de memória ou componentes de memória: espacial, verbal e contextual, entre outros (BECHARA *et al.*, 1995; IZQUIERDO; MEDINA, 1995).

No presente trabalho, os animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média apresentaram déficits na memória devidos provavelmente a lesões nas áreas envolvidas com os tipos de memória avaliados. Esses resultados estão de acordo com diversos estudos que confirmam que esse modelo de isquemia cerebral focal está associado a déficits na função cognitiva em ratos e camundongos (WAHL *et al.*, 1992; YONEMORI *et al.*, 1996; HATTORI *et al.*, 2000).

No teste da esQUIVA passiva, estudos demonstram que este modelo prejudica a aquisição (NODA *et al.*, 1995) e retenção de memória (HIRAKAWA *et al.*, 1994; HATTORI *et al.*, 2000), assim como é amplamente reconhecido que a isquemia provoca déficits na memória operacional (WOOD *et al.*, 1993; MUMBY *et al.*, 1996; GULINELLO *et al.*, 2006; PLAMONDON; MORIN; CHARRON, 2006) e na memória espacial (SANDSTROM; ROWAN, 2007).

Os déficits na aquisição de memória e na memória operacional foram significativamente revertidos pelo tratamento com PPADS, sugerindo que a interferência com o sistema excitatório do ATP pode levar à neuroproteção e que o bloqueio dos receptores P2



pode melhorar a lesão neuronal, assim como as alterações comportamentais e de memória causadas pela isquemia.

Pankatrov *et al.* (2002), demonstraram que o ATP pode modular a plasticidade sináptica através de receptores P2X pós-sinápticos situados em neurônios piramidais da área CA1. Esses receptores, que são canais iônicos operados por ligantes, agem contribuindo para o influxo sináptico de  $Ca^{++}$ , com baixos potenciais de membrana, em neurônios nos quais os receptores NMDA não estão ativos, impedindo assim estímulos fracos de induzir LTP (*long-term potentiation*). Em consequência dessa atividade, o antagonismo do receptor P2 pelo PPADS facilita significativamente a LTP induzida por estimulação de alta frequência (PANKATROV *et al.*, 2002).

Visto que a potenciação de longa duração (LTP) pode ser definida como uma forma ou mecanismo de memória importante no hipocampo e amígdala (CLUGNET; LE DOUX, 1990), estruturas envolvidas no processamento dos estágios iniciais da memória (consolidação), e também no córtex, onde se acredita ser o sítio de estocagem da memória (IZQUIERDO, 1989; KELLER; PAVLIDES; ASANUMA, 1990), o PPADS pode ter contribuído para melhora dos déficits de memória também através da facilitação da LTP.

Evidências produzidas ao longo da última década têm demonstrado uma importante função do processo inflamatório na patogênese da isquemia cerebral e muitas formas de neurodegeneração (KOGURE *et al.*, 1996; ALLAN; ROTHWELL, 2001), sendo um importante evento inicial da isquemia, a infiltração de leucócitos e a ativação de células cerebrais residentes incluindo astrócitos, micróglia e células endoteliais (STOLL *et al.*, 1998).

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos que é utilizada como marcador para o conteúdo dessas células nos tecidos. Essa enzima está expressa também na linhagem mielóide, especialmente nos monócitos e macrófagos/micróglia (BRECKWOLDT *et al.*, 2008).

Os neutrófilos se acumulam no cérebro cerca de 30 minutos após a oclusão da artéria cerebral média (HUANG; UPADHYAY; TAMARGO, 2006). O recrutamento dos neutrófilos à região isquêmica se inicia com o rolamento destes sobre a parede endotelial ativada, mediada por selectinas, seguidas por ativação neutrofílica e aderência, mediada por integrinas e imunoglobulinas. Quando aderidos à parede dos vasos sanguíneos cerebrais, os neutrófilos transmigram em direção ao parênquima cerebral, um processo facilitado pela disfunção da barreira hemato-encefálica. Uma vez que os neutrófilos penetrem no cérebro isquêmico, eles causam dano tecidual por liberação de radicais livres de oxigênio e enzimas

proteolíticas (HUANG; UPADHYAY; TAMARGO, 2006). Assim, alguns estudos demonstram que a diminuição da circulação de neutrófilos pode reduzir o volume de infarto e o edema em vários modelos de isquemia cerebral (SHIGA *et al.*, 1991; MATSUO *et al.*, 1994).

As células microgliais são as principais células imunocompetentes intrínsecas do cérebro. As células em repouso, com uma morfologia ramificada, se tornam ativadas sobre quase todas as condições patológicas. Elas mudam para forma amebóide, se tornando células fagocíticas e citotóxicas, que invadem o sítio de injúria e iniciam um processo de reparação (HANISCH, 2002; NIMMERJAHN; KIRCHHOFF; HELMCHEN, 2005). As células microgliais agem como *scavengers* eliminando células/neurônios debrís por fagocitose. No entanto, a produção microglial de citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são potentes neurotoxinas, exacerba a injúria e aumenta a morte neuronal (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006).

Os resultados demonstraram que a atividade da MPO aumentou drasticamente no estriado e córtex temporal dos animais submetidos à oclusão da artéria cerebral média e que esse aumento foi revertido pelo tratamento com PPADS. Visto que o modelo de isquemia focal utilizado resulta em infarto principalmente no córtex, caudato e putâmen (LIPTON, 1999), os presentes resultados sugerem que o efeito neuroprotetor da inibição dos receptores P2 pelo PPADS pode estar relacionado, pelo menos em parte, à diminuição da resposta inflamatória, com diminuição da infiltração de neutrófilos e a ativação microglial.

Contudo, a função diferencial dos subtipos de receptor P2 na fase inicial pós-isquêmica ainda não está muito bem esclarecida. Após a isquemia, os receptores P2X<sub>1, 2, 4, 7</sub> e P2Y<sub>1</sub> estão supra-regulados em neurônios e células da glia em várias regiões cerebrais (TU; WANG, 2009) sugerindo uma contribuição desses subtipos de receptores na patofisiologia da isquemia.

Os receptores P2X<sub>7</sub>, também estão expressos na micróglia e macrófagos. A presença dos receptores P2X<sub>7</sub> sobre as células imunes e as suas propriedades citotóxicas, junto a sua habilidade de regular a produção e liberação de citocinas, sugerem que eles podem regular a resposta inflamatória (LE FEUVRE; BROUGH; ROTHWELL, 2002; VOLONTE *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado que os receptores P2X<sub>7</sub> podem contribuir para a morte celular causada pela isquemia tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CAVALIERE *et al.*, 2004; FRANKE *et al.*, 2004). Uma importante característica desses receptores é a participação na liberação, induzida por ATP, de IL-1 $\beta$  dos macrófagos e micróglia expostas a substâncias como endotoxinas bacterianas (FRANKE; KRÜGEL; ILLES, 2006).

Melani *et al.* (2006) demonstraram que a isquemia aumenta a expressão dos receptores P2X<sub>7</sub> na micróglia e que o *Reactive Blue 2*, antagonista deste receptor, melhora os déficits sensorio-motores e diminui o volume de infarto, sem prevenir o aumento da expressão dos receptores P2X<sub>7</sub> na micróglia na região afetada pelo infarto. Contudo, este agente promove a expressão desses receptores na micróglia do córtex frontal e parietal e estriato no lado contralateral à isquemia. Dessa forma os autores afirmam que a redução do dano isquêmico ocorreu provavelmente devido ao bloqueio da função da micróglia ativada na área de infarto, mas não em regiões contralaterais, provavelmente esta ativação microglial esteja envolvida nos processos de defesa e reparação em áreas de projeção distantes do foco da lesão.

Por outro lado, evidências farmacológicas e eletrofisiológicas sugerem a presença de outros subtipos de receptores P2 na micróglia como, P2X<sub>1</sub> (XIANG; BURNSTOCK, 2005), P2X<sub>4</sub> (CAVALIERE *et al.*, 2003), P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>12</sub> (BOUCSEIN *et al.*, 2003; SASAKI *et al.* 2003b). Foi demonstrado, por exemplo, que a ativação de receptores P2Y regula a dinâmica microglial no cérebro intacto e a liberação de ATP do tecido lesado (DAVALOS *et al.*, 2005).

Dessa forma, sendo o PPADS um antagonista P2 não seletivo e devido à ampla distribuição simultânea de vários diferentes subtipos de receptores P2 em diversos tipos celulares e tecidos, ainda não está claro qual ou quais subtipos de receptores estão envolvidos com seu efeito neuroprotetor. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo, indicam que o bloqueio purinérgico constitui um interessante alvo para intervenção farmacológica objetivando reduzir os danos celulares consequentes à isquemia.

Apesar de o PPADS ter demonstrado, um pronunciado efeito neuroprotetor durante eventos isquêmicos, investigações sobre seu mecanismo de ação e sua especificidade a nível de receptor ainda precisam ser estudados. Além disso, o fato desta substância ser pobremente absorvida no trato gastrointestinal e não ser permeável à barreira hematoencefálica sobre condições normais é um obstáculo ao seu uso terapêutico. Contudo este obstáculo pode ser contornado futuramente, com o uso da nanotecnologia ou modificações na molécula. Deste modo, este ou outros antagonistas mais específicos do ATP podem emergir como futuros alvos terapêuticos na isquemia cerebral.

## 7 CONCLUSÕES

A oclusão permanente da artéria cerebral média produziu lesão neuronal principalmente no estriado e córtex temporal, diminuiu o desempenho motor, a função sensorial, bem como produziu déficits na aquisição de memória. Estes efeitos foram atenuados pelo PPADS, um antagonista inespecífico do receptor P2 das purinas.

Em relação à atividade da Mieloperoxidase, houve um aumento significativo desta enzima no estriado e córtex temporal dos animais submetidos à isquemia, sendo esse aumento revertido pelo tratamento com PPADS.

Os resultados do presente estudo sugerem que a interferência com o sistema excitatório do ATP pode levar à neuroproteção e indicam que o bloqueio dos receptores P2 pode melhorar a lesão neuronal, assim como os déficits motores e de memória causadas pela isquemia e que esses efeitos podem estar relacionados pelo menos em parte à diminuição dos eventos inflamatórios durante a isquemia cerebral.

## REFERÊNCIAS

- ABBASSI, O.; KISHIMOTO, T. K.; MCINTIRE, L. V.; ANDERSON, D. C.; SMITH, C. V. E-selectin supports neutrophil Rolling in vitro under conditions of flow. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2719–2730, 1993.
- ALMEIDA, A.; HEALES, S. J.; BOLAÑOS, J. P.; MEDINA, J. M. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. **Brain Res.**, v. 790, n. 1/2, p. 209-216, 1998.
- AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; CAVALIERE, F.; MURRA, B.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; BURNSTOCK, G.; VOLONTÈ, C. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 489–501, 2002.
- AMADIO, S.; D'AMBROSI, N.; TRINCAVELLI, M. L.; TUSCANO, D.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; MARTINI, C.; VOLONTÈ, C. Differences in the neurotoxicity profile induced by ATP and ATPgammaS in cultured cerebellar granule neurons. **Neurochem. Int.**, v. 47, p. 334–342, 2005.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Heart disease and stroke statistics: 2008 Update.** Dallas, 2008.
- ANDERSON, M. F.; SIMS, N. R. The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. **J. Neurochem.**, v. 81, p. 541 – 549, 2002.
- ANDRABI, S.A.; SPINA, M.G.; LORENZ, P.; EBMEYER, U.; WOLF, G.; HORN, T.F.W. Oxyresveratrol (trans-2,3',4,5'-tetrahydroxystilbene) is neuroprotective and inhibits the apoptotic cell death in transient cerebral ischemia. **Brain Res.**, v. 1017, p. 98–107, 2004.
- ARAQUE, A.; CARMIGNOTO, G.; HAYDON, P. G. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 63, p. 795–813, 2001.
- ASHE, P. C.; BERRY, M. D. Apoptotic signaling cascades. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 199-214, 2003.
- BAN, J. Y.; CHO, S. O.; CHOI, S. H.; JU, H. S.; KIM, J. Y.; BAE, K. H.; SONG, K. S.; SEONG, Y. H. Neuroprotective Effect of *Smilacis chiniae* Rhizome on NMDA-Induced Neurotoxicity In Vitro and Focal Cerebral Ischemia In Vivo. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 106, p. 68 – 77, 2008.
- BARONE, F. C.; SCHMIDT, D. B.; HILLEGASS, L. M. Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. **Stroke**, v. 23 p. 1337–1348, 1992.
- BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 9, p. 819–834, 1999.
- BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A.

Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BEZZI, P.; GUNDERSEN, V.; GALBETE, J. L.; SEIFERT, G.; STEINHAUSER, C.; PILATI, E.; VOLTERRA, A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. **Nat. Neurosci.**, v. 7, p. 613-620, 2004.

BIELENBERG, G. W.; BURNIOL, M.; ROSEN, R.; KLAUS, W. Effects of nimodipine on infarct size and cerebral acidosis after middle cerebral artery occlusion in the rat. **Stroke**, v. 21, p. 90-92, 1990.

BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J. Physiol.**, v. 232, n. 2, p. 331-56, June 1973.

BLOMGREN, K.; HALLIN, U.; PUKA-SUNDEVALL, M.; HAGBERG, H. Caspase-calpain interaction and calpastatin as a stress protein in neonatal rat hypoxia-ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 19, p. 49, 1999.

BOUCSEIN, C.; ZACHARIAS, R.; FÄRBER, K.; PAVLOVIC, S.; HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, p. 2267-2276, 2003.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982

BRALET, J.; BELEY, P.; JEMAA, R.; BRALET, A. M.; BELEY, A. Lipid metabolism, cerebral metabolic rate, and some related enzyme activities after brain infection in rat. **Stroke**, v. 18, p. 418-425, 1987.

BRAUN, J. S.; JANDER, S.; SCHROETER, M.; WITTE, O. W.; STOLL, G. Spatiotemporal relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. **Acta. Neuropathol.**, v. 92, p. 255-263, 1996.

BRAY, T.M.; TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and oxidative stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 746-751, 1993.

BREDESEN, D. E. Keeping neurons alive: the molecular control of apoptosis. **Neuroscientist**, v. 2, p. 211-216, 1996.

BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 28, p. 3-27, 1993.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.

BROOKES, P. S.; LAND, J. M.; CLARK, J. B.; HEALES, S. J. Peroxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. **J. Neurochem.**, v. 70, p. 2195-2202, 1998.

- BURNSTOCK, G. Cotransmission. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, p. 47–52, 2004.
- CAMPBELL, C. A.; MACKAY, K. B.; PATEL, S. Effects of isradipine and L-type calcium channel blocker on permanent and transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. **Exp. Neurol.**, v. 148 p. 45–50, 1997.
- CAPLAN, L.; BABIKIAN, V.; HELGASON, C.; HIER, D.B.; DEWITT, D.; PATEL, D.; STEIN, R. Occlusive disease of the middle cerebral artery. **Neurology**, v. 35, p. 975–982, 1985.
- CAPLAN, L. R.; SCHMAHMANN, J. D.; KASE, C. S.; FELDMANN, E.; BAQUIS, G.; GREENBERG, J. P.; GORELICK, P. B.; HELGASON, C.; HIER, D. B. Caudate infarcts. **Arch Neurol.**, v. 47, p. 133–143, 1990.
- CAVALIERE, F.; D'AMBROSI, N.; CIOTTI, M. T.; MANCINO, G.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; VOLONTÉ, C. Glucose deprivation and chemical hypoxia: neuroprotection by P2 receptor antagonists. **Neurochem. Int.**, v. 38, n. 3, p. 189–197, 2000.
- CAVALIERE, F.; FLORENZANO, F.; AMADIO, S.; FUSCO, F. R.; VISCOMI, M. T.; D'AMBROSI, N.; VACCA, F.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; MOLINARI, M.; VOLONTÉ, C. Up-regulation of P2X2, P2X4 receptor and ischemic cell death: prevention by P2 antagonists. **Neuroscience**, v. 120, p. 85–98, 2003.
- CAVALIERE, F.; AMADIO, S.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G.; VOLONTÉ, C. Synaptic P2X7 and oxygen/glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 24, p. 392–398, 2004.
- CAVALIERE, F.; DINKEL, K.; REYMANN, K. Microglia response and P2 receptor participation in oxygen/glucose deprivation-induced cortical damage. **Neuroscience**, v. 136, p. 615–623, 2005.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Division for Heart Disease and Stroke Prevention. **The Paul Coverdell National Acute Stroke Registry**. 2008. Disponível em: <[http://www.cdc.gov/dhdsp/stroke\\_registry.htm](http://www.cdc.gov/dhdsp/stroke_registry.htm)> Acesso em: 25 Mar. 2009.
- CHAN, P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. **Stroke**, v. 27, p. 1124–1129, 1996.
- CHAPMAN, P. F.; KAIRISS, E. W.; KEENAN, C. L.; BROWN, T. H. Long-term synaptic potentiation in the amygdala. **Synapse**, v. 6, n. 3, p. 271–278, 1990.
- CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; MARGAILL, I.; REPRESA, A.; POPOVICI, T.; PLOTKINE, M.; BEN-ARI, Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 16, p. 186–194, 1996.
- CHOI, D. Antagonizing excitotoxicity: a therapeutic strategy for stroke? **Mt. Sinai J. Med.**, v. 65, p. 133–138, 1998.
- CHONGA, Z. Z.; LIA, F.; MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 75 n. 3, p. 207–246, Feb. 2005.

- CLARK, S.F. The biochemistry of antioxidants revisited. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 17, p. 5-17, 2002.
- CLUGNET, M. C.; LEDOUX, J. E. Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 2818-2824, 1990.
- COLLI B. O.; NUNES M.; CARLOTTI C. G. JR. Ischemia cerebral experimental. In: \_\_\_\_\_. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Probel Editora, 1998. p. 643-662.
- CRAMER, S. C.; MOORE, C. I.; FINKLESTEIN, S. P.; ROSEN, B. R. A pilot study of somatotopic mapping after cortical infarct. **Stroke**, v. 31, p. 668-671, 2000.
- CUNHA, R. A.; RIBEIRO, J. A. ATP as a presynaptic modulator. **Life Sci.**, v. 68, p. 119 – 137, 2000.
- DANTON, G.H.; DIETRICH, W.D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 62, p. 127–136, 2003.
- 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. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 752–758, 2005.
- DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; SNYDER, S. H. Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 738, p. 76–85, 1994.
- DE BONO, D. P. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. **QJM**, v. 87, n. 8, p. 445-453, 1994.
- DEL ZOPPO, G.; GINIS, I.; HALLENBECK, J. M.; IADECOLA, C.; WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. **Brain Pathol.**, v. 10, p. 95–112, 2000.
- DE NOBLE, V. J.; REPETTI, S. J.; GELPKE, L. W.; WOOD, L. M.; KEIM, K. L.; Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharm. Biochem. Behav.**, v. 24, p.1123-1128, 1986.
- DEUCHARS, S. A.; ATKINSON, L.; BROOKE, R. E.; MUSA, H.; MILLIGAN, C. J.; BATTEN, T. F.; BUCKLEY, N. J.; PARSON, S. H.; DEUCHARS, J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 7143–7152, 2001.
- DÍAZ-HERNÁNDEZ, M.; GÓMEZ-VILLAFUERTES, R.; HERNANDO, F.; PINTOR, J.; MIRAS-PORTUGAL, M. T. Presence of different ATP receptors on rat midbrain single synaptic terminals. Involvement of the P2X3 subunits. **Neurosci. Lett.**, v. 301, p. 159 –162, 2001.
- DIRNAGL, U.; ISADECOLA, C.; MOSKOWITZ M. A. Pathobiology of ischaemic stroke:



an integrated view. **Trends Neurosci.**, v. 22, p. 391–397, 1999.

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

DYKENS, J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$ : implications for neurodegeneration. **J. Neurochem.**, v. 63, p. 584– 591, 1994.

DRIAN, M. J.; KAMENKA, J. M.; PRIVAT, A. In vitro neuroprotection against glutamate toxicity provided by novel non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists. **J. Neurosci. Res.**, v. 57, p. 927–934, 1999.

EDVINSSON, L.; KRAUSE, D.N. **Cerebral Blood Flow and Metabolism**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2002.

EDWARDS, F. A. Features of P2X receptor-mediated synapses in the rat brain: why doesn't ATP kill the postsynaptic cell? **Ciba Found Symp.**, v. 198, p. 278–286, 1996.

EPPIHIMER, M. J.; WOLITZKY, B.; ANDERSON, D. C.; LABOW, M. A.; GRANGER, D. N. Heterogeneity of expression of E and P-selectins in vivo. **Circ. Res.**, v. 79, p. 560–569, 1996.

ESCOTT, K. J.; BEECH, J. S.; HAGA, K. K.; WILLIAMS, S. C. R.; MELDRUM, B. S.; BATH, P. M. W. Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors, 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole and 7-nitro indazole after transient focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 18, p. 281–287, 1998.

ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M.; FEELISCH, M.; FUKUTO, J.; GRISHAM, M. B.; VITEK, M. P.; WINK, D. A. Mechanism of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 899, p. 209-221, 2000.

EVANS, P.; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Br. J. Nutr.**, v. 85, n. 2, p. S67-74, 2001.

FALCÃO, I. V.; CARVALHO, E. M. F.; BARRETO, K. M. L.; LESSA, F. J. D.; LEITE, V. M. M. Acidente vascular cerebral precoce: implicações para adultos em idade produtiva atendidos pelo Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 4, p. 95-101, 2004.

FAN, L. W.; LIN, S.; PANG, Y.; LEI, M.; ZHANG, F.; RHODES, P. G.; CAI, Z. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal rat. **Behav. Brain Res.**, v. 165, p. 80–90, 2005.

FERRARI, D.; VILLALBA, M.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; DI VIRGILIO, F. Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1531–1539, 1996.

FERRARI, D.; CHIOZZI, P.; FALZONI, S.; HANAU, S.; DI VIRGILIO, F. Purinergic modulation of interleukin-1 $\beta$  release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 579–582, 1997.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M.; PANTHER, E.; DI VIRGILIO, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J. Immunol.**, v. 176, n. 7, p. 3877-3883, Apr. 2006.

FERRO, J. M.; VERDELHO, A. Epidemiologia, factores de risco e prevenção primária do AVC. **Pathos**, p. 7-15, jul./ago. 2000.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron–glia communication. **Science**, v. 298, p. 556–562, 2002.

FIELDS, D.; BURNSTOCK G. Purinergic signalling in neuron–glia interactions. **Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 423-436, June 2006.

FISHER, M.; SCHAEBITZ, W. An overview of acute stroke therapy. Past, Present and Future. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, p. 3196-3206, 2000.

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptor-mediated proliferative effects on astrocytes in vivo. **Glia**, v. 28, p.190–200, 1999.

FRANKE, H.; KRÜGEL, U.; ILLES, P. P2 receptors and neuronal injury. **Eur. J. Physiol.**, v. 452, p. 622–644, 2006.

FRANKE, H.; ILLES, P. Involvement of P2 receptors in the growth and survival of neurons in the CNS. **Pharmacol. Ther.**, v. 109, p. 297–324, 2006.

FRANKE, H. *et al.* Involvement of P2X and P2Y receptors in microglial activation in vivo. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 435 – 445, 2007.

FRANKLIN, K. B.; PAXINOS, G. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Calif. Academic Press Inc., 1997.

GARCIA, J. H.; YOSHIDA, Y.; CHEN, H.; LI, Y.; ZHANG, Z. G.; CHOPP, M. Progression from ischemic injury to infarct following middle cerebral artery occlusion in the rat. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 623–635, 1993.

GARCIA, J. H. Experimental ischemic stroke: A review. **Stroke**, v. 15, p. 5-14, 1994a.

GARCIA, J. H.; LIU, K. F.; YOSHIDA, Y.; LIAN, J.; CHEN, S.; DEL ZOPPO, G. J. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar Rat). **Am. J. Pathol.**, v. 144, p. 188–199, 1994b.

GARCIA, J. H.; WAGNER, S.; LIU, K. F.; HU, X. J. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. **Stroke**, v. 26, p. 627-635, 1995a.

GARCIA, J. H.; LIU, K. F.; HO, K. L. Neuronal Necrosis After Middle Cerebral Artery Occlusion in Wistar Rats Progresses at Different Time Intervals in the Caudoputamen and the Cortex. **Stroke**, v. 26, p. 636 – 643, 1995b.

GERSZTEN, R. E.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; LIM, Y. C.; YOSHIDA, M.; DING, H. A.; GIMBRONE, M. A. J.; LUSTER, A. D.; LUSCINSKAS, F. W.; ROSENZWEIG, A. MCP-1

and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, p. 718–723, 1999.

GIDO, G.; KRISTIAN, T.; SIESJO, B. K. Extracellular potassium in a neocortical core area after transient focal ischemia. **Stroke**, v. 28, p. 206–210, 1997.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, n.2, p. 271-84, June, 2002.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection in brain ischemia: an update - Parts I and II. **Neuroscientist**, v. 1, p. 95-175, 1995.

GINSBERG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55 p. 363-389, 2008.

GOLDLUST, E. J.; PACZYNSKI, R. P.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; GOLDBERG, M. P. Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. **Stroke**, v. 27, n. 9, p. 1657-1662, 1996.

GONZALEZ, R. G.; HIRSCH, J. A.; KOROSHETZ, W. J.; LEV, M. J.; SCHAEFER, P. **Acute Ischemic Stroke: Imaging and Intervention**. Berlin: Springer, 2006.

GRAHAM, S.; CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, p. 99-109, 2001.

GUAN, Q. H.; PEI, D. S.; LIU, X. M.; WANG, X. T.; XU, T. L.; ZHANG, G. Y. Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. **Brain Res.**, v. 1092, n. 1, p. 36- 46, 2006a.

GUAN, Q. H.; PEI, D. S.; ZONG, Y. Y.; XU, T. L.; ZHANG, G. Y. Neuroprotection against ischemic brain injury by a small peptide inhibitor of c-Jun N terminal kinase (JNK) via nuclear and non-nuclear pathways. **Neuroscience**, v. 139, n. 2, p. 609-627, 2006b.

GÜNTHER, A.; KÜPPERS-TIEDT, L.; SCHNEIDER, P. M.; KUNERT, I.; BERROUSCHOT, J.; SCHNEIDER, D.; ROSSNER, S. Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. **Eur. J. Neurosci.**, v. 21, p. 3189–3194, 2005.

GUTTERIDGE, J.M.C.; HALIWELL, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **TIBS**, v. 15, p. 129-135, 1990.

HALLIWELL, B. **Antioxidantes: Conocimientos actuales sobre nutrición**. 7th ed. Washington: OMS, 1997.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, p. 140–155, 2002.

HARA, H.; FINK, K.; ENDRES, M.; FRIEDLANDER, R. M. ; GAGLIARDINI, V. ; YUAN, J. ; MOSKOWITZ, M. A. Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 17, p.

370-375, 1997.

HEITOR, H. P.; SARNI, R. S. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

HIDE, I.; TANAKA, M.; INOUE, A.; NAKAJIMA, K.; KOHSAKA, S.; INOUE, K.; NAKATA, Y. Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor alpha release from rat microglia. **J. Neurochem.**, v. 75, p. 965-972, 2000.

HOSSMANN, K.A. Animal models of cerebral ischemia. Review of literature. **Cerebrovasc. Dis.**, v. 1, p. 2-15, 1991.

HOSSMANN, K. A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. **Ann. Neurol.**, v. 36, p. 557-565, 1994.

HSU, C.Y. **Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development**. St. Louis: Karger, 1998. (Monogr. Clin. Neurosci.).

HU, W.H.; JOHSON, H.; SHU, H.B.; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kB and JNK Activation and apoptosis through distinct pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30603-30610, 1999.

HUANG, J.; UPADHYAY, U. M.; TAMARGO, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surg. Neurol.**, v. 66, p. 232-245, 2006.

IADECOLA, C.; ALEXANDER, M. Cerebral ischemia and inflammation. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 14, p. 89-94, 2001.

ILLES P.; RIBEIRO, J. A. Molecular physiology of P2 receptors in the central nervous system. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 483, p. 5-17, 2004.

INOUE, K.; NAKAJIMA, K.; MORIMOTO, T.; KIKUCHI, Y.; KOIZUMI, S.; ILLES, P.; KOHSAKA, S. ATP stimulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent plasminogen release from cultured microglia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 1304-1310, 1998.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav. Neur. Biol.**, v. 51, p. 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I.; Da CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav. Neural Biol.**, v. 58, p. 16-26, 1992.

IZQUIERDO, I.; BIANCHIN, M.; BUENO E SILVA, M.; ZANNATA, M. S.; WALZ, R.; Da SILVA, R. C.; RUSCHEL, A.; PACZKO, N.; MEDINA, J. H. CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. **Behav. Neural Biol.**, v. 59, p. 1-4, 1993a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; BIANCHIN, M.; WALZ, R.; ZANATTA, M. S.; Da SILVA, R. C.; BUENO E SILVA, M.; RUSCHEL, A. C.; PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems. **Behav. Brain**

**Res.**, v. 58, p. 91-98, 1993b.

IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 30, p. 1-17, 1993bc.

JACEWICZ, M.; BRINT, S.; TANABE, J.; PULSINELLI, W. A. Continuous nimodipine treatment attenuates cortical infarction in rats subjected to 24 hours of focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 10 p. 89–96, 1990.

JAMES, G.; BUTT, A. M. P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 447, p. 247–260, 2002.

JEREMIC, A.; JEFTINIJA, K.; STEVANOVIC, J.; GLAVASKI, A.; JEFTINIJA, S. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. **J. Neurochem.**, v. 77, p. 664–675, 2001.

JOSHI, M. S.; FERGUSON, T. B.; HAN JR., T. H.; HYDUKE, D. R.; LIAO, J. C.; RASSAF, T.; BRYAN, N.; FEELISCH, M.; LANCASTER JR., J. R. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 10341-10346, 2002.

JOSHIA, C. N.; JAINB, S. K.; MURTHY, P. S. R. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. **Brain Res. Protocols**, v. 13, p. 11–17, 2004.

KABRA, D. G.; THIYAGARAJAN, M.; KAUL, C. L.; SHARMA, S. S. Neuroprotective effect of 4-amino-1, 8-naphthalimide, a poly (ADP ribose) polymerase inhibitor in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rat. **Brain Res. Bull.** v. 62, p. 425–433, 2004.

KAPADIA, R.; TUREYEN, K.; BOWEN, K. K.; KALLURI, H.; JOHNSON, P. F.; VEMUGANTI, R. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. **J. Neurochem.**, v. 98, p. 1718–1731, 2006.

KAPOSZTA, Z.; YOUNG, E.; BATH, P. M. W.; MARKUS, H. S. Clinical application of asymptomatic embolic signal detection in acute stroke : a prospective study. **Stroke**, v. 30, p.1814–1818, Sept. 1999.

KELLER, A.; PAVLIDES, C.; ASANUMA, H. Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex. **Neuroreport**, v. 1, p. 49-52, 1990.

KENNEDY, C. The discovery and development of P2 receptor subtypes, **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 81, p. 158–163, 2000.

KHARLAMOV, A.; JONES, S. C.; KIM, D. K. Suramin reduces infarct volume in a model of focal cerebral ischemia. **Exp. Brain Res.**, v. 147, n. 3, p. 353–359, 2002.

KIM, D. S.; KWAK, S. E.; KIM, J. E.; WON, M. H.; KANG, T. C. The co-treatments of vigabatrin and P2X receptor antagonists protect ischemic neuronal cell death in the gerbil hippocampus. **Brain Res.**, v. 1120, p. 151–160, 2006.

KIM, H. Y.; VAUGHAN, D. K.; GHOSH, S. Pathways of cerebral calcium accumulation in a model of focal ischemia in rats. **Neurol. Res.**, v. 20, p. 169–177, 1998.

KIM, J. S.; GAUTAM, S. C.; CHOPP, M.; ZALOGA, C.; JONES, M. L.; WARD, P. A.; WELCH, K. M. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. **J. Neuroimmunol.**, v. 56, p. 127–134, 1995.

KIM, M. W.; BANG, M. S. HAN, T R.; KO, Y. J.; YOON, B. W.; KIM, J. H.; KANG, L. M.; LEE, K. M.; KIM, M. H. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. **Brain Res.**, v. 1052, p. 16 – 21, 2005.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp. Neurol.**, v.277, p. 152-259, 1998.

KONDO, T.; REAUME, G. A.; HUANG, T. T. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 4180–4189, 1997

KRAUSE, G. S.; KUMAR, K.; WHITE, B. C.; AUST, S. D.; WIEGENSTEIN, J. G. Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanism of tissue injury and prospects for protection. **Am. Heart J.**, v. 111, p. 178-180, 1986.

KRÜGEL, U.; SPIES, O.; REGENTHAL, R.; ILLES, P.; KITTNER, H. P2 receptors are involved in the mediation of motivation-related behaviour. **Purinergic Signalling**, v. 1, p. 21–29, 2004.

LAMBRECHT, G. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications, **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 362, p. 340–350, 2000.

LÄMMER, A.; GÜNTHER, A.; BECK, A.; KRÜGEL, U.; KITTNER, H.; SCHNEIDER, D.; ILLES, P.; FRANKE, H. Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. **Eur. J. Neurosci.**, v. 23, p. 2824–2828, 2006.

LAZAROWSKI, E. R.; BOUCHER, R. C.; HARDEN, T. K. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X and P2Y-receptor activating molecules. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, p. 785–795, 2003.

LE FEUVRE, R.; BROUGH, D.; ROTHWELL, N. Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration. **Eur. J. Pharmacol.** v. 447, n.2-3, 261— 269, jul., 2002.

LE PEILLET, E. ; LEKIEFFRE, D. ; ALLIX, M. ; PLOTKINE, M. ; BOULU, R. G. Modified open-field test to study the protective activity of drugs in cerebral ischemia in rats ("4 vessel model"). In: KRIEGLSTEIN, J. (Ed.). **Pharmacology of Cerebral Ischemia**. Amsterdam: Elsevier Science, 1988. p. 369-373.

LESORT, M.; ESCLAIRE, F.; YARDIN, C.; HUGON, J. NMDA induces apoptosis and necrosis in neuronal cultures. Increased APP immunoreactivity is linked to apoptotic cells.

**Neurosci. Lett.**, v. 221, p. 213–216, 1997.

LI, C. Y. Novel Mechanism of Inhibition by the P2 Receptor Antagonist PPADS of ATP-Activated Current in Dorsal Root Ganglion Neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 83, p. 2533-2541, 2000.

LI, Y.; CHOPP, M.; JIANG, N.; YAO, F.; ZALOGA, C. Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 15, p. 389–397, 1995.

LIEPERT, J.; BAUDER, H.; MILTNER, W. H. R.; TAUB, E.; WEILLER, C. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. **Stroke**, v. 31 p. 1210-1216, 2000.

LIÈVRE, V.; BECUWE, P.; BIANCHI, A. Intracellular generation of the free radicals and modifications of detoxifying enzy in cultured neurons from the developing rat forebrain in response to transient hypoxia. **Neuroscience**, v. 105, p. 287-97, 2001.

LIN, Y. *et al.* P2 receptor antagonist PPADS confers neuroprotection against glutamate/NMDA toxicity. **Neurosci. Lett.**, v. 377, p. 97–100, 2005.

LINNIK, M. D.; MILLER, A. J.; SPRINKLE-CAVALLO, J. Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. **Mol. Brain Res.**, v. 32 p. 116–124, 1995.

LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 1431-1568, 1999.

LIU, T.; CLARK, R. K.; MCDONNELL, P. C.; YOUNG, P. R.; WHITE, R. F.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. **Stroke**, v. 25 p. 1481–1488, 1994.

LIU, B.; LIAO, M.; MIELKE, J. G.; NING, K.; CHEN, Y.; LI, L.; EL-HAYEK, Y. H.; GOMEZ, E.; ZUKIN, R. S.; FEHLINGS, M. G.; WAN, Q. Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. **J. Neurosci.**, v. 26, n. 20, p. 5309-5319, 2006.

LOVE, S.; BARBER, R.; SRINIVASAN, A.; WILCOCK, G.K. Activation of caspase-3 in permanent and transient brain ischaemia in man. **Neuroreport**, v. 11, n. 11, p. 2495-2499, 2000.

LOVE, S. Apoptosis and brain ischemia. **Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 27, p. 267-282, 2003.

LU, A.; ARONOW, B. J.; SHARP, F. R. Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 23, p. 786–810, 2003.

LUCAS, J. A. **Encyclopedia of the Human Brain: Memory Overview**. New York: Elsevier Science, 2002.

LUKIC-PANIN, V.; KAMIYA, T.; ZHANG, H. Z.; HAYASHI, T.; TSUCHIYA, A.; SEHARA, Y.; DEGUCHI, K.; YAMASHITA, T.; ABE, K. Prevention of neuronal damage by calcium channel blockers with antioxidative effects after transient focal ischemia in rats.

**Brain Res.**, v. 1176, p. 143-150, 2007.

MADDEN, K.; CLARCK, W.; LESSOV, N. Failure of ischaemic neuroprotection by potentiators of gamma-aminobutyric acid. **Clin. Med. Resea.**, v. 1, p.119-124, 2003.

MAJUMDER, P.; TRUJILLO, C. A.; LOPES, C. G.; RESENDE, R. R.; GOMES, K. N.; YUAHASI, K. K.; BRITTO, L. R.; ULRICH, H. New insights into purinergic receptor signaling in neuronal differentiation, neuroprotection, and brain disorders. **Purinergic Signalling**, v. 3, p. 317–331, 2007.

MARKS, L.; CARSWELL, H. V.; PETERS, E. E.; GRAHAM, D. I.; PATTERSON, J.; DOMINICZAK, A. F.; MACRAE, I. M. Characterization of the Microglial Response to Cerebral Ischemia in the Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rat. **Hypertension**, v. 38, p. 116-122, 2001.

MARTIN, R. L.; LLOYD H. G.; COWAN, A. I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 251–257, 1994.

MASSARO, A. R. Triagem do AVC isquêmico agudo. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 7, jan./abr. 2006.

MATCHETT, G. A.; CALINISAN, J. B.; MATCHETT, G. C.; MARTIN, R. D.; ZHANG, J. H. The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. **Brain Res.**, v. 1136, p. 200–207, 2007.

MATSUO, Y.; ONODERA, H.; SHIGA, Y.; NAKAMURA, M.; NINOMIYA, M.; KIHARA, T.; KOGURE, K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. **Stroke**, v. 25, p. 1469–1475, 1994.

MATTSON, M. P.; CULMSEE, C.; YU, Z. F. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. **Cell Tissue Res.**, v. 301, p. 173-187, 2000.

MELANI, A.; TURCHI, D.; VANNUCCHI, M. G.; CIPRIANI, S.; GIANFRIDDO, M.; PEDATA, F. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. **Neurochem. Int.** v. 47, p. 442–448, 2005.

MELANI, A.; AMADIO, S.; GIANFRIDDO, M.; VANNUCCHI, M. G.; VOLONTÈ, C.; BERNARDI, G.; PEDATA, F.; SANCESARIO, G. P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. **J. Cereb. Blood Flow Metabol.**, v. 26, p. 974–982, 2006.

MONJE, M.L.; TODA, H.; PALMER, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. **Science**, v. 302, p. 1760–1765, 2003.

MUMBY, D. G.; WOOD, E. R.; DUVA, C. A.; KORNECOOK, T. J.; PINEL, J. P.; PHILLIPS, A. G. Ischemia-induced object recognition deficits in rats are attenuated by hippocampal ablation before or soon after ischemia. **Behav Neurosci.**, v. 110, p. 266–281,



1996.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 247, p. 1449-1456, 1995.

NAKAMURA, M.; NAKAKIMURA, K.; MATSUMOTO, M.; SAKABE, T. Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 22, p. 161-170, 2002.

NAMURA, S.; ZHU, J.; FINK, K.; ENDRES, M.; SRINIVASAN, A.; TOMASELLI, K. J. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. **J. Neurosci.**, v. 18, p. 3659-3668, 1998.

NEDERGAARD, M.; RANSOM, B.; GOLDMAN, S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 523-530, 2003.

NEWMAN, E. A. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 536-542, 2003.

NICOLESCU, A. C.; ZAVORIN, S. I.; TURRO, N. J.; REYNOLDS, J. N.; THATCHER, G. R. Inhibition of lipid peroxidation in synaptoso and liposo by nitrates and nitrites. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, p. 985-998, 2002.

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

NIZIOLEK, M.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A. W. Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 34, p. 997-1005, 2003.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol. Rev**, v. 82, p. 1013-1067, 2002.

NUTALL, S. L.; MARTIN, U.; SINCLAIR, A. J.; KENDALL, M. J. Glutathione in sickness and in health. **Lancet**, v. 351, n. 9103, p. 645-646, 1998.

OADES, R.; TAGHZOUTI, K.; SIMON, H.; LE MOAL, M. Dopaminesensitive alternation and collateral behavior in a Y-maze: Effects of d-amphetamine and haloperidol. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 123-128, 1985.

OHTANI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. Expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and production of nitric oxide are induced by adenosine triphosphate in cultured rat microglia. **Neurosci Lett.**, v. 293, p. 72-74, 2000.

PANENKA, W.; JIJON, H.; HERX, L. M.; ARMSTRONG, J. N.; FEIGHAN, D.; WEI, T.; YONG, V. W.; RANSOHOFF, R. M.; MACVICAR, B. A. P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. **J Neurosci.**, v. 21, p. 7135-7142, 2001.

PANKRATO, Y. V.; LALO, U. V.; KRISHTAL, O. A. Role for P2X Receptors in Long-Term Potentiation. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 19, p. 8363-8369, Oct. 2002.

PENBERTHY, T. W.; JIANG, Y.; LUSCINSKAS, F. W.; GRAVES, D. T. MCP-1-stimulated monocytes preferentially utilize beta 2-integrins to migrate on laminin and fibronectin. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. C60–68, 1995.

PENG, P. *et al.* ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia. **Neuron**, v. 49, n. 5, p. 719-733, 2006.

PLAMONDON, H.; MORIN, A.; CHARRON, C.; Chronic 17-beta-estradiol pretreatment and ischemia-induced hippocampal degeneration and memory impairments: A 6-month survival study. **Horm. Behav.**, v. 30, p. 30, 2006.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, p. 413–492, 1998.

RATHBONE, M. P.; MIDDLEMISS, P. J.; GYSBERS, J. W.; ANDREW, C.; HERMAN, M. A.; REED, J. K.; CICCARELLI, R.; DI IORIO, P.; CACIAGLI, F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. **Prog. Neurobiol.**, v. 59, p. 663–690, 1998.

ROBSON, S. C. *et al.* Loss of ATP diphosphohydrolase activity with endothelial cell activation. **J Exp Med.** v. 185, p. 153–163, 1997.

RODRIGUES, R. J.; ALMEIDA, T.; RICHARDSON, P. J.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Dual Presynaptic Control by ATP of Glutamate Release via Facilitatory P2X1, P2X2/3, and P2X3 and Inhibitory P2Y1, P2Y2, and/or P2Y4 Receptors in the Rat Hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 25, n. 27, p. 6286–6295, July 2005.

ROTTA, N. T.; SILVA, A. R.; SILVA, F. L. F.; OHLWEILER, L.; BELARMINO JR., E; FONTELES, V. R.; RANZAN, J.; RODRIGUEZ, O. J. R.; MARTINS, R. O. Cerebrovascular disease in pediatric patients. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 60, n. 4, p. 959-963, 2002.

ROWLAND, L. P.; MERRI, T. T. **Tratado de neurologia.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J. Biol. Chem.**, v. 269, 1994.

RUNDÉN-PRAN, E.; TANSØ, R.; HAUG, F. M.; OTTERSEN, O. P.; RING, A. Neuroprotective effects of inhibiting N-methyl-D-aspartate receptors, P2X receptors and the mitogen-activated protein kinase cascade: a quantitative analysis in organotypical hippocampal slice cultures subjected to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience**, v. 136, p. 795–810, 2005.

RYU, J. K.; KIM, J.; CHOI, S. H.; OH, Y. J.; LEE, Y. B.; KIM, S. U.; JIN, B. K. ATP-induced in vivo neurotoxicity in the rat striatum via P2 receptors. **Neuro Report.**, v. 13, n. 13, p. 1611 – 1615, 2002.

SANDSTROM, J.; ROWAN, J. M. Acute pretreatment with estradiol protects against CA1

cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. **Horm. Behav.**, v. 51, n. 3, p. 335–345, Mar. 2007.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 4, p. 491-495, 1988.

SASAKI, T.; KITAGAWA, K.; SUGIURA, S.; OMURA-MATSUOKA, E.; TANAKA, S.; YAGITA, Y.; OKANO, H.; MATSUMOTO, M.; HORI, M. Implication of cyclooxygenase-2 on enhanced proliferation of neural progenitor cells in the adult mouse hippocampus after ischemia. **J. Neurosci. Res.**, v. 72, p. 461–471, 2003a.

SASAKI, Y.; HOSHI, M.; AKAZAWA, C.; NAKAMURA, Y.; TSUZUKI, H.; INOUE, K.; KOHSAKA, S. Selective expression of Gi/o-coupled ATP receptor P2Y12 in microglia in rat brain. **Glia**, v. 44, p. 242–250, 2003b.

SCHAFFER, R.; REISER, G. Characterization of [35S]-ATP<sub>S</sub> and [3H] MeATP binding sites in rat brain cortical synaptosomes: regulation of ligand binding by divalent cations. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p. 913–922, 1997.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; LEONHARD, C.; MUELLER, M.; RINGELSTEIN, E. B.; KIEFER, R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Exp. Neurol.**, v. 183, p. 25–33, 2003.

SCHONHOFF, C. M.; GASTON, B.; MANNICK, J. B. Nitrosylation of cytochrome c during apoptosis. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 18265-18270, 2003.

SHIGA, Y.; ONODERA, H.; KOGURE, K.; YAMASAKI, Y.; YASHIMA, Y.; SYOZUHARA, H.; SENDO, F. Neutrophil as a mediator of ischemic edema formation in the brain. **Neurosci. Lett.**, v.125, p. 110–112, 1991.

SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; KOIZUMI, S.; TSUDA, M.; OHSAWA, K.; KOHSAKA, S.; INOUE, K. Mechanisms underlying extracellular ATP-evoked interleukin-6 release in mouse microglial cell line, MG-5. **J. Neurochem.**, v. 78, p. 1339–1349, 2001.

SHINOURA, N.; SATOU, R.; YOSHIDA, Y.; ASAI, A.; KIRINO, T.; HAMADA, H. Adenovirus mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis. **Exp. Cell Res.**, v. 254, n. 2, p. 221-231, 2000.

SIMON, J.; WEBB, T. E.; BARNARD, E. A. Distribution of [35S] dATP's binding sites in the adult rat neuraxis. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1243–1251, 1997.

SMITH, M. R.; LU, H.; TROCHET, S.; FRAYNE, R. Removing the effect of SVD algorithmic artifacts present in quantitative MR perfusion studies. **Magn. Reson. Med.**, v. 51, n.3, p. 631-634, Mar, 2004.

SMITH, W. S. Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a Therapeutic Perspective. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, v. 15, p. S3–S12, 2004.

SPERLÁGH, B.; ILLES P. Purinergic modulation of microglial cell activation. **Purinergic**

**Signalling**, v.3, p. 117–127, 2007.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 26, n. 93, p. 13515-13522, 1996.

STOLL, G.; JANDER, S.; SCHROETER, M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. **Prog. Neurobiol.**, v. 56, p. 149–171, 1998.

STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P.E. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alteration performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. **Behav. Neurosci.**, v. 105, p. 264–271, 1991.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

TAKIZAWA, S.; HAKIM, A. M. Animal models of cerebral ischemia. Rat models. **Cerebrovasc. Dis.**, v. 1, p. 16-21, 1991.

TERENT, A.; JONSSON, E. Costs of stroke in Sweden: a national perspective. **Stroke**, v. 25, p. 2363-2369, 1994.

TIKKA, T.; FIEBICH, B. L.; GOLDSTEINS, G.; KEINANEN, R.; KOISTINAHO, J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 2580–2588, 2001.

TIKKA, T.M.; KOISTINAHO, J.E. Minocycline provides neuroprotection against n-methyl-d-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. **J. Immunol.**, v. 166, p. 7527–7233, 2001.

TRAYSTMAN, A. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. **Horm. Behav.**, v. 31, p. 1939-1944, 2000.

TRAYSTMAN, R. J.; KIRSCH, J.R.; KOEHLER, R.C.; Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **J. Appl. Physiol.**, v. 71, p 1185-1195, 1991.

TRAYSTMAN, R. J. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. **ILAR J.**, v. 44, n. 2, 2003.

TÜREYEN, K.; VEMUGANTI, R.; SAILOR, K. A.; DEMPSEY, R. J. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. **J. Neurosci., Methods**, v. 139, p. 203–207, 2004.

XIANG, Z.; BURNSTOCK, G. Expression of P2X receptors on rat microglial cells during early development. **Glia**, v. 52, p. 119–126, 2005.

WAHL, F.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M.; BOULU, R. G. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 23, p. 267-272, 1992.

WANG, X.; YUE, T. L.; BARONE, F. C.; WHITE, R. F.; GAGNON, R. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 23, p.

103–114, 1994.

WANG, X.; YUE, T. L.; BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. **Stroke**, v.26, p. 661–665, 1995.

WARNER, D.S.; SHENG, H.; BATINIC-HARBELE, I. Oxidants, Antioxidants and the Ischemic Brain. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 3221-3231, 2004.

WATSON, B. D. Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. **Prog. Brain Res.**, v. 96, p. 69-95, 1993.

WEIGAND, M. A.; LAIPPLE, A.; PLASCHKE, K.; ECKSTEIN, H. H.; MARTIN, E.; BARDENHEUER, H. J. Concentration changes of malondialdehyde across the cerebral vascular bed and shedding of L-selectin during carotid endarterectomy. **Stroke**, v. 30, p. 306-11, 1999.

WEINSTEIN, P. R.; HONG, S.; SHARP, F. R. Molecular identification of the ischemic penumbra. **Stroke**, v.35, p. 2666-70, Nov. 2004.

WELSH, F. A.; SAKAMOTO, T.; MCKEE, A. E.; SIMS, R. E. Effect of lactacidosis on pyridine nucleotide stability during ischemia in mouse brain. **J. Neurochem.**, v. 49, n.3, p. 846-851, Sept. 1987.

WHITE, R. J.; REYNOLDS, I. J. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 5688–5697, 1996.

WIKIPÉDIA. Disponível em:

<[http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%ADrculo\\_arterial\\_cerebral](http://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%ADrculo_arterial_cerebral)>. Acesso em: 10 de outubro de 2008.

WITTER, M. P.; GROENEWEGEN, H. J.; LOPES DA SILVA, F. H.; LOHMANN, A. H. M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the rat parahippocampal region. **Prog. Neurobiol.**, v. 33, p. 161-253, 1989.

WOOD, E. R.; MUMBY, D. G.; PINEL, J. P.; PHILLIPS, A. G. Impaired object recognition memory in rats following ischemia-induced damage to the hippocampus. **Behav. Neurosci.**, v. 107, p. 51–62, 1993.

WOODS, B.T.; SCHOENE, W.; KNEISLEY, L. Are hippocampal lesions sufficient to cause lasting amnesia? **Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 45, n. 3, p. 243-246, 1982.

VAN BEEK, J.; ELWARD, K.; GASQUE, P. Activation of complement in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroprotection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 992, p. 56–71, 2003.

VEMUGANTI, R.; BOWEN, K. K.; DHODDA, V. K.; SONG, G.; FRANKLIN, J. L.; GAVVA, N. R.; DEMPSEY, R. J. Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal ischemia. **J. Neurochem.**, v. 83, p. 1072–1086, 2002.

VOLONTÉ, C.; AMADIO, S.; CAVALIERE, F.; D'AMBROSI, N.; VACCA, F.; BERNARDI, G. Extracellular ATP and neurodegeneration. **Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.**, v. 2, p. 403–412, 2003.

VON KÜGELGEN, I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. **Pharmacol. Ther.**, v. 110, n.3, p. 415-32, June 2006.

YANAGISAWA, D.; KITAMURA, Y.; TAKATA, K.; HIDE, I.; NAKATA, Y.; TANIGUCHI, T. Possible Involvement of P2X7 Receptor Activation in Microglial Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 6, p. 1121—1130, 2008.

YANAKA, K.; CAMARATA, P. J.; SPELLMAN, S. R.; MCCARTHY, J. B.; FURCHT, L. T.; LOW, W. C. Antagonism of leukocyte adherence by synthetic fibronectin peptide V in a rat model of transient focal cerebral ischemia. **Neurosurgery**, v. 40, p. 557–563, 1997.

YI, J.; PARK, S.; KAPADIA R.; VEMUGANTI, R. Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage. **Neurochem. Int.**, v. 50, n. 7-8, p. 1014–1027, June 2007.

YONEMORI, F.; YAMADA, H.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, A.; TAMURA, A. Spatial Memory Disturbance After Focal Cerebral Ischemia in Rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.16, p. 973–980, 1996.

YOSHIDA, T.; LIMMROTH, V.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M. A. The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 14, p. 924–929, 1994.

YOSHIDA, M.; YAMASHIMA, T.; ZHAO, L.; TSUCHIYA, K.; KOHDA, Y.; TONCHEV, A. B.; MATSUDA, M.; KOMINAMI, E. Primate neurons show different vulnerability to transient ischemia and response to cathepsin inhibition. **Acta Neuropathol.**, v. 104, n. 3, p. 267-72, Sept. 2002.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 13496–13500, 1999.

ZHANG, R. L.; CHOPP, M.; LI, Y.; ZALOGA, C.; JIANG, N.; JONES, M. L.; MIYASAKA, M.; WARD, P. A. Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rat. **Neurology**, v. 44, p. 1747–1751, 1994a.

ZHANG, R. L.; CHOPP, M.; CHEN, H.; GARCIA, J. H. Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. **J. Neurol. Sci.**, v. 125, p. 3–10, 1994b.

ZHANG, Z. G.; REIF, D.; MACDONALD, J. ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 16, p. 599–604, 1996.

ZHAO, W.; GINSBERG, M. D.; PRADO, R.; BELAYEV, L. Depiction of infarct frequency

distribution by computer-assisted image mapping in rat brains with middle cerebral artery occlusion: comparison of photothrombotic and intraluminal suture models. **Stroke**, v. 27, p. 1112 – 1117, June 1996.

ZHAO, H.; YENARI, M. A.; CHENG, D.; SAPOLSKY, R. M.; STEINBERG, G. K. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase 3 activity. **J. Neurochem.**, v. 85, n. 4, p. 1026-1036, 2003.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L. R.; AMARAL, D. G.; SUZUKI, W. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 4355-4370, 1989.

# 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](#)